

УДК 579.676

Поступила в редакцию 16.08.2024  
Received 16.08.2024**М. В. Силич, Е. И. Козельцева***РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси  
по продовольствию», г. Минск, Республика Беларусь***МОНИТОРИНГ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ  
БЕЗОПАСНОСТИ**

**Аннотация.** Обеспечение безопасности продуктов животного происхождения приобретает особую актуальность в связи с тем, что число заболеваний, связанных с микробиологическим загрязнением пищевой продукции, растет из года в год как в Республике Беларусь, так и в Европе в целом. Наиболее часто, причиной возникновения болезней пищевого происхождения являются патогенные бактерии рода *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*.

В настоящей работе представлены результаты по мониторинговым микробиологическим исследованиям мяса, мясных полуфабрикатов, мяса птицы и полуфабрикатов из мяса птицы, готовых мясных изделий.

**Ключевые слова:** патогенные бактерии, *Salmonella* spp., *Listeria*, идентификация, хромогенные среды.

**M. V. Silich, E. I. Kozeltsava***RUE “Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy  
of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus***MONITORING OF MEAT PRODUCTS ACCORDING  
TO SAFETY INDICATORS**

**Abstract.** Ensuring the safety of products of animal origin is of particular relevance due to the fact that the number of diseases associated with microbiological contamination of food products is growing from year both in the Republic Belarus and in Europe as a whole. The most common cause of foodborne illness is pathogenic bacteria of the genus *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

This paper presents the results of monitoring microbiological studies of meat, poultry meat and semi-finished products from poultry meat products.

**Keywords:** pathogenic bacteria, *Salmonella* spp., *Listeria*, pathogenic bacteria, identification, chromogenic.

**Введение.** За последние годы в Европейском союзе и других государствах мира резко усилилось внимание к проблемам бактериальной контаминации продукции животноводства патогенными микроорганизмами, в первую очередь сальмонеллами и листериями. По данным Программы наблюдения ВОЗ, зарегистрировано значительное увеличение распространенности заболеваний, вызванных этими патогенами [1].

Сальмонеллы (*Salmonella* spp.) чаще других бактерий являются причиной вспышек пищевых токсикоинфекций среди населения. Большинство случаев заболевания сальмонеллезом протекает в легкой форме, однако сальмонеллезная инфекция может вызывать и тяжелые заболевания, особенно у детей, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом. Основным механизмом пищевых отравлений, вызванных сальмонеллами, является употребление зараженных пищевых продуктов, таких как яйца, свинина, мясо домашней птицы и молочные продукты [2, с.726]. Попадание сальмонелл в пищу часто происходит при неправильной кулинарной обработке или несоблюдении санитарных норм при ее приготовлении. Сальмонеллы обладают достаточно высокой степенью устойчивости к воздействию различных факторов окружающей среды, легко переносят низкие температуры, наличие поваренной соли, оттаивание и замораживание [3]. Большинство штаммов сальмонелл не только выживают в пищевых продуктах (в молоке 40 суток, в копченостях — от 4 до 6 месяцев), но и размножаются с накоплением в них эндотоксинов [4].

*Listeria monocytogenes* — факультативный внутриклеточный патоген, вызывающий опасное заболевание с высоким уровнем летальности, называемое листериозом. Листериоз не является широко распространенной инфекцией, по количеству выявленных случаев он уступает сальмонеллезам, однако превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов [4, 5]. Этому заболеванию наиболее подвержены беременные женщины, дети, люди преклонного возраста и с ослабленной иммунной системой [6, с.298]. Большинство крупных эпидемических вспышек листериоза обусловлено потреблением пищевых продуктов животного происхождения: не пастеризованного или плохо пастеризованного молока и изготовленных из них мягких и рассольных сыров, молочных продуктов, мясных и рыбных изделий. Технология приготовления некоторых продуктов такова, что велика опасность контаминирования их листериями. Замораживание, поверхностная дегидротация продуктов, наличие вакуумной упаковки, практически не влияют на выживаемость этого микроорганизма. Листерии не только устойчивы к низким температурам, но и способны размножаться при температуре окружающей среды и бытового холодильника [7].

Целью работы являлось выделение бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* из различных образцов мясных продуктов и оценка степени загрязнения ими продуктов питания

**Материалы и методы исследований.** Материалом для исследования служили пробы охлажденного и мороженого мяса, мяса птицы, полуфабрикатов поступивших для испытания на микробиологические показатели безопасности в соответствии с ТР ТС 021/2011 [8], ТР ТС 034/2013 [9], ТР ТС 051/2021 [10].

Выявление бактерий *Listeria monocytogenes* проводили по ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* [11].

Выявление бактерий рода *Salmonella* осуществляли по ГОСТ 31659-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella* [12].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Стандартизированный метод обнаружения сальмонелл предполагает четыре основных этапа: предобогащение в жидкой неселективной среде, обогащение в жидкой селективной среде, выделение с использованием плотных селективных сред, идентификация выделенных культур. Согласно ГОСТ 31659-2012, навеску продукта массой 25 г вносили в забуференную пептонную воду для первичного обогащения и инкубировали при температуре 37°C в течение 18±2 ч. Неселективное обогащение необходимо для выявления сублетальных форм поврежденных бактерий в термически обработанных, замороженных образцах пищевых продуктов или когда предполагаемое число бактерий небольшое и необходимо их количественное увеличение. Однако в неселективной среде может происходить интенсивное размножение сопутствующей микрофлоры, поэтому для наиболее эффективного выделения сальмонелл, необходим этап селективного обогащения. ГОСТ 31659-2012, рекомендует использование в качестве сред для селективного обогащения сальмонелл среду Раппапорта-Вассилиадиса (RVS-бульон) и селенитовую среду. Среды селективного обогащения содержат компоненты для накопления сальмонелл и включают ингибиторы роста сопутствующей микрофлоры.

Для проведения вторичного обогащения 1,0 см<sup>3</sup> культуры, полученной в результате первичного обогащения, пересевали в 10 см<sup>3</sup> RVS-бульона и в 10 см<sup>3</sup> селенитовой среды. Посевы на RVS-бульоне инкубировали при температуре 41,5 ±1, а на селенитовой среде при температуре 37 ±1°C в течение 24 ±3 ч (рис. 1).

Следующим этапом, являлся высеивание бульонной культуры на плотные селективные среды для получения изолированных колоний. Следует отметить, что многие микроорганизмы семейств Enterobacteriaceae метаболически сходны с сальмонеллами и могут формировать визуально аналогичные колонии на селективных средах, это объясняет рекомендации об использовании одновременно нескольких сред для выделения сальмонелл. Из ряда селективных сред, рекомендуемых в ГОСТ 31659-2012, мы использовали ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и висмут-сульфит агар. После инкубирования посевов в течение 24-48 ч, чашки просматривали и отмечали колонии, предположительно относящиеся к бактериям рода *Salmonella*.

На XLD-агаре отбирали колонии красного цвета с черным центром. Изменение цвета среды обусловлено способностью сальмонелл декарбоксилировать лизин, в результате чего происходит подщелачивание среды и окрашивание ее в красный цвет. Образование сероводорода обнаруживается системой индикации содержащей тиосульфат натрия и цитрат железа-аммония, при выделении сероводорода образуются колонии с черным центром.



Рис. 1. Рост сальмонелл в жидких селективных средах: селенитовый бульон и среда Раппапорта-Вассилиадиса  
 Fig. 1. Salmonella growth in liquid selective media: selenite broth and Rappaport-Vassiliadis medium

На висмут-сульфитном агаре отбирали зеленые, черные, зеленые с черным центром и металлическим блеском колонии. Почернение среды происходит в результате продукции сероводорода и восстановления сульфита до сульфида железа, имеющего черный цвет.

Полученные на агаризованных средах колонии, предположительно относящиеся к сальмонеллам, подвергали последующей биохимической идентификации. Тестирование выделенных культур по биохимическим признакам мы проводили с использованием готовых стандартных тест-систем наборов для идентификации «Rapid 20E» (рис. 2).



Рис. 2. Набор «Rapid 20E»  
 Fig. 2. Set of «Rapid 20E»

Результаты идентификации типичных колоний отобранных на селективных средах показали, что красные колонии на XLD-агар могут формировать неферментирующие микроорганизмы, а черную окраску колоний могут иметь бактерии *Edwardsiella*. Также являлось затруднительным визуальное отличие красных с черным центром колоний *Proteus* от аналогичных колоний образованных сальмонеллами. Ввиду высокой селективности висмут-сульфит агара, на данной среде подавляется рост некоторых сальмонелл, поэтому она не может быть одной средой в ходе исследования. Также на висмут-агаре, похожие на колонии сальмонелл, но без металлического блеска образуют виды *Citrobacter* и *Proteus*.

В настоящее время для проведения бактериологических исследований, наряду с классическими средами, разработан широкий спектр дифференциальных питательных сред нового поколения — хромогенных сред. По сравнению с обычными селективными средами, хромогенные питательные среды обладают большей специфичностью. Механизм действия хромогенных сред заключается во взаимодействии высокоспецифичных ферментов бактерий с хромогенным субстратом, введенным в состав среды и играющим в ней роль индикатора.

Сальмонеллы ферментируют специфический субстрат — пропиленгликоль до кислоты, в результате чего происходит изменение pH-среды, и колонии сальмонелл окрашиваются в красный цвет. Для дифференциации сальмонелл от колиформных бактерий в состав среды включена хромогенная смесь, которая выявляет наличие фермента Я-галактозидазы — характерного фермента колиформных бактерий, которые растут в виде сине-зеленых или сине-фиолетовых колоний, остальные энтеробактерии и грамотрицательные бактерии, такие

как *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* вырастают в виде бесцветных либо слегка желтоватых колоний.

В ходе работы было выяснено, что при использовании Рамбах-агара легко отличить  $H_2S$ -продуцирующие штаммы *Citrobacter* от сальмонелл: первые - синего, вторые — красного цвета, тогда как на XLD-агаре или висмут-сульфитном агаре дифференцировать  $H_2S$ -продуцирующие бактерии с сальмонеллами затруднительно. Таким образом, на хромогенной среде Рамбах-агар, в смешанных культурах, бактерии рода *Salmonella*, легко отличимы от других энтеробактерий по малиновому цвету и морфологии колоний (рис 3).

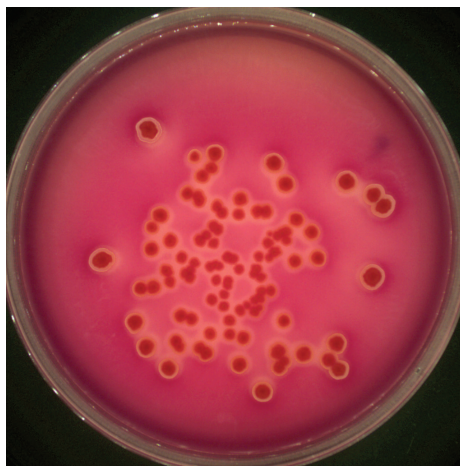


Рис. 3. Рост сальмонелл на хромогенном агаре Рамбах  
Fig. 3. Salmonella growth on chromogenic Rambach agar

*Listeria monocytogenes*, является возбудителем листериоза у людей, хотя продукты питания могут быть контаминированны и другими видами листерий: *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L. grayii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, поэтому важно не только выделить культуру, но и правильно идентифицировать ее до вида. Выявление *L. monocytogenes* в пищевых продуктах имеет ряд особенностей. В пищевых продуктах бактерии рода *Listeria* находятся в смешанной форме с другими микроорганизмами и для их выделения необходимо использование селективных сред обогащения. В соответствии с ГОСТ 32031-2012, для выявления *L. monocytogenes*, навеску пробы в количестве 25 г вносили в бульон Фрейзера. Этот бульон рекомендуется международным комитетом ISO для первичного и вторичного обогащения, выделения и подсчета *L. monocytogenes* в пищевых продуктах. Среда создает оптимальные условия для роста листерий благодаря высокому содержанию питательных веществ. Рост сопутствующих бактерий в значительной степени ингибируется хлоридом лития, налидиксовой кислотой и гидрохлоридом акрифлавина. Обнаружение D-глюкозидазы возможно благодаря добавлению эскулина и аммиачножелезного (111) цитрата. Глюкозоэскулин расщепляется D-глюкозидазой до эскулетина и глюкозы. Эскулетин образует комплекс с ионами железа от оливково-зеленого до черного цвета. Рост листерий на бульоне Фрейзера обычно сопровождается почернением среды.

Пробы засевали в среду первичного обогащения со сниженной концентрацией селективных компонентов. После культивирования посевов при 30°C в течение 24 часов, проводили второй этап обогащения в среде с полной концентрацией селективных компонентов (рис. 4).

Накопительную культуру термостатировали при 37°C в течение 48 часов и высевали на плотную селективную среду PALCAM агар (рис. 5), также известную как Полимиксин (Polymyxin) — акрифлавин (Acridiflavine) — Литий (Lithium-chloride) — Цефтазидим (Ceftazidim) — Эскулин (Esculin) — Маннит (Mannitol) агар, рекомендованный для выделения листерий из продуктов питания.

PALCAM агар ингибирует грамотрицательных и большинство грамположительных сопутствующих бактерий. Среда является высоко селективной за счет включения в ее состав хлорида лития, цефтазидима, полимикмина В и акрифлавина. PALCAM агар — дифференциально-диагностическая среда, в которой используются две индикаторные системы: с эскулином и маннитом. *L. monocytogenes* гидролизуют эскулин на эскулетин и глюкозу. Реагируя с цитратом железа, эскулетин образует коричнево-черный комплекс, что приводит к потемнению среды вокруг колоний. Посевы на на PALCAM агаре просматривали через 24 и 48

часов на наличие роста характерных для листерий колоний, отбирали серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом или с черным центром. Однако, все виды листерий гидролизуют эскулин и идентифицировать. *L. monocytogenes* без дополнительных тестов невозможно.

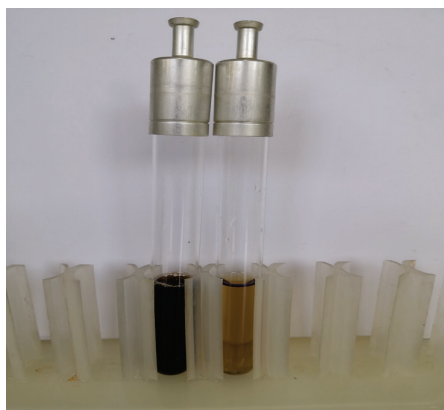


Рис. 4. Рост листерий в жидких селективных средах  
Fig. 4. Listeria growth in liquid selective media

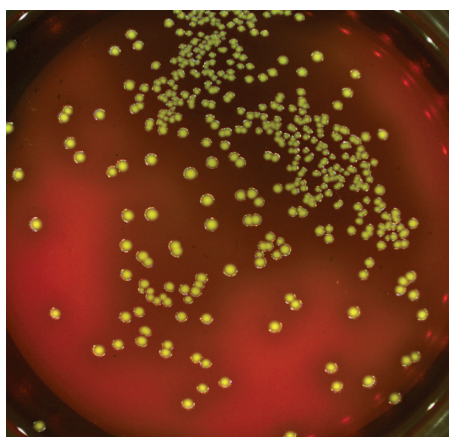


Рис. 5. Рост листерий на PALCAM агаре  
Fig. 5. Listeria growth on PALCAM agar

Для подтверждения принадлежности выделенных культур к бактериям рода *Listeria* проводили тест на каталазу, микроскопировали, определяли подвижность. Каталазаположительные, подвижные при температуре 25°C, грамположительные короткие палочки предположительно отнесли к бактериям рода *Listeria* и проводили дальнейшую идентификацию до вида. У выделенных культур определяли бета-гемолитическую активность на чашках с кровяным агаром. Посевы инкубировали при 37°C в течение 24±2 ч, на каждую чашку с кровяным агаром, кроме исследуемых культур, высевали контрольные штаммы, *L. monocytogenes* (положительный контроль) и *L. ivanovii* (отрицательный контроль). Сравнение прозрачности зон вокруг анализируемых культур проводили визуально. Следует отметить, что у многих изолятов *L. monocytogenes* гемолитическая активность очень мала, просветление можно было увидеть только после снятия бактериальной массы с агара (рис. 6).

Определение ферментативных свойств выделенных культур проводили с использованием наборов для идентификации «API Listeria» фирмы «BioMerieux» Франция (рис. 7).

В целях ускорения исследований и сокращения объема работ, для выделения листерий рекомендована хромогенная среда ALOA-агар по Ottaviani, Agosti (рис. 8). Богатая основа среды обеспечивает оптимальные условия для роста листерий. Включение в среду ингибиторов подавляет рост сопутствующих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и грибов. Рост *L. monocytogenes* и *L. innocua* не подавляется, тогда как рост других листерий (*L. ivanovii*) задерживается, или полностью ингибируется (*L. seeligeri*). Все

листерии обладают активностью фермента  $\beta$ -D-глюкозидазы и образуют при взаимодействии с хромогенным субстратом синие-зеленые колонии. Дифференциация *L.monocytogenes* от других листерий основана на выявлении активности фермента фосфатидилинозит-фосфолипазы С (PI-PLC). Фосфолипазная активность выявляется по наличию зоны помутнения вокруг колоний *L.monocytogenes*. Отметим, что кроме *L.monocytogenes* только *L.ivanovii* проявляет фосфолипазную активность.

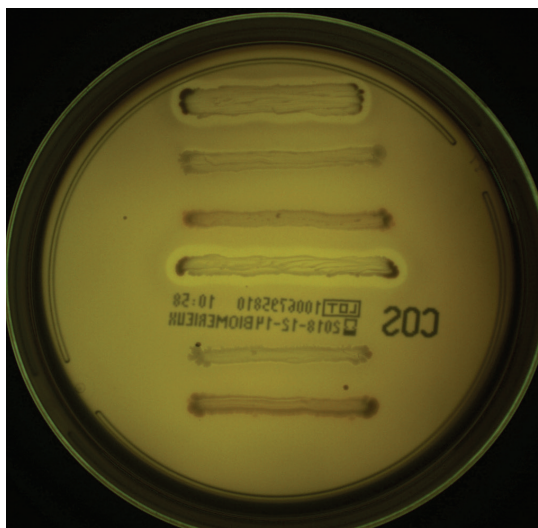


Рис. 6. Бета-гемолитическая активность  
Fig. 6. Beta-hemolytic activity

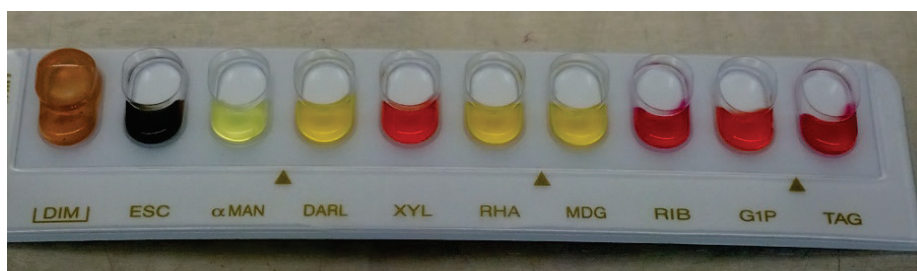


Рис. 7. Набор «API Listeria»  
Fig. 7. The Listeria API set

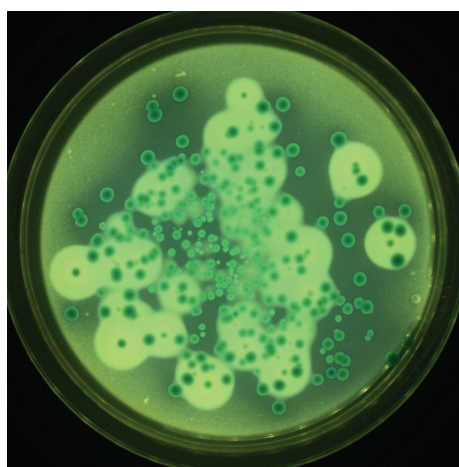


Рис. 8. Рост *L.monocytogenes* на агаре Chromocult® Listeria Selective Agar (ALOA-агар по Ottaviani, Agosti)  
Fig. 8. Growth of *L.monocytogenes* on Chromocult® Listeria Selective Agar (ALOA-агар by Ottaviani, Agosti)

В табл. 1 представлены данные по обнаружению патогенной микрофлоры в мясной продукции.

Таблица 1. Количество обнаружений патогенных микроорганизмов в мясной продукции  
Table 1. The number of detections of pathogenic microorganisms in meat products

Вид продукции	Количество образцов	Количество обнаружений <i>L.monocytogenes</i>	Количество обнаружений <i>Salmonella</i>
Мясо говядины замороженное	21	1	—
Полуфабрикаты из говядины охлажденные	18	4	—
Полуфабрикаты из говядины замороженные	16	1	—
Фарш говяжий	11	1	—
Мясо свинины замороженное	17	—	—
Полуфабрикаты из свинины	13	—	1
Фарш свиной	10	—	—
Субпродукты охлажденные	22	3	2
Тушка цыпленка-бройлера замороженная	12	—	1
Тушка цыпленка-бройлера охлажденная	15	2	4
П/ф куриные замороженные	19	1	3
Фарш куриный замороженный	15	—	2
П/ф куриные замороженные	10	—	1
Мясо птицы механической обвалки	17	4	5
Колбасы вареные	14	—	—
Колбасы варено-копченые	15	—	—

По данным таблицы видно, что наиболее часто патогенная микрофлора (листерии и сальмонеллы) обнаруживаются в сыром мясе, мясе птицы, полуфабрикатах и субпродуктах.

Частота обнаружения бактерий рода *Salmonella* в мясе птицы выше, чем в мясе животных. Следует также отметить, что мясное сырье менее обсеменено патогенной микрофлорой, чем полуфабрикаты, изготовленные из него.

Выявлено, что наибольшее количество выделенных культур сальмонелл пришлось на мясо механической обвалки и полуфабрикаты, сырьем для которых послужило мясо механической обвалки.

Листерии и сальмонеллы не были обнаружены в готовых изделиях из мяса.

**Выводы.** По результатам проведенных исследований установлено, что среди обнаруженных листерий преобладало два вида, наиболее часто обсеменяющих продукцию из мяса, — *L.innocua* и *L.monocytogenes*. Для более точной и быстрой дифференциации патогенной микрофлоры целесообразно использовать хромогенный ALOA-agar по Ottaviani, Agosti, выявляющий вирулентный фактор *L.monocytogenes*. Хромогенная среда Рамбах обладает лучшими дифференциальными свойствами по сравнению с КЛД агаром и позволяет отделить сальмонеллы от культурально сходных штаммов.

#### Список использованных источников

1. Бремя болезней пищевого происхождения в Европейском регионе ВОЗ.- Европейское региональное бюро ВОЗ. Копенгаген. 2017 — 36 с.
2. Джеймс, М. Джей. Современная пищевая микробиология / Джеймс М. Джей, Мартин Дж. Лесснер, Дэвид А.Гольден // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. 886 с.
3. Серегин И.Г. О болезнях пищевого происхождения / И.Г.Серегин, Д.В. Никитченко, А.М. Абдулаева // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Агрономия и животноводство. — 2015. — № 4. — С. 101-104.
4. Шмайхель, С.Е. Анализ выявлений бактерий рода SALMONELLA в странах европейского союза по данным информационной системы RASFF / С.Т. Шмайхель, Н.Б. Шадрова // Ветеринария сегодня. — 2018. — № 4(27). — С.12-20.

- Максимович, В. В. Листерия: этиология, эпизоотологические и эпидемиологические особенности, диагностика, общая и специфическая профилактика у животных и людей / В. В. Максимович, В. М. Семенов // Ветеринарный журнал Беларуси. — 2015. — №2. — С. 3–9.
5. Дж.К.Мид. Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцепродуктов / под. ред. Джеффа К.Мид. — СПб.: Профессия, 2008. — 383 с.
  6. Ефимочкина, Н.Р. Микробиология пищевых продуктов и современные методы детекции патогенов / Н.Р.Ефимочкина. — М: РАМН, Москва, 2013. — 518 с.
  7. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»: ТР ТС 021/2011. — Введ. 01.07.2013. — РФ: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2013. — 172 с.
  8. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции»: ТР ТС 034/2013. — Введ. 01.05.2014. — РФ: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2014. — 40 с.
  9. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria Monocytogenes*: ГОСТ 32031-2012. — Введ. 01.04.2016. — Минск: Госстандарт, 2016. — 30 с.
  10. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*: ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002). — Введ. 01.06.2014. — Минск: Госстандарт, 2014. — 26 с.

#### Информация об авторах

*Силич Мария Валентиновна*, заведующий лабораторией микробиологических исследований Республиканского контрольно-испытательного комплекса по качеству и безопасности продуктов питания РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: [marya\\_s2020@bk.ru](mailto:marya_s2020@bk.ru)

*Козельцева Елена Игоревна*, научный сотрудник лаборатории микробиологических исследований Республиканского контрольно-испытательного комплекса по качеству и безопасности продуктов питания РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: [kozeltsava@tut.by](mailto:kozeltsava@tut.by)

#### Information about authors

*Silich Maria Valentinovna*, Head of the Microbiological Research Laboratory of the Republican Control and Testing Complex for Food Quality and Safety of the RUE “Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus” (29, Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: [marya\\_s2020@bk.ru](mailto:marya_s2020@bk.ru)

*Kozeltseva Elena Igorevna*, Researcher at the Laboratory of Microbiological Research of the Republican Control and Testing Complex for Food Quality and Safety of the RUE “Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus” (29, Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: [kozeltsava@tut.by](mailto:kozeltsava@tut.by)