МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

ВРЕМЕННЫЕ УКАЗАНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ НОРМАТИВАМ ДЛЯ РЯДА ОСОБО СКОРОПОРТЯЩИХСЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И МЕТОДАМ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Москва — 1982

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
Главное санитарно-эпидемиологическое управление

ВРЕМЕННЫЕ УКАЗАНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ НОРМАТИВАМ ДЛЯ РЯДА ОСОБО СКОРОПОРТЯЩИХСЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И МЕТОДАМ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Москва - 1982

Настоящие указания предназначаются для использования органами Государственного санитарного надзора. Данным документом могут руководствоваться и ведомственные производственные бактериологические лаборатории.

Указания подготовили:

Отдел гигиены питания Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР

Институт питания АМН СССР

Исполнители:

Соломатина К.З.
Селиванова Л.В.

Куваева И.Б. (докт.биол. наук)
Петрушина Л.И. (канд.биол.наук)
Зайцев А.Н. (канд.мед. наук)

Под общей редакцией заместителя директора Института питания АМН СССР доктора медицинских наук В.А. Тутельяна

" УТВЕРЖДАЮ "

Заместитель Главного государственного
санитарного врача СССР _____

"__" _____ 1981 г.

№2510-81

ВРЕМЕННЫЕ УКАЗАНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ НОРМАТИВАМ ДЛЯ РЯДА ОСОБО СКОРОПОРТЯЩИХСЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И МЕТОДАМ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические нормативы на продукты питания созданы с целью улучшения качества пищевых продуктов и профилактики заболеваний, передающихся через пищу. Эти нормативы призваны способствовать повышению санитарно-гигиенического уровня предприятий, производящих и реализующих продукты питания, а также совершенствованию технологических процессов производства.

Настоящие рекомендации предназначаются для использования органами Государственного санитарного надзора при осуществлении текущего контроля за микробиологическими показателями качества особо скоропортящихся пищевых продуктов с целью обеспечения их безвредности для здоровья населения. Настоящими рекомендациями могут руководствоваться также ведомственные бактериологические лаборатории при контроле выпускаемой продукции.

До настоящего времени в нашей стране бактериологическое нормирование пищевых продуктов базировалось на двух показателях: общем количестве микроорганизмов, характеризующем бактериальную обсемененность продукта, и коли-титре, отражающем наличие в продукте санитарно-показательных микроорганизмов. Эпидемиологическая безопасность продукта предусматривалась требованием отсут-

ствия патогенных микроорганизмов [illegible] конкретных микроорганизмов и объёма не [illegible] продукта. На современном этапе развития производства продуктов питания микробиологические стандарты по рекомендациям экспертов ФАО/ВОЗ должны включать нормативы не только по индикаторным, но и по эпидемиологически опасным потенциально патогенным и патогенным микроорганизмам.

Настоящие рекомендации являются начальным этапом разработки микробиологических нормативов на продукты питания. Они составлены с учетом предложений экспертов ФАО/ВОЗ, данных экспериментальных исследований отечественных и зарубежных авторов и материалов Главных санитарно-эпидемиологических управлений Российской, Украинской, Белорусской, Латвийской, Литовской, Эстонской, Молдавской, Азербайджанской, Казахской, Киргизской и Туркменской ССР, данных санитарно-эпидемиологических станций Москвы и Московской области, полученных на основании результатов санитарно-бактериологического контроля качества продуктов питания, а для колбасных изделий - с учетом данных Всесоюзного научно-исследовательского института мясной промышленности. В рекомендациях отражен допускаемый уровень содержания ряда микроорганизмов в особо скоропортящихся продуктах, изготовленных с соблюдением санитарно-гигиенических норм, технологических режимов производства и с соблюдением условий хранения, транспортировки и сроков реализации готового продукта.

Настоящими рекомендациями следует руководствоваться при пересмотре существующей и разработке вновь создаваемой нормативно-технической документации.

Таблица I

КОЛБАСНЫЕ ИЗДЕЛИЯ

№№ п.п.	Наименование продукта	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (в 1 г не более)	Отсутствие в продукте (в г)		
			бактерии групп кишечной палочки	Salmonella	сульфитредуцирующие клостридии
1	2	3	4	5	6
I.	Вареные колбасы				
I.	Любительская в/с	$5xI0^2$ - $IxI0^3$	I,0	25	0,I
2.	Диабетическая в/с	$5xI0^2$ - $IxI0^3$	I,0	25	0,I
3.	Молочная в/с	$5xI0^2$ - $IxI0^3$	I,0	25	0,I
4.	Отдельная I с	$5xI0^2$ - $IxI0^3$	I,0	25	0,I
5.	Столовая I с. с добавками	$IxI0^3$ - $2xI0^3$	I,0	25	0,I
6.	Чайная I с. без добавок	$5xI0^2$ - $IxI0^3$	I,0	25	0,I
7.	Чайная II с. с добавками	$I,5xI0^3$ - $5xI0^3$	I,0	25	0,I
II.	Мясные хлебы				
8.	Хлеб мясной	$I \times I0^3$	I,0	25	0,I
9.	Хлеб заказной	$I \times I0^3$	I,0	25	0,I
III.	Сосиски, сардельки	$I \times I0^3$	I,0	25	0,I
IУ.	Кровяные колбасы				
II.	Домашняя в/с	$I \times I0^3$	I,0	25	0,I
I2.	Крестьянская I с, кишечная об.	$I,5xI0^3$ - $5xI0^3$	I,0	25	0,I
I3.	Крестьянская I с, оболочка саран	$I \times I0^3$	I,0	25	0,I

Продолжение таблицы I

1	2	3	4	5	6
7.	Зельц				
14.	Русский в/с	1×10^3	1,0	25	0,1
15.	Белый I с.	2×10^3	0,5	25	0,1
16.	Серый, III с.	2×10^3	0,5	25	0,1
	Диверше колбасы				
17.	Ливная в/с	1×10^3	1,0	25	0,1
18.	Диверная обыкновенная I с.	$1,5 \times 10^3$	1,0	25	0,1
19.	Диверная растительная III с.	$2 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	0,5	25	0,1

Таблица 2

Готовые мясные рубленые изделия, студни, паштеты, соусы

№№ п.п.	Наименование продукта	Мезофильные аэробные факультативно анаэробные микроорганизмы (в 1 г не более)	Отсутствие в продукте (в г)		
			бактерии группы кишечной палочки	Staph y coccus aureus	Salmonella
1.	Готовые мясные рубленные изделия	$5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	0,5	1,0	25,0
2.	Студни высшего сорта	$1 \times 10^3 - 2 \times 10^3$	0,1	0,1	25,0
3.	Студни первого и второго сорта	5×10^3	0,1	0,1	25,0
4.	Паштет из печени высшего сорта	1×10^3	1,0	0,1	25,0
5.	Паштет весовой в пелофановой упаковке	2×10^3	0,1	0,1	25,0
6.	Соусы (подлива для 2-х блюд)	5×10^2	1,0	1,0	25,0

Таблица 3

Мясные варёные и запечённые изделия

№№ п.п.	Наименование продукта	Мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы (в I г не более	Отсутствие в продукте (в г)	
			бактерий группы кишечной палочки	Salmonella
I.	Окорок (Тамбовский, Московский, Воронежский)	5×10^2	5,0	25,0
2.	Говядина пресованная	5×10^2	5,0	25,0
3.	Ветчина в оболочке	2×10^2	I0,0	25,0
4.	Баранина в форме	$I \times 10^3$	I,0	25,0
5.	Бекон пресованный	$I \times 10^3$	5,0	25,0
6.	Рулет (Ленинградский, Ростовский, Киевский, Советский)	2×10^2	I0,0	25,0
7.	Рулет из говядины в упаковке и без упаковки	5×10^2	5,0	25,0
8.	Буженина в целофане	одиночные	I0,0	25,0
9.	Буженина без упаковки	$I \times 10^2$	I0,0	25,0

Таблица 4

Кулинарные изделия из рыбы и нерыбных объектов морского промысла, *рыба холодного и горячего копчения*

№№ п.п.	Наименование продуктов или группы продуктов	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (в 1 г не более)	Отсутствие в продукте (в г)		
			бактерии группы кишечной палочки	Staphylococcus aureus	Salmonella
1	2	3	4	5	6
1.	Рыба жаренная и печеная (после упаковки)	1×10^3	1,0	1,0	25
2.	Рыбные палочки, обжаренные, упакованные и замороженные	1×10^3	1,0	1,0	25
3.	Фаршевые изделия из рыбы (котлеты, колбасы, сосиски)	1×10^3	1,0	1,0	25
4.	Рыба заливная	1×10^4	0,1	1,0	25
5.	Студень	5×10^3	1,0	1,0	25
6.	Пастообразные изделия из рыбы (паштеты, сельдь рубленная, селёдочное масло)	1×10^5	0,01	0,1	25
7.	Паста "Океан" и варено-мороженное мясо антарктической креветки (криля)	5×10^2	1,0	0,1	25
8.	Рыба и нерыбные объекты морского промысла в заливках (в маринаде, соусах)	5×10^3	1,0	0,1	25
9.	Многокомпонентные изделия (салаты из морской капусты, пловы и др.), а также быстрозамороженные блюда (рыба отварная под соусами, солянки, сосиски и др.)	5×10^3	0,1	0,1	25
10.	Рыба холодного копчения	5×10^3	1,0	1,0	25
11.	Рыба горячего копчения	5×10^2 – 1×10^3	10,0	1,0	25

Таблица 5

Салаты, винегреты, компоты, кисели, напитки

№№ п.п.	Наименование продукта	Мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы (в 1 г не более)	Отсутствие в продукте (в г)			
			бактерии группы кишечной палочки	Staphylococcus aureus	E.coli	Salmonella
1.	Салаты и винегреты из вареных овощей в незаправленном виде и без добавления солёных огурцов	1×10^3	1,0	1,0	-	25,0
2.	Салаты из сырых овощей и с добавлением фруктов	1×10^4	0,1	1,0	10,0	25,0
3.	Компоты	5×10^2	10,0	-	10,0	50,0
4.	Кисели	$5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	10,0	-	10,0	50,0
5.	Напитки, изготовленные на предприятиях общественного питания	5×10^2	10,0	-	10,0	50,0

1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ НА КОЛБАСНЫЕ И КУЛИНАРНЫЕ ИЗДЕЛИЯ, КУЛИНАРНЫЕ ИЗДЕЛИЯ ИЗ РЫБЫ И НЕРЫБНЫХ ОБЪЕКТОВ МОРСКОГО ПРОМЫСЛА, САЛАТЫ, ВИНЕГРЕТЫ, КУЛЬТИ, КИСЕЛИ, НАПИТКИ

Микробиологические нормативы разработаны на 30 наименований особо скоропортящихся пищевых продуктов и представлены в таблицах 1-5.

Микробиологические нормативы на нижеперечисленные продукты должны быть включены во вновь разрабатываемую нормативно-техническую документацию.

На молочные продукты микробиологические нормативы находятся в стадии разработки и будут изложены дополнительно. В настоящее время микробиологический контроль качества молочных продуктов осуществляется в соответствии с "Инструкцией по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности" (утверждена в 1976 году).

2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПРОВЕДЕНИЮ САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ

Следует подчеркнуть, что результаты микробиологических анализов могут быть получены через 48-72 часа, т.е. в сроки, когда эта группа продуктов должна уже быть реализована. Поэтому микробиологический контроль качества особо скоропортящихся продуктов является ретроспективным методом и служит целям объективной оценки санитарно-гигиенического уровня предприятий, производящих и реализующих продукты питания.

Обнаружение повышенного количества мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов позволяет установить нарушения температурного режима в процессе приготовления

или при хранении готового продукта.

- Присутствие повышенного количества бактерий группы кишечной палочки или колиформных бактерий указывает на неудовлетворительность санитарных условий во время и после обработки продукта.

- Коагулазоположительный стафилококк *Staphylococcus aureus* по рекомендациям ЗОЗ предложено рассматривать в продуктах, прошедших тепловую обработку, как организм потенциально опасный. Повышенное количество *St. aureus* в вышеперечисленных продуктах свидетельствует, как правило, о вторичном загрязнении продукта (за счет оборудования, рук и носоглотки работников).

- Бактерии рода *Proteus* *не должны обнаруживаться* в тех количествах продукта, которые предусмотрены для посева при выполнении анализа в соответствии с вышеназванными ГОСТ'ом и "методической инструкцией..." Обнаружение бактерий рода *Proteus* в прошедших тепловую обработку продуктах свидетельствует о необходимости дополнительной санитарной обработки оборудования, инвентаря, тары и т.п.

- Более строгие требования к отсутствию сальмонелл в пищевых продуктах введены в связи со способностью этих микроорганизмов вызывать не только пищевые токсикоинфекции при массивном размножении их в продукте, но и инфекционные заболевания.

В том случае, если при текущем санитарно-бактериологическом контроле микробиологические показатели в готовых продуктах превышают приводимые выше допустимые количества микроорганизмов, необходимо провести контроль за санитарно-гигиеническим состоянием всех рабочих помещений, технологических линий, воды и воздуха; проверить правильность проведения технологического про-

цесса и этапов упаковки и транспортировки готового продукта.

В том случае, когда обнаруживается стойкая повышенная обсеменённость готового продукта, повторно контролируется готовая продукция и проводится дополнительный микробиологический контроль сырья, полуфабрикатов и вспомогательных материалов, выясняется их соответствие ТУ и другой технической документации. На основании полученных результатов органы санитарного надзора назначают санитарно-гигиенические мероприятия - закрытие на генеральную уборку, санитарный день, проведение реконструкции или ремонта, прохождение санминимума и т.д.

3. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микробиологический анализ вышеперечисленных особо скоропортящихся продуктов осуществляется по методам, изложенным в действующих стандартах на продукты, утвержденных Минздравом СССР и других документах, касающихся микробиологического контроля.

В целях скорейшего приведения микробиологических показателей пищевых продуктов, разрабатываемых в нашей стране, в соответствие с международной практикой, а также в целях унификации методических приемов в "Рекомендации" введено описание 2-х методов, предложенных Международной комиссией по микробиологическим спецификациям пищи (ICMSF) при ФАО/ВОЗ: 1) определение мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов и 2) определение колиформных бактерий в 1 г продукта с использованием методики определения наиболее вероятного числа (НВЧ).

3.1. Содержание мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (общее количество микробов или общее микробное число) определяют во всех перечисленных продуктах по методу, предложенному ФАО/ВОЗ с учётом рекомендаций, сделанных для работы в условиях санитарно-эпидемиологических станций и ведомственных бактериологических лабораторий (см. п. 4.1.).

3.2. Бактерии группы кишечной палочки определяют общепринятыми в тодами, изложенными в действующих "Методических указаниях по санитарно-бактериологическому контролю предприятий общественного питания и торговли пищевыми продуктами", в ГОСТ'е "Колбасные изделия и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа", в "Методической инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства кулинарных изделий из рыбы и нерыбных объектов морского промысла".

В продуктах питания, имеющих микробиологические показатели по бактериям группы кишечных палочек, выраженных в титрах от 0,1 г и ниже, рекомендуется параллельно с общепринятым методом проводить определение количества колиформных бактерий в 1 г продукта с использованием метода наиболее вероятного числа (НВЧ), изложенного в пункте 4.2.

Накопленные данные с использованием метода НВЧ позволят подойти к нормированию допустимых количеств колиформных бактерий в 1 г продукта, что будет соответствовать международным критериям микробиологической безопасности пищевых продуктов.

3.3. E.coli определяют методом, описанным в "Инструкции о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при

пищевых отравлениях" (1975 г), а также с использованием метода, описанного в п. 4.2.

3.4. Бактерии рода протея определяют методом, изложенным в действующих "Методических указаниях по санитарно-бактериологическому контролю предприятий общественного питания и торговли пищевыми продуктами".

3.5. Спороносные анаэробные сульфитредуцирующие бактерии определяют согласно действующего ГОСТ'а "Колбасные изделия и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа".

3.6. Коагулазоположительные стафилококки в особо скоропортящихся продуктах необходимо определять в 1 г продукта и более. С этой целью производят посев в среды обогащения - солевые бульоны с 6,5% и 10% хлористого натрия и сахарный бульон с 1% глюкозы; соотношения засеваемого материала и питательной среды должно составлять 1:10. Дальнейшее исследование проводят в соответствии с действующей "Инструкцией о порядке расследования, учёта и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях", или "Методическими указаниями по санитарно-бактериологическому контролю предприятий общественного питания и торговли пищевыми продуктами".

3.7. Сальмонеллы определяют методом, изложенным в вышеупомянутой "Инструкции".

4. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ФАО/ВОЗ

4.I. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

4.I.I. Принцип

Этот метод основывается на предположении, что микробные клетки, присутствующие в образце, при смешивании с агаровой средой каждая образует видимую отдельную колонию. Количество живых клеток в продукте определяют путем посева десятикратных разведений испытуемого образца на плотную питательную среду. После инкубации чашек при 30°С в течение 72 часов подсчитывают число мезофильных аэробных микроорганизмов на I г образца продукта.

4.I.2. Аппаратура и посуда

а) Чашки Петри (диаметр 90-I00 мм)

б) Пипетки на I,5 и I0 мл, градуированные (выливающиеся до конца)

в) Водяная баня 45 ± I°С

г) Инкубатор (термостат) 30 ± I°С

д) Счётчик колоний

4.I.3. Среды и их приготовление

а) Забуференная пептонная вода

пептон - I0,0 г

$NaCl$ - 5,0 г

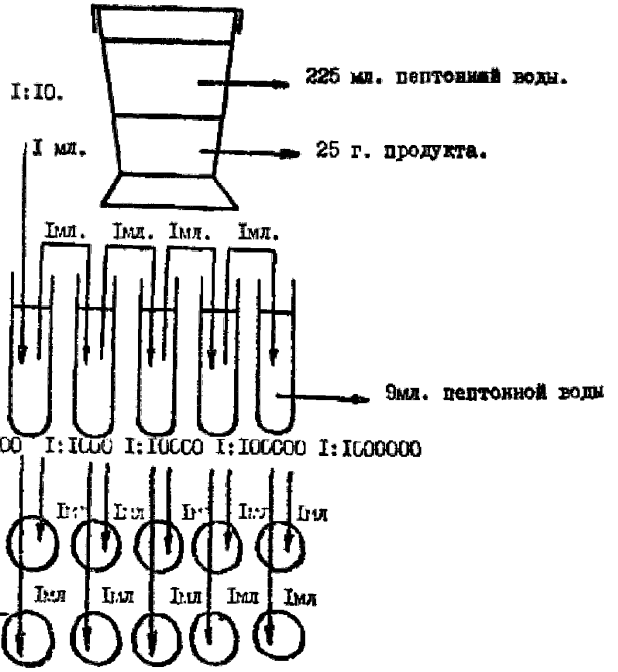
Na_2HPO_4 - 9,0 г

KH_2PO_4 - I,5 г

Дист. вода - I000 мл

схема I к стр. I6

МЕЗОФИЛЬНЫЕ АЭРОБНЫЕ И ФАКУЛЬТАТИВНО АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ.



5. Инкубировать при 30°С 72 часа.

6. Подсчёт колоний на чашках, содержащих 30–300 колоний, и умножение числа колоний на разведение.

Доводят pH до 7,0 , разливают по 225 мл в бутылки ёмкостью на 500 мл и по 9 мл в пробирки. Стерилизуют в течение 20 мин. при 121°С.

б) Питательный агар (рекомендация ЮС)

сухой экстракт дрожжей	- 2,5 г
панкреатический гидролизат казеина	- 5,0 г
глюкоза	- 1,0 г
агар	15 - 18 г
дистиллированная вода	- 1000 мл

Довести до pH = 7,0, разлить в пробирки по 15 мл, стерилизовать в течение 20 минут при 121°С. Перед использованием погрузить среду полностью в кипящую баню и держать пробирки в водяной бане при 45-48°С до залива среды в чашки.

4.1.4. Ход исследования

4.1.4.1. Приготовление гомогената из образца пищи

Навеску 25 г из смешанного образца продукта асептически вносят в стерильный стакан гомогенизатора и добавляют 225 мл забуференной пептонной воды. Гомогенизируют продукт при 15.000 - 20.000 оборотов не более чем в течение 2,5 минут. Гомогенат содержит 1 г продукта в 10 мл.

4.1.4.2. Разведение

а) Гомогенат (взвесь, а не отстой как в отечественных методах!) набирают в пипетку в количестве 1,0 мл и переносят в пробирку, содержащую 9 мл забуференной пептонной воды, смешивают осторожно, набирая и выдувая из пипетки 10 раз, и получают *разведение продукта* 1:100. *Затем готовят ряд десятикратных* разведений путем переноса каждый раз чистой пипеткой 1 мл из при-

Готовленного разведения в следующую пробирку с 9 мл забуференной пептонной воды (см. схему № I). Осторожно встряхивают все разведения.

4.I.4.3. Посев из чашки

По I мл гомогената продукта (I:I0) и каждого последующего разведения вносят в 2 чашки Петри (параллельное определение). Затем вливают в каждую чашку Петри по 15 мл питательного агара при $45^{\circ} \pm I^{\circ}C$, смешивают образец разведенного продукта с агаровой средой осторожно и равномерно, избегая образования комков.

4.I.4.4. Инкубация

После застывания среды чашки инкубируют в перевёрнутом виде при $30^{\circ} \pm I^{\circ}C$ в течение 72 ± 3 часов.

4.I.4.5. Подсчёт колоний

После инкубации подсчитывают колонии на тех чашках, где количество их составляет 30-300 колоний.

4.I.4.6. Расчёт

а) Если инкубированные чашки не содержат колоний, то результат выражают так: меньше чем $I \times I0^{I}$ бактерий на I г или I мл продукта.

б) Если чашка с разведением I:I0 содержит меньше чем 30 колоний, то результат выражается так: меньше чем $3 \times I0^{2}$.

в) Если количество колоний более 30, подсчитывают колонии на обоих чашках с одним и тем же разведением и вычисляют среднюю величину, останавливаются только на достоверных числах, умножают ее (среднюю величину) на соответствующее разведение и получают число микроорганизмов на I г или I мл продукта.

Пример: разведение 1/100: чашка 1 - 175 колоний, чашка 2 - 2-208 колоний; расчет 175 + 208 = 383 : 2 = 191 x 100; результат: $1,9 \times 10^4$ бактерий в 1 г продукта.

4.1.4.6. Адаптация к выполнению анализа в условиях санитарно-эпидемиологических станций и ведомственных лабораторий.

Для того, чтобы полученные изложенным методом данные соответствовали данным, положенным в основу микробиологических нормативов, при анализе рекомендуется внести следующие коррективы:

а) навеску продукта 10 г гомогенизируют в 90 мл 0,1% забуференной пептонной воды в гомогенизаторе или в стерильной ступке;

б) в пункте 4.1.3. б) плотная питательная среда:

сухой питательный агар - 35,0 г
сухой экстракт кормовых дрожжей - 2,5 г
глюкоза - 1,0 г
вода дистиллированная - 1000 мл;

в) при необходимости получить более быстрый ответ рекомендуется производить предварительный подсчет колоний через 48 часов инкубации при 30 ± 1°С, с последующим подсчетом через 72 часа.

Для получения микробиологической характеристики особо скоропортящихся продуктов, соответствующей международной практике, 10% анализируемых проб необходимо исследовать параллельно - неизменным методом и в соответствии с п. 4.1.4.6.

4.2. Определение количества колиформных бактерий (определение наиболее вероятного числа - НВЧ)

4.2.1. Определение понятия колиформных бактерий, E. coli и фекальных колиформных бактерий (ФАО/ВОЗ/

а) Группа колиформных бактерий включает все аэробные и факультативно-анаэробные грам-отрицательные неспорообразующие

палочки, ферментирующие лактозу с образованием газа в течение 48 часов при 35°С. Группа колиформных бактерий содержит как виды, обитающие в кишечнике, так и виды, обитающие в почве, воде, зерне и т.д. Группа колиформных бактерий включает E. coli, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella и Serratia species.

Единственным критерием для диагностики колиформных бактерий является образование кислоты и газа на средах с лактозой.

E.coli выживают в почве и на поверхностях менее продолжительный срок, чем другие колиформные бактерии. Поэтому колиформные бактерии не всегда свидетельствуют о фекальном источнике контаминации пищевых продуктов. Вместе с тем, эта группа микроорганизмов даже без E.coli признана в качестве санитарно-показательной. Присутствие большого количества колиформных бактерий в готовом продукте указывает на наличие благоприятных для размножения микроорганизмов условий при изготовлении продуктов, которые могли способствовать и размножению патогенных бактерий.

б) E. coli является общепризнанным индикатором относительно свежего фекального загрязнения. Естественное место обитания этого микроорганизма - дистальный отдел кишечника позвоночных животных. Идентификация E. coli проводится по следующим признакам: типичная E. coli - это Грам-отрицательная, неспорообразующая палочка, продуцирующая газ из лактозы, образующая индол, дающая положительную реакцию в тесте с метилротом и отрицательную реакцию на среде Фогес-Проскауэра и на цитратной среде.

в) Фекальные колиформы - это сравнительно новый термин. Определение этой группы микроорганизмов используется в качестве более быстрого теста для установления присутствия в продукте

E. coli или близких к ней вариантов без выделения чистых культур и проведения их через вышеперечисленные 4 теста. К фекальным колиформам относят те микроорганизмы из группы колиформных бактерий, которые способны расти и ферментировать лактозу при более высокой температуре - 44-45,5°С.

4.2.2. Аппаратура и посуда

а) Пробирки химические.

б) Поплавки.

в) Пипетки на 1 мл с делением до конца.

г) Термостат на 35° ± 1°С.

д) Термостат на 37° ± 1°С.

е) Термостат на 44,5° ± 0,05°С.

4.2.3.1. Бульон с лактозой, бычьей желчью и бриллиантовым зелёным

Пептон	- 10,0 г
лактоза	- 10,0 г
сухая бычья желчь	- 20,0 г
бриллиантовый зеленый	- 0,0133 г
дист.вода	- 1 000,0 мл

Растворяют пептон и лактозу в 500 мл дистиллированной воды и добавляют бычью желчь, растворенную в 200 мл воды, смешивают, доводят объём до 950 мл, pH - до 7,4. Добавляют 13,3 мл 0,1%-ного водного раствора бриллиантового зелёного, доводят общий объём водой до 1 литра. Разливают по 15 мл в пробирки, содержащие поплавки. Стерилизуют 15 минут при 121°С.

4.2.3.2. Забуференная пептонная вода

- как в методе для определения мезофильных аэробных микроорганизмов.

4.2.3.3. Среда с индолом

Триптон - 10,0 г

хлорид Na - 5,0 г

Д L-триптофан-1,0 г

дист.вода - 1000 мл

Довести pH до 7,0, разлить на порции по 5 мл в пробирки, стерилизовать 15 мин. при 121°С.

Реактив на индол

р - диметиламино-бензальдегид	- 5,0 г
соляная кислота *концентрированная*	-25,0 мл
изоамиловый спирт	-75,0 мл

4.2.3.4. Цитратный бульон Козера

$NaNH_4HPO_4$	- 1,5 г
K_2HPO_4	- 1,0 г
магнезиум сульфат	- 0,2 г
цитрат натрия	- 3,0 г
1,5% спиртовой р-р бромтимолблау	-10мл
дистил. вода	- 1000 мл

Довести pH до 6,8 , разлить по 10 мл в пробирки, стерилизовать в течение 15 мин. при 121°С.

4.2.3.5. Бульон с триптозой и лаурилсульфатом (натрий додецилсульфатом)

Триптоза (триптон или триптиказа)	-20,0 г

лактоза	- 5,0 г
K_2HPO_4	- 2,75 г
KH_2PO_4	- 2,75 г
NaCl	- 5,0 г
Лаурилсульфат (натрий додецилсульфат)	- 0,1 г
дистил.вода	- 1000,0 мл

Довести pH до 6,8 , разлить по 10 мл в пробирки с поплавками, стерилизовать 10 мин при 121°С.

4.2.3.6. Агар Левина (эозин-метиленово-синий агар)

а) пептон	- 10, 0 г
лактоза	- 10, 0 г
K_2HPO_4	- 2,0 г
агар	- 15,0 г
дистиллированная вода	- 1000 мл

б) эозин - 0,4 г + 20 мл дистил. H_2O

в) метиленовый синий - 0,075 г + 50 мл дист. H_2O

Готовят раствор "а", доводят pH до 7,1 - 7,2; разливают по 100 мл, стерилизуют 15 мин при 121°С. Перед использованием расплавляют и в каждые 100 мл добавляют 2,0 мл водного 2%-ного раствора эозина (раствор "б") и 4,3 мл 0,15% водного раствора метиленового синего (раствор "в").

4.2.3.7. Среда Фогес-Проскауэра

пептон	- 7,0 г
глюкоза	- 5,0 г
K_2HPO_4	- 5,0 г
дистиллированная вода	- 1000 мл

Растворить ингредиенты, довести pH=6,9 и профильтровать, стерилизовать 20 мин при 115°С.

4.2.3.8. Бульон для выявления E. coli (ЕС-бульон)

триптиказа или триптон - 20 г
желчные соли № 3 - 1,5 г
лактоза - 5,0 г
K_2HPO_4 - 4,0 г
KH_2PO_4 - 1,5 г
хлорид натрия - 5,0 г
дистиллированная вода - 1000,0 мл

Растворяют ингредиенты, доводят pH до 6,9; разливают по 15 мл в пробирки, стерилизуют в течение 15 мин при 121°С.

4.2.4. Ход исследования

4.2.4.1. Приготовление гомогената из продукта

Готовится также, как описано в 4.1.4.1.

4.2.4.2. Разведение

Готовится также, как описано в 4.1.4.2.

4.2.4.3. Внесение материала

Вносят по 1 мл гомогената продукта 1:10 в 3 пробирки с поплавками, содержащие бульон с триптозой и лаурилсульфатом натрия. Таким же образом производят посев последующих двух разведений 1:100 и 1:1000, используя для этих целей каждый раз чистую пипетку.

4.2.4.4. Инкубация

Посевы инкубируют при 37° ± 1°С в течение 24 и 48 часов

4.2.4.5. Учёт результатов (предварительный тест)

Регистрируют все пробирки, показавшие образование газа через 24 часа. Пробирки без газообразования инкубируют ещё 24 часа и затем регистрируют те пробирки, где есть газ.

4.2.4.6. Тест, подтверждающий наличие колиформных бактерий

а) переносят одну полную петлю из каждой газ-позитивной пробирки с бульоном, содержащим триптозу и лаурилсульфат натрия, в отдельные пробирки с бульоном, содержащим желчь, лактозу и бриллиантовый зелёный;

б) инкубируют эти пробирки при $37^{0} \pm 1^{0}C$ в течение 48 часов;

в) образование газа подтверждает присутствие колиформных бактерий. Регистрируют число положительных пробирок, которые подтверждают наличие колиформных бактерий.(схема 2)

4.2.4.7. Расчёт наиболее вероятного числа (НВЧ) бактерий

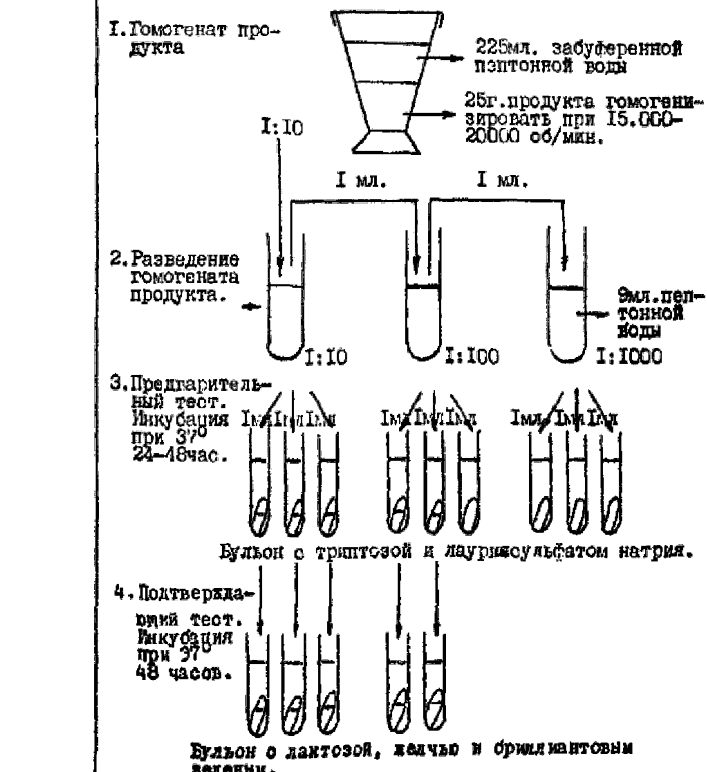
Наиболее вероятное число (НВЧ) рассчитывается в зависимости от количества пробирок с положительной пробой на газообразование по таблице. Например: положительное газообразование отмечено в 3-х пробирках посева гомогената 1:10, в 1 пробирке посева разведения 1:100 и 0 пробирок из разведения 1:1000. Из таблицы видно, что НВЧ для такой комбинации положительных реакций равно 43 колиформным бактериям в 1 г продукта (табл. см. ниже).

4.2.4.8. Определение НВЧ "фекальных колиформ"

а) одновременно с подтверждающим пересевом на бриллиантово-зелёный лактозный бульон может быть сделан пересев из всех пробирок с наличием газа (пункт 4.2.4.5.) на среду для E.coli - ЕС-бульон;

б) засеянные пробирки инкубируют при $44,5^{0}C$ 24 час. и регистрируют образование газа. Бактериальное число определяют из таблицы НВЧ;

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ НВЧ



5. Регистрация пробирок с наличием газа и рассчет НВЧ по таблице.

Таблица пересчёта НВЧ и пределы с 95% вероятности при использовании 3-х пробирок

Число положительных пробирок с разведениями			НВЧ на 1 г или 1 мл	Пределы с 95% вероятности	
1 : 10	1 : 100	1:1000		миним.	максим.
0	0	0	менее 3		
0	0	1	3	менее 0,5	9
0	1	0	3	менее 0,5	13
1	0	0	4	менее 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	360
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	16	360
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	более 2400		

в) для дифференциации колиформ применяют реакции на индол, метил-рот, Фогес-Проскауэра и цитрат.

4.2.5.9. Идентификация E. coli

а) производят пересев петлей из каждой пробирки, содержащей газ на бульоне с лаурилсульфатом натрия и триптозой, в отдельные пробирки с бульоном для E. coli (EC-бульон);

б) инкубируют посевы 48 часов при 44,5°С. Образование газа - положительная реакция;

в) из пробирок с положительной реакцией штрихом производят посев на чашку с агаром Левина таким образом, чтобы получить изолированные колонии и инкубируют 18-24 часа при 35°С;

г) переносят 2-3 колонии с каждого выросшего посева на среде Левина на скошенный питательный агар (см. 4.I.3.б) и косяки инкубируют 18-24 часа при 35°С. В то же время из каждой культуры готовят мазки и производят окраску по Граму;

д) проводят тесты с индолом, метиловым красным, на среде Фогес-Проскауэра (V.P.), цитратом.

Тест на индол

Культуру со скошенного агара вносят в пробирку с 5 мл индоловой среды (см. 4.2.3.3.) и инкубируют при 37°С в течение 24 часов. Добавляют I мл индольного реактива. При наличии индола в пограничном слое в течение 5 мин появляется красное окрашивание - положительная реакция.

Реакция Фогес-Проскауэра (V.P.)

Культуру со скошенного агара петлей вносят в 2 пробирки, содержащие 0,2 мл среды (4.2.3.7). Инкубируют одну пробирку при комнатной температуре, а другую при 37°С - 48 часов. Затем

добавляют в каждую пробирку две капли раствора креатина, 3 капли этанолнафтольного раствора и 2 капли реактива КОН; встряхивают после добавления каждого реактива и читают реакцию в течение 15 минут. Окраска розовая до ярко-красной показывает, что реакция на образование ацетилметилкарбинола положительная.

Тест с метилрот

Культуру со скошенного агара вносят петлей в пробирку со средой Фогес-Проскауэра и инкубируют в течение 48 часов при 35°С; добавляют 5 капель индикатора метилрот в каждую пробирку. Реакция ферментации углеводов с образованием кислоты положительная, если появилось красное окрашивание.

Тест с утилизацией цитрата

Вносят культуру со скошенного агара в пробирку со средой Козера (цитратной) и инкубируют 96 часов при 35°С и проверяют рост. Отсутствие роста и изменения цвета среды - реакция отрицательная. Наличие роста, изменение окраски среды с оливково-зелёного цвета на васильковый свидетельствует об утилизации цитрата. Реакция положительная.

Классификация колиформных бактерий с тестами И М А Ц

Индол	Метил-рот	Фогес-Проскауэра	Цитрат	Т и п
+	+	-	-	Типичная E.coli
-	+	-	-	Атипичная E.coli
-	-	+	+	Типичный E.aerogenes
+	-	+	-	Атипичный E.aerogenes

Подсчитывают НВЧ E.coli на 1 г или 1 мл, принимая, что E.coli - грамотрицательные, неспорообразующие, образующие газ из лактозы и дающие реакции в тесте И М А Ц + + - - или - + - - (по вышеописанной таблице).

4.2.4.9. Адаптация к выполнению анализа в условиях санитарно-эпидемиологических станций и ведомственных лабораторий.

а) В пунктах 4.2.3.3, 4.2.3.5 и 4.2.3.8 триптон или трипти-коза могут быть заменены на равную навеску сухого панкреатического гидролизата казеина отечественного производства, или на десяти-кратный объем жидкого панкреатического гидролизата казеина, изготов-ляемого ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

б) В пункте 4.2.3.3. рекомендуемый реактив на индол может быть заменен на реактив Эрлиха.

в) В пункте 4.2.3.5 лаурилсульфат (натрий додецилсульфат) может быть заменен 10-кратным количеством синтетического моющего средства "Лотос" (1 г. на 1 л среды).

г) В пункте 4.2.3.6 агар Левина в прописи ВОВ может быть за-менен на сухой эозин-метиленовосиний агар производства Дагестан-ского НИИ питательных сред.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезни, передаваемые через пищу: методы выборки и исследования в программах методико-санитарного надзора. Доклад исследовательской группы ВОЗ (серия техн. докл.-543), Женева, 1975

2. В.И. Бугрова, Т.М. Федорова, И.Е. Виноградова и др. "К разработке бактериальных показателей для вареных колбасных изделий" в. Гигиена и санитария, 1969, № 4, стр. 110-111

3. В.Г. Геймберг "Санитарно-пищевая микробиология". В кн.: "Гигиена питания". М., "Медицина", 1971, т. I, гл.22, стр. 480-507

4. ГОСТ 4288-76 **"Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленного мяса. Правила приемки и методы исследования".**

5. ГОСТ **"Колбасные изделия и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа"**

6. Инструкция о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях. М., 1975

7. Инструкция по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности. М., 1978 (утверждена 5/I-1978 г.).

8. Методическая инструкция по санитарно-микробиологическому контролю производства кулинарных изделий из рыбы и нерыбных объектов морского промысла. Ленинград, 1978 (утверждена 9/I-1978 г).

9. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю предприятий общественного питания и торговли пищевыми продуктами.

10. Минор Т.Е., ... Е.А.
Стафилококки в пищевых продуктах
М., "Пищевая промышленность", 1[illegible]

11. Школьникова С.С.
"Микробиологические исследования кулинарных и копченых рыбных продуктов".
М., "Пищевая промышленность", 1972

12. Baird-Parker A.C.
Microbeiiogical standards for food standards in search of reality.
Voedingsmiddelentechnologie, 1975, v.8, N 47; p. 25.

13. Green S.I.
Microbiological aspects of quality control.
Food manuf., 1976, v.51, N 7, p.55-71.

14. Manuals of food quality control. 4, Microbiological analysis.
Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1979.

15. Patterson I.T., Stewart D.B.
Microbiological quality of exported food.
Chemistry and Industry, 1977, N 9, p.349-353.

Л.-70219 от 25.10.[illegible] 2,25 п. л. Зак. № 1938 Тир. 1000
Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru