ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ им. В.М. ГОРБАТОВА» РАН

На правах рукописи

Зайко Елена Викторовна

ОЦЕНКА И УПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ РИСКАМИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОКОПЧЕНЫХ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ, ВОЗНИКАЮЩИХ ПРИ НАЛИЧИИ В МЯСЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Специальности 05.18.04 «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств», 05.02.23 «Стандартизация и управление качеством продукции»

Диссертация на соискание учёной степени кандидата технических наук

Научные руководители:

Кузнецова Оксана Александровна, доктор технических наук

Батаева Дагмара Султановна, кандидат технических наук, доцент

Москва
2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ……. 4

Актуальность темы……. 4

Степень разработанности…….. 6

Цель и задачи исследований……..... 7

Научная новизна …… 7

Теоретическая и практическая значимость работы…… 8

Положения, выносимые на защиту ……..... 8

Апробация работы…….. 8

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……... 9

1.1 Критерии качества сырокопченых колбас…….. 9

1.2 Критерии безопасности сырокопченых колбас…….. 10

1.3 Формирование характеристик, присущих сырокопченым колбасам…….. 20

1.4 Факторы, влияющие на качество сырокопчёных колбас…….. 24

1.5 Роль стартовых культур в производстве сырокопченых колбас…… 27

1.6 Последствия использования антибиотиков в различных отраслях животноводства ..…… 31

1.7 Заключение к литературному обзору …… 39

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ…….. 40

2.1 Организация проведения исследований……..…… 40

2.2 Объекты исследования……. 42

2.3 Методы исследования ……..... 46

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……..... 60

3.1 Изучение чувствительности микробиологического метода для расширения возможности выявления различных групп антибиотиков в продуктах убоя животных……... 60

3.2 Оценка мяса и фарша для производства сырокопченых колбас на наличия антимикробных веществ……. 64
3.3 Идентификация групп антибиотиков, выявленных в мясе и фарше…… 69
3.4 Исследование мяса и фарша для сырокопченых колбас на наличие патогенных микроорганизмов…… 76
3.5 Результаты изучения микробной популяции фарша сырокопчёных колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования…… 81
3.6 Оценка чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса и фарша для сырокопченых колбас (на примере мясо птицы)……..... 88
3.7 Изучение влияния антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас……..... 101
3.7.1 Изучение чувствительности микроорганизмов стартовых культур к антибиотикам……..... 101
3.7.2 Изучение влияния антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур……..... 105
3.8 Изучение биохимических и ферментативных процессов, формирующих вкусо-ароматические и физико-химические характеристики сырокопченой колбасы……... 110
3.9 Идентификация и оценка рисков……..... 119
3.10 Исследование управляющих воздействий на снижение рисков… 125
3.11 Экономическая эффективность……..... 132
ВЫВОДЫ……. 133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ…….. 136
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……... 137
Приложение 1 ……. 147
Приложение 2…….. 158

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Одним из путей удовлетворения растущего спроса на продукты животного происхождения является увеличение поголовья скота и интенсификация прироста мышечной массы. По данным Роспотребнадзора около 50% антибиотиков, производимых в мире, используются в сельском хозяйстве. При этом большая часть используется в качестве превентивных мер защиты от болезней и в профилактических целях.

Для увеличения прироста живой массы животных (в среднем на 4-5 %) и с целью повышения эффективности откорма практикуют добавление в корма антибиотиков в небольших дозах на протяжении длительного периода, при этом затраты корма снижаются на 5-8 %.

Производители несанкционированно применяют антимикробные вещества, в том числе используемые в терапии человека (производные пенициллина, тетрациклина и левомицетина и др.), что может привести к подавлению полезной микрофлоры человека с последующим развитием дисбактериоза при постоянном пассивном употреблении остаточных количеств антимикробных веществ.

Еще одним из последствий неконтролируемого применения антибиотиков является формирование резистентности у микроорганизмов. Согласно последнему отчету Всемирной организации здравоохранения, возникла угроза в снижении эффективности существующих антимикробных веществ по отношению к патогенным микроорганизмам.

Устойчивость к антибиотикам возрастает до угрожающе высокого уровня во всем мире. Многолетние динамические наблюдения наглядно демонстрируют, что устойчивость микроорганизмов к антимикробным средствам становится все более и более актуальной и серьезной проблемой здравоохранения, препятствующей эффективному лечению больных с инфекциями бактериальной этиологии.

Кроме того, антибиотики и продукты их метаболизма могут стать причиной аллергии у людей. Регулярное употребление человеком продуктов с остаточными количествами антибиотиков повышает риск развития хронических заболеваний,

лечение которых осложняется устойчивостью возбудителя к антибиотикам. Для населения земного шара устойчивость микроорганизмов к антибиотикам становится «бомбой замедленного действия», требующей незамедлительного вмешательства в процесс их использования.

На сегодняшний день отсутствует эффективная система управления рисками, возникающими при производстве пищевых продуктов с использованием мясного сырья с антибиотиками. Известно несколько тысяч разнообразных натуральных и синтетических веществ, применяемых в качестве антибиотиков. Однако методы контроля в пищевых продуктах разработаны для ограниченного списка этих веществ.

На территории РФ максимально допустимые количества антимикробных препаратов определены в ТР ТС 034/2013 "О безопасности мяса и мясной продукции". Обязательному контролю подлежат антибиотики тетрациклиновой группы, левомицетина (хлорамфеникола) и бацитрацина. Контроль других антимикробных веществ производят на основании информации об их применении, предоставленной поставщиком сельскохозяйственных животных и птицы. Таким образом, ответственность и контроль за использование антибиотиков в животноводстве полностью лежит на сельхозпроизводителях.

В мясной промышленности существуют технологии производства мясных продуктов, которые предполагают использование микроорганизмов стартовых культур, например сырокопченые колбасы. Как известно, антибиотики подавляют рост и развитие различных микроорганизмов, в том числе входящих в состав стартовых культур. Это особо актуально при производстве сырокопченых колбас.

Подавление антибиотиками роста стартовых культур, с последующим снижением ферментативной активности может привести к неконтролируемому процессу производства колбас. При этом можно предположить, что будет нарушен процесс естественной и/или направленной ферментации, и как следствие, за счет активного размножения микроорганизмов порчи и патогенных микроорганизмов, будет изготовлен продукт, не отвечающий требованиям

качества и безопасности. Производитель в итоге будет иметь большие экономические потери.

Таким образом, исследования, направленные на идентификацию и оценку рисков при производстве сырокопченых колбас из мяса с остаточными количествами антимикробных веществ, являются актуальными.

Интерес к данному вопросу и необходимость его изучения подтверждают работы отечественных и зарубежных исследователей: Семенова А.А., Кузнецова О.А., Kjeldgaard J.

Степень разработанности

Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках плана НИР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН «Разработать систему оценки, управления, предупреждающих действий микробиологическими рисками, возникающими при производстве сырокопченых колбас при наличии антимикробных веществ в мясном сырье и в ингредиентах» (№ 0585-2014-0005) к государственному заданию.

Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Фундаментальные исследования перемещений патогенных микроорганизмов и вирусов в пищевых системах и создание инновационных средств их предотвращения с использованием антимикробных материалов и физических методов воздействий на биологические объекты» (Соглашение №075–15–2020–775) 2020-2022 гг.

Методологической основой диссертационной работы служили труды отечественных и зарубежных ученых в области разработки методов контроля безопасности пищевой продукции, анализа и управления рисками.

Методология разработки метода основана на работах Батаевой Д.С., Куликовского А.В., анализ рисков – на работах Чернухи И.М., Кузнецовой О.А., Кузлякиной Ю.А.

Цель и задачи исследований

Цель работы состоит в идентификации, оценке и управлении рисками, возникающими при производстве сырокопченых колбасных изделий при наличии в мясе антибиотиков.

Задачи:

1. Изучить чувствительность микробиологического метода для расширения возможности выявления различных групп антибиотиков в продуктах убоя животных

2. Провести оценку мяса и фарша для сырокопченых колбас на наличие антимикробных веществ с идентификацией преобладающих групп.

3. Идентифицировать патогенные микроорганизмы в мясе и фарше для сырокопченых колбас. Определить состав сообщества микроорганизмов фарша для сырокопченых колбас с помощью метагеномного анализа.

4. Изучить чувствительность к антибиотикам выявленных патогенных микроорганизмов *(Salmonella* spp.*, Listeria monocytogenes*).

5. Изучить влияние антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас.

6. Идентифицировать, оценить и разработать схему управления рисками. Оценить мероприятия по управлению рисками.

Научная новизна

Определен фенотипический профиль антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса, поступающего для производства сырокопченой мясной продукции.

Установлен уровень контаминированного антибиотиками мяса, поступающего на переработку, и идентифицированы их группы.

Определен состав бактериального сообщества фарша сырокопченых колбас методом метагеномного секвенирования.

На базе методологии FMEA проведен анализ видов, последствий и причин несоответствий, возникающих на этапах производства сырокопченых колбас, в случае присутствия антибиотиков в мясе.

Проведена идентификация и оценка рисков, возникающих при присутствии антибиотиков в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас, и разработаны управляющие мероприятия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Описан характер органолептических и физико-химических изменений сырокопченой продукции в случае ее производства из мяса с антибиотиками.

Внесены изменения в проект ГОСТ 55481 «Мясо и мясные продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ»

Разработан СТО 00419779-012-2022, в котором представлены методы отбора проб и методика быстрого выявления антибиотиков при входном контроле мяса.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ и мероприятия управления рисками, возникающими при производстве сырокопченой колбасы при использовании мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков.
2. СТО 00419779-012-2022 «Мясо и мясные продукты. Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ»

Апробация работы

Основные положения и результаты работы представлены и доложены на научных конференциях: Международной конференции «Food quality and food safety» («Качество и безопасность продуктов питания») (Москва, 2021); 61 The International Meat Industry Conference MEATCON 2021», (Zlatibor, Serbia 2021).

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Критерии качества сырокопченых колбас

Сырокопченые колбасы - колбасное изделие, подвергнутое в процессе изготовления осадке и (или) ферментации без использования или с использованием стартовых культур, холодному копчению и сушке [1]. Сырокопченые колбасы отличаются стойкостью при хранении, за счет длительного копчения (3-4 суток) и сушки (от 5 до 30 суток). Процесс ферментации и сушки считается одним из старейших методов сохранения мяса, в результате которых получается колбаса с характерным ароматом, с пониженным pH и пониженной активностью воды. Данные характеристики делают готовый продукт стабильным с длительным сроком хранения, даже если в процессе производства не происходило высокотемпературной термической обработке.

В последнее время наблюдается тенденция к увеличению объемов производства этого вида продукции. Все чаще для увеличения объема выпускаемой продукции помимо традиционного использования свинины/говядины используют мясо птицы. [2].

Одно из главных требований потребителя к продукту – стабильность качества. Качество пищевых продуктов - совокупность характеристик пищевых продуктов, способных удовлетворять потребности человека в пище при обычных условиях их использования [3].

Качество копчёных колбас оценивается комплексом органолептических, микробиологических и физико-химических параметров. К органолептическим показателям качества сырокопченых колбас относятся внешний вид готового изделия, цвет фарша на разрезе, запах и вкус, консистенция, форма, размер и вязка батонов.

Внешний вид батонов готовой продукции должен быть с чистой, сухой поверхностью, без пятен, слипов, повреждений оболочки, наплывов фарша. Консистенция сырокопчёных колбас, изготовляемых по ГОСТ – твердая, плотная. Цвет и вид фарша на разрезе должен варьировать от розового до темно-красного. Фарш равномерно перемешан, без серых пятен, пустот, видимых

включений соединительной ткани и с кусочками жира. Запах и вкус должны быть приятные, свойственные данному виду продукта, без посторонних привкуса и запаха, вкус слегка острый, солоноватый, запах с выраженным ароматом пряностей и копчения [4].

Из физико-химических показателей нормируются: температура в центре батона, массовая доля влаги, поваренной соли, нитрита натрия, pH.

Массовая доля влаги нормируется в зависимости от вида изделия. Для сырокопчёных колбас, изготовленных по ГОСТ Р 55456-2013 массовая доля влаги должна составлять 25-30 % в зависимости от вида изделия [4].

Массовая доля нитрита натрия для сырокопчёных колбас − не более 0,003-0,005 %. Массовая доля поваренной соли в сырокопчёных − не более 5-6 %. Для колбас, изготовляемых по ТУ, эти параметры могут быть изменены.

Одной из наиболее существенных проблем отечественной мясоперерабатывающей промышленности, влияющих на качество готово продукта, является наличие антимикробных веществ в мясном сырье. Всё это отражается на конечном продукте, его свойствах и органолептических показателях.

1.2. Критерии безопасности сырокопченых колбас

Пищевые продукты должны удовлетворять физиологические потребности человека в необходимых питательных веществах, отвечать требованиям безопасности и качества предъявляемым к пищевым продуктам. А также соответствовать требованиям, установленных нормативными документами, по допустимому содержанию химических веществ и их соединений, а также микроорганизмов и других биологических организмов.

Согласно Федеральному закону "О качестве и безопасности пищевых продуктов" от 02.01.2000 N 29-ФЗ под безопасность пищевых продуктов понимают - состояние обоснованной уверенности в том, что пищевые продукты при обычных условиях их использования не являются вредными и не представляют опасности для здоровья нынешнего и будущих поколений.

На безопасность готового продукта прямое влияние оказывает безопасность исходного мясного сырья, используемого при производстве. Показатели безопасности мясного сырья установлены в Технический регламент Таможенного союза "О безопасности мяса и мясной продукции" (ТР ТС 034/2013) "О безопасности мяса и мясной продукции" и Технический регламент Таможенного союз ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [1,5]. Мясо, используемое для производства сырокопченых колбас, должно соответствовать микробиологическим и химическим показателям, согласно Техническим регламентам Таможенного союза. К микробиологическим показателям относятся такие показатели, как КМАФАнМ, присутствие БГКП, бактерий рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*. Для охлажденного и подмороженного мяса в тушах, полутушах, четвертинах и отрубах КМАФАнМ не должен превышать $1*10^3$ КОЕ/г, БГКП не допускается в 0,1 г, патогенные, в т.ч. сальмонеллы и *Listeria monocytogenes* не допускаются в 25 граммах. Также нормируется содержание токсических элементов (свинец, мышьяк, кадмий и ртуть), пестицидов, радионуклидов и остаточные количества антимикробных веществ. Максимально допустимые уровни этих веществ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Максимально допустимые уровни химических веществ в мясе

Наименование показателя	Максимально допустимый уровень, не более	Единицы измерения
Токсичные элементы:		
свинец	0,5	мг/кг
мышьяк	0,1	мг/кг
ртуть	0,03	мг/кг
кадмий	0,05	мг/кг
Пестициды:		
гексахлорциклогексан	0,1	мг/кг
ДДТ и его метаболиты	0,1	мг/кг

Радионуклиды:		
цезия 137	160	Бк/кг
стронция 90	50	Бк/кг
Антибиотики		
левомицетин (хлорамфеникол)	< 0,01	ед/г
тетрациклиновая группа	< 0,01	ед/г
гризин	< 0,5	ед/г
бацитрацин	< 0,02	ед/г

При контроле готовой продукции сырокопченых колбас определяются еще такие показатели как сумма нитрозаминов (НДМА и НДЭА – не более 0,004 мг/кг) и концентрация бенз(а)пирена не более 0,001 мг/кг.

Необходимость определения количества нитрозаминов в сырокопчёных колбасах связана с тем, что нитрит натрия, добавляемый при производстве, может взаимодействовать с вторичными аминами, в результате чего получаются нитрозамин и нитрозодиэтиламин, которые обладают канцерогенным и мутагенным действиями на человека. По этой же причине опасность представляет и бенз(а)пирен, относящийся к наиболее известным канцерогенным веществам.

Для обеспечения безопасности продукта выявляют возможные риски, влияющие на безопасность. Наиболее опасные риски, оказывающие влияние на безопасность сырокопченых колбас, подразделяются на биологические и химические риски.

Биологическим рискам уделяется большое внимание, так их возникновения напрямую влияет на здоровье людей. Последствия возникновения и краткая характеристика биологических рисков представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Последствия возникновения и краткая характеристика биологических рисков [6]

№	Микроорганизм	Краткая характеристика
1	БКГП (в том числе *E.coli*)	Вызывают инфекционные заболевания, протекающие с интоксикацией, лихорадкой, чаще всего с поражением желудочно-кишечного тракта. Не развивается при температуре от 0 до 8 °С. Однако могут выживать при pH от 5 до 9.
2	Бактерии рода *Proteus*	Могут стать причиной болезней выделительной и половой систем человека. Хорошо развивается в фарше при температуре от 4 °С до 43 °С.
3	Сульфитредуцирующие клостридии	Клостридии являются причиной токсикоинфекций. При попадании в организм вырабатывают энтеротоксин. Токсин нарушает слизистую оболочку кишечника, что приводит к нарушению всасывания питательных веществ. По проявлению занимает третье место среди токсикоинфекций после токсикоинфекций, вызванными бактериями рода сальмонелла и стафилококка.
4	Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*)	Относится к патогенным микроорганизмам, выделяющим энтеротоксины. Стафилококковый энтеротоксин образовывается при температура 27-37 °С и pH=6,5-7,1. Выработка его прекращается при температуре ниже 10 °С. Присутствие в пищевых продуктах стафилококков и их токсинов не приводит органолептическим изменениям. Стафилококковый энтеротоксин устойчив к пищеварительным ферментам и проникает через слизистые оболочки ЖКТ. Инкубационный период длится несколько часов, так как всасывание его начинается уже в желудке. При попадании в кровь влияет на

		парасимпатическую нервную систему, активирует моторику желудка и кишечника, значительно понижает артериальное давление.
5	*Salmonella* spp.	При попадании в организм сальмонелла отражает жизненно важные органы и приводит к серьёзным осложнениям. Сальмонеллёз может вызвать такие тяжёлые заболевания, как менингит, остеомиелит, сальмонеллезная пневмония и другие. Бактерии вырабатывают токсины, что приводит к воспалению органов желудочно-кишечного тракта.
6	Бактерии рода *Bacillus*	Микробы способны вызывать два типа пищевых отравлений. Интоксикация организма происходит за счет выделения энтеротоксина, образующего вегетативными формами, прорастающими из спор. Споры являются устойчивыми к определенным термическим режимам обработки мясных продуктов. Бациллы продуцируют свои токсины только in vivo, во время прорастания спор.
7	*Listeria monocytogenes*	*L. monocytogenes* является патогенным микроорганизмом, продуцирующим токсин листериолизин О. Микроорганизм способен развиваться при pH среды от 4,1 до 9,6 и при температурах от 1°С до 45°С. Доказано, что *L. monocytogenes* – второй пищевой патогенный микроорганизм после стафилококков, способный к росту при a_w ниже 0,93.
8	Энтерококки	Спор не образуют, устойчивы в широком диапазоне условий. Растут при температуре +10…+45 °С, pH 4,5—10,0; а также при высоких концентрациях

		хлорида натрия.

На основании анализа возможных биологических рисков были определены наиболее опасные микроорганизмы (таблица 3).

Таблица 3 – Список наиболее опасных микроорганизмов и условия их развития [6]

Микроорганизм	Оптимальная температура роста, °С	Оптимальное значение pH для роста	Минимальное значение активности воды для роста
Clostridium botulinum (mun A,B,C)	3,2-45	Более 4,6	0,94
Clostridium perfringens	15-50	5,5-8,0	0,95
Bacillus cereus	10-46	4,9-9,2	0,95
Escherichia coli O157:H7	10-40	4,5-9,0	0,95
Campylobacter jejuni	30-46	6,5-7,4	-
Listeria monocytogenes	2,5-45	5,1-9,5	0,95
Salmonella spp	5-46	4-9	0,94
Staphylococcus aureus	6,5-45	5,2-9	0,86
Yersinia enterocolitica	2-46	4,5-9,5	0,96

Условия развития многих патогенных микроорганизмов соответствуют условиям этапа ферментации при производстве сырокопченых колбас. Поэтому существует ряд мер предотвращающих рост и развитие патогенных

микроорганизмов в процессе производства. Список предупреждающих действий возникновения биологических рисков приведен в таблице 4.

Таблица 4 – Действия, предупреждающие возникновение биологических рисков [7]

Патогенный микроорганизм	Предупреждающее действие
Clostridium botulinum	Добавление нитрита натрия и соли в мясо; замораживание мясных продуктов, упакованных под вакуумом; снижение pH до значения ниже 4,6 и снижение активности воды до значения ниже 0,93
Clostridium perfringens	Соблюдение режимов охлаждения и хранения мясного сырья, соблюдения длительности процессов.
Bacillus cereus	Соблюдение режимов охлаждения и хранения мясного сырья
Campylobacter jejuni	Предотвращение заражения при контакте с оборудованием и инструментами.
Listeria monocytogenes	Разделение сырья и готовой продукции, разделение помещений подготовки сырья и производства продукции.
Salmonella spp.	Разделение сырья и готовой продукции, санитарно-гигиенические мероприятия и гигиена персонала, направленность процесса ферментации, снижение активности воды.
Staphylococcus aureus	Соблюдение правил санитарии и гигиены персоналом, установление проведения ферментации и контроля pH, снижение активности воды
Yersinia enterocolitica	Контроль при добавлении соли и подкислении, предотвращение контаминации при контакте

При наличии химических факторов также могут возникнуть заболевания или отравления, но в меньших масштабах, чем при наличии биологических рисков.

Источниками химических рисков являются химические вещества, используемые в животноводстве (пестициды, антибиотики), используемые моющие и дезинфицирующие вещества на мясоперерабатывающем предприятии, использующиеся при производстве продукта (консерванты, пищевые добавки) и вещества из окружающей среды (ртуть, кадмий, свинец). В таблице 5 приведена локализация химических рисков в процессе производства.

Таблица 5 – Локализация химических рисков в процессе производства [7]

Химические риски	Локализация
Антибиотики, токсины, пестициды, удобрения, гормоны, тяжелые металлы	Используемое сырье
Консерванты, красители, ароматизаторы	Производство
Химические вещества	Пестициды, чистящие средства, дезинфектанты
Вещества, способные заражать или загрязнять при контакте с продукцией	Хранение и транспортирование

Перечень потенциально опасных химических факторов для сырокопченых колбас представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Перечень потенциально опасных химических факторов

	Химический фактор	Краткая характеристика
	Токсичные элементы: - свинец	Эти химические элементы обладают высокой токсичностью, при длительном поступлении способны накапливаться в организме.

	- мышьяк - кадмий - ртуть	Они попадают в сырье и готовую продукцию из окружающей среды, почвы, при использовании оборудования, инвентаря, инструментов и контейнеров, не соответствующих санитарным нормам и правилам, технологической воды, содержащей промышленные отходы, и т.п.
	Пестициды	В готовую продукцию попадают из сырья и используемую воду в процессе технологии. Имеют канцерогенное, мутагенное и кумулятивное воздействие на человека.
	Антибиотики (левомицетин, тетрациклиновая группа, гризин, бацитрацин)	Попадают в мясо при лечении животных, а также вместе с кормами. Вызывают у людей аллергии, дисбактериоз. Постоянное использование приводит к формированию устойчивых форм микроорганизмов.
	N-нитрозамины	Нитрозамины обладают высокой токсичностью. Поражают печень, вызывают кровоизлияния у человека. Проявляются головной боль, тошнотой, болью в области желудка, слезотечением, легким субфебрилитетом.
	Бенз(а)пирен	Относится к веществам первого класса опасности. В окружающей среде накапливается преимущественно в почве, меньше в воде.

Присутствие биологических и химических опасностей может приводить к порче продукта и вызывать пищевые отравления. Наличие химических веществ, при систематическом употреблении может привести к отравлению потребителей и нарушению функционального состояния организма.

К факторам с высокой тяжестью последствий относится, например, наличие бактерий рода *Salmonella* в продукте, так как при попадании в организм человека первые признаки отравления проявляются уже через несколько часов. А при

попадании с пищей в желудок таких микробов как стафилококк или кишечная палочка первые признаки отравления могут появиться уже впервые 30 минут после отравления.

Одним из факторов средней тяжести является наличие остаточных количеств антимикробных веществ. Попадание антибиотиков в организм может вызвать сильные аллергические реакции. Проявление аллергического эффекта происходит даже при крайне низких содержаниях антибиотиков в готовых продуктах. Согласно статистике, в течение последних 40 лет в России в десятки раз увеличилось количество людей с аллергическими заболеваниями, особенно среди детей. Например, антибиотик пенициллин обладает одной из самых высоких антигенных активностей. Пенициллин вызывает аллергическую реакцию у 1-5 % людей. Пенициллин практически не токсичен, однако ряд антибиотиков, таких как стрептомицин, тетрациклин и, прежде всего, хлорамфеникол, обладают токсичностью. Стрептомицин оказывает токсичное действие на центральную и периферическую нервную систему. Тетрациклин вызывает изменение состава крови, повреждение паренхимы печени и токсикоз нервной системы. Все антибиотики обладают иммунодепрессивным действием.

В связи с тем, что группы применяемых антибиотиков у людей и животных в сельском хозяйстве одинаковы, остаточные количества антибиотиков в пищевых продуктах способствуют появлению устойчивых штаммов и у людей. При постоянном попадании в организм человека минимальных доз антибиотиков формируется устойчивость к ним у микроорганизмов, и для получения ожидаемого эффекта при лечении требуются более сильные препараты или повышенные концентрации.

Длительное поступление антибиотиков в организм человека может вызывать раздражение слизистых оболочек желудка, обострение язвенных и предъязвенных состояний, нарушение баланса микрофлоры в кишечнике, нарушения в работе печени, почек, желчного пузыря, реакции со стороны нервной и кровеносной систем при индивидуальной непереносимости антибактериальных компонентов [8].

Наличие антибиотиков в мясе может приводить к формированию устойчивости микроорганизмов к ним. В настоящее время одной из глобальных проблем всего мира признана проблема формирование антибиотикорезистентности у микробов. Так антибиотики в низких концентрациях, подавляя полезную микрофлору (стартовые культуры), не оказывают влияния на резистентные штаммы микроорганизмов, которые в дальнейшем могут активно размножаются при ферментации. Все это приводит к выпуску продукции не безопасной для потребителя.

Исходя из выше сказанного, можно сделать вывод, что при производстве ферментированных продуктов важно учесть все возможные химические и биологические риски. А среди химических рисков важно исключить наличие антимикробных веществ в сырье. При производстве колбас не так важно количество антимикробных веществ в мясе, как сам факт их наличия, так как постоянное употребление даже низких концентраций антибиотиков ведет к нарушению функционального состояния организма человека и технологии производства.

1.3 Формирование характеристик, присущих сырокопченым колбасам

Приятный запах, специфический кислый вкус, плотная консистенция и достаточно длительный срок хранения – именно за эти характеристики сырокопченые колбасы так полюбились потребителям.

Свойственный цвет сырокопченых колбас формируется за счет бактерий, продуктами жизнедеятельности которых является окись азота. Для формирования стабильной окраски ферментированных колбас из денитрифицирующих бактерий широко применяются *Micrococcus nitrificans, Micrococcus epidermis, Micrococcus caselyticus, Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus*. Скорость развития стафилококков не велики, поэтому необходимо вносить их в достаточном количестве, примерно 10^6-10^7 КОЕ/г. В процессе созревания стафилококки восстанавливают нитрат в нитрит, участвуют в образовании характерного аромата, восстанавливают пероксид водорода, продуцируемого

каталазонегативными лактобациллами. При снижении pH, которое происходит в результате действий лактобактерий, количество кокковых бактерий уменьшается, так как они чувствительны к кислой среде.

За счет направленности своей деятельности чаще всего в состав стартовых культур включают смесь нескольких видов микроорганизмов, в которых в большинстве случаем почти всегда присутствуют в составе молочнокислые бактерии. Некоторые виды молочнокислых микроорганизмов образуют перекись водорода, которая способствует реакции окисления, что негативно сказывается на вкусе и цвете готовых ферментированных колбас. Однако микроорганизмы рода *Micrococcus* вырабатывают фермент каталаза, который разрушает образуемую молочнокислыми бактериями перекись водорода. Поэтому, зачастую молочнокислые бактерии используют совместно с представителями рода *Micrococcus*, что позволяет получить продукт со свойственными ему цветом и вкусом.

Цветообразование начинается от центра и постепенно переходит к периферии батона. Длительность процесса составляет несколько дней. Считается, что оптимум процесса цветообразования находится в диапазоне pH 5,2-5,7. Процесс цветообразования начинает прекращаться только при pH меньше 4,8.

Применение денитрифицирующих микроорганизмов при производстве ферментированных продуктов способствуют не только формированию стабильной традиционной окраске, но и снижению количества остаточного нитрита.

Формирование вкуса готового продукта начинается с формирования вкуса используемого сырья. Свежее мясо почти не имеет запаха из-за низкого количества низкомолекулярных веществ, которые и формируют вкус и запах мяса [9]. Аромат и вкусовые характеристики мяса появляются при хранении при низких положительных температурах примерно на 3-4 сутки. В процессе автолиза накапливаются предшественники вкуса и аромата - аминокислоты и их амины. Небольшие количества глутаминовой кислоты и ее натриевой соли также придают мясу свойственный ему вкус. Поскольку при автолизе происходит также

распад углеводов и белков, то происходит накопление моносахаридов, которые имеет вкус. Формирование аромата и вкуса у сырокопченых колбас происходит при ферментации. В создании вкуса принимают участие нелетучие экстрактивные вещества, а также вносимые дополнительные ингредиенты. При нормальном протекании процесса ферментации стартовые культуры расщепляют сахара, что приводит к накоплению кислот, а воздействие ферментов приводит к накоплению аминокислот, что формирует как аромат, так и цвет готового продукта. В накопленных ароматических веществах ведущая роль принадлежит карбонильным соединения. Карбонильные соединения часто являются конечными продуктами при происходящих биохимических процессах.

Существенный вклад в аромато- и вкусообразование сырых колбас вносят биохимические превращения фарша под действием прежде всего липаз, а также протеаз. Немало важную роль в создании аромата колбас играют микрококки. Они относятся к липазопродуцирующим микроорганизмам. Активность их развития зависит от жировых субстанций. Микрококки принимают участие в ароматообразовании колбас за счет протеолитической и липолитической активности. Оказывая протеолитическую активность на белки, расщепляют их до свободных аминокислот, которые обеспечивают аромат продукта. Благодаря липолитической активности происходит образование низкомолекулярных лечучих жирных кислот, которые способствуют вкусообразованию.

Для этого вида продукции свойственен кислый вкус. Молочнокислые бактерии, расщепляя углеводы, накапливают молочную и другие кислоты, которые способствуют возникновению кисловатого привкуса и аромата.

При сбраживании углеводов полезной микрофлорой повышается активность протеолитических и липолитических ферментов [10], образуются летучие жирные кислоты, карбонильные соединения, свободные аминокислоты, пептиды, спирты, эфиры, летучие гетероциклические соединения и т.д.

Отмечено, неприятные тона в аромате ферментированных колбас появляются в результате активной жизнедеятельности нежелательных микроорганизмов. Например, *Escherichia coli* и *Enterobacter*, участвуя в распаде

углеводов, образуют достаточное количество уксусной и муравьиной кислот. А Грамотрицательная бактерия *Serratia marcescens* образует муравьиную кислоту, а масляная и уксусная кислоты являются результатом ферментативной деятельности клостридий [10].

Вносимые бактерии родов *Lactobacillus, Leuconostos, Streptococcus, Staphylococcus* способны образовывать липазы. При взаимодействии фермента липазы и кислота происходит образование свободных жирных кислот, альдегидов, эфиров, кетонов. Этим веществам свойственен аромат.

Но не всегда липазы получаются микроорганизмами выше перечисленных родов, потому что способность образовывать липазы имеют так называемые нежелательные микробы, например, бактерии родов *Pseudomonas, Enterobacter, Proteus*.

При окислении жиров и карбонильных соединений под воздействием липолитических тканевых ферментов образовываются летучие жирные кислоты, которые участвуют в формирование запаха.

При формировании специфического вкуса и аромата, свойственного ферментированным колбасным изделиям, важная роль принадлежит реакции Майяра или меланоидинообразования. В этой реакции принимают участие редуцирующие сахара, альдегиды, кетоны, аминокислоты, пептиды, белки и амины. На первом этапе данной реакции происходит окислительно-восстановительное взаимодействие аминокислот с редуцирующими сахарами. Затем в результате множества превращений выделяются летучие и водорастворимые компоненты, которые и создают аромат мясного изделия.

Удачно подобранные стартовые культуры обладают способностью эффективно и за короткий срок продуцировать молочную кислоту, проявляют антагонистические свойства к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, участвуют в процессе формирования вкусо-ароматического комплекса, способствуют активному вовлечению в реакцию цветообразования нитрита натрия.

1.4 Факторы, влияющие на качество сырокопчёных колбас

На качество готовой продукции влияет качество используемого сырья и соблюдение этапов технологического процесса. При использовании некачественного мясного сырья и при нарушении этапов технологического процесса на выходе получается продукция низкого качества.

При производстве ферментированных колбас в качестве сырья используют мясо взрослых продуктивных животных, а именно говядину и свинину, птицу, конину, а также мясо диких животных. Светлое мясо молодых или плохо откормленных животных не рекомендуется использовать при производстве таких колбас, потому что готовый продукт будет иметь не стабильную окраску или бледный цвет. Рекомендуется использовать мясное сырье с большим количеством гликогена (до 2 %). Такое количество содержится в мясе некастрированных быков 6-7 лет и мясе свиней 3-летнего возраста. Правильность подобранного сырья обеспечивает нужную кислотность, консистенцию, свойственный вкус и аромат в готовых изделиях.

Большое значение при производстве ферментированных колбас имеет шпик. При производстве используют хребтовый или боковой шпик. Но в большинстве случаев используют хребтовой шпик, за счет твердой консистенции, которую обуславливают ненасыщенные жирные кислоты. В связи с этим он менее подвержен окислению.

От качества шпика, в особенности его свежести, напрямую зависит качество выпускаемой продукции. Использование осалившегося шпика может негативно повлиять на процессы, происходящие при созревании колбас. Подмораживание шпика до температуры в толще куска 2 ℃ позволяет получить равномерное измельчение, миновать размазывания и в итоге получить равномерное распределение шпика по батону колбасы. Использование мягкого шпика не только нарушает структуру колбасы, но и замедляет процесс сушки.

Сырье, используемое для производства ферментированных колбас, должно соответствовать определенным нормам бактериальной обсемененности, температуры, pH, активности воды.

Одним из важных показателей качества мясного сырья является его первоначальная обсемененность мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами (КМАФАнМ). Согласно ТР ТС 021/2011 в бескостных жилованных замороженных блоков из мяса убойных животных допускается содержание КМАФАнМ не более $5*10^5$ КОЕ в 1 г, а в 1 г свиного (говяжьего) фарша допустимый уровень КМАФАнМ - $5*10^6$ КОЕ.

Использование мясного сырья с высокой степенью обсемененности, может негативно сказаться на качестве (вкус, запах) сырокопченых колбас. Патогенные сальмонеллы должны отсутствовать 25 г используемого мяса (фарша) [11]. Ранее было доказано, что при высоком содержании в мясном сырье энтеробактерий, а именно более чем $1x10^5$ КОЕ/г, риск присутствия сальмонелл возрастает.

Также на качество колбас влияет температура хранения используемого мяса. Необходимо соблюдать температурный режим в пределе от -1 до +2 ℃ . При нарушении температурно-влажностного режима хранения сырья будут активно развиваться патогенные микроорганизмы.

При изготовлении ферментированных колбас используют как замороженное и охлажденное, так и парное мясо. Не рекомендуется использовать ранее размороженное мясное сырье, так как это отрицательно сказывается на качественных характеристиках получаемого продукта. Мясо, изменившее цвет, а также замороженную свинину и говядину более 3 и 9 месяцев соответственно, не допускается использовать при производстве [12].

При производстве таких колбас следует использовать мясо с pH в пределах 5,4-5,8 [12]. Но допускается использовать мясо с величиной pH до 6,0. Величина pH используемого мяса оказывает на ход процессов созревания и сушки, и, следовательно, на качество.

Не мало важную роль при производстве сырокопченых колбас имеет значение активности воды в мясном сырье (a_w). Показатель активности воды показывает количество свободной влаги в сырье. По значению a_w можно судить о возможной жизнедеятельности микроорганизмов.

Активность воды оказывает влияние на микробиологические, ферментативные и химические изменения в мясном сырье. С понижением показателя активности воды прекращают свою жизнедеятельность микроорганизмы, замедляются ферментативные процессы, что положительно сказывается на сохранности готового продукта. У разных видов микроорганизмов есть минимальное и максимальное значение активности воды, при которых микроорганизм может сохранять способность к росту и развитию. В таблице 7 приведены минимальные значения активности воды, при которых возможно развитие микробов.

Таблица 7 – Минимальные значения активности воды необходимые для развития микроорганизмов

Микроорганизмы	Диапазон минимального значения активности воды
Pseudomonas spp.	0,97
Bacillus cereus	0,93
Escherichia coli O157:H7	0,95
Listeria monocytogenes	0,92
Salmonella spp.	0,94
Staphylococcus aureus	0,86, для образования энтеротоксина 0,9
Yersinia enterocolitica	0,96

В сыром фарше значение активности воды не должно превышать 0,96. Величина a_w влияет на сроки хранения готового продукта, развитие присущего цвета и запаха. Однако существуют подходы позволяющие снизить значения a_w. К одному из таких методов относится подсушка мясного сырья на стеллажах (в сетках).

При прохождении всех этапов технологического процесса активность воды достигает значения 0,80, при котором не развиваются патогенные бактерии.

Однако, при таком значении активности воды вносимые стартовые культуры остаются жизнеспособными.

Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 мясо должно быть свободно от таких антибиотиков как левомицитин, тетрациклиновой группы, гризина и бацитрацина. Наличие их остаточных количеств в мясном сырье может отрицательно повлиять на течение технологического процесса. Использование мяса с остаточными количествами антибактериальных препаратов при производстве сырокопченой продукции, влечет за собой невозможность производства качественной и безопасной продукции, т.к. процессы естественной и направленной ферментации и созревания будут ими частично или полностью ингибированы [13].

Таким образом, выпуск качественного продукта напрямую зависит от качества, безопасности используемого сырья и его характеристик (pH, активности воды).

1.5 Роль стартовых культур в производстве сырокопченых колбас

С давних времен к традиционным методам консервирования мяса относят посол, сушку и ферментацию. В последнее время постоянно растет потребность в больших объемах ферментированной продукции с длительным сроком хранения [14]. Срок годности такой продукции может быть продлен за счет наличия полезной микрофлоры в мясе, нитритов и высокой концентрации соли. Так в 1940 году была предложено вносить в мясо бактерии *Lactobacillus* spp. с целью сокращения сроков созревания, улучшения органолептических характеристик и увеличения сроков хранения ферментированных колбас.

Тенденцией сегодняшнего дня является создание ферментированных мясных продуктов с целью улучшения здоровья потребителей за счет полезного влияния стартовых культур [15]. Ферментированные продукты обладают уникальными функциональными свойствами, придающими потребителю определенную пользу для здоровья благодаря наличию функциональных микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами, антимикробной, антиоксидантной, пептидной продукцией и др. [16]. Эффективность и

безопасность этих микроорганизмов доказана в многочисленных исследованиях [17,18].

В России признание технологической значимости и начало широкого промышленного использования стартовых культур можно отнести к концу семидесятых годов прошлого века.

К технологическим свойствам микроорганизмов стартовых культур, которые могут использовать в мясной промышленности, относят их возможность сбраживать углеводы с образованием молочной кислоты.

При производстве сырокопченых колбас вносят большое количество соли, поэтому микроорганизмы должны быть солеустойчивыми, а также обладать способностью к денитрификации. К технологическим свойствам также можно отнести: их антагонистическую активность по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре за счет способности синтезировать бактериоцины и антибиотикоподобные соединения; способность к липолизу, протеолизу и образованию вкусоароматических соединений; утилизировать кислород и его активные формы за счет выделения таких ферментов, как каталаза, пероксидаза и снижать уровень нежелательных соединений, которые могут отрицательно повлиять на здоровье человека.

На сегодняшний день в мясной промышленности используют различные бактериальные препараты, которые могут быть представлены как монокультурой, так и несколькими видами микроорганизмов. В состав стартовых культур могут входить микроорганизмы рода *Lactobacillus*, которые обеспечивают снижение pH, образование цвета, формирование аромата; микроорганизмы родов стафилококков и микрококков способные редуцировать нитраты, блокировать перекисное окисление, образовывать ароматические вещества. Поэтому чаще всего в состав стартовых культур входит смесь нитрат восстанавливающих микрококков, гомоферментативных молочнокислых бактерий, педиококков и дрожжей [19]. В процессе постепенного обезвоживания продукта все эти солеустойчивые бактерии активно развиваются, в то время как нежелательные микроорганизмы отмирают.

Особый интерес вызывают стартовые культуры, которые обладают антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре. Одним из важных свойств стартовых культур является продление срока годности мясных продуктов путем подавления роста нежелательной микрофлоры. Подавление происходит за счет образования стартовыми культурами органических кислот, диоксида углерода, перекиси водорода, диацетила и бактериоцинов. Одним из самых известных бактериоцинов является низин, продуцируемый некоторыми штаммами *Lactococcus lactis*. Многие штаммы, выделенные из ферментированных колбас такие, как *Lactobacillus plantarum, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus breve* и другие молочнокислые бактерии, обладают антагонистической активность.

На протяжении уже многих лет бактерии, принадлежащие к родам *Lactobacillus, Pediococcus, Staphylococcus и Streptococcus* входят в коммерческие бактериальные препараты, поскольку имеют высокие показатели образования молочной кислоты при сбраживании сахаров. В зависимости от желаемого вкуса, структуры и внешнего вида продукта выбираются определенные культуры или смеси нескольких культур, что более приветствуется.

Вносимые микроорганизмы играют существенную роль в образовании уникальных характеристик ферментированных колбас. Среди молочнокислых бактерий различают гомо- и гетероферментативные. Последние кроме молочной кислоты продуцируют еще и пропионовую и уксусную кислоты, углекислый газ и другие вещества. В связи с этим присутствие этой группы молочнокислых микроорганизмов не нежелательно в ферментированных колбасах. Долго сохраняющийся вкус и аромат ферментированных колбас придают соединения, образующиеся при углеводном обмене: ацетальдегид, ацетон, двуокись углерода, щавелево-уксусная, яблочная, винная, лимонная кислоты и некоторые другие.

Микроорганизмы в начале созревания способствуют распаду углеводов, затем белков и уже потом жиров, благодаря чему формируется свойственный продукту аромат.

Применение бактериальных культур при производстве ферментированных колбас дает возможность выпуска нового типа колбас, обладающих специфическими органолептическими параметрами.

Вносимые в ферментированные колбасы стартовые культуры образуют протеолитические ферменты. Сбраживая сахара, они создают условия для более интенсивного развития ферментативных реакций, обусловленных тканевыми ферментами.

Однако деятельность молочнокислых микроорганизмов не будет такой выраженной без внесения углеводов. Установлено, что, благодаря добавлению в фарш с микроорганизмами углеводов, формируется специфический вкус колбас. Углеводы необходимы для жизнедеятельности молочнокислых микроорганизмов, которые за счет их сбраживания образуют молочную кислоту. Сбраживание сахаров молочнокислыми бактериями начинается с моносахаридов, затем дисахариды и самыми последними сбраживаются полисахариды. В таблице 8 приведены данные о количестве молочной кислоты образующейся при сбраживании разных углеводов *Lactobacillus plantarum* .

Таблица 8 – Количество молочной кислоты образующейся при сбраживании разных углеводов *Lactobacillus plantarum* в MRS бульоне

Углевод	Количество молочной кислоты, %	Значение pH конечное
Глюкоза	0,97	4,07
Сахароза	0,87	4,03
Мальтоза	0,70	4,25
Галактоза	0,30	4,84
Раффиноз	0,07	6,11

Из таблицы 8 видно, что при сбраживании глюкозы образуется максимальное количество молочной кислоты. Немного ниже окислительная способность у сахарозы, и еще ниже находится мальтоза. В современном производстве принято вносить в колбасный фарш смесь нескольких углеводов. Это позволяет контролировать уровень кислотообразования, а также

целенаправленно влиять на органолептические показатели получаемого продукта. Выбор вида и количества углеводов зависит от состава бактериального препарата. Но количество вносимых углевод напрямую зависит от исходного pH мясного сырья. При величине pH ниже 5,5 не добавляют больше 0,5 % углеводов, так как кислотообразование будет происходить в ускоренном темпе, а pH быстро снижаться до очень низких значений. Таким образом, управлять качеством ферментированных колбас позволяет и правильный подбор углеводов для определенных микроорганизмов.

Образующаяся молочная кислота лежит в основе составляющей специфического вкуса ферментированных колбас. Однако нежелательная микрофлора также может продуцировать молочную кислоту, но наряду с этим еще и уксусную и масляную кислоты, этиловый спирт и газ, которые нарушают процесс ферментации мясного сырья. Температурные режимы, при которых изготавливаются ферментированные мясные продукты, не обеспечивают подавление роста нежелательной микрофлоры, а естественное ее отмирание за счет повышенной концентрации соли и обезвоживания продукта происходит медленно. Но благодаря молочнокислым микроорганизмам, продуцирующим бактериоцины, подавляется развитие нежелательной микрофлоры.

В результате применения стартовых культур интенсифицируется производственный процесс и сокращается продолжительность ферментации. Целенаправленное использование стартовых культур уменьшает брак на выходе готовой продукции, а также дает возможность получить продукт высокого качества. Поэтому очень важно обеспечить жизнеспособность стартовых культур в процессе производства.

1.6 Последствия использования антибиотиков в различных отраслях животноводства

Несколько десятков лет назад антибиотики стали использовать для лечения заболеваний бактериального происхождения. Однако способность бактерий к быстрой адаптации привела к формированию антибиотикорезистентных

штаммов. Быстрое появление резистентных бактерий происходит во всем мире, что ставит под угрозу эффективность антибиотиков, которые изменили медицину и спасли миллионы жизней. Еще в 1945 году Александр Флеминг поднял тревогу по поводу чрезмерного использования антибиотиков, когда он предупредил, что «общественность будет требовать препарат и затем начнется эра злоупотреблений».

С целью повышения эффективности прироста мышечной массы животных практикуют введение в корма антибиотиков в относительно малых дозах на протяжении длительного периода времени, что приводит в среднем к увеличению прироста живой массы животных на 4-5 % по сравнению с животными, выращиваемыми без использования антибиотиков, а также затраты корма на единицу прироста снижаются на 5-8 % [20].

На сегодняшний день производители несанкционированно применяют антибиотические вещества, в том числе и те, которые используются в лечении человека (производные пенициллина, тетрациклина и левомицетина и др.), что может привести к подавлению полезной микрофлоры человека с последующим развитием дисбактериоза [20].

Еще одним из последствий неконтролируемого применения антибиотиков является формирование резистентности у микроорганизмов к ним. Согласно последнему отчету Всемирной организации здравоохранения возникла угроза в не эффективности существующих антимикробных веществ к новым разновидностям патогенных микроорганизмов.

Формирование устойчивость к антибиотикам у микроорганизмов возрастает до угрожающе высокого уровня во всем мире. Новые механизмы антибиотикоустойчивости появляются и распространяются повсюду. Многолетние динамические наблюдения наглядно демонстрируют, что устойчивость микроорганизмов к антибиотикам становится все более и более актуальной и серьезной проблемой здравоохранения, препятствующей эффективному лечению больных с инфекциями бактериальной этиологии [21].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) впервые публиковала список устойчивых к действию антибиотиков “приоритетных патогенов” – 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, среди которых *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus, Campylobacter* spp. и другие микроорганизмы, которые также являются актуальными при контроле качества и обеспечении безопасности мяса и мясной продукции [22]. Устойчивые формы этих «приоритетных патогенов» могут быть переданы человеку при употреблении мяса и мясных продуктов.

Кроме того, антибиотики и продукты их метаболизма могут стать причиной аллергии. У человека, регулярно употребляемого продукты, с остаточными количествами антибиотиков возрастает риск развития хронических заболеваний, лечение которых осложняется все той же устойчивостью возбудителя к антибиотику. Таким образом, это становится для населения земного шара «бомбой замедленного действия», требующей незамедлительного вмешательства в процесс их использования.

Использование противомикробных препаратов при лечении инфекций в течение определенного периода времени заставляет микроорганизмы или адаптироваться или погибать (избирательное давление). Особую опасность представляют выжившие микроорганизмы, которые могут нести гены лекарственной устойчивости, способные передаваться другим штаммам в пределах их собственного рода и вида или неродственным видам [23].

Устойчивость бактерий может быть врожденной или приобретенной. В то время как внутренняя резистентность является естественной чертой, обусловленной биологией организма, например, резистентностью к ванкомицину у кишечной палочки [24], приобретенная резистентность возникает, когда бактерия, которая ранее была чувствительна к антибиотикам, но приобрела способность быть устойчивой к антибиотику. Это часто происходит в результате мутации или приобретения нового участка ДНК [25]. Мутация в настоящее время признана наиболее распространенным механизмом развития резистентности у бактерий [26], и она возникает независимо от наличия антибиотика.

В дополнение к мутации бактерии разработали широкий спектр биохимических и генетических систем для обеспечения эволюции и распространения устойчивости к антибиотикам [24]. Они включают модификацию антибиотика таким образом, чтобы он не реагировал с сайтом-мишенью, как это происходит в β-лактамазах, которые ферментативно расщепляют четырехчленное β-лактамное кольцо, делая антибиотик неактивным [27].

В некоторых случаях бактерии, устойчивые к антибиотикам, могут защитить мишень действия антибиотика, уменьшая поглощение антибиотика и/или его быстрое выведение, как это происходит между β-лактамными антибиотиками и грамотрицательными бактериями [26]. Кроме того, целевое действие антибиотика может быть изменено, что делает антибиотик неэффективным, например, устойчивость энтерококков к цефалоспоринам [27].

Последним механизмом, с помощью которого бактерии могут защитить себя от действия антибиотиков, является выработка альтернативной мишени (обычно фермента), которая устойчива к ингибированию антибиотиком. Большинство штаммов *Streptococcus pneumoniae* очень чувствительны как к пенициллинам, так и к цефалоспоринам, но могут приобретать ДНК от других бактерий, что изменяет фермент таким образом, что они развивают низкое сродство к пенициллинам и, следовательно, становятся устойчивыми к ингибированию пенициллинами [25]. Измененный фермент все еще синтезирует пептидогликан, но теперь он имеет другую структуру.[28]

Однако нередко можно обнаружить бактерию, проявляющую более одного из этих механизмов [24].

Одним из способов, с помощью которого бактерии проявляют устойчивость к противомикробным препаратам, является их способность образовывать биопленки. Биопленки - это прикрепленные к поверхности бактерии, заключенные в самопроизводящуюся внеклеточную полимерную матрицу. Отличительной чертой образа жизни биопленки является повышенная устойчивость к широкому спектру стрессоров, включая иммунную систему,

дезинфицирующие средства и антибиотики. Механизмы, лежащие в основе этого сопротивления, сложны. Холл и Ма (2017) дают представление об этих механизмах, которые включают взаимодействие антибиотиков с компонентами матрицы, снижение темпов роста и ряд генетических детерминант, которые конкретно опосредуют устойчивость в режиме роста биопленки [29]. Примечательно, что обычно не один механизм обеспечивает устойчивость, а скорее комбинация нескольких из этих механизмов, которая проявляет чрезвычайно высокую устойчивость, наблюдаемую в клетках биопленки.

Интересно, что важным механизмом, который разделяют бактерии биопленки и свободноживущие планктонные бактерии, является персистенция. Персистенция - это переходное состояние толерантности, при котором толерантность к антибиотикам не является генетической и сохраняется в восприимчивой популяции. Ван ден Берг, Фоварт и Михельс (2017) предоставили полный обзор такого способа выживания бактерий в присутствии антибиотиков [30]. Поскольку персистенция была задокументирована у большинства видов бактерий, дальнейшее понимание этого явления может улучшить наши терапевтические подходы и может даже привести к разработке специфических антимикробных агентов, нацеленных на персистирующие клетки.

Пищевые продукты животного происхождения, такие как мясо и мясопродукты, являются одними из основных средств передачи зоонозных устойчивых бактериальных патогенов к человеку. Кишечная палочка (*E. coli*), золотистый стафилококк (*St. aureus*), *Salmonella* spp. *и Listeria monocytogenes* известны как основные зоонозные бактериальные патогены, которые связаны со многими случаями заболеваний пищевого происхождения и смерти людей после употребления загрязненной пищи в мире [31,32,33,34,35,36].

Мясо и мясопродукты могут быть важным средством распространения устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий [37,38,39,40]. В нескольких исследованиях последних лет сообщалось о наличии бактерий, устойчивых к антибиотикам, в мясе и мясопродуктах [40,41,42,43,44]. Поэтому мониторинг распространенности микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, необходим

не только для того, чтобы предоставить достаточные знания о масштабах этой проблемы, но и помочь государственным органам оценить эффективность мер контроля [34,35,45].

Устойчивость к антибактериальным препаратам может передаваться по пищевой цепочке путем прямого или косвенного воздействия. Прямое воздействие происходит после контакта человека с животным или его кровью, слюной, молоком и прочее, что является очень простым и быстрым способом распространения устойчивых бактерий. Косвенный контакт происходит при потреблении загрязненных пищевых продуктов, таких как яйца, мясо и молочные продукты [46,47]. Другие пути передачи связаны с окружающей средой, которая может быть источником генов устойчивости к антибиотикам [48,49]. В результате бактерии, как резервуар генов устойчивости, помимо своей патогенности, могут представлять скрытую опасность для здоровья населения. Появление устойчивости к противомикробным препаратам в пищевой цепочке является межсекторальной проблемой; во-первых, антибиотики широко используются в ветеринарии, аквакультуре и сельском хозяйстве, во-вторых, бактерии и гены, устойчивые к антибактериальным препаратам, могут просто распространяться на каждом этапе пищевой цепи, и последнее может быть связано с инфекционными заболеваниями у людей [50]. С другой стороны, устойчивость к антибактериальным препаратам может иметь глобальное распространение по пищевой цепочке из-за увеличения объемов торговли пищевыми продуктами между странами.

Сегодня устойчивость к антибиотикам, особенно к тем, которые передаются из пищевой цепочки человеку, является глобальной проблемой.

Безопасность пищевых продуктов - это научный курс, который был сосредоточен на профилактике и борьбе с болезнями, передаваемыми пищевыми продуктами, во всех процессах производства пищевых продуктов, включая транспортировку, хранение, обработку, приготовление, а также на обеспечении здоровья и безопасности пищевых продуктов для потребления человеком [51].

Устойчивые заболевания пищевого происхождения являются одной из наиболее важных проблем общественного здравоохранения, связанных с риском возникновения устойчивости к антибактериальным препаратам в пищевой производственной цепочке. Увеличение числа бактерий, устойчивых к антибиотикам, привело к увеличению числа заболеваний, передаваемых с пищей и сложно поддающихся лечению. Кроме того, следует отметить, что две трети заболеваний тяжелой степени были связаны с грамотрицательными резистентными бактериями, значение и способы, лечения которых у различных резистентных бактерий неодинаковы [52]. Сегодня из пищевых продуктах и от больных людей были выявлены различные профили устойчивых бактерий. Согласно Менсе и др., остатки антибиотиков в пищевых продуктах могут оказывать различные неблагоприятные последствия для здоровья населения, включая аллергические реакции, гепатотоксичность, мутагенность, канцерогенность, токсические эффекты, нефропатию и устойчивость к антибактериальным препаратам.

В целом, результаты распространения устойчивых к антибиотикам бактерий и инфекционных заболеваний можно резюмировать следующим образом: (1) задержка или безуспешность в лечении, (2) ограничение в выборе противомикробных препаратов, (3) выживание устойчивых штаммов при лечении других бактериальных заболеваний, (4) сосуществование и повышенная патогенность генов устойчивости в результате отбора.

Согласно литературным данным, существуют различные патогенные микроорганизмы, передаваемые человеку с пищей, с установленной устойчивостью к различным лекарствам и антибиотикам. К ним относят:

- термотолерантный кампилобактер: заболевание, связанное с ним, длится недолго, имеет низкий уровень смертности и является проблемой общественного здравоохранения. Исследования показали, что некоторые *Campylobacter* spp. были устойчивы к макролидам, хинолонам, хлорамфениколу, ампициллину, тетрациклину, линкозамидам, аминогликозидам и другим тилозинам, β-лактамам и котримоксазолу [53,54].

- Сальмонелла*:* один из патогенов, передаваемых с пищей, который является очень высоким фактором риска для здоровья человека и широко распространен во всем мире. *Salmonella* spp. показали множественную лекарственную устойчивость к тетрациклинам, канамицину, сульфаниламидам, хлорамфениколу, стрептомицину, цефалоспоринам и пенициллинам [55]

- Золотистый стафилококк являются распространенными патогенами для животных и человека, которые были зарегистрированы как устойчивые патогены к пенициллинам еще в 1948 г [56]

- Энтерококки являются распространенными бактериями в кишечном тракте птиц и млекопитающих и известны как индикаторы кишечного загрязнения пищевых продуктов. Эти патогены могут переносить неблагоприятные условия, такие как низкий или высокий уровень pH, температура и соленая вода [57,58], что свидетельствует о том, что устойчивые *энтерококки* могут быть важным фактором внебольничных инфекций [59]. Кроме того, резистентные *энтерококки* могут переносить ген устойчивости к штаммам, адаптированным к человеку, и косвенно оказывать неблагоприятное воздействие [60].

- Иерсиния. Этот род состоит из различных видов, включая *Y. pestis, Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, которые являются патогенными штаммами [61]. *Y. enterocolitica* может привести к сепсису, септическому артриту, пневмонии, целлюлиту, менингиту, эмпиеме, остеомиелиту и панофтальмиту. Согласно литературным данным, штаммы биовара 1B (серовар O:8) показали устойчивость к карбенициллину, цефалотину и тикарциллину [62], тогда как штаммы биовара 3 (0:1,2,3 и O:5,27) были устойчивы к цефокситину и амоксициллину/клавулановой кислоте [63].

Меры по обеспечению биобезопасности в сельском хозяйстве и пищевых продуктах играют значительную роль в снижении устойчивости бактерий к противомикробным препаратам и их передачи с фермы на прилавок. Согласно ФАО и ВОЗ, 2011 год, биобезопасность определяется как меры по снижению или устранению угрозы возникновения или распространения заболеваний на региональном или страновом уровнях [64,65]. С другой стороны, в ситуации

появления устойчивых бактерий эффективные методы могут предотвратить их распространение и обеспечить безопасность пищевых продуктов и здоровье пищевых продуктов.

1.7 Заключение к литературному обзору

Сегодня в России, в условиях экономических санкций и импортзамещения, необходимо увеличить выращивание основных видов сельскохозяйственных животных и птицы, для производства российской пищевой продукции.

Решение данной задачи требует существенных скоординированных усилий правительства России, государственных надзорных органов и предприятий пищевой промышленности. Интенсификацию процесса производства мяса достигают за счет прироста мышечной массы у животных, в т.ч. с использованием антибактериальных препаратов, таких как террамицин, биомицин, бацитрацин, гризин и др. Эти препараты используют в составе кормовых добавок.

Результаты проведенного обзора научно-технической литературы наглядно показали, что использование антибиотиков в разных отраслях животноводства влечет за собой вред для здоровья человека и экономические потери производителям пищевой продукции. Особую обеспокоенность вызывают риски при изготовлении мясной продукции с использованием стартовых культур. В настоящий момент не оценено влияние антимикробных веществ, в том числе антибиотиков, на качество и безопасность такой продукции. Не существует эффективной системы по идентификации, оценке и управлению рисками, возникающими при производстве пищевой продукции в случае использования мясного сырья с антибиотиками.

В связи с этим, анализ рисков, возникающих при использовании мясного сырья с антибиотиками, является актуальной темой для исследования. Исследования в этом направлении позволят избежать снижения качества и безопасности производимой продукции, снизить экономические потери и сохранить здоровье потребителей.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация проведения исследования

Экспериментальная часть работы проведена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Автор выражает глубокую благодарность за бесценную помощь в работе над диссертацией и профессиональную поддержку руководству ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» Кузнецовой О.А., Семеновой А.А., всем сотрудникам лаборатории «Гигиена производства и микробиологии» и лично Батаевой Д.С, Юшиной Ю.К., а также Насоновой В.В. (руководитель отдела «Научно-прикладных и технологических разработок»), Кузнецовой Т.Г. (руководитель направления квалиметрии и сенсорной оценки продукции), Кузлякиной Ю.А. (и.о. руководителя отдела Технического регулирования и систем управления качества), Марданову А.В. (заведующий лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики ФИЦ Биотехнологии РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина)), Никитченко Д.В. (профессор департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института РУДН). Исследования выполняли в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

Рисунок 1 – Схема диссертационного исследования

2.2 Объекты исследования

Объектами исследований служили:

1) При изучении чувствительности микробиологического метода к антибиотикам различных групп споры *Geobacillus stearothermophilus* в составе питательного агара по Кундрату и 35 антибиотиков (Sigma Aldrich, Германия). Использовали антибиотики в концентрациях, которые являются максимально допустимыми (МДУ) согласно ТР ТС 034/2013: гентамицин 0,05 мг/кг, канамицин 0,1 мг/кг, неомицин 0,5 мг/кг, паромомицин 0,5 мг/кг, спектиномицин 0,5 мг/кг, стрептомицин 0,5 мг/кг, цефалексин 0,2 мг/кг, цефапирин 0,05 мг/кг, цефкином 0,05 мг/кг, линкомицин 0,1 мг/кг, фуразолидон 0,1 мг/кг, доксициклин 0,1 мг/кг, окситетрациклин 0,1 мг/кг, хлортетрациклин 0,1 мг/кг, тетрациклин 0,1 мг/кг, бензилпенициллин 0,05 мг/кг, ампициллин 0,05 мг/кг, амоксициллин 0,05 мг/кг, клоксациллин 0,3 , диклоксациллин 0,3 , нафциллин 0,3 , оксациллин 0,3 мг/кг.

В случаях отсутствия эффекта ингибирования роста спор *Geobacillus stearothermophilus* антибиотиками в концентрациях МДУ концентрацию увеличивали: данофлоксацин 4 мг/кг, марбофлоксацин 3 мг/кг, ципрофлоксацин 3 мг/кг, тилозин 0,2 мг/кг, тилмикозин 5 мг/кг, спирамицин 20 мг/кг, вальнемулин 0,5 мг/кг, тиамулин 10 мг/кг, тиамфеникол 5 мг/кг, триметоприм 0,2 мг/кг, бацитрацин 3 мг/кг, колистин 15 мг/кг, флорфеникол 20 мг/кг.

2) Для установления наличия антибиотиков и уровня контаминированного мяса, используемого при производстве сырокопчёных колбас, объектами исследования служили: основное мясное сырье (несоленое), используемое в рецептуре сырокопченых колбас, свинина (жилованная нежирная и полужирная, грудинка), говядина (жилованная высшего и первого сорта), мясо птицы (филе грудки); фарш, полученный из основного мясного сырья (несоленое) и отобранный для исследования до внесения не мясных ингредиентов согласно рецептуре (с целью исключения влияния их на результаты). Состав фарша по основному мясному сырью представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Мясная основа фарша для сырокопченых колбас

№	Наименование исследуемого образца	Содержание мясной основы в фарше, %	Сырокопченая колбаса, производимая из этого фарша
1	Фарш из мяса птицы №1	- филе грудки	«Чикен салями»
2	Фарш из свинины №1	- свинина нежирная 35 % - свинина жирная 40 %	«Ароматная»
3	Фарш из свинины №2	- свинина нежирная 35 %	«Салями Итальянская»
4	Фарш из свинины №3	- свинина нежирная 22 %	«Юбилейная»
5	Фарш из свинины №4	- свинина нежирная 15 % (целый кусок) – 26 % - свинина жирная 25 %	«Бургундия»
6	Фарш из говядины №1	- говядина высшего сорта 70 %	«Еврейская»
7	Фарш из говядины №2	- говядина 2 сорта 60 %	«Зернистая»

3) Для идентификации групп антибиотиков в качестве объектов исследования были взяты все положительные образцы на наличие антимикробных веществ, выявленные при проведении скрининга.

4) Для выявления патогенных бактерий рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes* в качестве объектов исследования были взяты: свинина (жилованная нежирная и полужирная, грудинка), говядина (жилованная высший и первый сорт), мясо птицы (филе грудок куриных) и фарш (из говядины, из свинины, из мяса птицы).

5) Состав микробного сообщества исследовали образцов фарша: из говядины, из свинины №1 (свинина нежирная 22 %), из свинины №2 (свинина

нежирная 35 %, свинина жирная 40 %), из мяса птицы. Образцы были отобраны на этапе приготовления фарша в куттере до внесения стартовой культуры.

6) Для оценки чувствительности к антибиотикам в качестве объектов исследования были взяты микроорганизмы выделенные: из мяса птицы и фарша из него: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, а также 32 штамма *Salmonella* spp., выделенных из 443 образцов (112 образцов от различных видов домашней птицы, 91 образец свинины, 103 образца говядины и 168 образцов мясного фарша), собранных в 2019 году.

7) Для оценки чувствительности микроорганизмов, входящих в состав стартовых культур, к антибиотикам исследовали *Staphylococcus carnosus (*L-1, L-2, L-4, L-6, L-7, L-9, L-11*), Lactobacillus sakei (L-3, L-12,L-16,L-18), Staphylococcus xylosus (L-5 ,L-8, L-10, L-14, L-19), Lactobacillus plantarum (L-20), Lactobacillus curvatus (L-21).* Они были выделены из следующих стартовых культур: BITEC SM 96 аром (Фрутаром продакшен ГмбХ, Германия), BITEC LS 25 (Фрутаром продакшен ГмбХ, Германия), Простарт HS (М Профуд Зрт. Венгрия), Safe Pro B-LC-77 (Хр.Хансен ГмбХ, Германия), Bactoferm SM-194 RU, (Хр.Хансен ГмбХ, Германия), Bactoferm T-SP (Chr. Hansen, Германия), ПротектСтарт (Moguntia Schweiz AG, Швейцария), MildSTART (Милдстарт) FB-CA4 (Швейцария), PrestoSTART (Престостарт) (Moguntia, Швейцария), Fermarom R4/160 (Frutarom Savory Solutions GmbH" ("Фрутаром Сэвори Солюшэнс ГмбХ", Германия), Lyocarni VBL-97 (Sacco S.r.l., ИТАЛИЯ).

8) Влияние антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур исследовали на *Staphylococcus carnosus* (L-2), *Lactobacillus sakei* (L-18), *Staphylococcus xylosus* (L-8), *Lactobacillus plantarum* (L-20). Для этого использовали растворы следующих антибиотиков: гентамицин 0,05 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, стрептомицин 0,5 мкг/см^3.

9) Изучение влияния антибиотиков на снижение pH микроорганизмами стартовых культур проводили на *Lactobacillus plantarum* (L-20) *и Lactobacillus sakei* (L-18), с использованием растворов антибиотиков: стрептомицин 0,5

мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, канамицин 0,1 мкг/см^3, гентамицин 0,05 мкг/см^3.

10) Для изучения влияния антибиотиков на процесс ферментации использовали модельные образцы ($К_1$-$К_6$), приготовленные согласно СТО 00419779-002-2013 «Метод ускоренного тестирования технологических свойств стартовых культур». Базовый состав модельного образца представлен в таблице 10 и антибиотик неомицин в концентрации 0,5 мг/кг.

Таблица 10 – Базовый состав модельного образца для изучения процесса ферментации

Наименование сырья	Количество сырья
Основное сырье, грамм на 1 кг	
Говядина жилованная высшего сорта	450
Свинина жилованная нежирная	250
Шпик свиной хребтовый	300
Прочие компоненты, грамм на 1 кг основного сырья	
Посолочная смесь «НИСО»	30,00
Глюкоза	3,50
Аскорбиновая кислота	0,75
Перец черный молотый	1,00

Состав и условное обозначение модельных образцов:

$К_1$ - контрольный образец: Модельный образец с *Staphylococcus carnosus*

$К_2$ - опытный образец: Модельный образец с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком неомицин в концентрации 0,5 мг/кг.

$К_3$ – контрольный образец: Модельный образец с *Lactobacillus sakei*;

$К_4$ - опытный образец: Модельный образец с *Lactobacillus sakei* и антибиотиком неомицин в концентрации 0,5 мг/кг;

$К_5$ - контрольный образец: Модельный образец с *Staphylococcus carnosus и Lactobacillus sakei*;

$К_6$ - опытный образец: Модельный образец с *Staphylococcus carnosus и Lactobacillus sakei* и антибиотиком неомицин в концентрации 0,5 мг/кг.

11) Для производственной апробации разработанного СТО была проведена выработка сырокопченых колбас с составом согласно таблице 10 (Контрольный образец, Опытный образец 2.1, Опытный образец 2.2, Опытный образец 3.1, Опытный образец 3.2). Опытные образцы были выработаны из мяса с антибиотиками, наличие которых было установлено микробиологическим скрининговым методом согласно ГОСТ Р 55481.

2.3 Методы исследования

Изучение чувствительности микробиологического метода ГОСТ Р 55481 проводили с помощью набора для определения антимикробных веществ (Биотест–Пущино, Россия). Набор состоит из плотной питательной среды по Кундрату с индикатором бромкрезоловый пурпурный и суспензии спор *Geobacillus stearothermophilus*. На водяной бане растапливали питательную среду, с последующим охлаждением при комнатной температуре до 50 °С. Затем питательную среду разливали в чашки Петри по 10 $см^3$. С помощью специального сверла определенного диаметра (9 мм) в затвердевшей среде делали лунки (не более семи лунок на одной чашке). Приготовление стоковых растворов из стандартов антибиотиков проводили согласно таблице 11.

Таблица 11 – Схема приготовления растворов антибиотиков

Группа антибиотиков	Название антибиотика	Вес, мг	Разбавитель	Объем разбавителя, мл	Стоковая концентрация, мг/мл
Аминогликозиды	Стрептомицин	5,4	H_20	4,132	1,0
	Паромомицин	6,0	H_20	5,091	1,0
	Канамицин А	5,5	H_20	3,274	1,0
	Неомицин	5,4	H_20	2,531	1,0
	Гентамицин	4,9	H_20	3,453	1,0

	Спектиномицин	-	H_2O	1,0	-
Пенициллины	Клоксациллин	5,9	H_2O	4,923	1,0
	Амоксициллин	6,8	H_2O	5,775	1,0
	Бензилпенициллин	-	H_2O	1,0	-
	Ампициллин	-	H_2O	1,0	-
	Диклоксациллин	-	H_2O	1,0	-
	Нафциллин	-	H_2O	1,0	-
	Оксациллин	-	H_2O	1,0	-
Хинолоны	Марбофлоксацин	6,1	NaOH 1 M	5,948	1,0
	Ципрофлоксацин	4,5	NaOH 1 M	4,428	1,0
	Данофлоксацин	6,1	NaOH 1 M	6,077	1,0
	Дифлоксацин	5,1	NaOH 1 M	4,360	1,0
Макролиды	Тилозин	5,0	DMF	3,980	1,0
	Тилмикозин	4,9	DMF	4,606	1,0
	Спирамицин	5,3	DMF	4,944	1,0
Тетрациклиновая группа	Тетрациклин	6,3	H_2O	5,677	1,0
	Окситетрациклин	5,2	H_2O	4,355	1,0
	Доксициклин	5,9	H_2O	5,059	1,0
	Хлортетрациклин	4,8	H_2O	4,149	1,0
Полимиксины	Колистин	4,4	H_2O	3,630	1,0
Фениколы	Тиамфеникол	6,2	DMF	6,132	1,0
	Флорфеникол	5,3	DMF	5,247	1,0
Линкозамиды	Линкомицин	4,7	H_2O	4,149	1,0
Плевромутилины	Тиамулин	5,1	DMF	4,124	1,0
	Вальнемулин	3,5	DMF	3,187	1,0

Цефалоспорины	Цефалексин	-	H_2O	1,0	-
	Цефапирин	-	H_2O	1,0	-
	Цефкином	-	H_2O	1,0	-
Производные диаминопиримидинов	Триметоприм	-	H_2O	1,0	-
Нитрофураны	Фуразолидон	-	H_2O	1,0	-

Примечание. H_2O - вода; NaOH 1 М - одномолярный раствор гидроксида натрия; DMF - N, N-Диметилформамид

Из полученных стоковых растворов, путем серийных разведений готовили рабочие растворы антибиотиков в выше заявленных концентрациях. Рабочие растворы антибиотиков вносили по 0,05 $см^3$ параллельно в две лунки питательного агара с помощью дозатора переменного объема. Чашки Петри с антибиотиками оставляли при комнатной температуре не менее чем на 30 минут (для диффузии раствора в питательную среду). Инкубацию чашек с образцами проводили при температуре 65 °С ±1 °С в термостате (Binder, Германия) в течение 4,0 ч ±0,5 ч. После термостатирования проводили измерения зоны ингибирования роста спор вокруг лунок. Зона ингибирования вокруг лунки шириной 2,0 и более мм, оценивали, как положительный результат. В зоне ингибирования роста *Geobacillus stearothermophilus* цвет среды не меняется.

При отсутствии роста *Geobacillus stearothermophilus* в зоне шириной менее 2,0 мм, оценивали как отрицательный результат, т.е. не возможность выявления антибиотика в исследуемой концентрации данным методом.

Наличие антимикробных химиотерапевтических веществ в объектах исследования устанавливали согласно ГОСТ Р 55481-2013 [66].

Идентификацию групп антибиотиков проводили на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences и Unisensor, США) с программным обеспечением BeadyExpress согласно инструкции к тест-системе BEADYPLEX KIT187.

Принцип действия прибора BEADYPLEX основан на многокомпонентном конкурентном проточно-цитометрическом иммуноанализе (FCIA) и позволяет

проводить одновременное скрининговое определение более 80 антибиотиков, входящих в 10 различных групп, в мясе продуктивных животных. Список тестируемых групп представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Перечень групп антибиотиков, тестируемых с помощью тест системы «BEADYPLEX»

№	Наименование группы	Наименование антибиотика
1.	Аминогликозиды	Канамицин, Гентамицин, Неомицин, Паромомицин, Апрамицин, Дигидрострептомицин, Стрептомицин, Тобрамицин
2.	Амфениколы (Фениколы)	Флорфеникол, Тиамфеникол, Хлорамфеникол
3.	В-лактамы	Цефалексин, Цефазолин,Цефкином, Цефтиофур, Оксациллин, Десфуроилцефтиофур, Цефоперазон, Нафциллин, Цефалоним, Пенициллин V, Цефапирин, Деацетилцефапирин, Цефацетрил, Пенициллин G, Ампициллин, Амоксициллин, Диклоксациллин, Клоксациллин, Пиперациллин
4.	Линкозамиды	Клиндамицин, Линкомицин
5.	Макролиды	Тилозин А, Лейкомицин, Спирамицин, Тилвалозин, Тилдипирозин, Тилмикозин (смесь изомеров),
6.	Плевромутилины	Тиамулин, Вальнемулин
7.	Полипептидные антибиотики	Колистин и Полимиксин В
8.	Хинолоны	Флумеквин, Ципрофлоксацин, Марбофлоксацин, Данофлоксацин, Энрофлоксацин, Оксолиновая к-та, Норфлоксацин, Дифлоксацин, Сарафлоксацин, Эноксацин, Пефлоксацин, Налидиксовая к-та Ломефлоксацин, Офлоксацин, Циноксацин,

9.	Сульфаниламиды	Сульфадимидин/Сульфаметазин, Сульфадоксин, Сульфадиметоксин, Сульфадиазин, Сульфаметоксазол, Сульфаметизол, Сульфапиридин, Сульфахлорпиридазин, Сульфагуанидин, Сульфатиазол, Сульфахиноксалин, Сульфаметоксипиридазин, Сульфамеразин, Сульфаклозин, Сульфамонометоксин, Сульфаметер, Сульфаниламид, Сульфизоксазол, Дапсон
10.	Тетрациклины	Тетрациклин, Окситетрациклин, Доксициклин, Хлортетрациклин, Демеклоциклин, Метациклин, 4-эпитетрациклин, Эпихлортетрациклин, Эпиокситетрациклин,

Исследования проводили согласно рекомендациям производителя. Результаты по присутствию антибиотиков в исследуемом образце определяется прибором автоматически путем считывания уровня внешней флуоресценции. Результаты предоставляются отчетом о присутствии или отсутствии каждой из 10 групп антибиотиков.

Исследование на наличие патогенных бактерий проводили в соответствии с ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*» [67] и ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» [68].

Микробное сообщество образцов фарша изучали с помощью метагеномного анализа**.** Для этого проводили выделение микробной ДНК с последующим секвенированием и биоинформационным анализом.

Выделение ДНК проводили на автоматической станции выделения ДНК MagNA Pure LC 2.0 (Roche, Mannheim, Germany) по протоколу MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (bacteria, fungi) (Roche) согласно инструкции производителя. Концентрацию тотальной ДНК измеряли на приборе Qubit 3.0 (Thermo Fisher). Оценку полученных геномов бактерий и контроль отсутствия ПЦР-ингибиторов

проводили путем постановки количественной ПЦР с праймерами (таблица 13) на вариабельный регион V_3-V_4 гена 16S рРНК на приборе Step One Plus (Applied Biosystems).

Таблица 13 – Праймеры на вариабельный регион V_3-V_4 гена 16S рРНК

Праймеры	Последовательность
16S Amplicon PCR – прямой праймер	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S Amplicon PCR – обратный праймер	5’TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC.

Из полученного материала согласно стандартному протоколу Illumina были приготовлены библиотеки ДНК для секвенирования вариабельных регионов V_3-V_4 гена 16S рРНК. Секвенирование образцов проводилось на платформе Illumina MiSeq.

Биоинформационный анализ. С помощью инструмента cutadapt v2.7 у полученных прочтений были удалены адаптерные последовательности и нуклеотиды с низким качеством прочтения. В результате проведенного анализа доля нуклеотидов с качеством прочтения не менее 30 (Phred ≥ 30) составляла более 92 % в каждом из исследуемых образцов. При помощи инструмента UCHIME v4.2 были удалены химерные последовательности. В качестве референса использовалось выравнивание последовательностей из базы данных Greengenes, предоставленное ресурсом Broad Institute. В среднем в образцах содержалось 12 % химерных последовательностей. Для каждого образца было получено более 7 400 пар прочтений хорошего качества без химер. Прочтения хорошего качества были классифицированы в оперативные таксономические единицы (OTE) с минимальной идентичностью 97 %. Для определения доли OTE в каждом из образцов, на репрезентативные последовательности OTE были наложены исходные чтения (включая низкокачественные и синглетоны) с минимальной идентичностью 97 % по всей длине чтения. Для этого использовали пакет программ usearch [69]. Идентификацию микроорганизмов по таконам по

последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием usearch и базы данных Silva. Для каждого образца было получено не менее 5000 тыс. последовательностей. Для описания разнообразия микробного сообщества проводили оценку альфа-разнообразия с помощью QIIME, чтобы представить.

Изучение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Штаммы микроорганизмов выращивали при температуре 37 °C в течение 24 часов на неселективном питательном агаре (TSA). Затем в стерильном физиологическом растворе готовили суспензию бактериальных клеток мутностью равной 0,5 по стандарту Мак-Фарланда, что соответствует концентрации клеток $1,5*10^8$ КОЕ/см^3. Тест на чувствительность к антибиотикам проводили диско-диффузным методом в соответствие с Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам [70]. Для этого использовали диски, пропитанные следующими противомикробными веществами: ампициллин 10 мкг, имипенем 10 мкг, амикацин 30 мкг, стрептомицин 10 мкг, тобрамицин 10 мкг, цефотаксим 30 мкг, цефазолин 30 мкг, триметоприм/сульфаметоксазол 1,25/23,75 мкг, хлорамфеникол 30 мкг, азитромицин 15 мкг, амоксициллин/клавулановая кислота 20/10 мкг, фурадонин 300 мкг, тетрациклин 30 мкг (Oxoid ™ DMM063-ThermoFisher Scientific).

Подготовленную суспензию микроорганизмов наносили на чашку Петри и равномерно распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона с помощью стерильных ватных палочек. Затем сверху агара с нанесенной культурой микроорганизма помещали диски с антибиотиками. Чашки инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. По окончании времени культивирования посевов измеряли зону ингибирования роста микроорганизма с точностью до миллиметра. В зависимости от величины зоны ингибирования роста микроорганизмы классифицировали как восприимчивые, промежуточные и устойчивые в соответствии с CLSI (2019) [70]. *Escherichia coli* ATCC 25922 (Манассас, штат Вирджиния, США) использовали для контроля качества исследования. Изоляты, устойчивые к трем или более различным классам противомикробных препаратов, были определены как мультирезистентные.

Выделение штаммов микроорганизмов из стартовых культур. Выделение и идентификацию бактерий рода *Staphylococcus*, входящих в состав стартовых культур, проводили путем накопления 1 г препарата в 10 см^3 TSB бульона. Инкубировали при температуре 37 °С в течении 24 ч. По истечении времени инкубации был произведен рассев на плотную питательную среду Байрд-Паркер агар. Чашки инкубировали при 37 °С в течении 24 ч. По истечении времени инкубации проводили отбор отдельных колоний на TSA агар.

Выделение и идентификацию бактерий рода *Lactobacillus*, входящих в состав стартовых культур, проводили путем накопления 1 г препарата в 10 см^3 MRS бульона. Инкубировали при температуре 30 °С в течении 24 ч. По истечении времени инкубации был произведен рассев на плотную питательную среду MRS агар. Чашки инкубировали при 30 °С в течении 48 ч в микроаэрофильных условиях. По истечении времени инкубации производили отбор отдельных колоний на MRS агар. Идентификацию всех выделенных бактериальных изолятов проводили на масс-спектрометрафотометре MALDI Biotyper Microflex.

Оценка антимикробной чувствительности. Штаммы бактерий рода *Staphylococcus* выращивали на питательном агаре при 37 °С в течение 24 ч, а бактерии рода *Lactobacillus* на MRS агар при 30 °С в течение 24 ч. Затем в стерильном физиологическом растворе готовили суспензию клеток мутностью равную 0,5 по стандарту Мак-Фарланда, что соответствовало концентрации 1,5*10^8 КОЕ/см^3. Для определения чувствительности к антибиотикам были использованы растворы антибиотиков в концентрациях МДУ согласно приложению 5 ТР ТС 034/2013: доксициклин 0,1 мкг/см^3, канамицин 0,1 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, стрептомицин 0,5 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, ципрофлоксацин 0,1 мкг/см^3, гентамицин 0,05 мкг/см^3, колистин 0,15 мкг/см^3 (Sigma Aldrich, Германия). 100 мкл суспензии клеток рода *Staphylococcus* равномерно распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона и 100 мкл суспензии клеток рода *Lactobacillus* по поверхности агара MRS с помощью стерильных шпателей. После этого с помощью сверла делали лунки в агаре и вносили по 0,05 см^3 раствора антибиотика. Чашки в течение 24 часов

инкубировали при 37 °С при исследовании чувствительности бактерий рода *Staphylococcus* и при 30 °С при исследовании чувствительности бактерий рода *Lactobacillus*. По истечении времени инкубации измеряли диаметр зоны ингибирования роста и записывали с точностью до миллиметра.

Изучение влияния антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур. Динамику роста *Staphylococcus xylosus* (L-8), *Staphylococcus carnosus* (L-2), *Lactobacillus plantarum* (L-20), *Lactobacillus sakei* (L-18) изучали на модельных средах в присутствии антибиотиков. Для этого в колбы с MRS бульоном по 100 см^3 вносили по 1 см^3 суспензию клеток в концентрации 1*10^8 КОЕ/см^3 и один из антибиотиков: неомицин 0,5 мкг/см^3, стрептомицин 0,5 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, гентамицина 0,05 мкг/см^3. Посевы инкубировали при 37 °С и 30 °С в зависимости от исследуемого микроорганизма в течение 72 ч с 24-часовыми интервалами отбора образцов для мониторинга роста бактериальных клеток. Динамику роста изучали путем измерения плотности клеток с помощью Спектрофотометра OD600 DiluPhotometer. Для измерения оптической плотности использовали светодиод 600 нм.

Изучение влияния антибиотиков на снижение pH микроорганизмами стартовых культур проводили в MRS бульоне с использованием штаммов *Lactobacillus plantarum и Lactobacillus sakei*. Для этого в бульон MRS в объеме 99 см^3 вносили 1 см^3 суспензию бактериальных клеток в концентрации 2*10^8 КОЕ/см^3 и один из антибиотиков (канамицин 0,1 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, стрептомицин 0,5 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, гентамицин 0,05 мкг/см^3). Культивирование посевов проводили при температуре при 24°С (приближенной к процессу ферментации сырокопченых колбас). В качестве контроля использовали образец без антибиотика. Измерения pH культуральной жидкости проводили сразу после внесения антибиотика (0 точка), через 24 и 48 часов культивирования с помощью pH-метра.

Определение нитрита натрия проводили согласно ГОСТ 8558.1-2015 «Продукты мясные. Методы определения нитрита [71].

Определение pH проводили согласно ГОСТ Р 51478-99 «Мясо и мясные продукты. Контрольный метод определения концентрации водородных ионов (pH)» [72].

Содержание жира проводили согласно ГОСТ 23042-2015 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира» [73].

Определение амино-аммиачного азота (ААА) проводили согласно ГОСТ Р 55479-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод определения амино-аммиачного азота» [74].

Определение тиобарбитурового числа проводили согласно ГОСТ Р 55810-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод определения тиобарбитурового числа» [75].

Определение кислотного числа проводили согласно ГОСТ Р 55480-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод определения кислотного числа» [76].

Определение белка проводили согласно ГОСТ 25011-2017 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка» [77].

Определение перекисного числа проводили согласно ГОСТ 34118-2017 «Мясо и мясные продукты. Метод определения перекисного числа» [78].

Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) проводили согласно ГОСТ 31747-2012 [79].

Определение сульфитредуцирующих клостридий проводили согласно ГОСТ 29185-2014 [80].

Определение *Staphylococcus aureus* проводили согласно ГОСТ 31746-2012 [81].

Определение бактерий рода *Salmonella* проводили согласно ГОСТ 31659-2012 [68].

Определение *L.monocytogenes* проводили согласно ГОСТ 32031-2012 [67].

Определение *E. coli* проводили согласно ГОСТ 30726-2001 [82].

Определение молочнокислых бактерий (МКБ) проводили согласно ГОСТ 10444.11-2013 [83].

Определение остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ проводили согласно ГОСТ Р 55481-2013 [66].

Активность воды исследовали согласно ГОСТ ISO 21807-2015 Микробиология пищевой продукции и кормов. Определение активности воды [84].

Цветовые характеристики мышечной ткани (светлоты (L), красноты (a) и желтизны (b)) изучали на спектроколориметром «Спектротон»

Мультисенсорные показатели аромата исследовали на приборе «VOCmeter» («Электронный нос») согласно Методические указания по проведению мультисенсорных исследований;

Методика анализа уязвимых этапов (FMEA). При применении метода каждый потенциально уязвимый этап производства оценивали экспертным путем по трем критериям: тяжесть последствий (S), вероятность возникновения (O) и вероятность обнаружения (D) несоответствия, используя условные обозначения [85].

Оценка тяжести последствий по отношению к ущербу для здоровья потребителя и нарушения технологии производства (S) осуществлялась согласно таблице 14.

Таблица 14 – Критерии оценки тяжести/значимости последствий (S)

Тяжесть последствий	Критерий	Ранг
Очень высокая	Критическое влияние (необратимый вред здоровью потребителя или невозможность реализации технологии производства)	5
Высокая	Существенное влияние (серьезные нарушения здоровья, может браковаться до 100 % партии продукции)	4
Умеренная	Умеренное влияние (серьезные нарушения,	3

	может потребоваться сортировка продукции, когда часть ее партии бракуется, может браковаться до 50-75 % партии продукции)	
Низкая	Может браковаться до 10 % партии продукции	2
Отсутствует	Вероятность, близкая к нулю, что риск может иметь какие-либо ощутимые последствия	1

Оценка вероятности возникновения риска, приводящего к уязвимости этапа (O) осуществлялась согласно таблице 15.

Таблица 15 – Критерии оценки вероятности возникновения риска (O)

Вероятность возникновения	Критерий	Ранг
Отсутствует	наступление риска маловероятно	1
Низкая	вероятность возникновения риска сведена к минимуму предупреждающими действиями	2
Умеренная	редкое возникновение риска	3
Высокая	частое возникновение риска	4
Очень высокая	возникновение риска неизбежно	5

Оценку вероятности обнаружения несоответствия (D) осуществляли согласно таблице 16.

Таблица 16 – Критерии оценки вероятности обнаружения (D)

Вероятность обнаружения	Критерий	Ранг
Вероятность обнаружения почти невозможна	абсолютная уверенность в не обнаружении риска	5
Обнаружение слабое	при контроле можно обнаружить риск с низкой вероятностью	4
Обнаружение умеренное	при контроле можно обнаружить риск	3

Обнаружение высокое	при контроле хорошие шансы обнаружить риск (50 %)	2
Обнаружение очень высокое	при контроле можно обнаружить риск	1

После получения экспертных оценок в баллах для тяжести последствий (S), вероятности возникновения (O) и вероятности обнаружения (D) рисков путем их перемножения определяли приоритетное число риска (ПЧР). ПЧР – обобщенная количественная характеристика риска уязвимости, которая показывает наиболее существенные возможные причины уязвимости. По установленному значению принимают решение о необходимости принимать предупреждающие. Каждый из этих трех параметров определен в баллах в пределах от 1 до 5,то ПЧР может быть в пределах от 1 до 125.

После определения ПЧР для каждого параметра высчитывали ПЧРэт (приоритетное число риска этапа), которое показывает наиболее уязвимый этап производства. Значение показателя определяли путем сложения каждого из установленного значения для ПЧР. Для ПЧРэт должен быть заранее установлен критерий R (граничное значение ПЧРэт). Значение устанавливается заранее сформированной командой экспертов, которые осуществляют сбор, изучение исходных данных и выбирают процессы, подлежащие анализу. После проведенных расчетов заполняли протокол, представленный в виде таблицы (таблица 17) [86].

Таблица 17 – Протокол FMEA

Потенциально уязвимый этап	Причина уязвимости	Возможные последствия	Вероятная причина	S	O	D	ПЧР
ПЧРэт							

Примечание: S- Значимость последствий, O-вероятность возникновения, D- возможность обнаружения

После разработки действий по улучшению качества проводили повторный анализ с использованием данного протокола с дополнениями в протокол согласно таблице 18.

Таблица 18 – Протокол FMEA (продолжение)

Потенциально уязвимый этап	Меры по предотвращению	Меры по обнаружению	Предпринятые действия	S	O	D	ПЧР

В протокол вносили все возможные мероприятия по обнаружению и предупреждению риска и анализировали их посредством сравнения ПЧР до и после предпринятых действий, а в дальнейшем сравнения ПЧРэт с предельным значением ПЧРгр. При снижении риска до приемлемого уровня выбирали такие предупреждающие и корректирующие мероприятия, которые являются легко реализуемыми с наименьшими затратами времени и средств.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение чувствительности микробиологического метода для расширения возможности выявления различных групп антибиотиков в продуктах убоя животных[1]

Согласно Приложению 5 ТР ТС 034/2013 и Решения № 28 Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 г была расширена линейка исследуемых в пищевых продуктах антибиотиков. Была проведена исследовательская работа по оценке чувствительности качественного микробиологического метода ГОСТ Р 55481 для выявления остаточных количеств антимикробных веществ.

На первом этапе работы было изучено влияние 35 различных антибиотиков в концентрациях МДУ, установленных для мяса, на рост спор *Geobacillus stearothermophilus* в составе питательной среды по Кундрату. Результаты представлены на рисунке 2.

[1] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье: Расширение возможности использования мультискрининговогo микробиологического метода для определения химиотерапевтических препаратов в мясе / Батаева, Д.С. Зайко Е.В. и др. // Все о мясе – 2019 – № 3 – С. 36-39

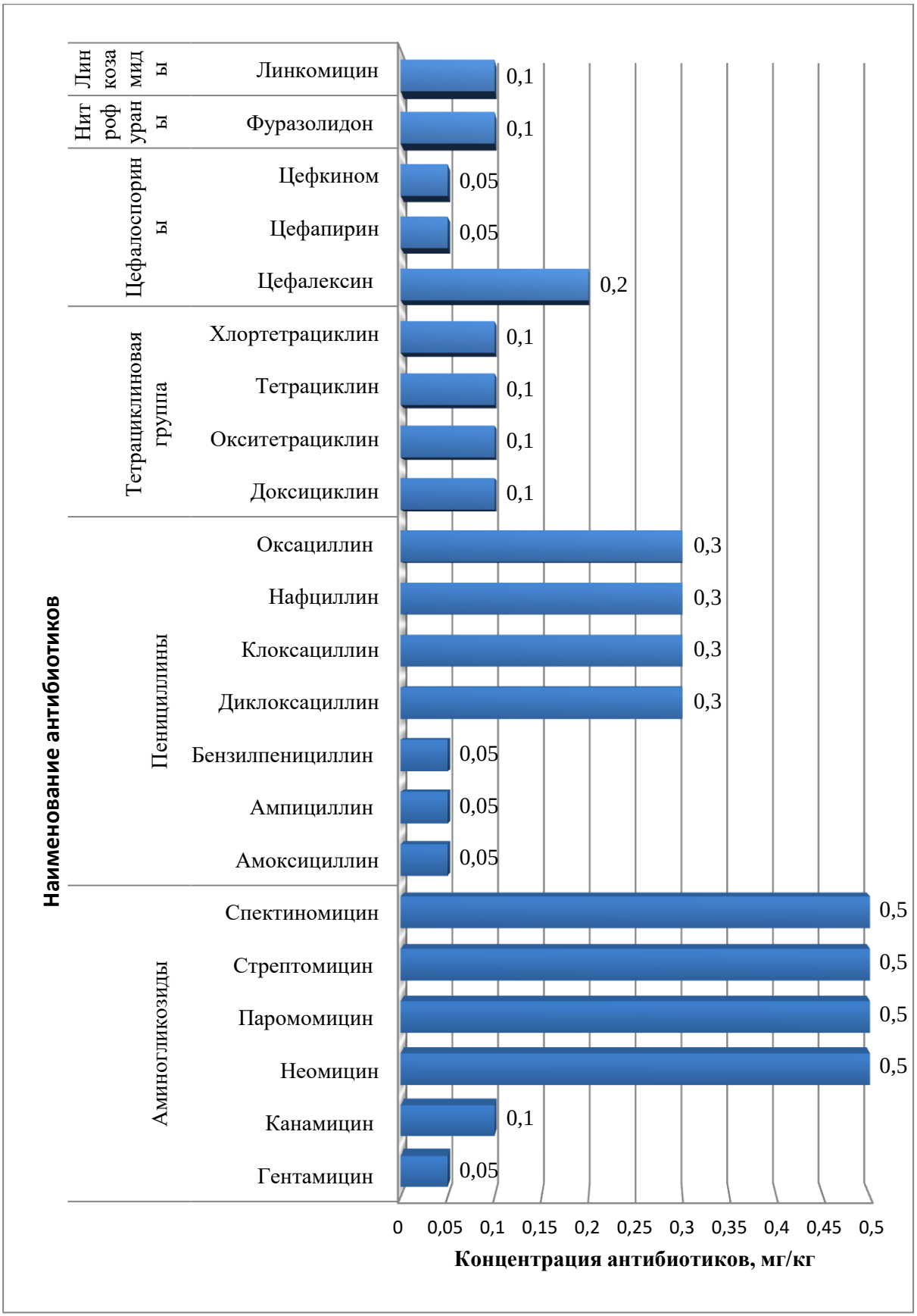


Рисунок 2 – Результаты ингибирования роста спор *Geobacillus stearothermophilus* (более 2 мм) антибиотиками различных групп на уровне МДУ

Из 35 исследуемых антибиотиков 22 антибиотика ингибировали рост тест-микроорганизма *Geobacillus stearothermophilus* в концентрациях МДУ, установленного для мяса. Это свидетельствует о чувствительности метода к этим антибиотикам и возможности выявления в случае присутствия в мясе и продуктах убоя антибиотиков шести групп, таких как, цефалоспорины, антибиотиков тетрациклиновой группой, пенициллиновой группой, а также аминогликозидов, нитрофуранов и линкозамидов.

Антибиотики, которые не проявляли ингибирующую способность в концентрациях МДУ, были исследованы в концентрациях, превышающих МДУ. Результаты исследования представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты ингибирования антибиотиками роста *Bacillus stearothermophilus*

Группа антибиотиков	Наименование антибиотика	Концентрация антибиотика, мг/кг	
		МДУ	ингибирующая рост тест-штамма
Хинолоны	Данофлоксацин	0,2	4
	Марбофлоксацин	0,15	3
	Ципрофлоксацин	0,1	2
Макролиды	Тилозин	0,1	0,2
	Тилмикозин	0,05	5
	Спирамицин	0,2	20
Плевромутилины	Вальнемулин	0,05	0,5
	Тиамулин	0,1	10
Амфениколы	Тиамфеникол	0,05	5
Производные диаминопиримидинов	Триметоприм	0,05	0,2
Полипептиды	Бацитрацин	0,15	3

Полимиксины	Колистин	0,15	15
Флорфениколы	Флорфеникол	0,2	20

Несмотря на то, что концентрации 13 антибиотиков, ингибирующие рост тест-штамма, находятся выше МДУ, указанного в ТР ТС 034/2013, это не ограничивает возможности метода по их выявлению. Это показывает возможность выявления этих антибиотиков, но в случае присутствия в более высоких концентрациях антибиотиков.

Таким образом, основываясь на новых научных данных список выявляемых антибиотиков, приведенных в Приложении А ГОСТ Р 55481, будет расширен на 35 антибиотиков из 14 групп. Это количество антибиотиков составляет 68,6 % от всех заявленных в ТР ТС 034/2013. Из нормируемых антибиотиков 43,1 % можно будет выявить на уровне МДУ (ТР ТС 034/2013 (приложение 5)), 25,5 % от нормируемых антибиотиков можно выявить выше МДУ (рисунок 3).

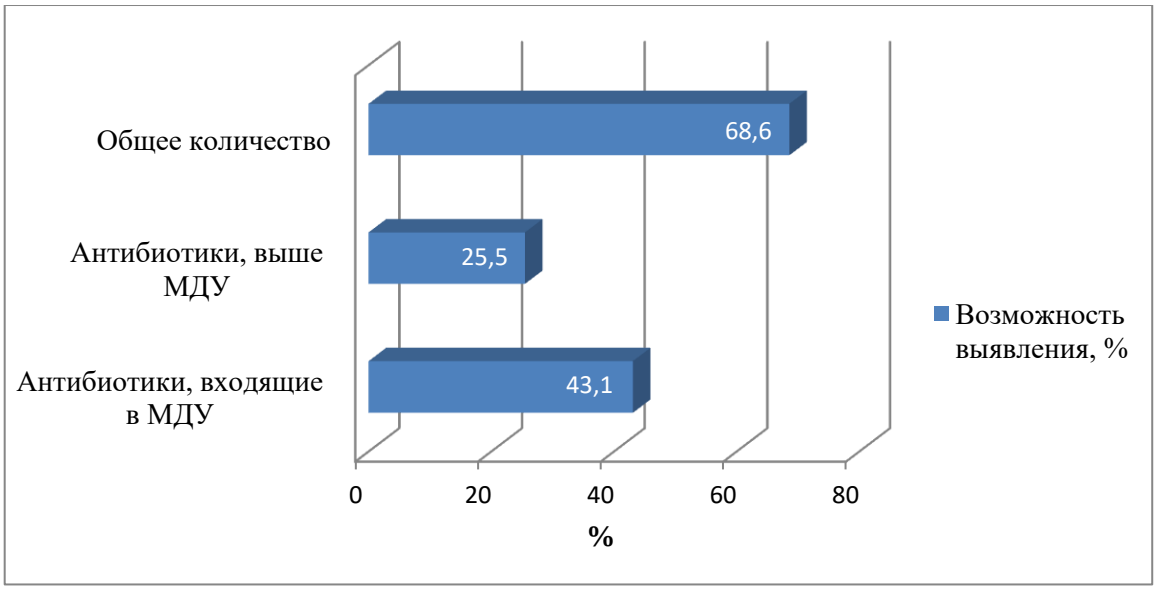


Рисунок 3 – Возможности выявления антибиотиков качественным микробиологическим методом

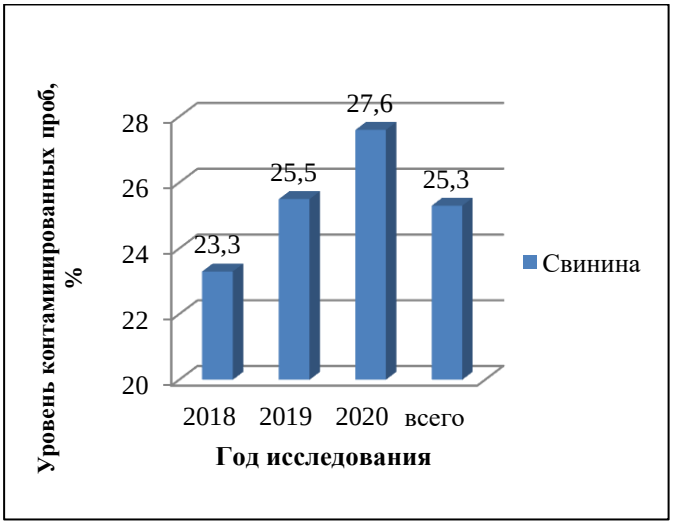
Уникальность метода заключается в том, что выявить антибиотики возможно одновременно. При этом не требуется специального оборудования, а также высококвалифицированного персонала для его применения. При этом максимальная продолжительность исследования занимает не более 8 часов.

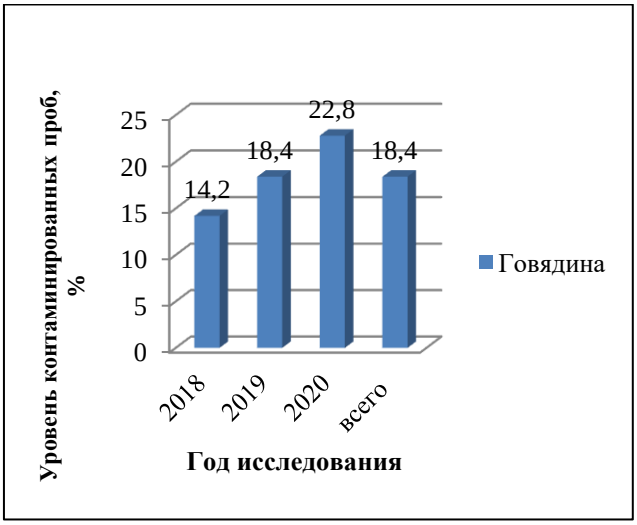
Чувствительность метода к 35 антибиотикам является основанием для более масштабных скрининговых исследований, в частности мясного сырья, представленного на рынке и используемого в производстве сырокопченых колбас.

3.2 Оценка мяса и фарша для производства сырокопченых колбас на наличия антимикробных веществ[2]

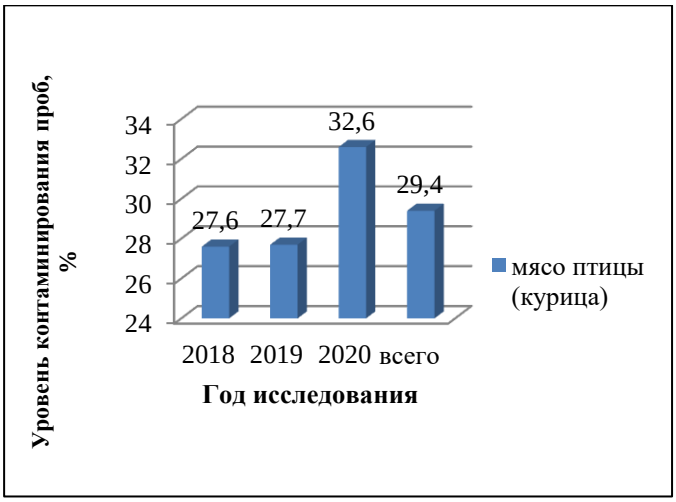
Было проведено исследование мяса и фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие антимикробных веществ. Исследования проводили на протяжении трех лет с 2018-2020 гг. Всего было проанализировали 1498 образцов, из которых 294 образцов свинины, 554 говядины, 269 образцов мяса птицы и 381 образец фарша. Все образцы были отобраны на предприятиях по производству сырокопченых колбас.

За три года исследований было установлено, что 25,3 % (n=74) образцов свинины, 18,4 % (n=102) образцов говядины и 29,4 % (n=79) мяса птицы содержали антимикробные вещества (рисунок 4), что составляет 22,8 % (n=255) от основного мясного сырья, используемого в производстве сырокопченых колбас.





[2] Материал, изложенный в данном разделе, частично опубликован в статье:
Идентификация рисков связанных с сырьем животного происхождения / Зайко Е.В., Батаева Д.С. // Теория и практика переработки мяса – 2018- 3- 4 - С 23-31



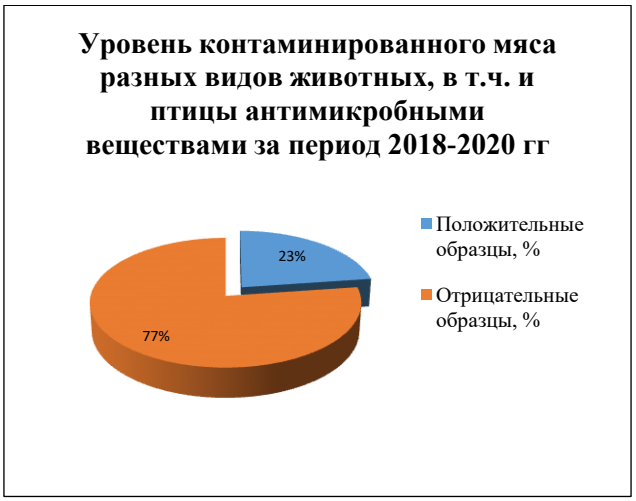


Рисунок 4 – Уровень контаминированного антимикробными веществами мяса, используемого для производства сырокопчёных колбас с 2018 по 2020 гг.

Количество контаминированной антимикробными веществами свинины, как и других видов мяса, в каждом последующим за 2018 годом увеличивалось.

Так в 2018 г было контаминировано 23,3 % свинины от числа исследованных образцов, в 2019 году это значение возросло до 25,5 %, а 2020 году – до 27,6 %.

Максимальное количество проб говядины (22,8 %) с антимикробными веществами было выявлено в 2020 году, что на 38 % больше чем в 2018 году и на 20 % чем в 2019 г.

В мясе птицы в течение первых двух годов исследования процент контаминированных образцов находился практически на одном уровне в пределах 27,6 – 27,7 %. Однако в 2020 году количество таких образцов увеличилось и составило 32,6 %.

Тенденция выявляемости антимикробных химиотерапевтических веществ в мясе для производства сырокопченых колбас, в течение 2018-2020 гг. представлена на рисунке 5.

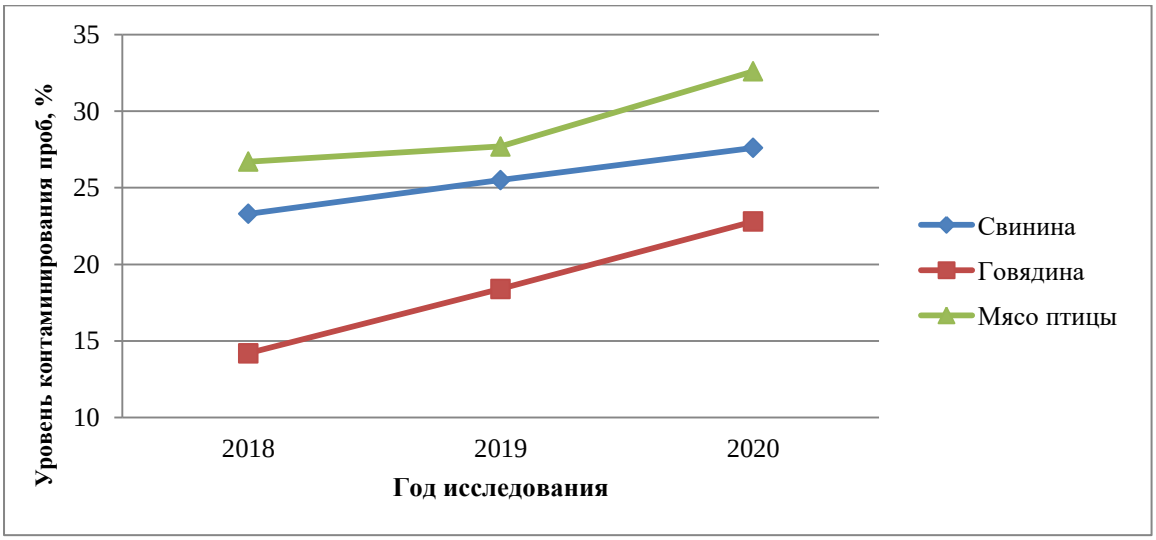


Рисунок 5 – Тенденция выявляемости антимикробных химиотерапевтических веществ в мясе для производства сырокопченых колбас, в течение 2018-2020 гг.

Наиболее динамичные данные представлены по говядине, контаминированной антимикробными веществами с 14,2 % в 2018 году до 22,8 % в 2020 г. Однако мясо птицы является наиболее контаминированным антимикробными веществами видом мясного сырья, используемого в производстве сырокопченых колбас.

Представлял большой интерес фарш, используемый для производства сырокопченых колбас, на наличие антимикробных веществ. Ранжирование проб фарша проводилось по преобладающему виду мясного сырья в составе: фарш из свинины, фарш из говядины, фарш из мяса птицы. Результаты исследования представлены на рисунке 6.

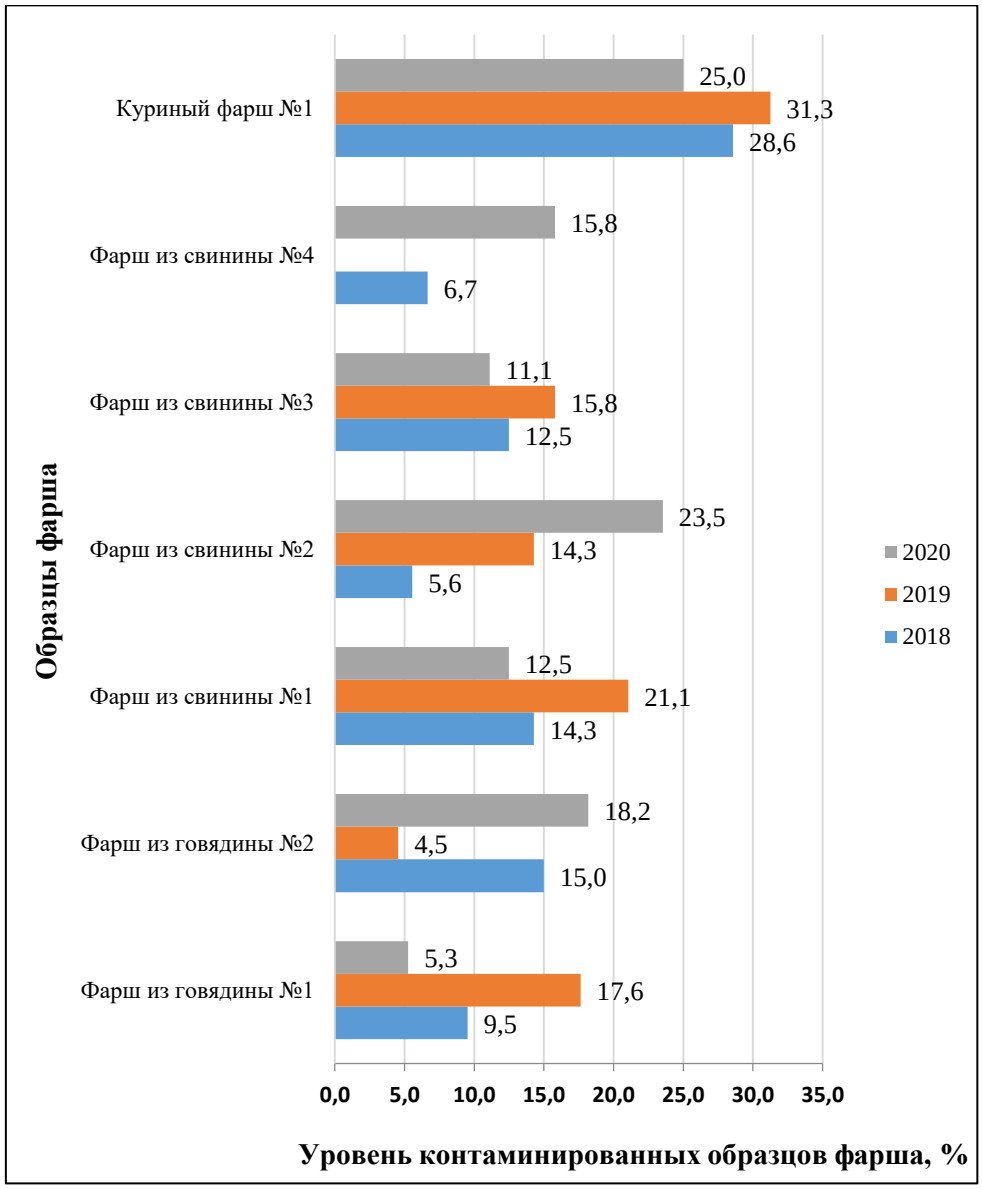


Рисунок 6 – Уровень контаминированного антимикробными веществами фарша, используемого для производства сырокопчёных колбас с 2018 по 2020 гг.

Уровень контаминированных проб фарша из говядины за весь исследуемый период составила 11 %, фарша из свинины – 40 %, а фарш из мяса птицы был контаминирован антимикробными веществами в 49 % (рисунок 7).

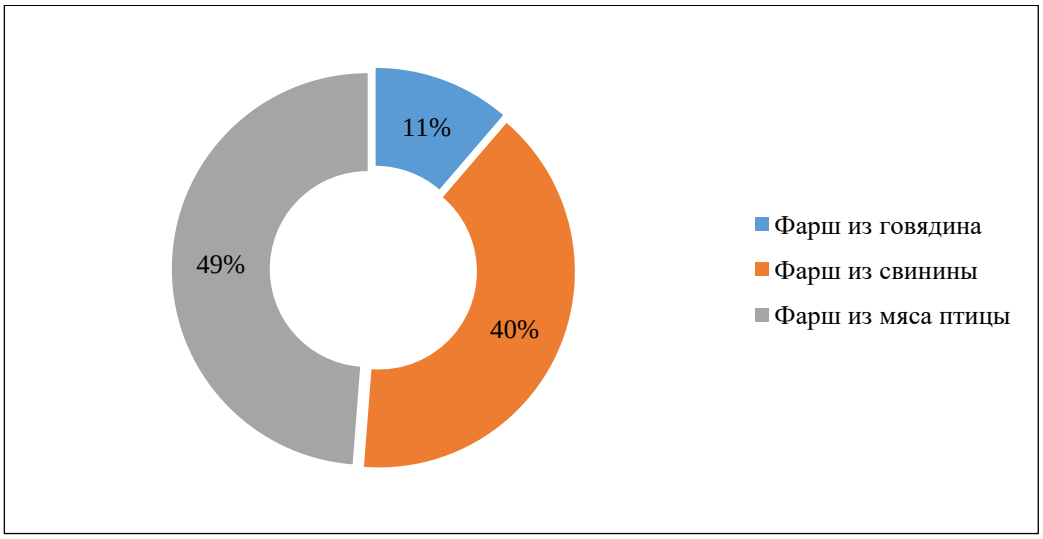


Рисунок 7 – Уровень контаминации антимикробными веществами фарша, используемого для производства сырокопченых колбас

Анализируя распределение положительных образцов по годам, была отмечена динамика в выявляемости антимикробных веществ в фарше из свинины с 5,8 % в 2018 г и до 9,1 % в 2020 г (рисунок 8). Контаминация фарша из говядины при этом не превышала 2,3 %.

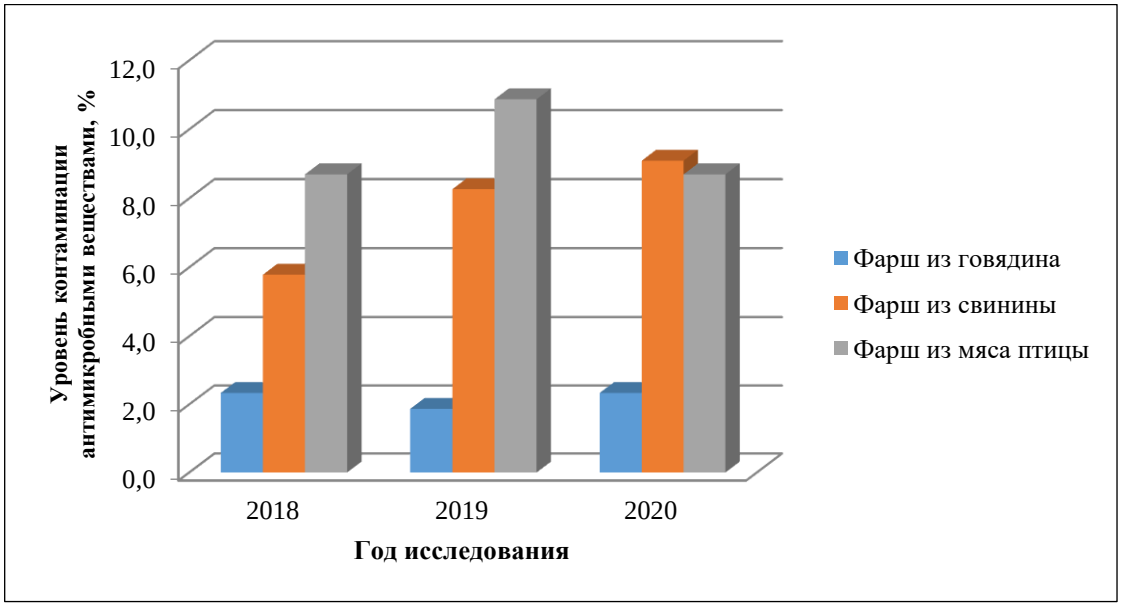


Рисунок 8 – Результаты контаминации фарша антимикробными веществами по годам

Установлено, что на производство сырокопченых колбас поступает и используется до 22,8 % мяса разных видов убойных животных, в т.ч. и птицы содержащее антимикробные вещества.

3.3 Идентификация групп антибиотиков, выявленных в мясе и фарше[3]

Представлял научный интерес изучение всех образцов мяса, содержащих антимикробные вещества, с точки зрения представленных групп антибиотиков, которые могут попадать в организм человека через пищевой продукт. Были исследованы образцы говядины в количестве 102, свинины - 74 образца и мясо птицы - 79 образцов.

В нашей стране в рамках данной диссертационной работы впервые была апробирована методика с использованием проточно-цитометрического анализатора Beadyplex для идентификации групп антибиотиков в образцах мяса и фарша.

Результаты распространенности групп антибиотиков с 2018 по 2020 года в говядине представлены на рисунке 9. Установлено, что аминогликозиды, фениколы и бета-лактамы занимали лидирующие позиции по частоте обнаружения в говядине. Выявляемость аминогликозидов составляла 24,5 %, фениколов – 25,5 %, а бета-лактамов – 15,7 %. Частота обнаружения колистина (полипептидные антибиотики) составила 8,8 %, макролидов – 7,8 %, фторхинолонов – 5,9 %, а тетрациклиновой группы 4,9 %. Наименее часто образцы были контаминированы сульфаниламидами и линкозамидами по 2,0 % каждого.

[3] Материал, изложенный в данном разделе, частично опубликован в статье: Зайко, Е.В. Идентификация антибиотиков в мясе. Возможности проточной цитометрии / Е.В. Зайко, О.А. Кузнецова, Д.С. Батаева, М.А. Грудистова // Все о мясе. – 2020. – № 5. – С. 56-60.

Рисунок 9 – Результаты идентификации групп антибиотиков, выявленных в говядине за 2018-2020 гг.

Анализируя распределение идентифицированных групп антибиотиков в говядине по годам, было установлено, что присутствие аминогликозидов составляло 23,8-25,0 %, фениколов 21,4 % в 2018 г и 28,1 % в 2019 г (рисунок 10). Также было отмечено уменьшение по выявляемости макролидов с 10,7 % в 2018 г до 7,1 % в 2020 г.

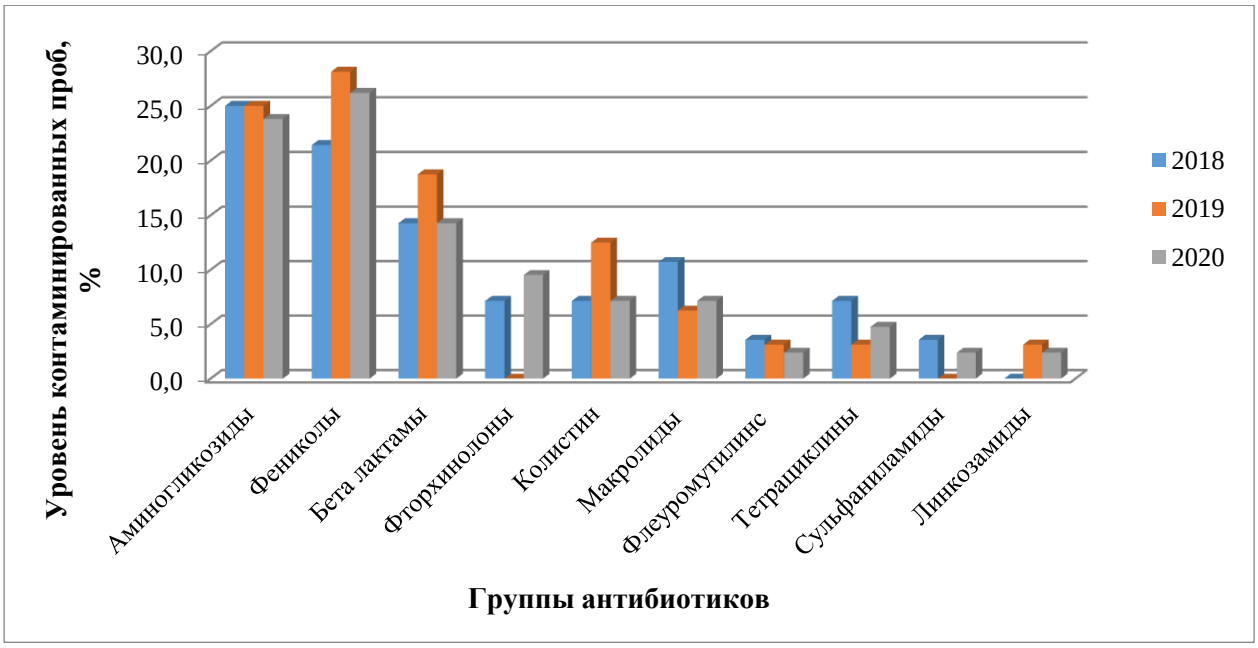


Рисунок 10 – Распределение по годам групп антибиотиков, выявленных в говядине за 2018 - 2020 гг.

В образцах говядины, в которых были обнаружены антимикробные химиотерапевтические вещества, установили присутствие всех 10 групп антибиотиков, тестируемых набором BEADYPLEX KIT187.

В образцах свинины наиболее часто идентифицировались тетрациклины – 23,0 %, сульфаниламиды – 14,9 % и колистин – 9,5 % (рисунок 11). Бета-лактамы, фторхтнолоны, макролиды, линкозамиды и фениколы были обнаружены в равной степени по 8,1%. Наименее распространенной группой антибиотиков являлись аминогликозиды – 4,1 %. Плевромутилины обнаружены не были. Таким образом, в свинине было установлено наличие 9 групп антибиотиков.

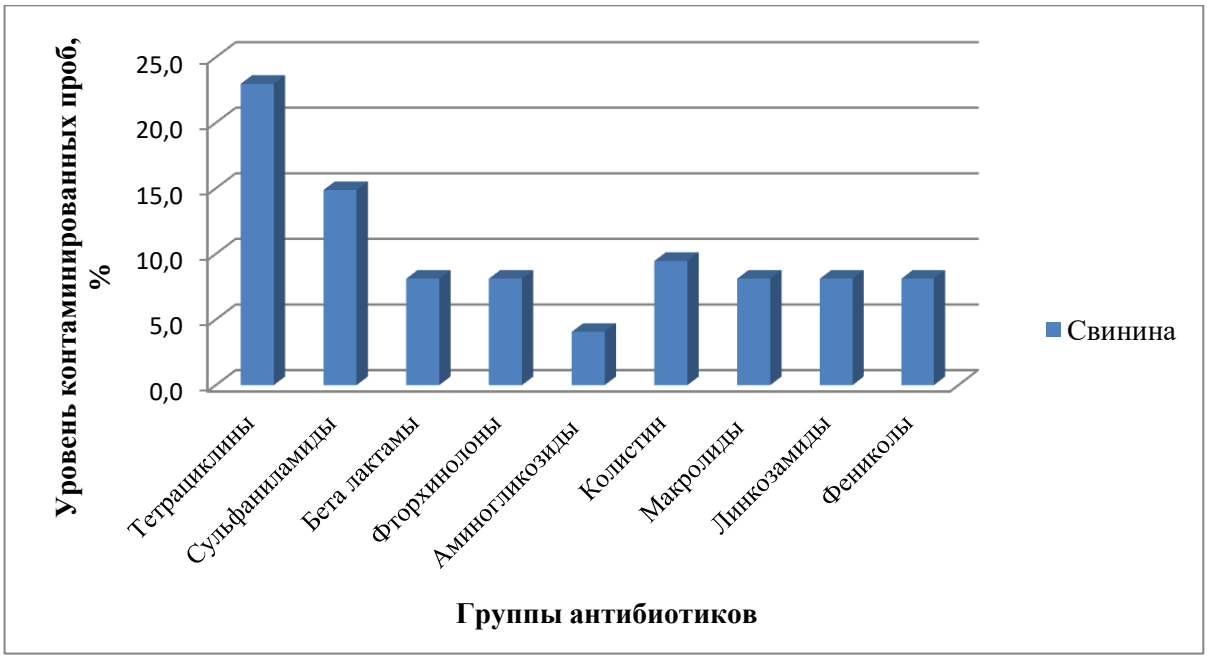


Рисунок 11 – Результаты идентификации групп антибиотиков, выявленных в свинине за 2018-2020 гг.

Анализ выявляемости различных групп антибиотиков в свинине с 2018 по 2020 года представлен на рисунке 11. В 2018 году в свинине наиболее часто идентифицировались сульфаниламиды – 20,8 %, тетрациклины 16,7 % и бета-лактамы, фторхинолоны и фениколы были обнаружены по 12,5 % каждого. Результаты представлены на рисунке 12.

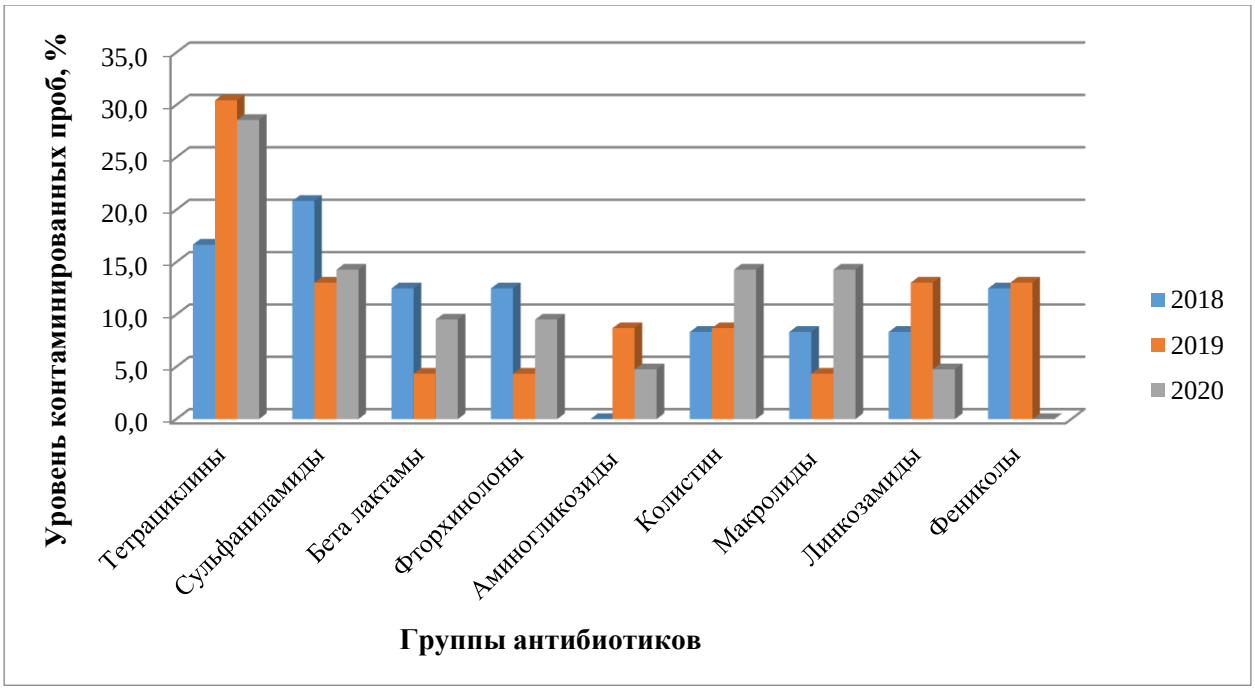


Рисунок 12 – Распределение групп антибиотиков, выявленных в свинине в 2018 - 2020 гг.

В 2019 и 2020 гг. лидирующее место по выявляемости в образцах свинины занимала группа тетрациклины по 30,4 % и 28,6 %, соответственно. После тетрациклиновой группы в 2018 году преобладали сульфаниламиды, линкозамиды и фениколы по 13,0 % каждого, а в 2020 году сульфаламиды, колистин и макролиды по 14,3 % каждого.

Анализируя полученные данные можно сказать, что на протяжении трех лет частота обнаружения тетрациклиновой группы и сульфаниламидов была выше, чем остальных групп антибиотиков. Это может свидетельствовать об интенсивном их использовании в животноводстве.

В образцах мяса птицы наиболее часто встречались фениколы – 16,2 %, сульфаниламиды и тетрациклиновая группа по 14,7 % (рисунок 13).

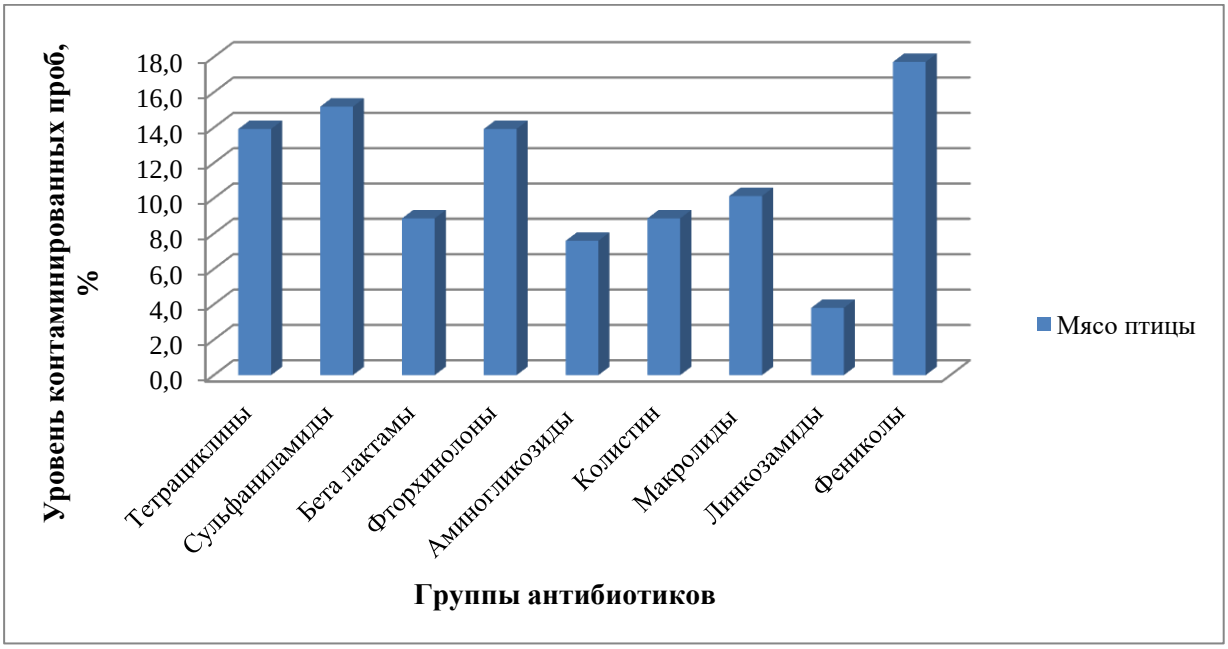


Рисунок 13 – Результаты идентификации групп антибиотиков, выявленных в мясе птицы за 2018-2020 гг.

Фторхинолоны и макролиды содержались 13,9 % и 10,1 %, соответственно. Бета-лактамы и колистин (полипептидные антибиотики) содержались в равных долях по 8,9 % каждого. Аминогликозиды были обнаружены в 7,6 % образцов и менее распространенной группой в мясе птицы были линкозамиды. Они были

выявлены в 3,8 % исследуемых образцов. Плевромутилины в исследуемых образцах обнаружены не были. В мясе птицы было установлено наличие 9 групп антибиотиков.

Результаты распространенности групп антибиотиков в мясе птицы с 2018 по 2020 год представлены на рисунке 14.

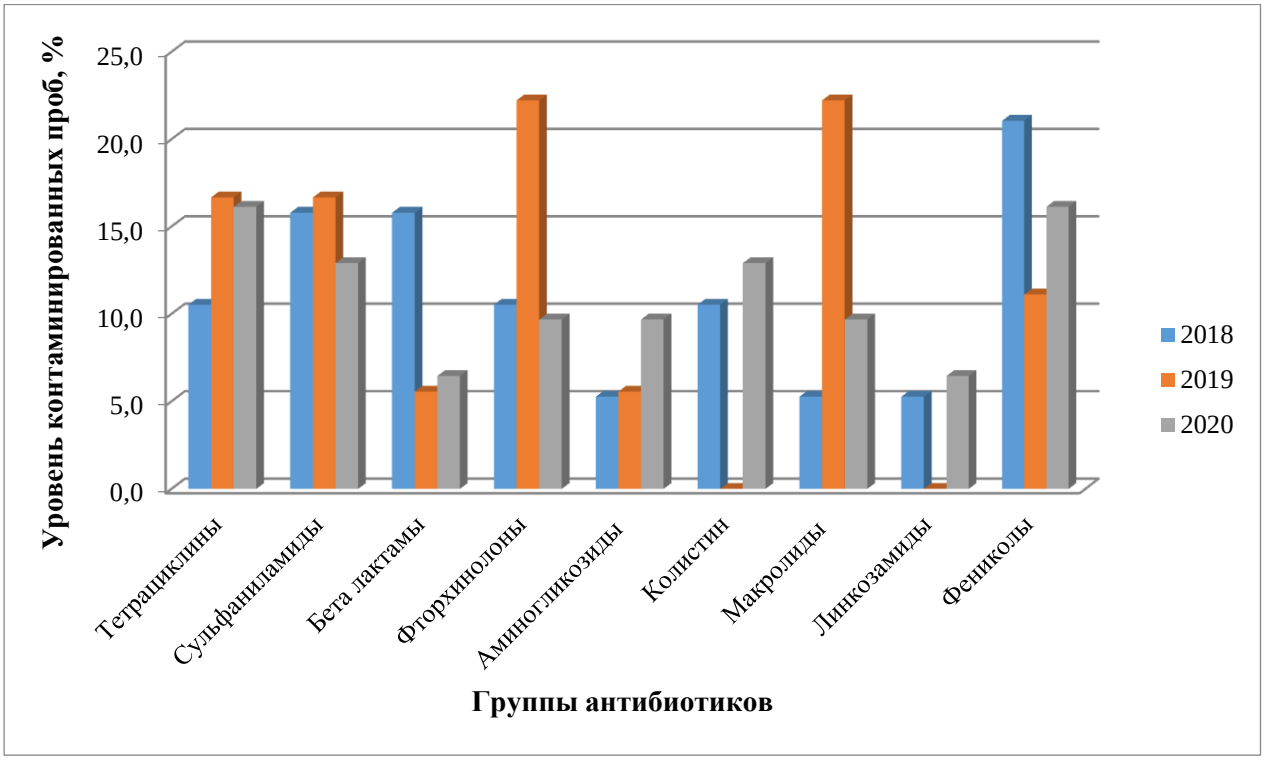


Рисунок 14 – Распределение групп антибиотиков по годам, выявленных в мясе птицы, с 2018 по 2020 года

В 2018 наиболее часто выявляемые были фениколы – 21,1 %, и в последующие года частота их обнаружения не снижалась, и составляла не менее 11 %. Максимальное количество выявляемости фторхинолонов пришлось на 2019 год и составило 22,2 %, а в 2018 и 2020 годах их количество составляло 10,5 % и 9,7 %, соответственно. Также и максимальное количество макролидов пришлось на 2019 год и составило 22,2 %, в 2018 они были обнаружены в 5,3 % образцов, а в 2020 – в 9,7 %.

Тетрациклиновая группа идентифицировалась на протяжении 2018-2020 годов, была отмечена положительная динамика выявления с 10,5 % в 2018 г до 16,1 % в 2021 году. Частота обнаружения сульфаниламидов в 2018-2019 годах была в пределах 15,8-16,7 %, однако в 2020 году установлено снижение частоты

обнаружения на 3,8 %. Бета-лактамы были обнаружены в 15,8 % образцов в 2018 г, а в 2019 и 2020 годах были выявлены только в 5,6 % и 6,5 %, соответственно. В 2019 году колистин (полипептидные антибиотики) и линкозамиды обнаружены не были.

В фарше наиболее часто идентифицировались антибиотики тетрациклиновой группы – 20,0 % (рисунок 15).

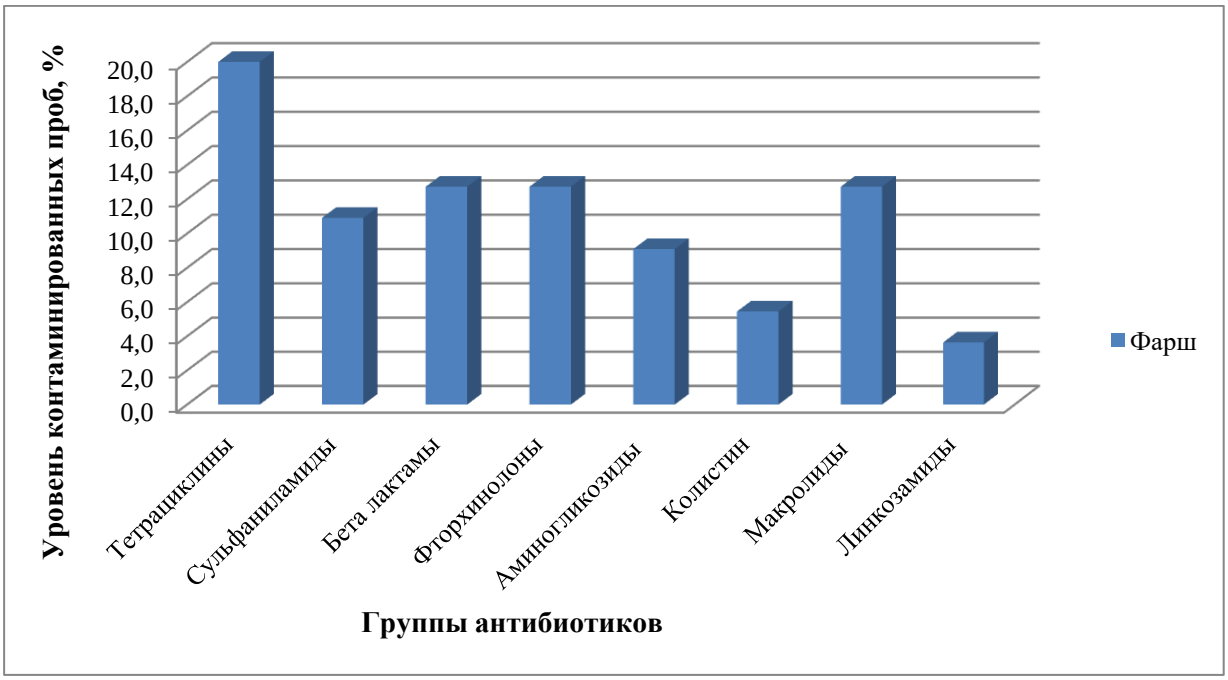


Рисунок 15 – Группы антибиотиков, выявленных в фарше в 2018-2020 гг.

Макролиды, бета-лактамы и фторхинолоны были представлены в образцах в равных количествах по 12,7 %, сульфаниламиды и аминогликозиды по 10,9 % и 9,1 %, соответственно. В небольшим количествах образцов был идентифицирован колистин (полипептидные антибиотики) – 5,5 %. Менее распространенной группой в образцах фарша были линкозамиды. Они были выявлены в 3,6 % исследуемых образцов. Плевромутилины в исследуемых образцах не обнаружены. Таким образом, в фарше было установлено наличие 9 групп антибиотиков.

Распределение групп антибиотиков, идентифицированных в фарше в 2018-2020 года, представлено на рисунке 16.

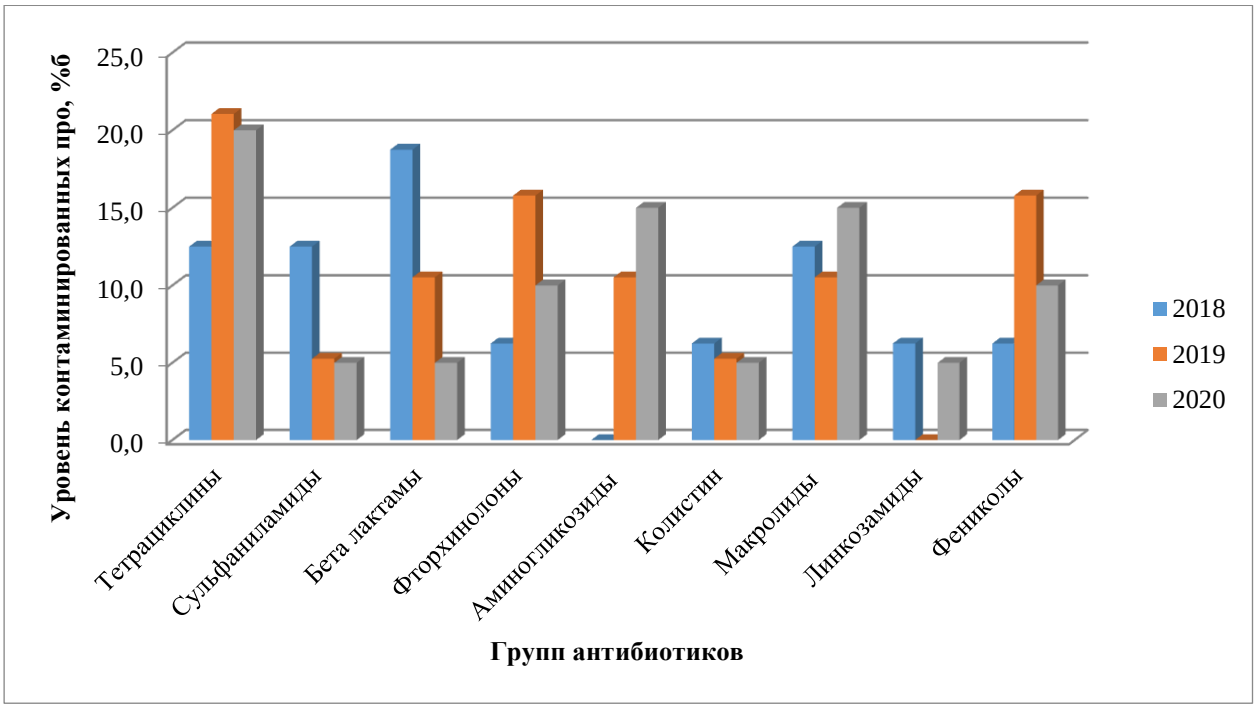


Рисунок 16 – Распределение по годам групп антибиотиков, выявленных в фарше с 2018 по 2020 года

Группа сульфаниламидов стабильно была представлена в образцах фарша на протяжении всего исследуемого периода. В 2018 г антибиотики этой группы обнаружены в 12,5 % образцов, в 2019 – 5,3 %, в 2020- 5,0 %. Бета-лактамы были выявлены в 2018 г в 18,8 % образцов, затем произошло снижение количества положительных образцов до 10,5 % в 2019 г и до 5 % в 2020 г. На протяжении исследуемого периода колистин (полипептидные антибиотики) и линкозамиды были обнаружены менее 7 % ежегодно. В 2018 году аминогликозиды не были обнаружены ни в одном из исследуемых образцов, а в 2019 году не были выявлены линкозамиды.

Новый метод идентификации антибиотиков с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences и Unisensor, США) с программным обеспечением BeadyExpress и тест-системы Beadyplex позволил изучить профиль всех групп антибиотиков мяса и фарша, используемого при производстве сырокопченых колбас.

Группы антибиотиков, обнаруженные в мясе и фарше, широко используются в медицине при лечении людей, что чревато формированием устойчивости

микроорганизмов к антибиотикам и влиянию на здоровье людей. Присутствие антимикробных остатков в продуктах питания может вызывать аллергию у потребителя, т.к. антибиотики обладают кумулятивным, мутагенным, тератогенным или канцерогенным действием. Самое резонансное действие антибиотиков развитие мультирезистентности у патогенных и условно-патогенных бактерий, которые могут передаваться с пищей человеку и затруднять лечение.

В рамках данной диссертационной работы было изучено состояние отечественной сырьевой базы, используемой в производстве сырокопченых колбас. Впервые был апробирован новый подход по оценке мясного сырья на наличие антимикробных химиотерапевтических веществ, представляющий собой двух стадийное испытание. Предлагается сначала в рамках производственного контроля проводит мониторинг поступающего мясного сырья на наличие антимикробных химиотерапевтических препаратов скрининговым микробиологическим методом. Затем для установления групп антибиотиков в контаминированной пробе проводя одну пробоподготовку с помощью тест-системы Beadyplex на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences и Unisensor, США) с программным обеспечением BeadyExpress.

3.4 Исследование мяса и фарша для сырокопченых колбас на наличие патогенных микроорганизмов[4]*.

Несмотря на меры по борьбе с патогенами пищевого происхождения от фермы до прилавка, бремя болезней, вызываемыми ими, остается проблемой для здравоохранения и экономики, как в развитых, так и в развивающихся странах.

В рамках этой работы была проведена идентификация патогенных микроорганизмов в мясе и фарше, используемом для производства сырокопченых

---

[4] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье:
Zaiko E. Antibiotic resistant of microorganisms in fermented sausages / E. V. Zaiko, D. S. Bataeva, Yu K. Yushina, A. A. Makhova, M. Yu Minaev // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2020– 421 – 052013.
Zaiko E. Prevalence, serovar, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from meat and minced meat used for production smoked sausage / E. V. Zaiko, *D. S. Bataeva, Yu. K. Yushina, M. A. Grudistova and B. Velebit // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* – 2021- 854 - 012108

колбас, и изучен состав сообщества микроорганизмов образцов фарша с помощью секвенирования гена 16S. Для выявления патогенных бактерий (бактерий рода *Salmonella* и вида *Listeria monocytogenes*) были исследовано 294 образца свинины, 554 образца говядины, 269 образца мяса птицы (филе грудок куриных) и 381 образец фарша.

Результаты уровня обсеменённых проб мяса для производства сырокопченых колбас, бактериями рода *Salmonella*, представлены на рисунке 17.

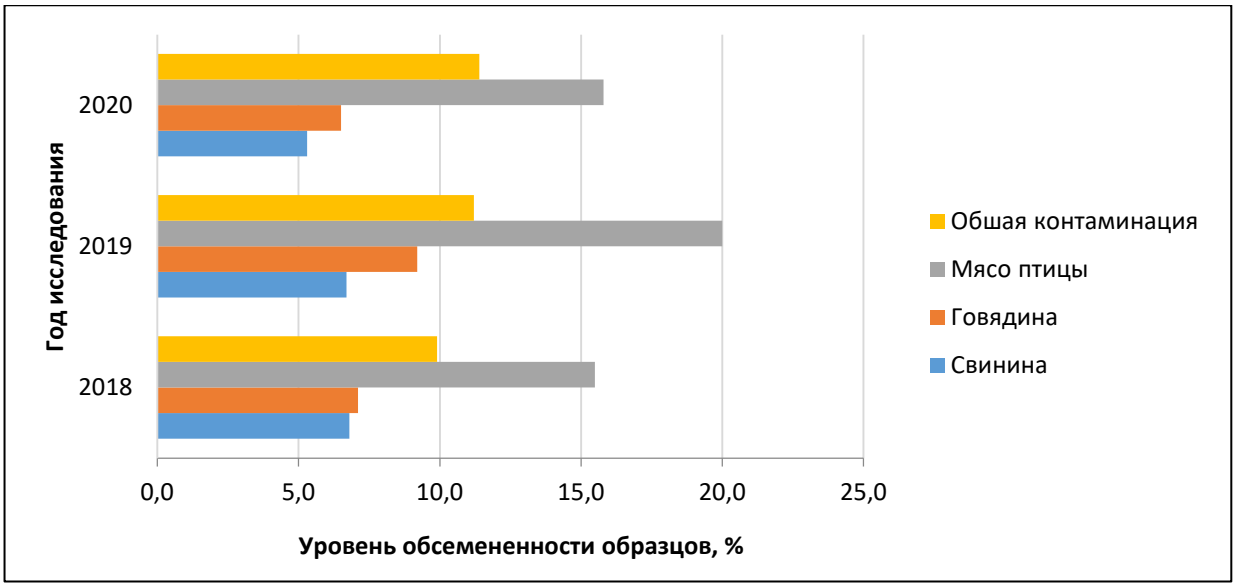


Рисунок 17 – Динамика выявляемости бактерий рода *Salmonella* в мясе для производства сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 года

Средний уровень обсеменённого мяса бактериями рода *Salmonella* составил 9,9 - 11,4 % в период с 2018 по 2020 гг. При этом больше всего бактерий *Salmonella spp*. было выявлено мясо птицы (до 20 % в 2019 г). В течение трех лет среди исследованных образцов мяса птицы этим патогеном было обсеменено не менее 15 % проб. Свинина и говядина были меньше обсеменены сальмонеллами, чем мясо птицы. По полученным данным 5,3 - 6,8 % свинины и 6,5 - 9,2 % говядины от исследованных образцов содержали сальмонеллы.

Кроме мяса убойных животных мясо птицы все чаще используют при производстве сырокопченых колбас. Мясо птицы является источником полноценного белка животного происхождения. Соединительная ткань мяса

птицы обладает меньшей прочностью, чем мясо убойных животных, поэтому оно значительно быстрее подвергается изменениям при созревании.

Присутствие сальмонелл в мясе для сырокопченых колбас является риском для безопасности потребителя, т.к. не предусмотрена высокотемпературная его обработка в процессе изготовления мясной продукции. Это может способствовать выживанию патогенных микроорганизмов.

Помимо мяса были исследованы образцы фарша на наличие сальмонелл. Результаты исследования представлены на рисунке 18.

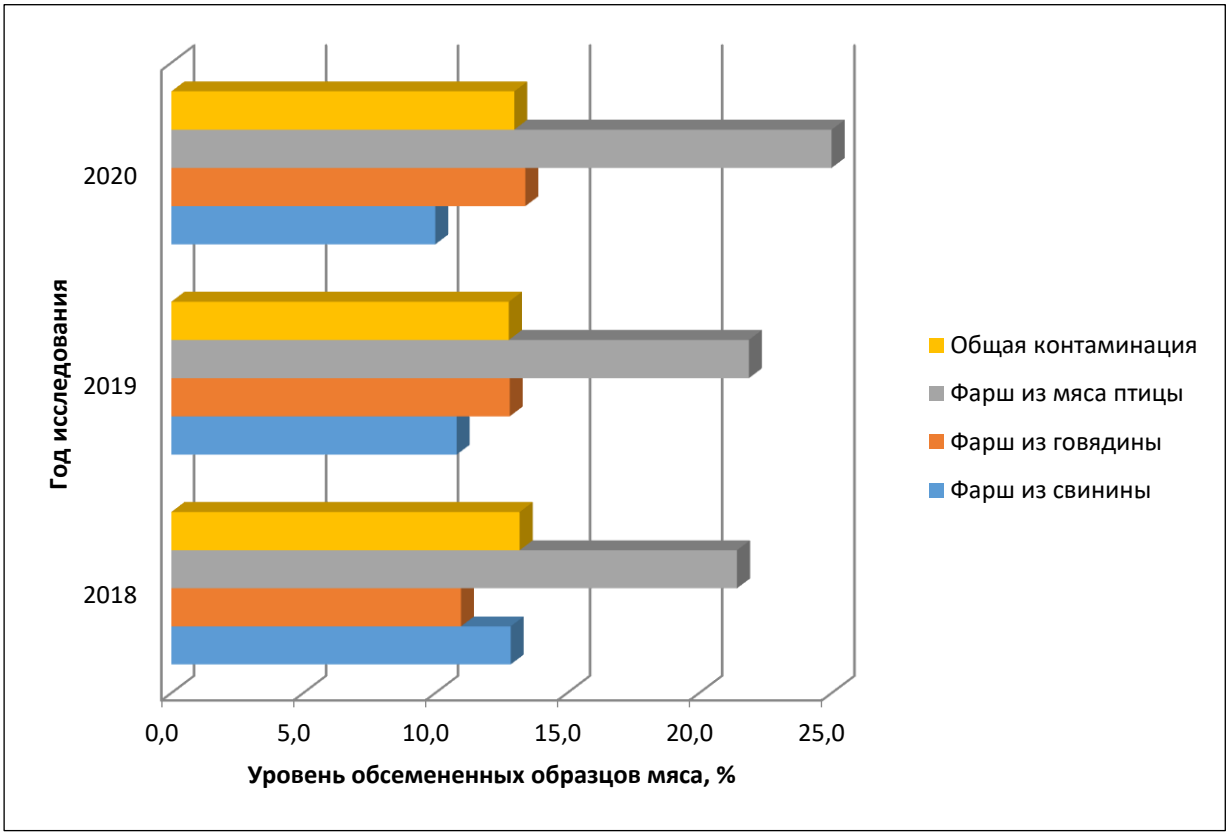


Рисунок 18 – Динамика выявляемости бактерий рода *Salmonella* в фарше для сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 года

Уровень контаминированных проб за три года среди всех исследуемых образцов фарша составил 12,8 - 13,2 %. Тенденция высокой обсеменённости мяса птицы сальмонеллами была сохранена и на фарше и составила от 21,4 % в 2018 г до 25,0 % в 2020 г. В тоже время фарш из свинины был обсеменен сальмонеллами в 10,0 - 12,9 %, а фарш из говядины в 11,0 - 13,4 % среди исследованных за весь период.

Измельчение мяса в процессе производства сырокопченых колбас способствует распределению поверхностной микробной популяции в исследуемой пробе и соответственно увеличивает ее распространенность.

Кроме бактерий рода Salmonella в мясе и фарше было изучено присутствие *Listeria monocytogenes*. Результаты представлены на рисунке 19.

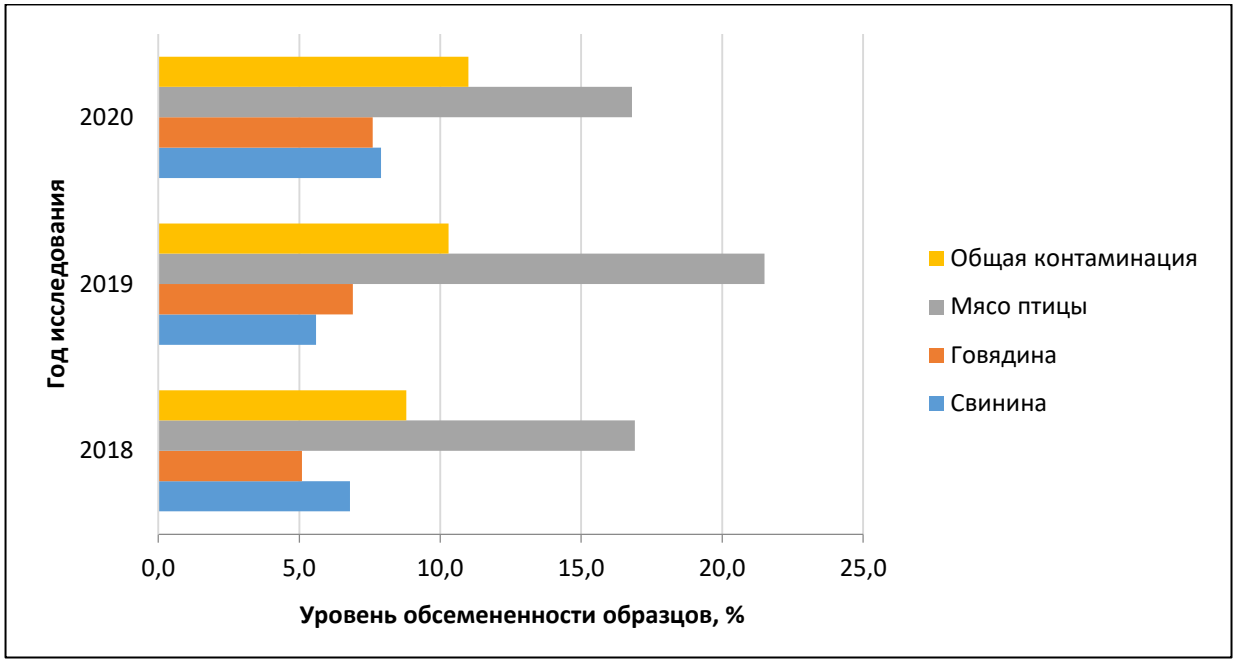


Рисунок 19 – Динамика выявляемости бактерий *Listeria monocytogenes* в мясе для сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 года

Количество обсеменённого мяса микроорганизмами *Listeria monocytogenes* за три года исследования находилось в пределах 8,8 – 11,0 %, что ниже уровня обсеменённости сальмонеллами. При этом наибольшее количество образцов, обсеменённых листериями, наблюдалось в мясе птицы. В 2019 году патогенные листерии были выявлены в 21,5 % исследованных образцов мяса птицы, а в 2018 и 2020 годах в 16,9 % и 16,8 %, соответственно.

Обсеменённость бактериями *Listeria monocytogenes* говядины было достаточно стабильным в течение всего периода исследования и находилось в пределах 5,1 – 7,6 %. Уровень образцов свинины с патогенными листериями за три года наблюдений составил 5,9 - 7,9 %.

Listeria monocytogenes — это бактерии, способные прикрепляться к поверхностям оборудования с образованием биопленок, устойчивых к действию

дезинфицирующих средств. Наличие биопленок на объектах производственной среды может приводить к контаминации пищевых продуктов.

Присутствие *Listeria monocytogenes* в мясе, используемом для сырокопченых колбас, является риском их присутствия в сырокопченых колбасах.

Также была проведена оценка фарша на обсемененность бактериями *Listeria monocytogenes*. Ежегодно, листерии были обнаружены не менее чем в 11,4 % образцах фарша (рисунок 20).

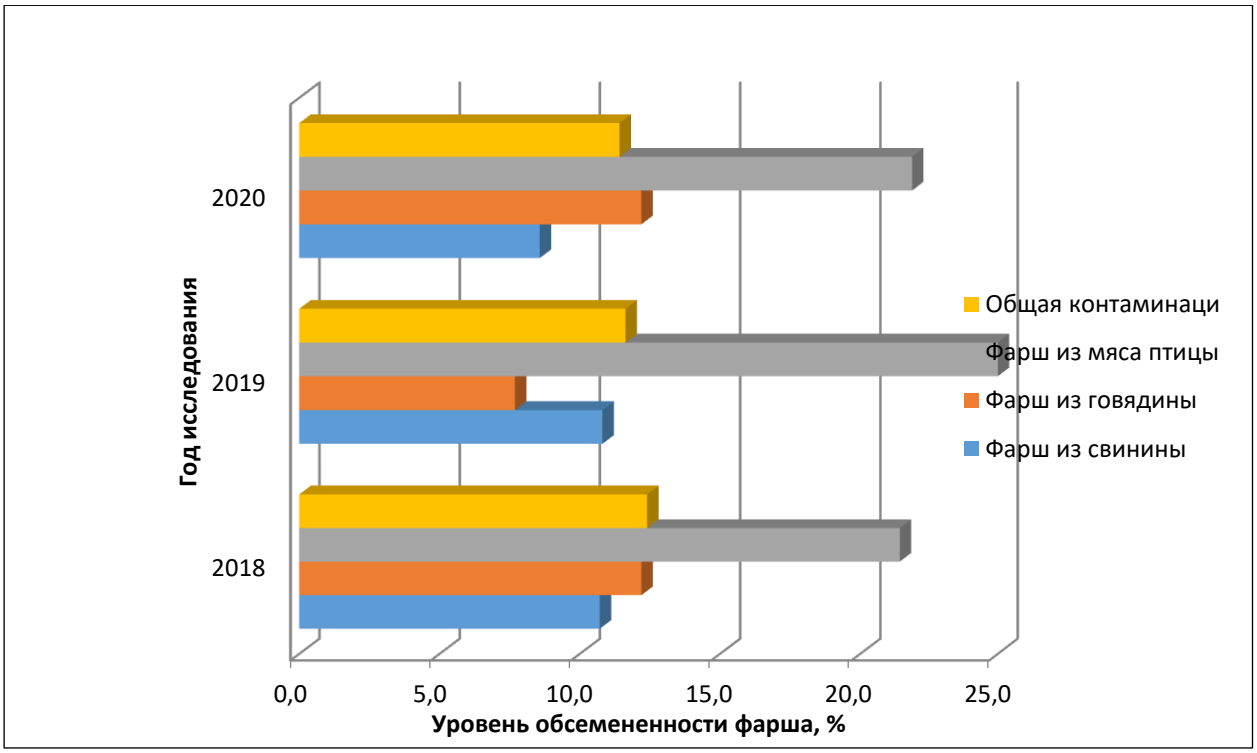


Рисунок 20 – Динамика выявляемости бактерий *Listeria monocytogenes* в фарше сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 года

Наибольший уровень обсеменённости бактериями *Listeria monocytogenes* наблюдали в фарше из мяса птицы, на уровне от 21,4 % (2018 год) и до 25 % (2019 год).

Listeria monocytogenes также были обнаружены в образцах фарша из говядины. Наибольшее число обсемененных образцов было выявлено в 2018 и 2020 годах на уровне 12,2 %, а в 2019 году количество положительных проб не превышало 7,7 %. Анализируя образцы фарша из свинины на присутствие бактерий вида *Listeria monocytogenes*, было установлено, что в 2018 и 2019 годах

10,7 % и 10,8 % исследованных проб обсеменено искомыми патогенами, соответственно. Однако в 2020 году количество положительных проб снизилась до 8,6 %.

За три года мониторинга мяса разных видов животных, в т.ч. и мяса птицы, а также фарша, используемых для производства сырокопченых колбас, на перерабатывающие предприятия поступило: 9,9 - 11,4 % мяса и 12,8-13,2 % фарша обсеменённых бактериями рода *Salmonella*, а также 8,8 – 11,0 % мяса и 11,4 – 12,4 % фарша обсеменённого *Listeria monocytogenes.*

Настоящее исследование было использовано для оценки распространенности заражения и выявления факторов риска, связанных с присутствием сальмонелл и *Listeria monocytogenes* на мясной основе сырокопченых колбас. По результатам исследований, очевидно, что мясо (говядина, свинина и мясо птицы), а также фарш являются потенциальными источниками опасных для здоровья микробных контаминантов.

3.5 Результаты изучения микробной популяции фарша сырокопчёных колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования[5]

Состав и количество исходной микробной популяции мяса и фарша сырокопченых колбас зависит от многих факторов. Основные факторы, это санитарное состояние животных перед убоем, процесса убоя и переработки, санитарно-гигиеническое состояние объектов производственной среды и проводимые технологические операции. Исходная микробиота фарша претерпевает изменения в процессе технологических процессов, которые способствуют снижению количества патогенных, условно-патогенных микроорганизмов. Для оценки риска для качества и безопасности сырокопченых колбас необходимо понимание структуры исходной микробной популяции

[5] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье:
Изучение микробной популяции фаршей сырокопчёных колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Зайко, Ю.К. Юшина, Е.В. Груздев, А.В. Белецкий, А.В. Марданов, Д.С. Батаева, А.А. Семенова // Все о мясе. – 2021 – № 2 – С. 64-67

фарша. Новые знания в данном направлении позволят идентифицировать микробиологические риски производства этой продукции.

Классические микробиологические подходы не позволяют получить полную картину состава микробиоты фарша. Это вызвано тем, что некоторые штаммы микроорганизмов переходят в некультивируемые формы или после стресса (например, тепловое воздействие, низкого значение pH) и их наличие невозможно установить. Один из молекулярных методов, который прочно вошел в методическую базу научных изысканий, был использован для получения новых данных по составу микробной популяции фарша сырокопчёных колбас.

С помощью высокопроизводительного секвенирования был определен таксономический состав образцов фарша из мяса разных видов животных и птицы. Для этого были выбраны 4 фарша, содержащие в своем составе один из видов сырья: свинину, говядину и мясо птицы.

Биологическое разнообразие рассмотренных сообществ колебалось от высокого (chao1 index = 50,1) в фарше из свинины, до низкого в фарше из мяса птицы (chao1 index = 45,0) (таблица 20).

Таблица 20 – Индексы видового разнообразия фаршей

Объект исследования	Индексы разнообразия				
	chao1	Чтения	Индекс Шеннона_e	Индекс Шеннона_2	Индекс Шеннона_10
Фарш из говядины	47,6	7466	1,99	2,89	0,866
Фарш из свинины №1	50,1	7460	2,67	3,85	1,160
Фарш из свинины №2	44,1	7460	2,04	2,95	0,887
Фарш из мяса птицы	45,0	7460	1,88	2,72	0,817

На основании полученных данных было установлено, что все OTE (без учета OTE растительных пластид) принадлежат бактериям филумов:

Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria и Tenericutes (рисунок 21). При этом два филума микроорганизмов являлись ключевыми: *Proteobacteria и Firmicutes*, остальные представители микробных сообществ являлись минорными.

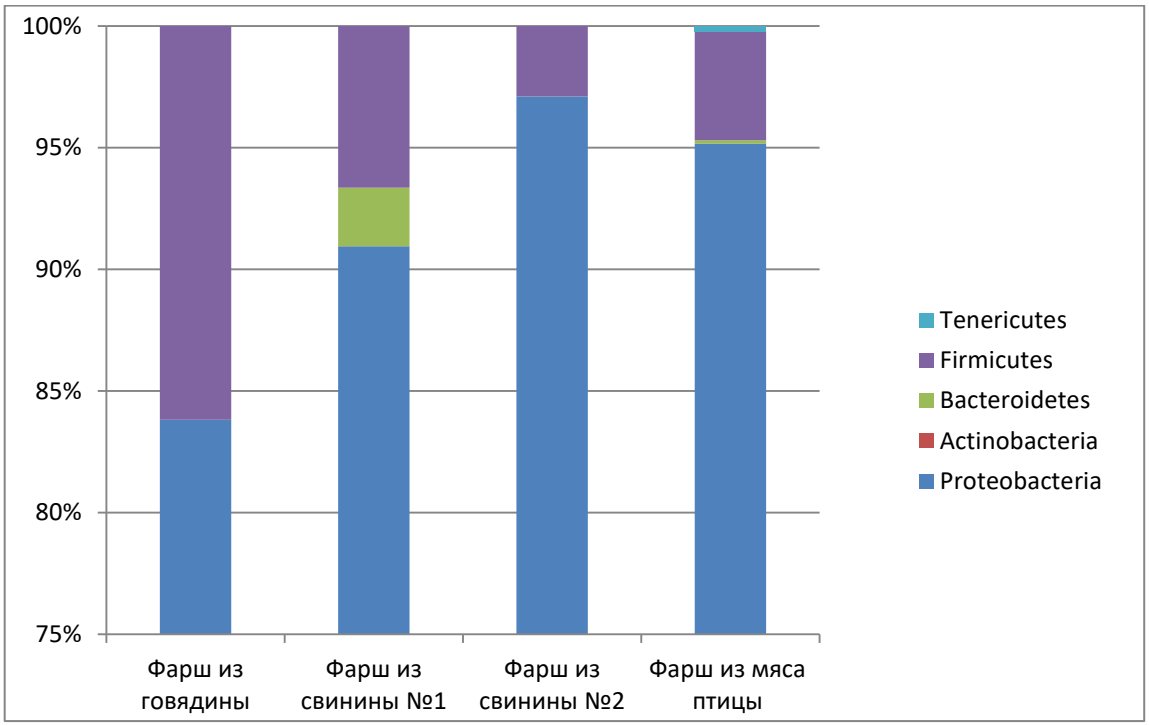


Рисунок 21 – Соотношение представителей различных бактериальных филумов в образцах фарша из разного вида мяса

Во всех образцах фарша представители отрядов *Enterobacteriales и Pseudomonadales* являлись доминантными (рисунок 22). В наименьшей степени были представлены представители таких порядков как *Aeromonadales, Lactobacillales, Flavobacteriales и Bacilales*.

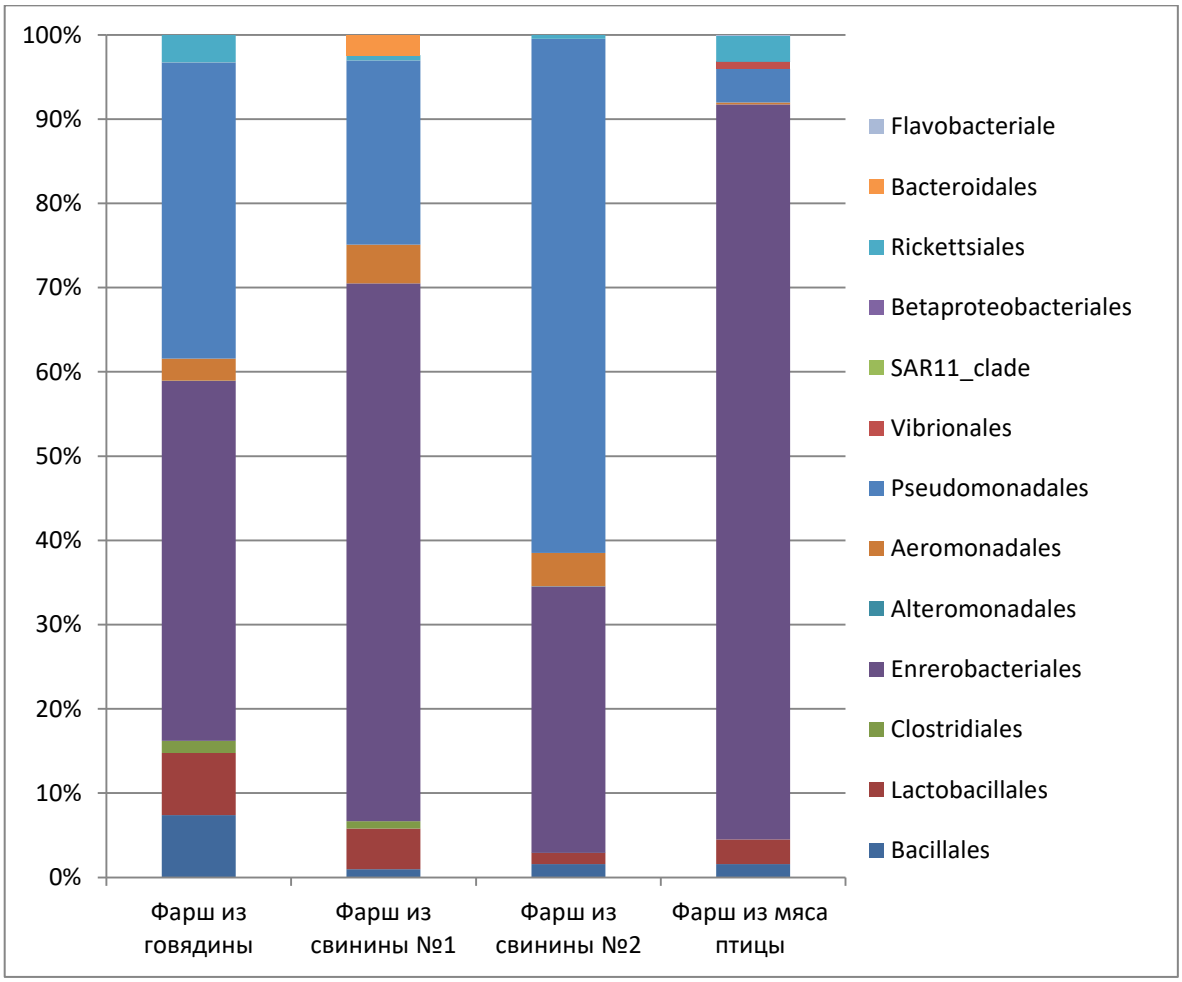


Рисунок 22 – Соотношение представителей различных бактериальных порядков в образцах фарша из разного вида мяса

Порядок *Enterobacteriales* в основном был представлен семейством *Enterobacteriaceae*, включающим 10 родов бактерий в разной степени. Наиболее распространенным родами в исследованных образцах были *Enterobacter и Escherichia-Shigella*.

Бактерии рода *Shigella* spp вызывают такое заболевание как шигеллез (бактериальная дизентерия). Шигиллез считается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, особенно в развивающихся странах [87 ,88]. Присутствие бактерий *Shigella* spp. в исследуемых образцах фарша вызывает обеспокоенность, так как, согласно последним данным, представили этого рода становятся устойчивыми ко многим противомикробным препаратам, включая препараты первого ряда, недорогие пероральные антибиотики (ампициллин, триметоприм-сульфаметоксазол и тетрациклин), а также антибиотики широкого

спектра действия, такие как хинолоны, фторхинолоны и цефалоспорины расширенного спектра действия [89]. При выживании *Shigella* spp., например в сырокопченых колбах по различным причинам (например, нарушении технологии производства) создает риск для здоровья человека.

Представитель рода *Escherichia,* в частности *Escherichia coli*, продуцирующие шига-токсин, также представляют смертельную опасность для здоровья человека. При попадании в организм человека эшерихии вызывают широкий спектр клинических симптомов, таких как диарея, геморрагический колит, гемолитико-уремический синдром и даже могут приводить к летальному исходу [90].

Несколько мировых инфекционных вспышек были связаны с присутствием энтерогеморрагических штаммов *Escherichia coli* различных серотипов, таких как, O157: H7 [91], O103: H25 [92] и O26: H11[93] в ферментированных колбас.

Это свидетельствует о том, что фарш, используемый для производства сырокопченых колбас, может быть источником микробиологического риска возникновения пищевых отравлений при употреблении сырокопченых колбас.

Бактерии порядка *Pseudomonadales* в исследованных образцах фарша были представлены семействами *Moraxellaceae* и *Pseudomonadaceae*. Разнообразие микробного сообщества на уровне семейств представлено на рисунке 23.

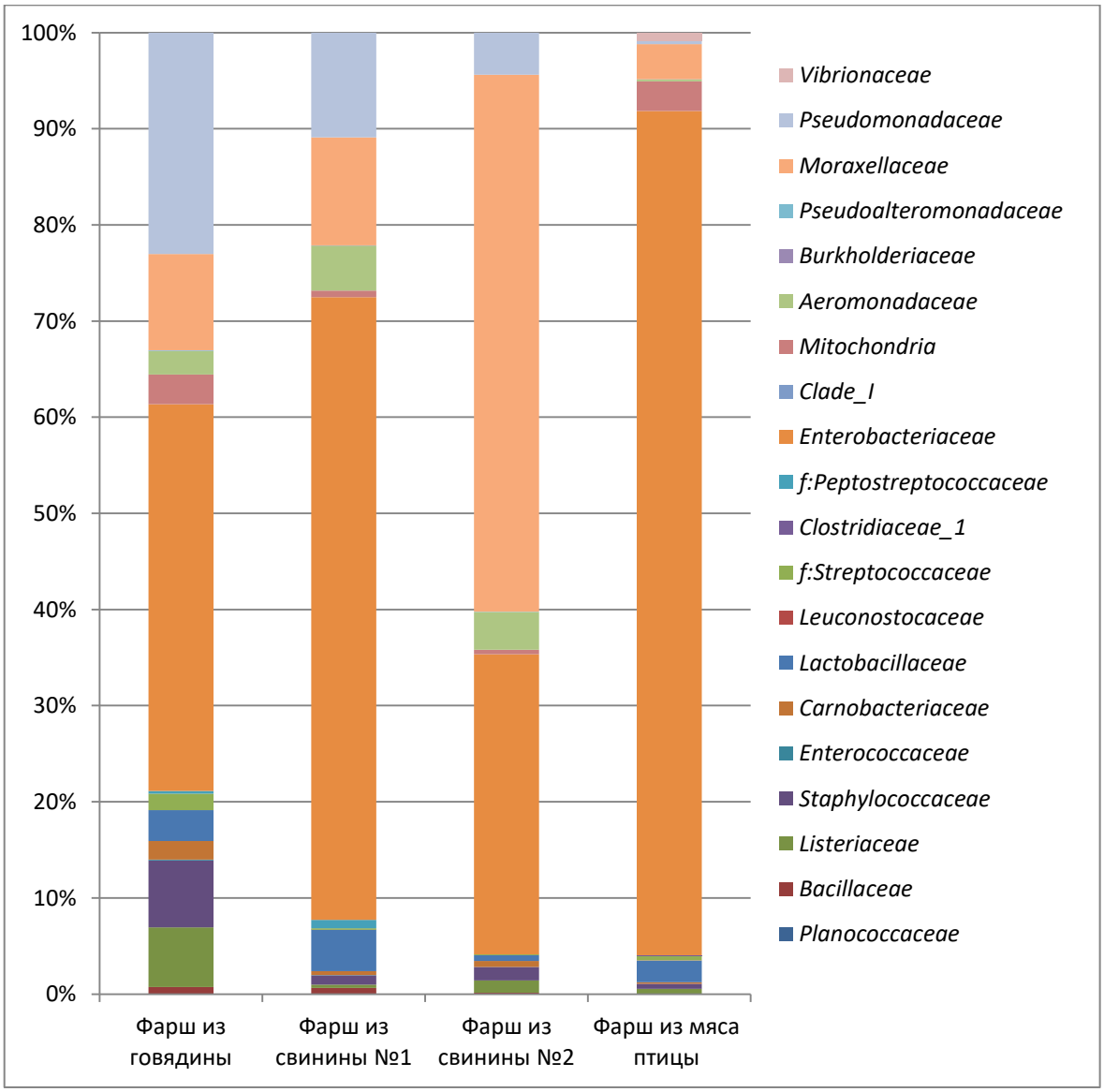


Рисунок 23 – Соотношение представителей различных бактериальных семейств в образцах фарша из разного вида мяса

В семействе *Pseudomonadaceae* доминантным представителем был род *Pseudomonas*. Как известно, представители рода *Pseudomonas* являются микроорганизмами порчи. Ключевыми микроорганизмами, вызывающими порчу мяса и мясных продуктов это психротрофные виды *Pseudomonas*. Представители этого семейства были обнаружены в разных количествах во всех исследованных образцах фарша. Наибольшее их количество было в образце фарша из говядины до 11,8 % от всей выявленной микрофлоры, меньше всего в образце фарша из мяса птицы до 0,32 %.

В фарше из говядины, а также из свинины №2 были обнаружены бактерии рода *Brochothrix*. *Brochothrix thermosphacta* являются одними из ведущих микроорганизмов участвующих в порче мяса и мясных продуктов, при хранении в аэробной, анаэробной или модифицированной атмосфере. *B. thermosphacta* могут расти как при низких положительных температурах, так и при низком содержании кислорода. Эти условия сопоставимы с условиями хранения ферментированных колбасных изделий.

Помимо вышеупомянутых микроорганизмов, вызывающих порчу, из мяса также были выделены бактерии, которые повсеместно встречаются в окружающей среде, например, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Macrococcus* spp.. Микроорганизмы *Staphylococcus* spp. обычно встречаются в свежем мясе. Один из его видов, *Staphylococcus aureus*, представляет риск для безопасности пищевых продуктов, так как является продуцентом термостабильных энтеротоксинов.

Проведенные исследования были направлены на получение научных данных по распространенности микроорганизмов в фарше, используемом для производства сырокопченых колбас, представляющих риск влияния на качество и безопасность готовой продукции. Методом метагеномного секвенирования были установлены ключевые микроорганизмы, несущие в себе как риск возникновения порчи продуктов питания, в частности сырокопченых колбас, так и риск возникновения пищевых отравлений.

Анализ имеющихся и получение новых данных по разнообразию микроорганизмов, как в готовой продукции, так и в сырье, используемом для ее производства, является актуальным направлением исследований.

Полученные на основании этого исследования результаты могут лечь в основу риск-ориентированных подходов производства сырокопченых колбас.

3.6 Оценка чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса и фарша для сырокопченых колбас (на примере мясо птицы)[6]

Развитие устойчивости к антибиотикам, в том числе и множественной устойчивости, среди патогенных микроорганизмов рассматривается как глобальная проблема общественного здравоохранения.

Использование антибиотиков в животноводстве, свиноводстве и птицеводстве приводит к риску формирования устойчивости у микроорганизмов, в т.ч. патогенных. Это может привести к проблемам при лечении инфекционных заболеваний, вызванных «пищевыми» патогенами. Установленный в рамках данной работы высокий процент контаминированного мяса и фарша антимикробными веществами и одновременно обсеменённость патогенными бактериями, может способствовать риску формирования у них резистентности к антибиотикам.

Для изучения этой проблемы была поставлена задача оценить чувствительность к антибиотикам патогенных бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes,* выделенных из мяса и фарша, используемых для производства сырокопченых колбас. Было исследовано 39 штаммов *Salmonella* на устойчивость к 13 антимикробным препаратам.

Результаты исследований представлены в таблице 21.

---

[6] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье:
- Зайко, Е.В. Распространённость и устойчивость к антибиотикам патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса различных видов животных / Е.В. Зайко, А.А. Панченко, Д.М. Сатабаева, Д.С. Батаева // Все о мясе. – 2019. – № 3. – С. 42-45.
- Зайко, Е.В. Изучение фенотипического и генотипического профиля устойчивости сероваров *S. enteritidis и S. typhimurium*, выделенных из мясного сырья для производства сырокопчёных колбас / Е.В. Зайко, Д.С. Батаева, Ю.К. Юшина, Д.М. Сатабаева // Все о мясе. – 2020.- 3

Таблица 21 – Результаты оценки чувствительности бактерий *Salmonella* spp. к антибиотикам

Классы антибиотиков	Антибиотик	Количество штаммов (%)		
		Резистентные (R)	Промежуточные (I)	Чувствительные (S)
Пенициллин	Ампициллин	9 (23,1)	1 (2,6)	29 (74,4)
Карбапенемы	Имипенем	8 (23,1)	2 (2,6)	29 (74,4)
Аминогликозиды	Амикацин	7 (17,9)	19 (48,7)	13 (33,3)
	Стрептомицин	5 (12,8)	5 (12,8)	29 (74,4)
	Тобрамицин	6 (15,4)	1 (2,6)	32 (82,1)
Цефалоспорины	Цефотаксим	7 (17,9)	8 (20,5)	24 (61,5)
	Цефазолин	17 (43,6)	8 (20,5)	14 (35,9)
Антагонисты пути фолиевой кислоты	Триметоприм / сульфаметоксазол	13 (33,3)	0 (0)	26 (66,7)
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол	8 (20,5)	5 (12,8)	26 (66,7)
Макролиды и азалиды	Азитромицин	11 (28,5)	-	28 (71,8)
β-лактамы / ингибиторы β-лактамаз	Амоксициллин-клавулановая кислота	3 (7,7)	4 (10,3)	32 (82,1)
Нитрофураны	Фурадонин	4 (10,3)	6 (15,4)	29 (74,4)
Тетрациклиновая группа	Тетрациклин	12 (30,8)	10 (25,6)	17 (43,6)

Изоляты микроорганизмов, были классифицированы как резистентные к антибиотикам в следующей последовательности: к цефазолину 43,6 % (n = 17), к сульфаметоксазол/ триметоприму 33,3 % (n = 13), к тетрациклину 30,8 % (n = 12) и к азитромицину 28,5 % (n = 11) всех исследованных сальмонелл.

При этом наиболее чувствительны были к амоксициллин-клавулановой кислоте и тобрамицину 82,1 % (n = 32), нитрофурадонину и ампициллину 74,4 % (n = 29) исследованные штаммы *Salmonella* spp.

Были получены интересные данные по устойчивости сальмонелл, выделенных из мяса и фарша, к противомикробным препаратам в зависимости от года исследования. Результаты представлены на рис. 24.

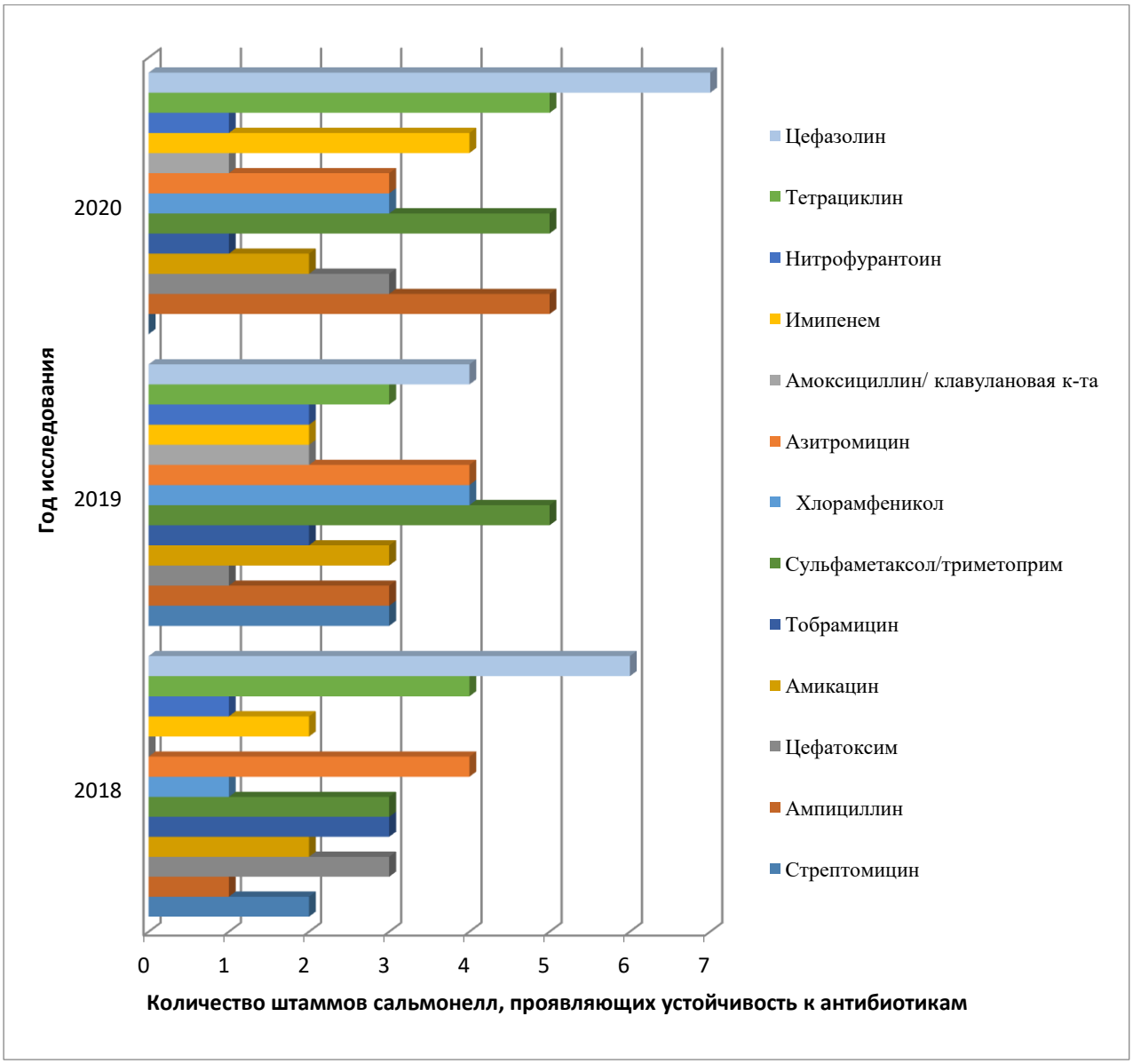


Рисунок 24 – Распределение устойчивости к антибиотикам у бактерий рода *Salmonella* с 2018 по 2020 год

За весь период исследования бактерии рода *Salmonella* наиболее часто проявляли устойчивость к цефазолину, тетрациклину, сульфаметаксолу/ триметоприму и азитромицину.

В 2018 году наиболее часто штаммы сальмонелл проявляли устойчивость к цефазолину (n= 6), тетрациклину (n= 4) и азитромицину (n= 4), в 2019 году к сульфаметаксолу/ триметоприму (n= 5), хлорамфениколу (n= 4), цефазолину (n= 4) и азитромицину (n=4), а в 2020 году к цефазолину (n=7), сульфаметаксолу/триметоприму (n=5), тетрациклину (n=5) и ампициллину (n=5).

Устойчивость к антибиотикам у патогенов пищевого происхождения, таких как сальмонелла, является серьезной проблемой для общественного здравоохранения.

Полученные данные по резистентности сальмонелл к антибиотикам были проанализированы на мультирезистентность штаммов (рисунок 25).

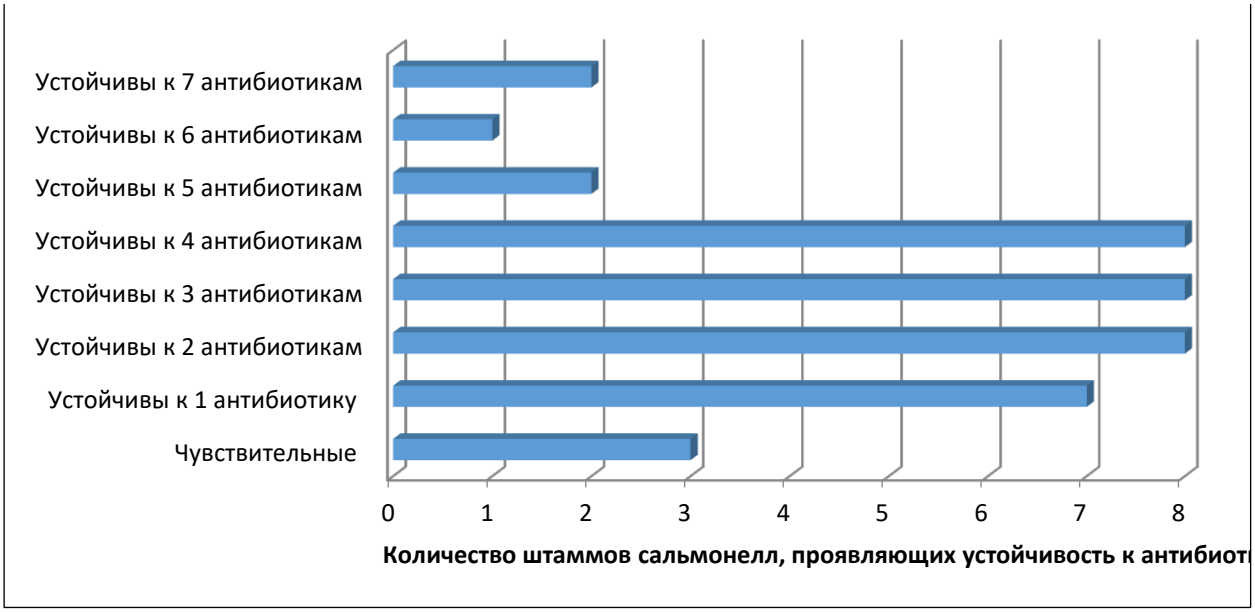


Рисунок 25 – Анализ мультирезистентности к антибиотикам штаммов сальмонелл, выделенных из мяса и фарша

Было установлено, что 53,8 % (n=21) исследованных штаммов сальмонелл проявляли множественную лекарственную устойчивость к антибиотикам (устойчивость к трем и более антибиотикам).

Один из штаммов сальмонелл проявлял устойчивость к 6 антимикробным препаратам, два штамма к 5 и восемь штаммов к 4 антимикробным препаратам. Среди всех изолятов 2 штамма сальмонелл проявляли устойчивость к 7 различным противомикробным препаратам, относящихся к 6 классам антимикробных веществ.

Формирование мультирезистентности у штаммов *Salmonella*, пищевого происхождения может стать причиной усложнения лечения, эволюции критически больных пациентов.

Актуальна проблема мультирезистентности патогенных бактерий и при производстве ферментированных мясных продуктов. Особенно при нарушении в

технологии при производстве сырокопченых колбас. Существует риск присутствия штаммов *Salmonella* с множественной лекарственной устойчивость в готовом продукте.

Для каждого штамма сальмонелл был определен фенотипический профиль устойчивости к антимикробным препаратам (таблица 22).

Таблица 22 – Фенотипический профиль устойчивости штаммов сальмонелл, выделенных из мяса и фарша

Штамм	Профиль устойчивости	Кол-во антибиотиков
S1	-	-
S2	Ампициллин-Тобрамицин-Имипенем-Хлорамфеникол	4
S3	Цефотаксим-Триметоприм/сульфаметоксазол-Азитромицин-Тетрациклин-Цефазолин	5
S4	Стрептомицин-Азиторомицин-Тетрациклин-Цефазолин	4
S5	-	0
S6	Цефотаксим- Азитромицин -Цефазолин	3
S7	Амоксициллин/клавулановая к-та-Триметоприм/ сульфаметоксазол-Тетрациклин- Нитрофурантоин	4
S8	Цефазолин	1
S9	Стрептомицин-Амоксициллин/клавулановая к-та-АзитромицинТетрациклин	4
S10	Цефотаксим-Тобрамицин - Цефазолин - Триметоприм/ сульфаметоксазол	4
S11	Тобрамицин-Имипенем-Цефазолин	3
S12	Стрептомицин- Азитромицин	2
S13	Хлорамфеникол- Цефазолин	2
S14	Ампициллин- Амикацин - Амоксициллин/клавулановая к-та - Триметоприм/сульфаметоксазол- Азитромицин	4
S15	-	0
S16	Триметоприм/сульфаметоксазол-Тетрациклин-Цефазолин	3
S17	Стрептомицин-Ампициллин-Амикацин-Тобрамицин-Хлорамефеникол-Амоксициллин/клавулановая к-та -Имипенем	7
S18	Стрептомицин-Амоксициллин/клавулановая к-та-Тобрамицин-Хлорамфеникол-Амикацин-Имипенем-Тетрациклин	7

S19	Ампициллин-Триметоприм/сульфаметоксазол-Цефазолин	3
S20	Триметоприм/сульфаметоксазол Нитрофурантоин	2
S21	Нитрофурантоин	1
S22	Тетрациклин	1
S23	Цефотаксим-Хлорамфеникол-Азитромицин - Цефазолин	4
S24	Триметоприм/сульфаметоксазол-Азитромицин	2
S25	Амоксициллин/клавулановая к-та –Азитромицин-Цефазолин	3
S26	Ампициллин-Триметоприм/сульфаметоксазол-Хлорамфеникол-Нитрофурантоин-Тетрациклин - Цефазолин	1
S27	Цефотаксим	6
S28	Имипенем-Цефазолин	2
S29	ЦефотаксимТетрациклин	2
S30	Триметоприм/сульфаметоксазол	1
S31	Ампициллин	1
S32	Имипенем-Цефазолин	2
S33	Ампициллин-Амоксициллин/клавулановая к-та-Триметоприм/сульфаметоксазол - Амикацин - Тетрациклин	5
S34	Триметоприм/сульфаметоксазол-Имипенем-Цефазолин	3
S35	Триметоприм/сульфаметоксазол-Хлорамфеникол-Азитромицин-Цефазолин	4
S36	Ампициллин- Тетрациклин	2
S37	Тобрамицин-Хлорамфеникол-Имипенем-Цефазолин	4
S38	Азитромицин	1
S39	Ампициллин-Триметоприм/сульфаметоксазол-Тетрациклин	3

На следующем этапе была оценена чувствительность к 18 антибиотикам микроорганизмов *Listeria monocytogenes*, выделенных из мясного сырья. Результаты представлены на рисунке 26.

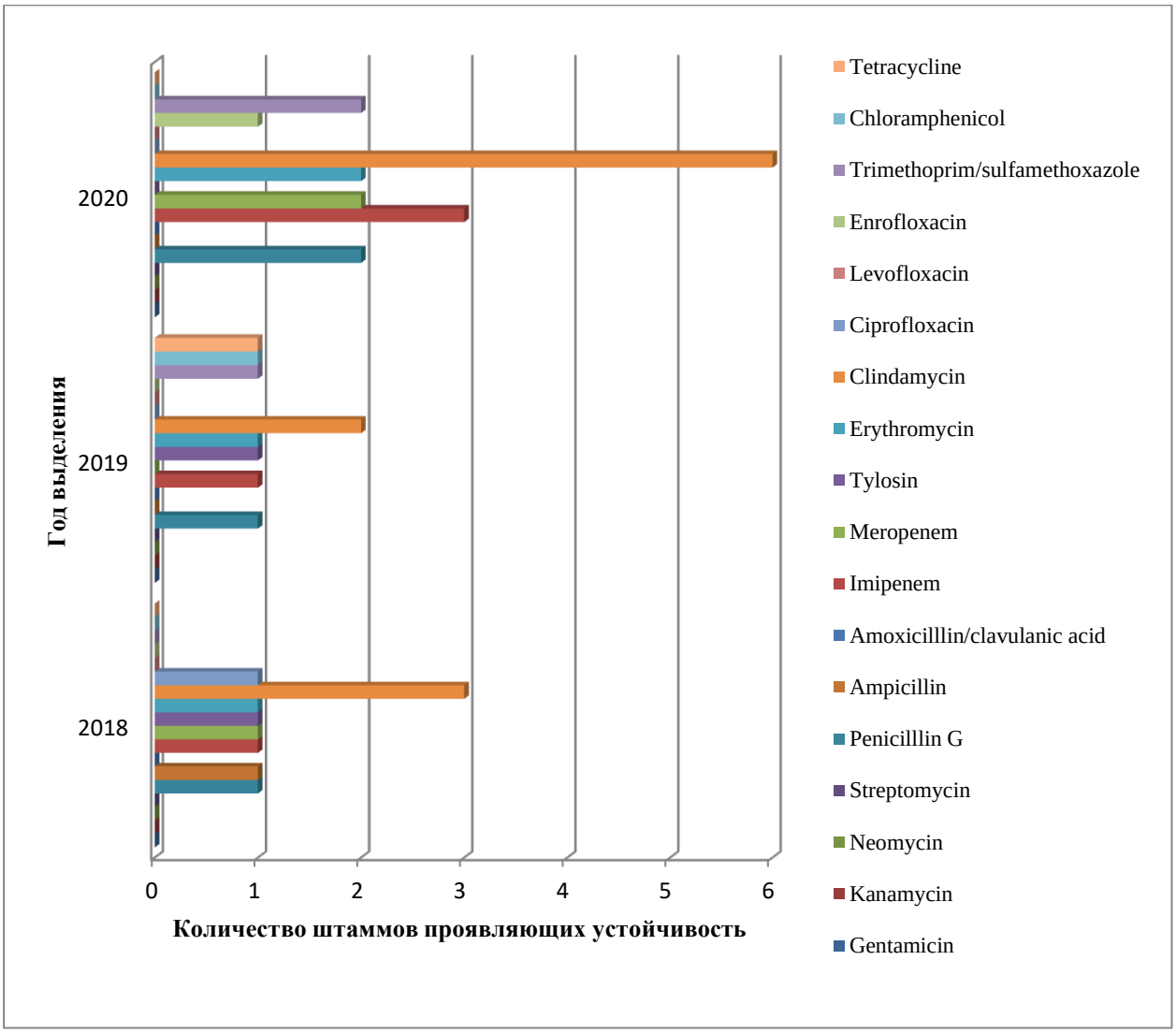


Рисунок 26 – Распределение устойчивости к антибиотикам у штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных в период с 2018 по 2020 года

Была установлена устойчивость *Listeria monocytogenes* к 12 различным антибиотикам. За весь период исследования наибольшее количество штаммов *L.monocytogenes* проявляли устойчивость к клиндамицину. Стабильно с 2018 по 2020 г отмечалось проявления устойчивости патогенных для человека листерий также к пенициллину G, имипенему и эритромицину.

На протяжении всего периода исследования *Listeria monocytogenes* были чувствительны к гентамицину, канамицину, неомицину, стрептомицину, амоксициллину/клавулановой кислоте, левофлоксацину. Это предполагает, что данными препараты может быть обеспечена эффективная терапия при листериозе.

Штаммы листерий, выделенные в последние два года (2019 и 2020 год), исследований были чувствительны к ампициллину и ципрофлоксацину, хотя в 2018 году были выявлены штаммы устойчивые в данным антибиотикам (n=1). Так же было установлено наличие чувствительности к тетрациклину и хлорамфениколу у штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных в 2018 и 2020 годах.

Анализируя полученные данные, была оценена мультирезистентность штаммов листерий (рисунок 27).

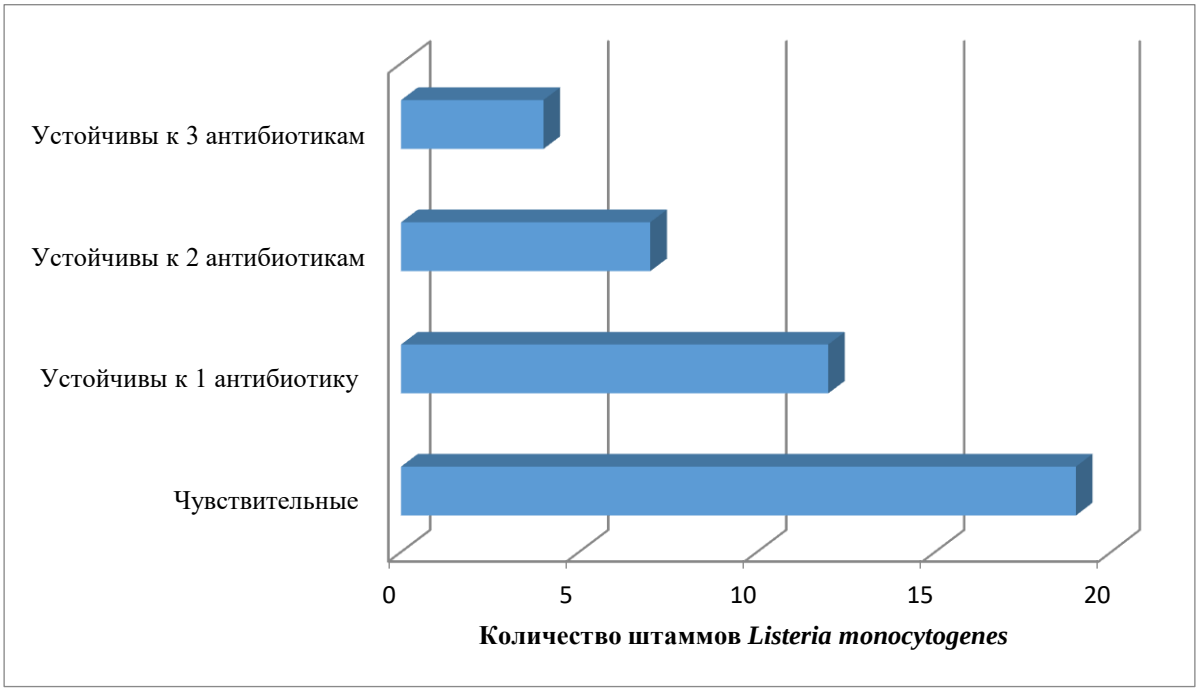


Рисунок 27 – Анализ мультирезистентности к антибиотикам штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса и фарша

Множественную устойчивость к антибиотикам (устойчивость к трем и более антибиотикам) из всех исследуемых штаммов *Listeria monocytogenes* проявляли 9,5 % (n=4), к двум антибиотикам проявляли 16,7 % (n=7) штаммов *L.monocytogenes*.

Несмотря на то, что ферментированные продукты имеют длительный срок хранения и предполагают различные барьеры для роста нежелательных микроорганизмов, известно, что патогены, такие как *Listeria monocytogenes*, могут сохранять жизнеспособность в готовом продукте. Устойчивость к антибиотикам у этого вида микроорганизмов представляет значительную проблему для здоровья

человека, поскольку *L.monocytogenes* имеет высокое соотношение летальности/случаев заболевания, а резистентность может способствовать неудачам терапевтического лечения.

Для каждого исследованного штамма *L.monocytogenes* был составлен фенотипический профиль устойчивости (таблица 23).

Таблица 23 – Фенотипический профиль устойчивости *L.monocytogenes* к антибиотикам.

Штамм	Фенотипический профиль устойчивости	Кол-во антибиотиков
L1	Эритромицин-Клиндамицин	2
L2	Ципрофлоксацин	1
L4	Пенициллин G- ампициллин	2
L 7	Имипенем	1
L 8	Клиндамицин	1
L 11	Меропенем	1
L 13	Хлорамфеникол	1
L 19	Клиндамицин	1
L 21	Триметоприм/сульфаметаксол	1
L 22	Тетрациклин-эритромицин	2
L 24	Пенициллин G – имипенем- Клиндамицин	3
L 26	Тилозин	1
L 27	Клиндамицин	1
L 28	Имипенем	1
L 29	Ампициллин-Триметоприм/сульфаметаксол	2
L 31	Пенициллин G – Клиндамицин	2
L 32	Меропенем – Эритромицин	2
L 33	Энрофлоксацин	1
L 34	Имепенем – Клиндамицин	2
L 36	Пенициллин G- Клиндамицин – Эритромицин	3
L 38	Триметоприм/сульфаметакзол	1
L 39	Клиндамицин	1
L 40	Имепенем – Меропенем – Клиндамицин	3

Присутствие в мясном сырье для производства ферментированных мясных продуктов эпидемиологически значимых патогенных бактерий, таких как *Salmonella* spp. *и Listeria monocytogenes,* обладающих множественной

лекарственной устойчивостью, создает дополнительный риск возникновения пищевых токсикоинфекций у людей.

Результаты изучения распространенности устойчивости среди штаммов бактерий рода *Salmonella* к противомикробным препаратам[7]

Исследование чувствительности изолятов сальмонелл к антибиотикам выявило различные уровни устойчивости к 13 противомикробным препаратам (таблица 24). Штаммы наиболее часто были устойчивы к триметоприму/сульфаметоксазолу (n = 19, 59,38 %), цефазолину (n = 15, 46,86 %), тетрациклину (n = 13, 40,63 %) и амикацину (n = 9, 28,13 %). Но при этом наибольшую чувствительность штаммы проявляли к амоксициллину – клавулановой кислоте (n = 30, 93,75 %), тобрамицину (n = 26, 81,25), ампициллину (n = 23, 71,88 %) и азитромицину (n = 20, 62,50 %).

[7] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье: Rakitin, A.L.; Yushina, Y.K.; Zaiko, E.V.; Bataeva, D.S.; Kuznetsova, O.A.; Semenova, A.A.; Ermolaeva, S.A.; Beletskiy, A.V.; Kolganova, T.V.; Mardanov, A.V.; Shapovalov, S.O.; Tkachik, T.E. Evaluation of Antibiotic Resistance of Salmonella Serotypes and Whole-Genome Sequencing of Multiresistant Strains Isolated from Food Products in Russia. //Antibiotics 2022, 11, 1.DOI:10.3390/antibiotics11010001

Таблица 24 – Результаты изучения устойчивости к противомикробным препаратам бактерий *Salmonella* spp., выделенных из пищевых продуктов

Класс противомикробных средств	Наименование противомикробного средства	Количество штаммов (%)		
		Устойчивые	Промежуточные	Чувствительные
Пенициллины	ампициллин	8 (25,00)	8 (3,13)	23 (71,88)
Монобактамы/ карбапенемы	имипенем	6 (18,75)	2 (6,25)	24 (75,00)
Аминогликозиды	амикацин	9 (28,13)	14 (43,75)	9 (28,13)
	стрептомицин	8 (25,00)	4 (12,50)	20 (62,50)
	тобрамицин	5 (15,63)	1 (3,13)	26 (81,25)
Цефемы	цефотаксим	6 (18,75)	6 (18,75)	20 (62,50)
	цефазолин	15 (46,86)	8 (25,00)	9 (28,13)
Антагонисты фолиевой кислоты	триметоприм/ сульфаметоксазол	19 (59,38)	0 (0)	13 (40,63)
	хлорамфеникол	7 (21,88)	3 (9,38)	22 (68,75)
Макролиды и азалиды	азитромицин	12 (37,50)	-	20 (62,50)
Комбинации β-лактама/ ингибитора β-лактамазы	амоксициллин – клавулановая кислота	2 (6,25)	0 (0)	30 (93,75)
Нитрофуран	фурадонин	5 (18,75)	3 (9,38)	24 (75,00)
Тетрациклины	тетрациклин	13 (40,63)	9 (28,13)	10 (31,25)

Примечание: ампициллин 10 мкг, имипенем 10 мкг, амикацин 10 мкг, стрептомицин 10 мкг, тобрамицин 10 мкг, цефотаксим 30 мкг, цефазолин 30 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 1,25 / 23,75 мкг, хлорамфеникол 30 мкг, азитромицин 15 мкг, амоксициллин – клавулановая кислота 20/10 мкг, фурадонин 300 мкг и тетрациклин 30 мкг.

Всего было обнаружено 30 паттернов устойчивости среди изученных изолятов сальмонелл к восьми группам противомикробных препаратов (таблица 25).

Таблица 25 – Фенотипический профиль устойчивости сальмонелл, выделенных из пищевых продуктов

Изолят	Фенотипический профиль устойчивости	Количество противомик-робных соединений	Количество классов
S1	Ампициллин - триметоприм/ сульфаметоксазол - цефазолин	3	3

S3	Стрептомицин – ампициллин - тобрамицин - имипенем - хлорамфеникол	5	4
S5	Цефатоксим - триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин- тетрациклин - цефазолин	5	4
S14	Стрептомицин - триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин - тетрациклин - цефазолин	5	4
S25	Стрептомицин - триметоприм/ сульфаметоксазол - тетрациклин	3	3
S23	Цефатоксим -амикацин- азитромицин - цефазолин	4	3
S4	Амикацин- триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин - тетрациклин - нитрофурантоин	5	5
S33	Цефазолин	1	1
S6	Стрептомицин - амикацин - азитромицин	4	3
S11	Цефотаксим -тобрамицин- триметоприм/	4	3
S9	Азитромицин	1	1
S10	Цефазолин - хлорамфеникол	1	1
S18	Ампициллин - амикацин - триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин	4	4
S26	Стрептомицин -имипенем- цефазолин - нитрофурантоин	4	4
S15	Амикацин - триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин - тетрациклин - цефазолин	5	5
SZL30	Стрептомицин - Ампициллин - амикацин - тобрамицин - триметоприм/ сульфаметоксазол - имипенем –тетрациклин - хлорамфеникол	8	6
SZL 31	Стрептомицин - Ампициллин - амикацин - тобрамицин - триметоприм/ сульфаметоксазол - имипенем –тетрациклин - хлорамфеникол	8	6
S34	Амикацин- триметоприм/ сульфаметоксазол - тетрациклин - цефазолин - нитрофурантоин	5	5

S35	Триметоприм/ сульфаметоксазол	1	1
S36	-	0	0
S37	Триметоприм/ сульфаметоксазол - тетрациклин - нитрофурантоин	3	3
S28	Цефотаксим - азитромицин - цефазолин – хлорамфеникол - нитрофурантоин	5	4
S16	Триметоприм/ сульфаметоксазол - азитромицин	2	2
S7	Амикацин - азитромицин - цефазолин	3	3
S8	Цефотаксим - азитромицин	2	2
S17	Ампициллин - триметоприм/ сульфаметоксазол - тетрациклин - цефазолин - хлорамфеникол	5	5
S20	Триметоприм/ сульфаметоксазол -имипенем- цефазолин	3	3
S27	Цефотаксим - тетрациклин	2	2
S29	Триметоприм/ сульфаметоксазол	1	1
S32	-	0	0
S19	Триметоприм/ сульфаметоксазол -имипенем- цефазолин	3	3
SZL 38	Стрептомицин - Ампициллин - амикацин –тобрамицин - триметоприм/ сульфаметоксазол - тетрациклин	6	4

Примечание: ампициллин 10 мкг, имипенем 10 мкг, амикацин 10 мкг, стрептомицин 10 мкг, тобрамицин 10 мкг, цефотаксим 30 мкг, цефазолин 30 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 1,25 / 23,75 мкг, хлорамфеникол 30 мкг, азитромицин 15 мкг, амоксициллин-клавулановая кислота 20/10 мкг, фурадонин 300 мкг и тетрациклин 30 мкг.

Из таблицы 25 видно, что только два из исследованных штаммов (6,3 %) были чувствительны ко всем протестированным противомикробным препаратам. Остальные 93,8 % были устойчивы, по крайней мере, к одному классу противомикробных препаратов, тогда как 68,8 % штаммов проявляли множественную устойчивость к трем или более классам противомикробных препаратов. Среди изученных изолятов 15,7 % (5/32) были устойчивы к четырем

группам противомикробных средств, а 25 % (8/32) проявили устойчивость к четырем противомикробным препаратам.

Три штамма проявили наивысшую устойчивость. SZL 38 был устойчив к шести антибиотикам, относящимся к четырем группам противомикробных соединений, а SZL 30 и SZL 31 были устойчивы к восьми противомикробным соединениям, принадлежащим к шести группам.

3.7 Изучение влияния антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас

Изучение влияния антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас было начато с изучения чувствительности к ним микроорганизмов стартовых культур.

3.7.1 Изучение чувствительности микроорганизмов стартовых культур к антибиотикам

Согласно нормативным документам с целью обеспечения безопасности и пригодности пробиотических пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище, содержащие в составе живые микроорганизмы, должны иметь штаммы с определенным профилем антибиотикорезистентности в отношении применяемых в медицинской практике антибиотиков и не обладать антибиотикорезистентностью трансмиссивного типа [94].

Из 10 стартовых культур, применяемых при производстве сырокопченой продукции, была выделена 21 культура микроорганизмов. Перечень исследованных стартовых культур и выделенных из них штаммов микроорганизмов приведен в таблице 26.

Таблица 26 – Перечень штаммов микроорганизмов, выделенных из стартовых культур

№	Бактериальный препарат	Вид выделенного штамма микроорганизма	Код образца
Коммерческие бактериальные препараты			
1	BITEC SM 96 аром (Фрутаром продакшен	*Staphylococcus carnosus*	L-1

	ГмбХ, Германия)		
2	BITEC LS 25 (Фрутаром продакшен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-2
		Lactobacillus sakei	L-3
3	Простарт HS (М Профуд Зрт. Венгрия)	*Staphylococcus carnosus*	L-4
		Staphylococcus xylosus	L-5
4	Safe Pro B-LC-77 (Хр.Хансен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-6
5	Bactoferm SM-194 RU (Хр.Хансен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-7
		Staphylococcus xylosus	L-8
6.	Bactoferm T-SP (Chr. Hansen, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-9
7.	ПротектСтарт (Moguntia Schweiz AG, Швейцария)	*Staphylococcus xylosus,*	L-10
		Staphylococcus carnosus	L-11
8.	MildSTART (Милдстарт) FB-CA4 (Швейцария)	*Lactobacillus sakel*	L-12
		Staphylococcus carnosus	L-13
		Staphylococcus xylosus	L-14
9.	PrestoSTART (Престостарт) (Moguntia, Швейцария)	*Staphylococcus carnosus*	L-15
		Lactobacillus sakei	L-16
10.	Fermarom R4/160 (Frutarom Savory Solutions GmbH" ("Фрутаром Сэвори Солюшэнс ГмбХ", Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-17
		Lactobacillus sakei	L-18
11.	Lyocarni VBL-97 (Sacco S.r.l., ИТАЛИЯ)	*Staphylococcus xylosus*	L-19
		Lactobacillus plantarum	L-20
		Lactobacillus curvatus	L-21

Для изучения чувствительности микроорганизмов были использованы антибиотики в концентрациях, которые максимально допустимы (МДУ) в мясе согласно ТР ТС 034/2013 (приложение 5).

Чувствительность к антибиотикам исследовали у 6 штаммов рода *Lactobacillus* и 15 штаммов рода *Staphylococcus*. Результаты исследования представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Результаты исследования чувствительности микроорганизмов стартовых культур к антибиотикам

Вид микроорганизма	Код образца	Наименование антибиотика и его концентрация							
		Доксициклин 0,1 мкг/см^3	Канамицин 0,1 мкг/см^3	Неомицин 0,5 мкг/см^3	Стрептомицин 0,5 мкг/см^3	Амоксициллин 0,05 мкг/см^3	Ципрофлоксацин 0,1 мкг/см^3	Гентамицин 0,05 мкг/см^3	Колистин 0,15 мкг/см^3
		Зона ингибирования роста микроорганизма, мм							
Staphylococcus carnosus	L-1	14	15	25	15	12	12	18	18
Staphylococcus carnosus	L2	15	15	16	18	12	17	17	10
Lactobacillus sakei	L-3	12	10	15	10	16	12	9	15
Staphylococcus carnosus	L-4	16	15	25	16	11	14	18	13
Staphylococcus xylosus	L-5	12	14	24	15	16	19	15	12
Staphylococcus carnosus	L-6	14	15	25	16	14	10	17	12
Staphylococcus carnosus	L-7	12	15	26	15	10	12	16	12
Staphylococcus xylosus	L-8	15	14	23	16	11	10	14	11
Staphylococcus carnosus	L-9	12	16	26	19	12	10	17	10
Staphylococcus xylosus	L-10	14	15	25	17	14	14	15	10
Staphylococcus carnosus	L-11	15	14	11	18	12	10	15	13
Lactobacillus sakei,	L-12	10	10	15	12	16	12	12	15
Staphylococcus carnosus,	L-13	16	12	24	15	17	18	16	16
Staphylococcus	L-14	12	15	26	16	14	19	14	14

xylosus									
Staphylococcus carnosus,	L-15	15	16	24	18	10	10	16	18
Lactobacillus sakei	L-16	12	18	15	16	14	15	10	14
Staphylococcus carnosus	L-17	12	15	25	12	16	16	15	15
Lactobacillus sakei	L-18	18	15	19	11	14	14	11	13
Staphylococcus xylosus	L-19	18	14	23	18	12	7	14	16
Lactobacillus plantarum	L-20	16	10	17	19	21	12	19	11
Lactobacillus curvatus	L-21	12	15	18	13	15	11	14	12

По результатам исследования было установлено, что микроорганизмы стартовых культур обладают чувствительностью к антибиотикам в исследуемых концентрациях, что свидетельствует о соответствии их требованиям нормативных документов [90].

Однако, учитывая данные, полученные в рамках настоящей диссертационной работы, по контаминации антибиотиками мяса и данные по чувствительности микроорганизмов стартовых культур, вызывает обеспокоенность направленность ферментативных процессов.

Чувствительность микроорганизмов стартовых культур к МДУ антибиотиков в мясе предполагает возникновения риска технологического характера за счет ингибирования их роста и как следствие неконтролируемый процесс созревания сырокопченых колбас в случае наличия остаточных количеств антимикробных веществ. Можно предположить, что частичное или полное ингибирование роста стартовых культур чревато медленным снижением pH до регламентированного значения, ингибированием процессов естественной и направленной ферментации.

На фоне отсутствия быстрого закисления, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы белковой составляющей продукта (мяса) не

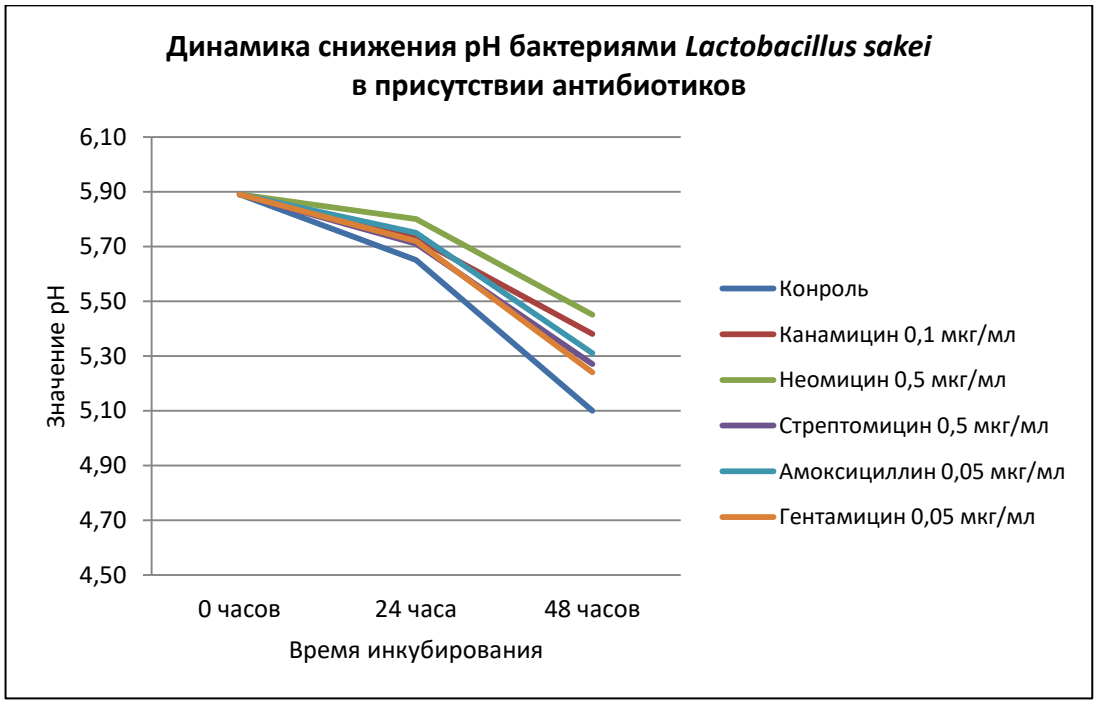
замедляют рост, а переходят в экспоненциальную фазу роста в среде с оптимальным значением pH для своего активного размножения.

Таким образом, присутствие антибиотиков в мясном сырье для сырокопченых колбасных изделий представляет риск ингибирования роста стартовых культур, что в свою очередь провоцирует риск размножения патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи и возникновения разные рода отклонений качества и безопасности готовой продукции.

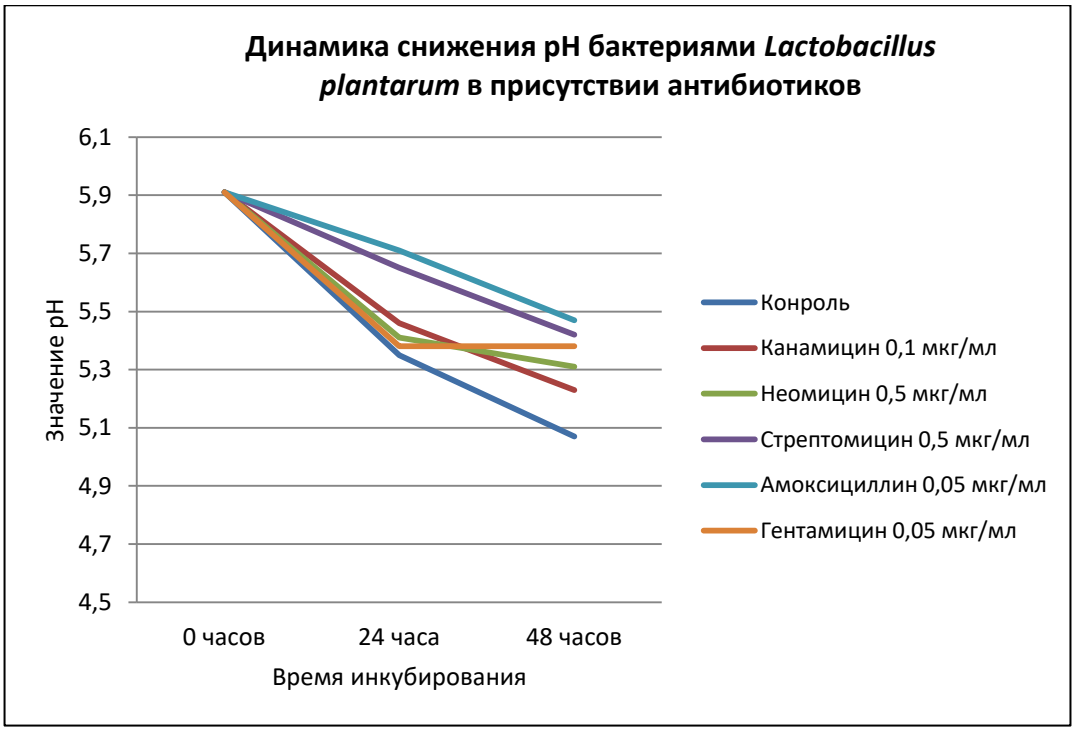
3.7.2 Изучение влияния антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур

Молочнокислые бактерии, при производстве сырокопченой продукции, сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, за счет которой происходит снижение pH. Для обеспечения производства безопасной продукции значение имеет скорость снижения pH.

Для аргументации предположения, что антибиотики являются причиной неконтролируемого процесса ферментации, была изучена динамика снижения pH бактериями *Lactobacillus sakei* и *Lacbacillus plantarum*, в присутствии антибиотиков в концентрации МДУ для мясного сырья (согласно ТР ТС 034/2013 приложение 5) и динамика роста этих и других представителей стартовых культур. Результаты представлены на рисунке 28.



а)



б)

Рисунок 28 – Динамика снижения pH модельной среды в присутствии антибиотиков

а) бактериями *Lactobacillus sakei (L-18)*

б) бактериями *Lactobacillus plantarum (L-20)*

За счет роста лактобацилл (*Lactobacillus* spp.) стартовых культур не менее чем за 35 ч при температуре 22 °С - 24 °С обеспечивается снижение pH модельных мясных систем до значений 5,0-5,3 ед. pH [4].

При культивировании штамма *Lactobacillus plantarum (L-20)* в контрольном образце без антибиотиков за 48 часов было достигнуто значение pH равное 5,07±0,02. Однако в присутствии антибиотиков значения pH не снижалось. При наличии амоксициллина в концентрации 0,05 мкг/см^3 через 48 часов значение pH составило 5,45±0,02, стрептомицина в концентрации 0,5 мкг/см^3 – 5,42±0,02, гентамицина в концентрации 0,05 мкг/см^3 - 5,38±0,02.

Схожие результаты были получены при исследовании *Lactobacillus sakei (L-18).* При культивировании *Lactobacillus sakei (L-18)* за 48 ч значение pH достигло 5,10±0,02 в контрольном образце. В то время как при культивировании с неомицином за это же время значение pH составило 5,45±0,02, с канамицином – 5,38±0,02, а с амоксициллином – 5,31±0,02.

После установления факта влияние антибиотиков на скорость снижения pH микроорганизмами стартовых культур было определено количество клеток ингибируемых МДУ антибиотиков, установленных для мяса. Для этого изучили динамику роста *Lactobacillus plantarum (L-20) и Lactobacillus sakei (L-18*), а также *Staphylococcus carnosus (L-2), Staphylococcus xylosus (L-8)* как в присутствии антибиотиков, так и без них. Результаты представлены на рисунках 29-32.

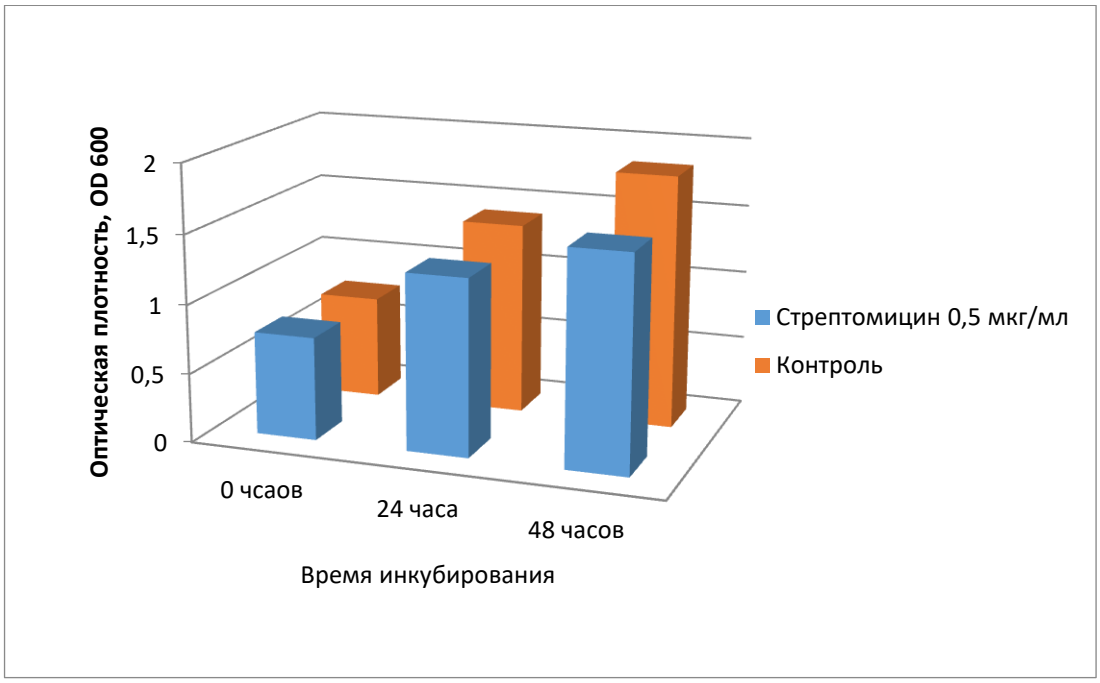


Рисунок 29 – Динамика роста *Staphylococcus carnosus* (L-2) в присутствии антибиотика стрептомицина (0,5 мкг/см^3)

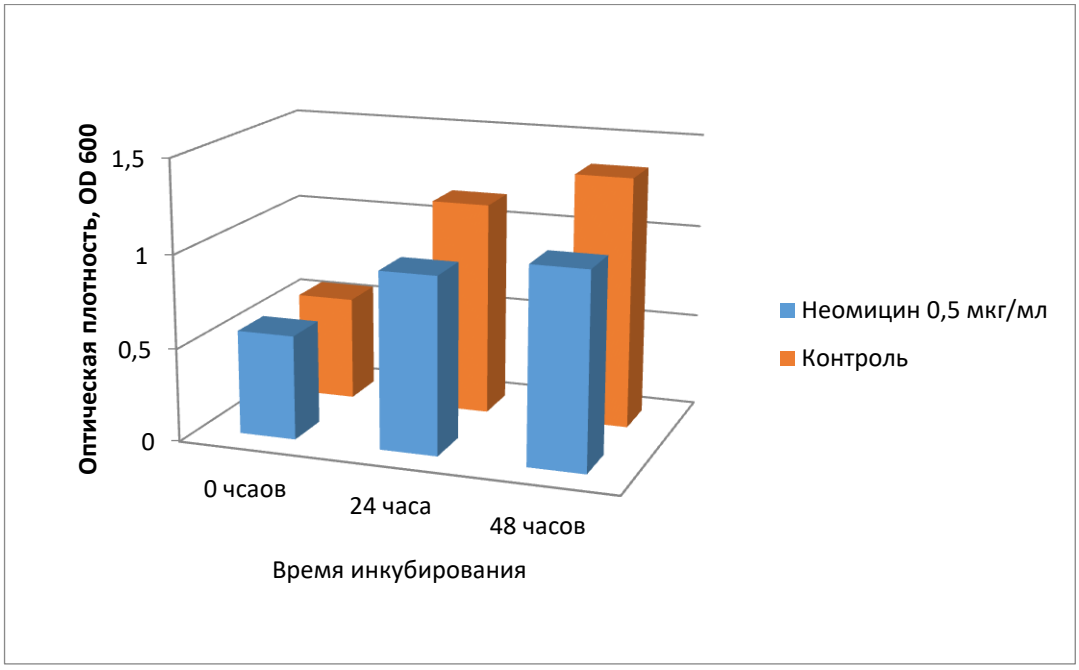


Рисунок 30 – Динамика роста *Staphylococcus xylosus* (L-8) в присутствии антибиотика неомицина (0,5 мкг/см^3)

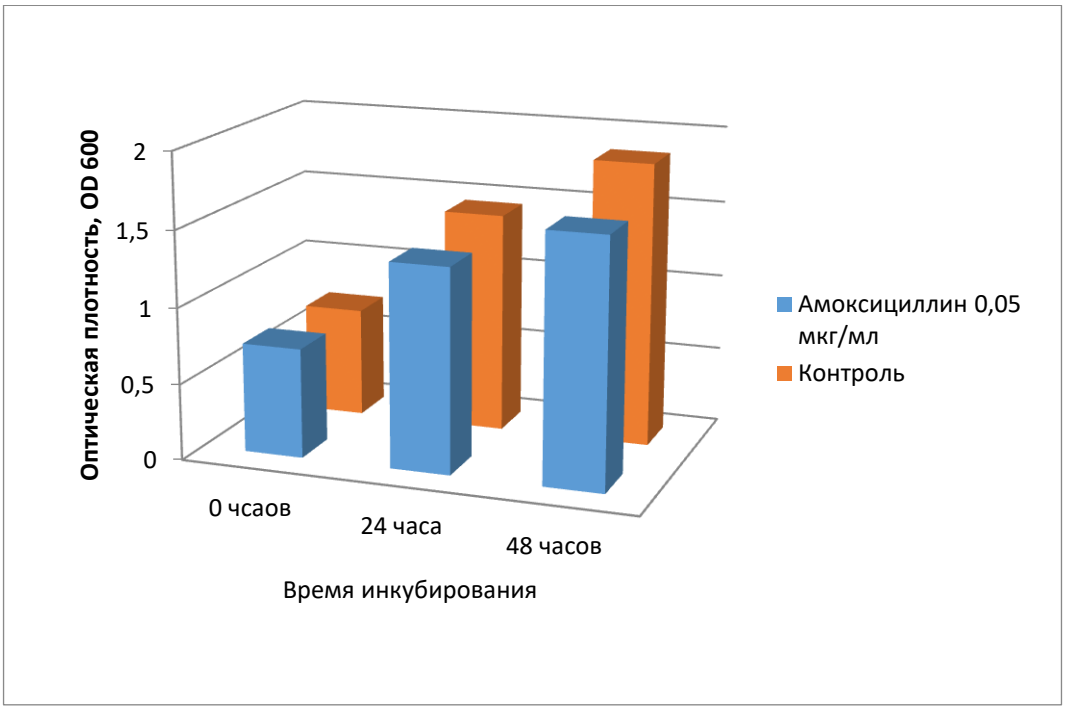


Рисунок 31 – Динамика роста *Lactobacillus plantarum* (L-20) в присутствии антибиотика амоксициллина (0,05 мкг/см^3)

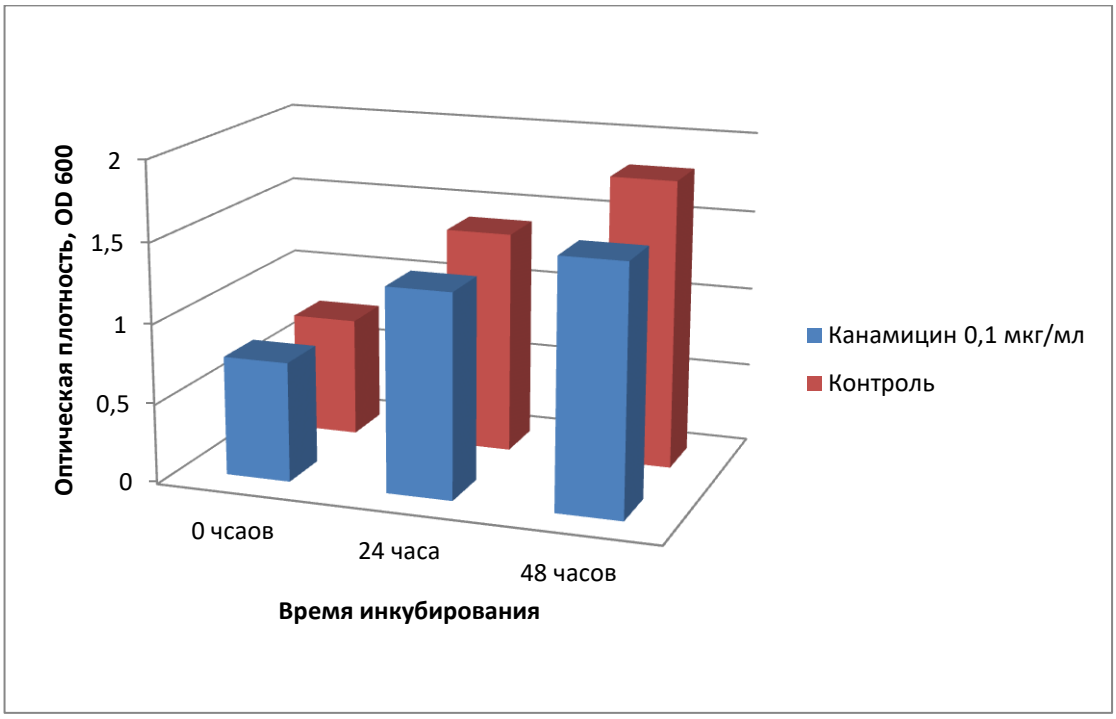


Рисунок 32 – Динамика роста *Lactobacillus sakei* (L-18) в присутствии антибиотика канамицина (0,1 мкг/см^3)

Через 48 часов культивирования каждого из микроорганизмов с антибиотиками по сравнению с контролем количество клеток *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus plantarum и Lactobacillus sakei*

снизилось на 10 %, 22 %, 13 % и 12 % соответственно. Больше всех, из исследованных микроорганизмов, снизилось количество *Staphylococcus xylosus* на 22 %. Они оказались наиболее чувствительны к действию антибиотиков. Соответственно потенциал этого кокка в формировании аромата и вкуса, а также формировании и сохранении цвета колбасного сырокопченого изделия будет снижен.

Анализ полученных данных по скорости снижения pH микроорганизмами стартовых культур в присутствии антибиотиков в концентрации МДУ установленного для мяса и потенциала роста этих микроорганизмов наглядно демонстрирует, что снижение количества клеток даже на 12-13 % может стать причиной неконтролируемого процесса ферментации сырокопченых колбас и соответственно риск производства некачественной и не безопасной продукции. Эти научные данные могут быть основой для пересмотра количества клеток в составе стартовых культур.

3.8 Изучение биохимических и ферментативных процессов, формирующих вкусо-ароматические и физико-химические характеристики сырокопченой колбасы

Основная функция вносимых стартовых культур, используемых при производстве сырокопченой мясной продукции, а в частности бактерий рода *Lactobacillus*, заключается в быстрой выработке молочной кислоты, которая вызывает снижение pH, подавление роста патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи, увеличение срока хранения ферментированных продуктов. Поскольку стартовые культуры являются преобладающей микробиотой, это позволяет производителям пищевых продуктов контролировать процесс ферментации, исключая нежелательную флору и снижая микробиологические и производственные риски. Однако при нарушении данных процессов гарантировать безопасность готового продукта невозможно.

Коагулазонегативные стафилококки, как правило, представленные в стартовых культурах бактериями рода *Staphylococcus,* способствуют

формированию сенсорного качества сырокопченых колбас через катаболизм углеводов и аминокислот, образование сложных эфиров и их взаимодействие с жирными кислотами. Во время ферментации *St. carnosus*, *St. equorumb* и *St. xylosus* отвечают за формирование различных профилей аромата. Ингибирование роста коагулазонегативных стафилококков может приводить к нарушениям при формировании вкуса и аромата в готовом продукте.

Установив, что антибиотики снижают потенциал роста микроорганизмов стартовых культур и соответственно скорость снижения pH, было продолжено исследование и изучены биохимические и ферментативные процессы, формирующие вкусо-ароматические и физико-химические характеристики сырокопченой колбасы.

Для исследования были приготовлены модельные образцы сырокопченых колбас согласно СТО 00419779-002-2013 «Метод ускоренного тестирования технологических свойств стартовых культур».

Как известно, для обеспечения яркости и стабильности цвета, получения характерного вкуса в фарш сырокопченых колбас вводят коагулазонегативные стафилококки. Стафилококки, восстанавливая нитраты натрия до нитритов, способствуют образованию окиси азота, которая взаимодействует с миоглобином до образования стабильного нитрозомиоглобина.

Изучено влияние антибиотиков на преобразование нитрита натрия в процессе ферментации модельных образцов ($К_1$-$К_2$, $К_5$-$К_6$). В результате проведенных экспериментов было установлено, что в опытных образцах массовая доля нитрита натрия снижалась менее интенсивно, чем в контрольных образцах без антибиотиков (рисунки 33-34).

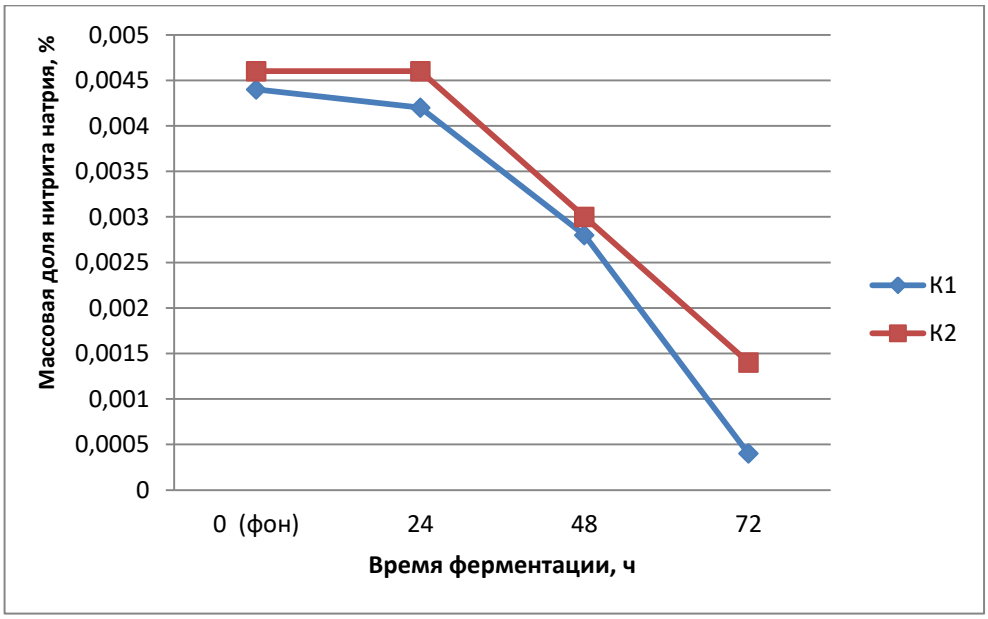


Рисунок 33 – Динамика снижения нитрита натрия в образцах $К_1$ и $К_2$ под влиянием *Staphylococcus carnosus* в присутствии антибиотиков

Примечание: Модельные образцы сырокопченой колбасы:
$К_1$ – контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus;*
$К_2$ – опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

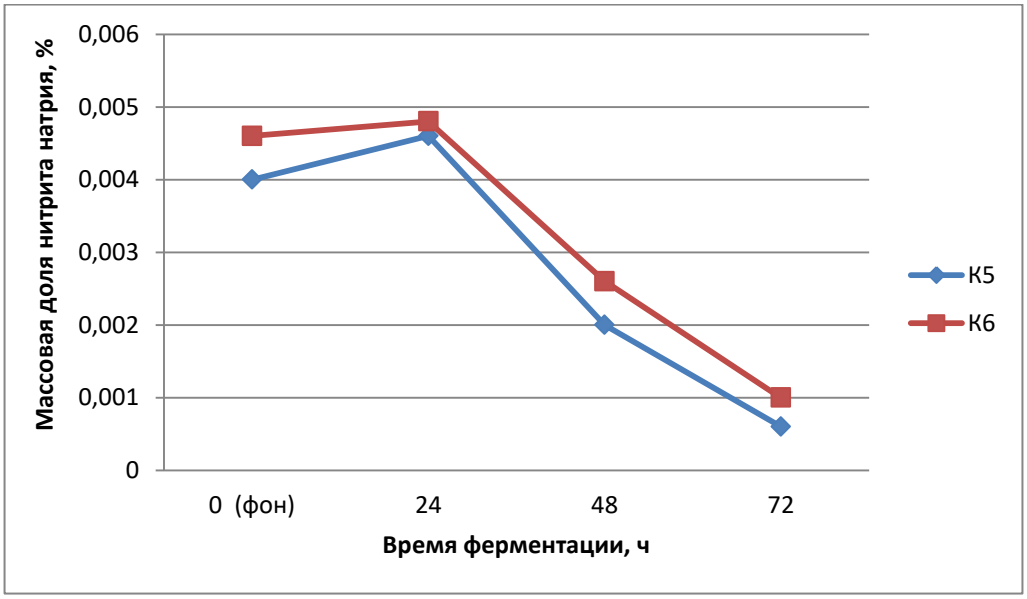


Рисунок 34 – Динамика снижения нитрита натрия в образцах $К_5$ и $К_6$ под влиянием *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei* в присутствии антибиотиков

Примечание: Модельные образцы сырокопченой колбасы:
$К_5$ - контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei;*

$К_6$ - опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

Установлено, что в опытных образцах массовая доля нитрита натрия снижалась менее интенсивно, чем в образцах без антибиотиков. *Staphylococcus carnosus* часто используется при производстве сырокопченых колбас за счет своей основной функции, заключающейся в восстановлении нитрита натрия с образованием оксида азота, что приводит к снижению концентрации нитрита. Ингибирование остаточными количествами антибиотиков роста денитрифицирующих микроорганизмов рода стафилококк, в том числе *Staphylococcus carnosus,* может приводить не только к замедленному формированию цвета, но и к нарушениям формирования типичных аромата и вкуса, свойственных готовому продукту.

Низкое значение активности воды в готовом продукте один из барьеров роста многих микроорганизмов, в том числе патогенных. Значение активности воды в процессе изготовления сырокопченых колбас снижается от 0,99 (исходное мясное сырье) до 0,80-0,86 для готового продукта. Значение этого показателя было изучено в процессе ферментации модельных образцов ($К_1$-$К_6$), хотя снижение активности воды происходит на этапе сушки при производстве сырокопченой продукции. Результаты исследования представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты изменения активности воды в образцах колбасы

Наименование образца	Значение активности воды (a_w)			
	0 часов (фон)	24 часа	48 часов	72 часа
$К_1$ контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus*	0,9767	0,9675	0,9668	0,9670
$К_2$ опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.	0,9770	0,9679	0,9620	0,9681
$К_3$ контрольный образец колбасы с	0,9782	0,9677	0,9672	0,9620

Lactobacillus sakei				
$К_4$ опытный образец колбасы с *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.	0,9785	0,9698	0,9675	0,9616
$К_5$ контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei*	0,9788	0,9676	0,9468	0,9358
$К_6$ опытный образец колбасы с Staphylococcus carnosus и *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.	0,9789	0,9669	0,9578	0,9569

В течение 72 часов ферментации существенной разницы в значениях активности воды и скорости ее снижения в контрольных и опытных образцах выявлено не было.

Направленное действие микроорганизмов стартовых культур и индигенной микрофлоры мяса обеспечивает органолептические характеристики сырокопченых колбас.

Из микроорганизмов, входящих в состав стартовых культур, ароматообразователями являются представители семейства микрококков, стафилококков и отдельные штаммы молочнокислых бактерий.

В результате углеводного обмена микроорганизмов образуются продукты, которые играют очень важную роль в формировании аромата. Вносимые микроорганизмы и их ферментативные комплексы осуществляют деструкцию основных компонентов мяса и трансформацию их во вкусовые, ароматические и физиологически активные соединения, определяющие органолептические свойства готового продукта, его усвояемости в организме человека, биологическую ценность и безопасность для потребителя.

Изучение органолептических изменений аромата в исследуемых образцах ($К_1$-$К_6$) проводили с использованием прибора «электронный нос».

Для количественной оценки интенсивности аромата контрольных и опытных образцов сырокопченых колбас использовали площади соответствующих мультисенсорных профилей. Результаты на рисунках 35-37.

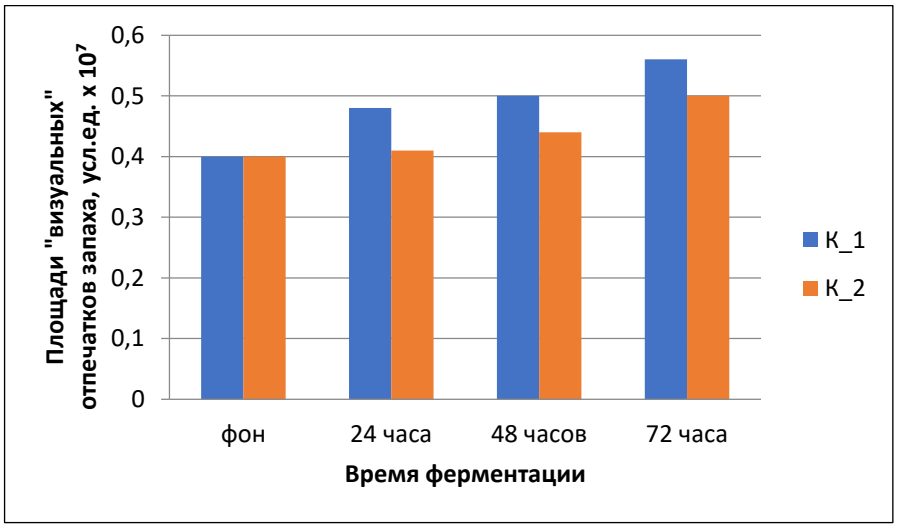


Рисунок 35 – График площадей «визуальных» отпечатков запаха образцов $К_1$ и $К_2$ в процессе ферментации

Примечание: $К_1$ - контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus*; $К_2$ - опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

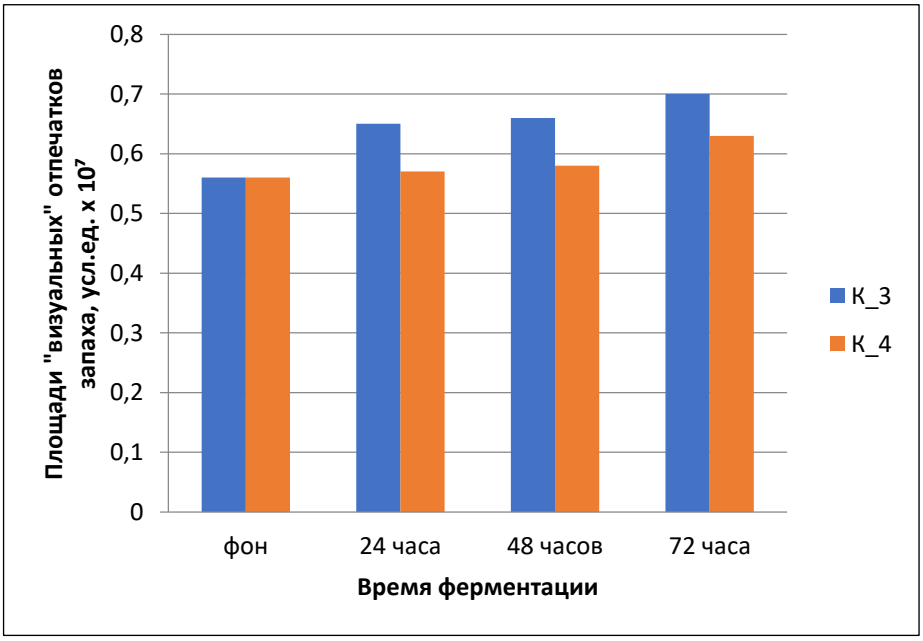


Рисунок 36 – График площадей «визуальных» отпечатков запаха образцов $К_3$ и $К_4$ в процессе ферментации

Примечание: $К_3$ контрольный образец колбасы с *Lactobacillus sakei*; $К_4$ опытный образец колбасы с *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

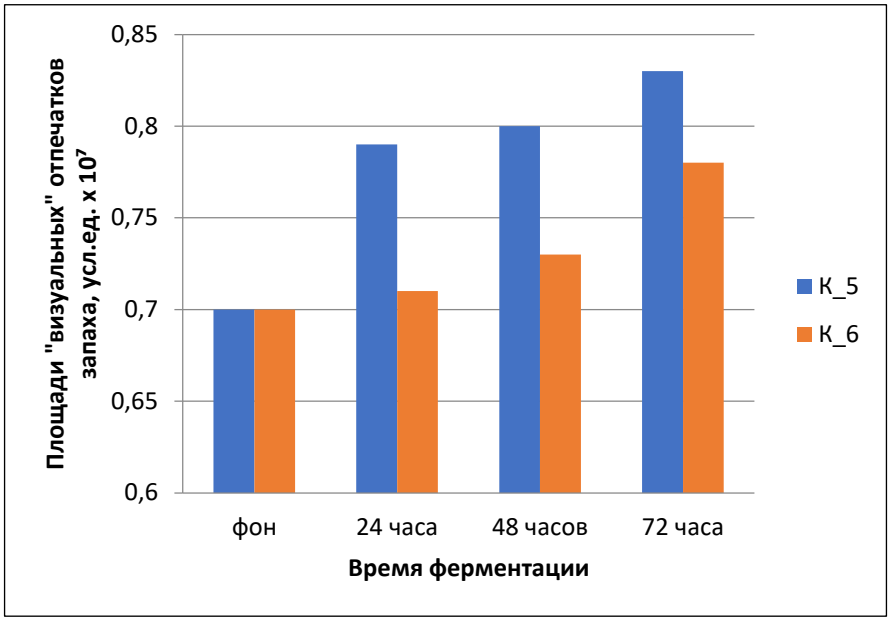


Рисунок 37 – График площадей «визуальных» отпечатков запаха образцов $К_5$ и $К_6$ в процессе ферментации

Примечание: $К_5$ контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus и Lactobacillus sakei*; $К_6$ опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus и Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

Согласно требованиям, предъявляемым к бактериальным препаратам для производства колбасных изделий, является продуцирование летучих ароматических соединений, для формирования органолептических свойств. Из данных, представленных на рисунках видно, что площади «визуальных отпечатков» контрольных образцов больше чем опытных образцов на 0,05-0,07 усл.ед*10^7. Это означает, что процесс формирования аромата опытных образцов в присутствии антибиотиков низкой интенсивности за счет снижения продуцирования ароматических летучих соединений.

Не менее важное значение, чем аромат сырокопченых колбас, имеет цвет готового изделия. Была проведена оценка образцов ($К_1$-$К_2$, $К_5$-$К_6$) по показателям светлоты (L) и красноты (a). Результаты представлены на рисунках 38-41.

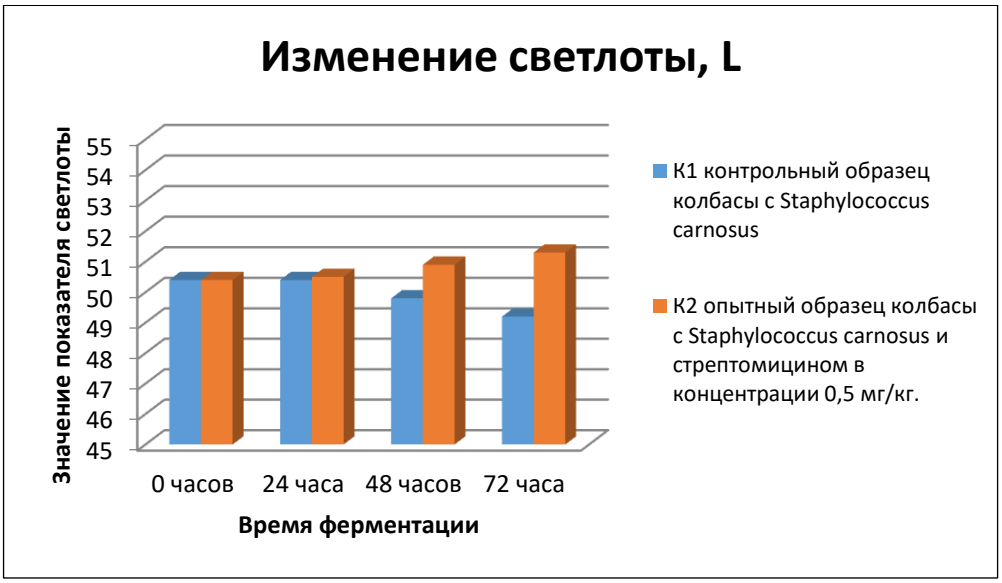


Рисунок 38 – Изменение светлоты образцов $К_1$ и $К_2$ в процессе ферментации

Примечание: $К_1$ контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus*; $К_2$ опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

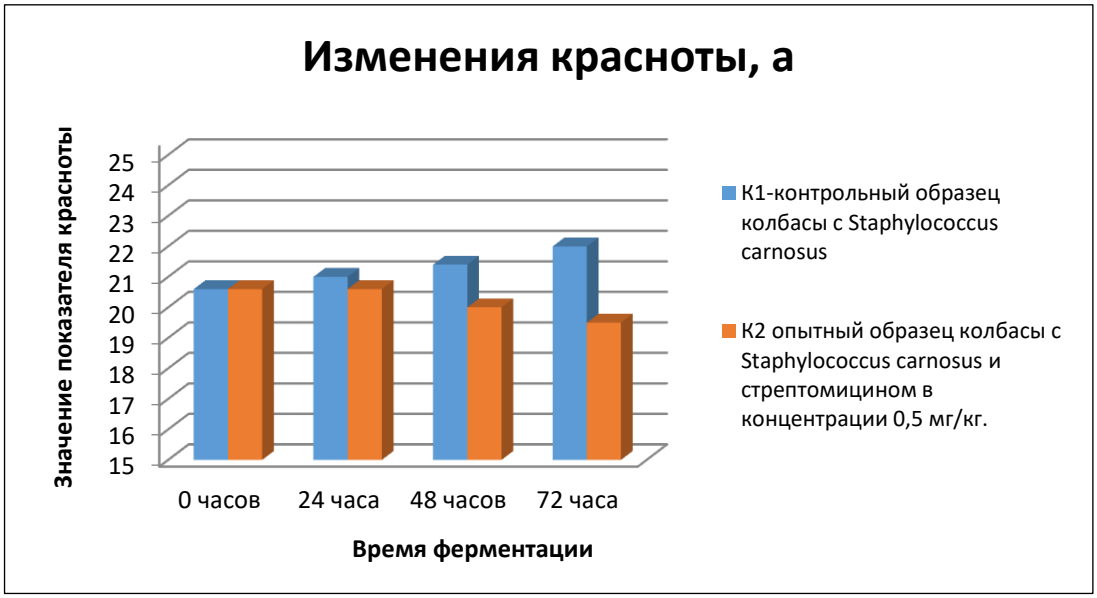


Рисунок 39 – Изменение красноты образцов $К_1$ и $К_2$ в процессе ферментации

Примечание: $К_1$ - контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus;* $К_2$ - опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

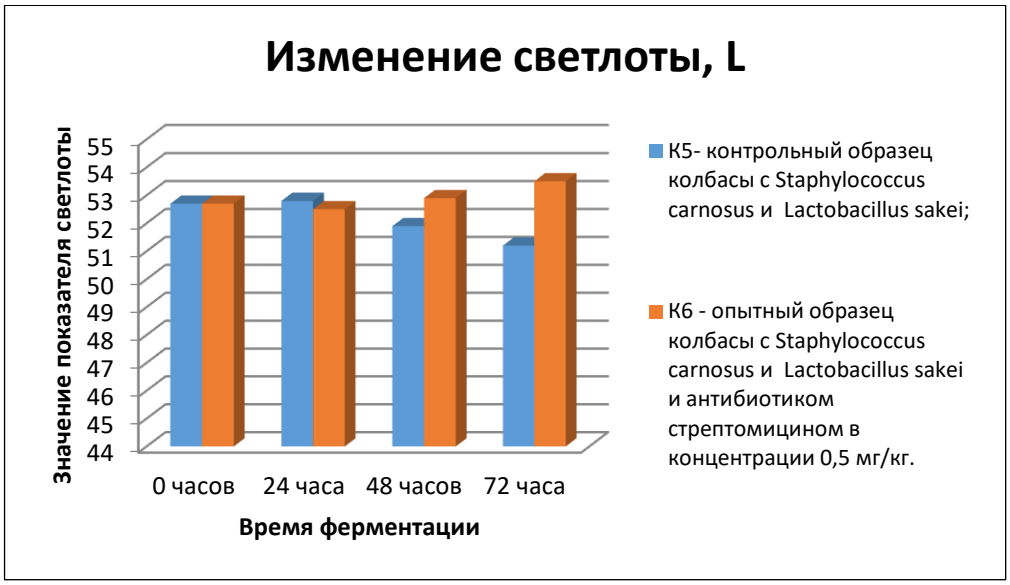


Рисунок 40 – Изменение светлоты образцов $К_5$ и $К_6$ в процессе ферментации

Примечание: $К_5$ контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei*; $К_6$ опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

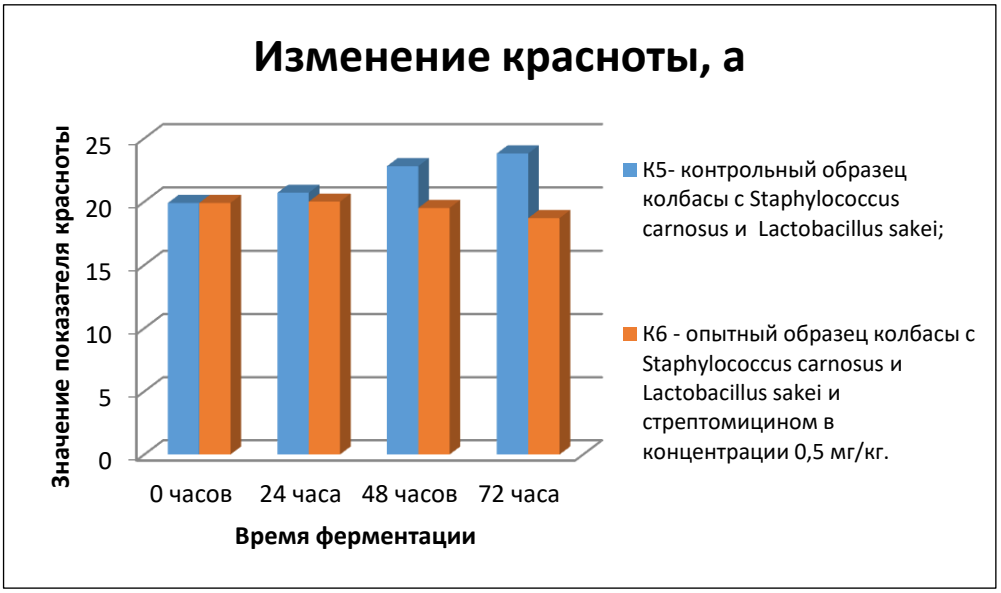


Рисунок 41 – Изменение красноты образцов $К_5$ и $К_6$ в процессе ферментации

Примечание: $К_5$ - контрольный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei*; $К_6$ - опытный образец колбасы с *Staphylococcus carnosus* и *Lactobacillus sakei* и антибиотиком стрептомицином в концентрации 0,5 мг/кг.

Помимо формирования вкуса, одной из основных функций *St. carnosus* в качестве стартовой культуры является его способность уменьшать нитраты и

нитриты. Нитраты и/или нитриты являются отвердителями, которые играют решающую роль в получении специфических сенсорных свойств, стабильности и гигиенической безопасности таких продуктов, как ферментированные колбасы, ветчина, а в последнее время и эмульсионные колбасы.

В результате проведённых исследований контрольные образцы характеризовались наибольшей интенсивностью изменения показателя «краснота», и пропорциональным уменьшением значения светлоты в процессе ферментации. В отличие от опытных образцов с антибиотиками, где увеличение показателя красноты происходило менее интенсивно.

3.9 Идентификация и оценка рисков

На первом этапе анализа риска, на основании проведенных исследований была проведена идентификация рисков, возникающих при производстве сырокопченых изделий, возникающих при наличии в мясе остаточных количеств антимикробных препаратов.

Риски при присутствии антимикробных веществ в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас, заключались в формировании антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов и ингибировании роста стартовых культур (при изготовлении полусухих колбас), а также желательной (молочнокислой) микрофлоры (при изготовлении сухих колбас без стартовых культур).

Для изучения и анализа потенциальных рисков была применена методика FMEA - анализа, количественной оценки риска.

Экспертным путем осуществлена оценка идентифицированных потенциальных рисков с точки зрения тяжести последствий, вероятности их реализации и вероятности обнаружения в процессе производства. Для определения критического фактора опасности определено предельное число риска (далее - ПЧР) (таблица 29)

Таблица 29 – Протокол FMEA анализа

Потенциально уязвимый этап	Причина уязвимости	Возможные последствия	Вероятная причина	S	O	D	ПЧР
Входной контроль и приемка сырья и материалов	присутствие антимикробных веществ в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас	Использование мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков	отсутствие контроля всех групп антибиотиков	3	4	3	36
Измель-чение мясного сырья		Последствия отсутствуют	-				
Посол		Последствия отсутствуют	-				
Последствия отсутствуют		Последствия отсутствуют	-				
Осадка		Последствия отсутствуют	-				
Климатизация и копчение (ферментация)		ингибирование роста вносимых стартовых культур, и собственной полезной микрофлоры мяса	отсутствие контроля всех групп антибиотиков, отсутствие временной выдержки перед убоем после применения антибиотиков	3	4	3	36
		формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов	отсутствие контроля всех групп антибиотиков, незаконное	4	4	3	48

			использование антибиотиков в животноводстве,				
Сушка		Последствия отсутствуют	-				
Охлаждение		Последствия отсутствуют	-				
Упаковка		Последствия отсутствуют	-				

В ходе FMEA-анализа, для выявления этапа, оказывающего максимальное влияние на качество сырья и готового продукта, вычисляем приоритетное число риска этапа (ПЧРэт). Экспертным путем установлено граничное значение ПЧР (ПЧР гр) равное 8±1. Как видно из таблицы наиболее уязвимыми этапами при производстве сырокопченых колбас являются ферментация (ПЧРэт 84) и входной контроль и приемка сырья и материалов (ПЧРэт 36). Эти этапы определены как этапы, на которых возможно нанесение максимального ущерба качеству и безопасности готовой продукции сырокопченых колбас, при присутствии антимикробных веществ в мясе, и на которых должен быть основной контроль.

На следующем этапе были составлены профили опасности в соответствии методикой профилирования рисков, предложенных в [95].

На основании выявленного критического технологического этапа **было оценено приоритетное число риска (ПЧР) в соответствии** с [95].

1) Для риска ингибирование роста стартовых культур:

Тяжесть последствия (Т) – Опасный компонент находится в готовом продукте, и не значительно превышает нормативные значения, не приводящие к серьезным последствиям – соответствует частично, в связи с этим ранг тяжести последствия был оценен как – 7.

Вероятность возникновения (В) – средний (В = 2-5) – соответствует полностью, поэтому ранг вероятности возникновения был оценен как 5.

Возможность выявления (ВВ) – Методики выявления есть, но контроль на данном этапе не проводится, ранг риска по критерию возможности выявления оценен как– 6.

Таким образом, ПЧР был рассчитан как:

ПЧР = Тп х Вр х ВВ=7 х 5 х 6 =210.

Высокое значение приоритетного числа риска показывает важность при обеспечении безопасности сырокопченых колбас проведение контроля антибиотиков в мясном сырье.

Ранг риска был рассчитан по формуле

Р=Вр+Тп(± Фр),

Где, Р-ранг риска

Вр- вероятность реализации

Тп – тяжесть последствия

Фр – фактор риска

Вероятность реализации (Вр) – очень высокий – 10-50 % и более выявления в объеме исследуемой продукции – Вр 5

Тяжесть последствия (Тп) - низкий – существует доказанный кратковременный негативный эффект на здоровье человека не приводящий к заболеванию – 2

Рассчитан Ранг риска (2+5)±да = 7

Согласно матрице оценки рисков риск относится к среднему.

2) Для риска формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов:

Тяжесть последствия (Т) – Опасный компонент находится в готовом продукте, и не значительно превышает нормативные значения, не приводящие к серьезным последствиям – соответствует частично, в связи с этим ранг тяжести последствия был оценен как – 7.

Вероятность возникновения (В) – средний (В = 5-10) – соответствует полностью, поэтому ранг вероятности возникновения был оценен как **8**.

Возможность выявления (ВВ) – Методики выявления есть, но контроль на данном этапе невозможен или законодательно показатель не нормируется, ранг риска по критерию возможности выявления оценен как– 7.

Таким образом, ПЧР был рассчитан как:

ПЧР = Тп х Вр х ВВ= 7 х 8 х 7 =392.

Высокое значение приоритетного числа риска показывает важность при обеспечении безопасности сырокопченых колбас проведение контроля антибиотиков в мясном сырье.

Ранг риска был рассчитан по формуле

Р=Вр+Тп(± Фр),

Где, Р-ранг риска

Вр- вероятность реализации

Тп – тяжесть последствия

Фр – фактор риска

Вероятность реализации (Вр) – очень высокий – 10-50 % и более выявления в объеме исследуемой продукции – Вр 5.

Тяжесть последствия (Тп) - высокая – существует доказанный негативный эффект на здоровье человека приводящий к значительному снижению качества жизни человека – 4.

Рассчитан Ранг риска (4+5)±да = 9.

Согласно матрице оценки рисков риск относится к высокому.

Используя формулу расчета ранга риска и матрицу риска, было проведено ранжирование и составление профилей, для всех ранее оцененных опасных факторов.

Таблица 30 – Профили рисков

Характеристика	Значение	
	ингибирование роста стартовых культур	формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов
Тяжесть последствия	7	7

(Т)		
Вероятность возникновения (В)	5	8
Возможность выявления (ВВ)	6	7
Приоритетное число риска	210	392
Вероятность реализации (Вр)	5	5
Тяжесть последствия (Тп)	2	4
Ранг риска	средний	высокий

Высокое значение приоритетного числа рисков показывает важность мер предотвращения рисков в обеспечении безопасности мясной продукции. Высокие значения вероятности возникновения и возможности выявления свидетельствуют о недостаточности научного изучения рассматриваемого риска.

На основе проведенного анализа и составления профиля рисков одним из ключевых факторов при оценке рисков является возможность их предотвращения.

На основе этого разработана схема управления идентифицированными рисками (рисунок 42).

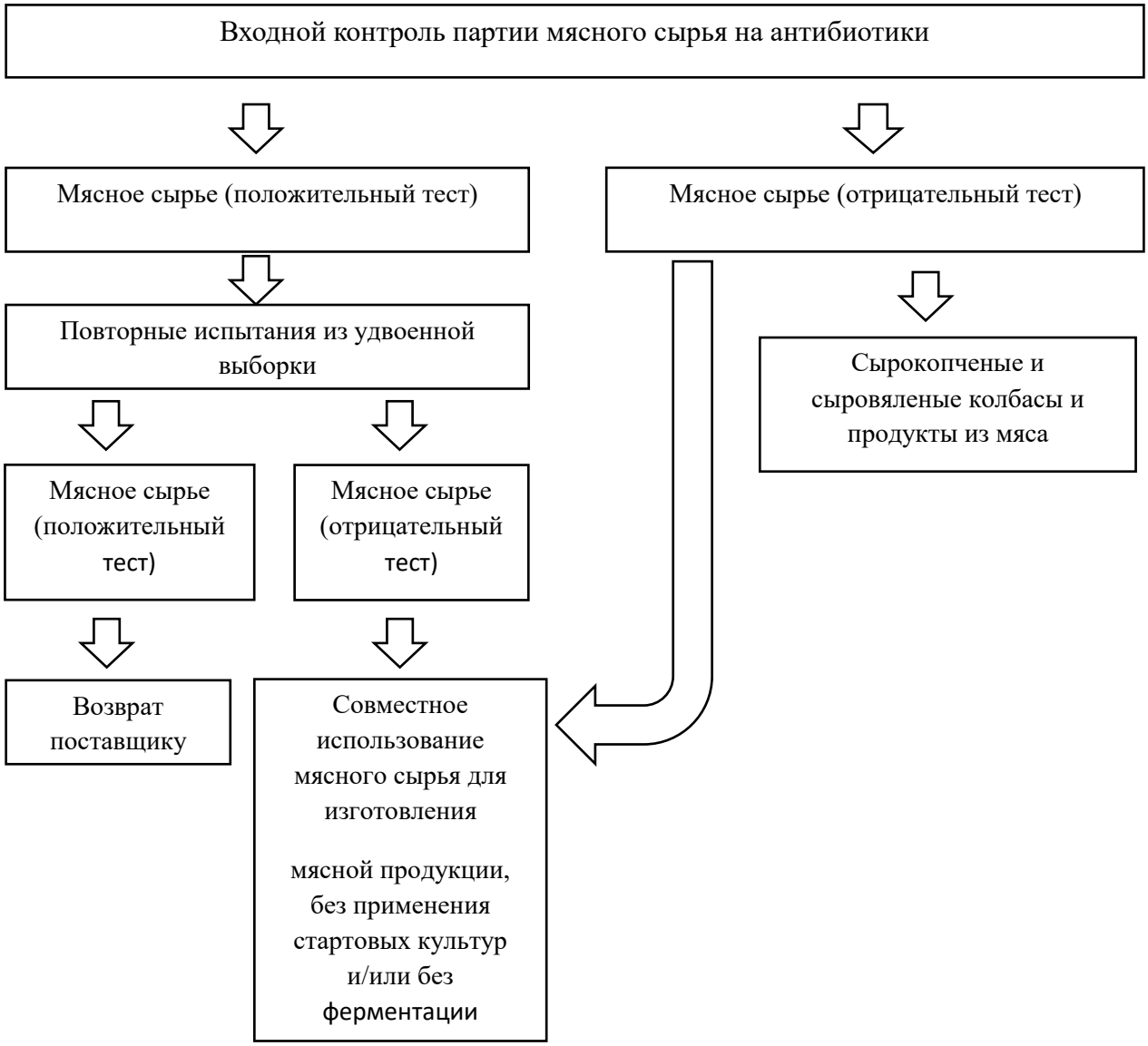


Рисунок 42 – Схема управления идентифицированными рисками

На основании разработанной схемы управления идентифицированными рисками было разработано СТО 00419779-012-2022 по организации и порядку проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

3.10 Исследование управляющих воздействий на снижение рисков

Для реализации схемы управления рисками был разработан СТО 00419779-012-2022 «Мясо и мясные продукты. Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых

колбас на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ».

Была проведена производственная выработка сырокопченых колбас, с применением разработанного СТО 00419779-012-2022. Выработанные образцы были исследованы на соответствие стандартам безопасности и качества, предъявляемым к сырокопченым колбасам.

Все полученные образцы были оценены по органолептическим показателям качества, таким как внешний вид, форма, цвет на разрезе, запах и вкус, консистенция. Результаты исследования представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Результаты органолептического исследования образцов сырокопченых колбас

Наименование показателя	Результаты исследования образцов колбас				
	Контрольный образец	Опытный образец 2.1	Опытный образец 2.2	Опытный образец 3.1	Опытный образец 3.2
Внешний вид, форма	Батоны с чистой, сухой поверхностью				
Цвет и вид на разрезе	Фарш темно-красного цвета, равномерно перемешан, без серых пятен, пустот	Фарш неравномерно окрашен с более светлой серединой, уплотненный поверхностный слой	Фарш темно-розового цвета, с наличием уплотненного поверхностного слоя (10 мм)	Фарш равномерно окрашен красного цвета	Фарш неравномерно окрашен с наличием уплотненного поверхностного слоя (10 мм) красного цвета
Запах и вкус	Запах и вкус свойственные данному виду продукта, без посторонних привкуса и запаха, запах с выраженным ароматом пряностей, копчения	**Несвойственный данному виду продукта**, с легким посторонним привкусом, аромат ферментации и пряностей выражен недостаточно, с легким кисловатым привкусом	Свойственный данному виду продукта, аромат ферментации и пряностей выражен недостаточно, горьковатым привкусом , более «тяжелый» аромат и вкус по сравнению с контролем	**Несвойственный данному виду продукта**, с выраженным посторонним запахом и привкусом, аромат ферментации выражен слабо, вкус сладковатый, горьковатый, кисловатый, аромат копчения выражен	**Аромат ферментации слабо выражен**, с посторонним запахом, соленый, с горьким привкусом
Консистенция	Плотная	Мягкая рыхловатая консистенция	Плотная	**Мягкая, несвязанная консистенция**	Мягкая рыхловатая консистенция

По сравнению с контрольным образцом в опытных образцах отмечалось неравномерное окрашивание фарша. В опытных образцах 2.1, 2.2 и 3.2 дополнительно отмечалось наличием уплотненного поверхностного слоя (10 мм) красного цвета. А в опытном образце 2.1 была отмечена более светлая середина.

Запах и вкус в опытных образцах 2.1 и 3.1 был несвойственный данному виду продукт, при этом аромат ферментации слабо выражен был в образцах 2.2 и 3.2. Консистенция при этом в опытных образцах характеризовалась как мягкая, рыхловатая и несвязанная.

Таким образом, все опытные образцы имели отклонения по органолептическим показателям по сравнению с контрольным образцом, выработанным с применением разработанного СТО 00419779-012-2022.

На следующем этапе все образцы были оценены на соответствие физико-химическим показателям. Результаты представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Результаты физико-химического исследования образцов сырокопченых колбас

Показатель	Наименование образца				
	Контрольный образец	Опытный образец 2.1	Опытный образец 2.2	Опытный образец 3.1	Опытный образец 3.2
Массовая доля нитрита натрия, %	0,0004 ±0,00006	0,0004 ±0,00006	0,0006 ±0,0009	0,00040 ±0,00006	0,00040 ±0,00006
Массовая доля жира, %	47	26,7±2,1	30,0±2,4	44,1±3,5	43,4±3,5
Массовая доля белка, %	22	22,8±1,8	25,1±2,0	20,1±1,6	22,6±1,8
Амино-аммиачный азот	76±5,1	**101,5±5,1**	**112,0±5,6**	**91,0±9,1**	**105,01±5,2**
Тиобарбитуровое число	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Кислотное число	2,05±0,43	**4,79±0,33**	**6,15±0,43**	**5,11±0,35**	**6,60±0,45**
Перекисное число	3,60±0,38	**8,06±0,40**	**8,67±0,63**	**7,60±0,38**	**8,40±0,62**

pH	5,05±0,01	5,21±0,01	5,34±0,01	5,42±0,01	5,38±0,01

При оценке физико-химических показателей были выявлены отклонения по сравнению с контрольным образцом по таким показателям как амино-аммиачный азот, кислотное число и перекисное число, что свидетельствует о начале окислительной порче жиров и снижению показателя свежести продукта.

Изменение данных показателей говорит о начале порчи продукта, что может быть связано со снижением количества МКБ, за счет ингибирования их роста антибиотиками и нарушением процесса ферментации.

Существенные отличия наблюдались и в значении показателя pH. Согласно нормативным документам значение pH к концу процесса ферментации должно достигнуть значения 5,0-5,3 и в готовом продукте быть не ниже 4,8-4,9 в зависимости от вида колбасного изделия. Проведенные исследования показали, что в опытных образцах 2.2, 3.1 и 3.2 значение pH превышало 5.3 в готовом продукте, что не соответствует нормативным требованиям, предъявляемым к сырокопченым колбасам. Как известно, низкое значение pH достигается путем превращения углеводов молочнокислыми бактериями и выработкой молочной кислоты. Анализ количества молочнокислых бактерий в опытных образцах также показал их низкое значение (таблица 33). В опытных образцах в готовом продукте количество МКБ не превышало $2,3*10^6$ КОЕ/г, в то время как в контрольном образце это значение составило $>3*10^8$ КОЕ/г.

Таблица 33 – Результаты микробиологического исследования сырокопченых колбас

Показатель	Наименование образца				
	Контрольный образец	Опытный образец 2.1	Опытный образец 2.2	Опытный образец 3.1	Опытный образец 3.2
БГКП (колиформы), не допускаются в 0,1 г	Не обнаружено				
Сульфитредуци-рующие клостридии, не	Не обнаружено				

допускаются в 0,01 г					
Staphylococcus aureus, не допускаются в 1,0 г	Не обнаружено				
Сальмонеллы, не допускаются в 25 г	Не обнаружено				
L.monocytogenes, не допускаются в 25 г	Не обнаружено				
E. coli, не допускаются в 1,0 г	Не обнаружено	Не обнаружено	**обнаружено**	**обнаружено**	Не обнаружено
Молочнокислые бактерии (МКБ)	$>3*10^{8}$	**$<4*10^{5}$**	**$2,3*10^{6}$**	**$1,8*10^{6}$**	**$1,6*10^{6}$**
Антимикробные вещества	Не обнаружено	**обнаружено**	**обнаружено**	**обнаружено**	**обнаружено**

Высокое значение pH и низкое количество молочнокислых бактерий может приводить к производству продукта несоответствующего требованиям безопасности. Результаты микробиологического исследования выявили наличие *Escherichia coli* в опытных образцах 2.2 и 3.1.

Контрольный образец, выработанных согласно разработанному СТО 00419779-012-2022, соответствовал всем требованиям безопасности и качества, предъявляемых к сырокопченым колбасам.

Разработанная схема управления рисками, реализованная в СТО 00419779-012-2022, позволяет снизить риски, которые возникают при производстве сырокопченых колбас из сырья с остаточными количествами антимикробных веществ, исключая возможность использования мяса с остаточными количествами антимикробных веществ для производства сырокопченых колбас.

Производственная апробация продемонстрировала работоспособность предпринятых мер. Образцы, выработанные согласно предложенной схеме соответствовали всем требованиям, предъявляемым к сырокопченым колбасам. В то время как образцы, выработанные без использования СТО 00419779-012-2022 не соответствовали как параметрам качества (нарушения органолептических характеристик, превышение значений амино-аммиачного азота, кислотного числа,

перекисного числа), так и параметрам безопасности (присутствие *Escherichia coli*, сниженное количество МКБ).

После разработки действий по улучшению качества и предупреждению возникновения рисков проводили повторный анализ с использованием метода FMEA (таблице 34).

Таблица 34 – протокол FMEA анализа (продолжение)

Возможные последствия	Меры по предотвращению	Меры по обнаружению	Предпринятые действия	S	O	D	ПЧР
ингибирование роста вносимых стартовых культур, и собственной полезной микрофлоры мяса	Контроль присутствия антимикробных веществ в мясе, используемом для производства	Разработка СТО 00419779-012-2022 «Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ»	Контроль входного сырья на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ	1	2	2	4
формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов	Не допуск мяса с остаточными количествами антибиотиков для производства сырокопченых колбас			1	2	1	2
Использование мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков	Контроль присутствия антимикробных веществ в мясе, используемом для производства			1	2	2	4

По результатам предпринятых действий по обнаружению и мер по предотвращению возникновению выявленных рисков произошло снижение уязвимости этапов ферментации (ПЧРэт - 6 баллов) и входного контроля и приемки сырья и материалов (ПЧРэт - 4 баллов).

3.11 Экономическая эффективность

Оценка экономической эффективности использования СТО 00419779-012-2022 «Мясо и мясные продукты. Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ» проводился путем расчета стоимости используемых реактивов, аренды используемого оборудования и лабораторной посуды. Подробно методические подходы и результаты расчета приведены в приложении 2.

Результаты расчёта показали, что суммарные затраты на проведение исследований по определению наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ в мясе всех видов убойных животных, в том числе мясе птицы, составили 478,24 рублей.

Полученные данные позволяют рекомендовать СТО 00419779-012-2022 для проведения рутинных исследований.

Выводы

1. Установлено, что микробиологическим качественным методом можно определить наличие 35 нормируемых антибиотиков одновременно. Определено, что методом можно установить наличие 22 антибиотиков в концентрации МДУ и 13 антибиотиков в концентрациях выше МДУ. Полученные результаты подготовлены для внесения в Приложение проекта ГОСТ 55481.
2. Определен уровень контаминированного мяса, используемого в производстве сырокопченых колбас, антимикробными веществами: свинины - 25,3 %, говядины- 18,4 %, мясо птицы - 29,4 %, фарша – 14,4 %. Установлены группы антибиотиков наиболее часто используемых и выявляемых в говядине: фениколы – 51,0 %, аминогликозиды – 49,0 % и бета-лактамы – 31,4%; в свинине: тетрациклины – 25,0 %, сульфаниламиды – 16,2 % и колистин – 10,3 %; в мясе птицы: фениколы – 16,2 %, сульфаниламиды и тетрациклиновая группа по 14,7 %; в фарше: тетрациклиновой группы – 20,0 %, макролиды, бета-лактамы и фторхинолоны по 12,7 %.
3. Установлено, что за три года мониторинга мяса разных видов животных, в т.ч. и птицы, а также фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, на перерабатывающие предприятия поступило: 9,9-11,4 % мяса и 12,8-13,2 % фарша обсеменённого бактериями рода *Salmonella*, а также 8,8 – 11,0 % мяса и 11,4 – 12,4 % фарша обсеменённого *Listeria monocytogenes*. Определен метагеномный профиль микроорганизмов образцов фарша сырокопченых колбас, состоящий из основных филумов: *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Tenericutes.* Установлена таксономическая разнородность микроорганизмов образцов, в зависимости от вида сырья и ключевые группы микроорганизмов, несущих в себе как риск возникновения порчи (*Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*) продуктов питания, в том

числе сырокопченых колбас, так и риск возникновения пищевых отравлений: (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*).

4. Установлено наличие устойчивости у штаммов *Salmonella* к 13 и *Listeria monocytogenes* к 12 антибиотикам, в том числе используемых в терапии инфекционных заболеваний людей. Из мяса и фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, выделены штаммы *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* обладающих мультирезистетностью. Определен их фенотипический профиль устойчивости.
5. Исследуя влияние антибиотиков на качество и безопасность сырокопченых колбас установлено: неконтролируемое изменение pH до 5,31-5,45; менее интенсивное снижение массовой доли нитрита натрия; снижение количества клеток микроорганизмов стартовых культур на 13-22 %; низкой интенсивности процесс формирования аромата модельных образцов микроорганизмами стартовых культур в присутствии антибиотиков за счет снижения образования ароматических летучих соединений; наибольшая интенсивность изменения показателя «светлоты», и пропорциональное уменьшение значения «красноты» в процессе ферментации. Установлена чувствительность микроорганизмов стартовых культур к МДУ антибиотиков установленный для мяса согласно ТР ТС 034.
6. Идентифицированы риски, которые могут возникнуть при наличии в мясе для изготовления сырокопченых колбасных изделий антибиотиков. Это риск ингибирования роста микроорганизмов стартовых культур и риск формирования антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов мяса.
7. Составлен профиль рисков ингибирования роста микроорганизмов стартовых культур сырокопченых колбас и формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса. Тяжесть последствий ингибирования роста микроорганизмов стартовых культур сырокопченых колбас и формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из

мяса составляет 7 баллов, вероятность их возникновения - 5 и 8 баллов соответственно, а возможность выявления – 6 и 7 баллов. Приоритетное число риска ингибирования роста стартовых культур составило 210 единиц, а формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса 392 единицы.

8. Разработана схема управления рисками, реализованная в СТО 00419779-012-2022.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МДУ – максимально допустимый уровень

H_2O - вода

NaOH 1 M - одномолярный раствор гидроксида натрия

DMF - N, N-Диметилформамид

кг - килограмм

мкг/см^3 – микрограмм на сантиметр кубический

КОЕ/г – Колониеобразующие единицы на грамм

мкл – микролитр

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

мм – миллиметр

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности мяса и мясной продукции"(ТР ТС 034/2013)
2. Антипова, Л.В. Технология и оборудование производства колбас и полуфабрикатов / Л.В. Антипова, И.Н. Толпыгина, А.А. Калачев.- Санкт-Петербург: Гиорд, 2011.- 600 с.
3. Федеральный закон "О качестве и безопасности пищевых продуктов" от 02.01.2000 N 29-ФЗ
4. ГОСТ Р 55456-2013 Колбасы сырокопченые. Технические условия.- М.: Стандартинформ, 2014. – 20 с.
5. Технический регламент Таможенного союз ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»
6. Система анализа рисков и определение контрольных точек: НАССР/ХАССП: Государственный стандарт США и России.- М.: 2003-594 с.
7. Фатьянов, Е.В. Производство сырокопченых и сыровяленых колбас/ Е.В. Фатьянов, Ч.К. Авылов – М.: Эдиториал сервис, 2008.- 74 с.
8. Репина Е. Антибиотики: новая реальность/ Е. Репина// Сфера: технологии. корма. Ветеринария.-2017.- 1 (4).- с. 52.
9. Акопян, К. В. Формирование аромата и вкуса сырокопченых колбас / К. В. Акопян, А. А. Нестеренко // Молодой ученый. — 2014. — №7. — С. 93-95
10. Храмченко, С. В. Совершенствование технологии полусухих ферментированных колбас: дис. …канд. техн. наук: 05.18.04/ Храмченко Светлана Владимировна.- М., 2007.- 173.
11. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. – М., 2002.

12. Лисицын, А.Б. Исследование качества мясного сырья для производства сырокопченых колбас / А.Б. Лисицын, А.А. Семенова, М.А. Цинпаев // Все о мясе.- 2006.- № 4.- С. 7-10
13. Батаева, Д.С. Проблемы, связанные с наличием о статочных количеств антимикробных препаратов в мясе и в продуктах убоя животных и метод их обнаружения / Д.С. Батаева, Е.В, Зайко, Ю.К. Юшина// Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова.- 2016.- 1.- с.50-53
14. Машенцева Н.Г. Функциональные стартовые культуры в мясной промышленности: монография / Н.Г. Машенцева, В.В. Хорольский. – М.: ДеЛи принт, 2008 – 11 с.
15. Соловьева А. А. Оценка безопасности ферментированных колбас / А. А. Соловьева // Техника и технология пищевых производств.- 2015.- 3 (38).- С. 55-59
16. Tamang, J.P. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods / J.P. Tamang, D-H Shin, S-J Jung and S-W Chae // Front. Microbiol.- 2016.-7.-c.578 doi: 10.3389/fmicb.2016.00578
17. Hammami R. Editorial: Application of protective cultures and bacteriocins for food biopreservation/ R. Hammami, I. Fliss, A. Corsetti // Frontiers Microbiol.- 2019.-10.-1561. doi: 10.3389/fmicb.2019.01561.
18. Taskila S. Industrial production of starter cultures. / S. Taskila, B. Speranza, A. Bevilacqua, M.R. Corbo, M. Sinigaglia. Starter Cultures in Food Production. John Wiley & Sons, Ltd; West Sussex, UK: 2017. pp. 79–100. Chapter 5.
19. Полтавская Ю. А. Применение стартовых культур при производстве сырокопченых колбас / Ю. А. Полтавская, Ребезов М. Б., Соловьева А. А., Паульс Е. А., Зинина О. В., Асенова Б. К.// Молодой ученый. — 2014. — №9. — С. 193-196
20. Батаева Д.С. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов./Д.С. Батаева,

Е.В, Зайко//Теория и практика переработки мяса. – 2016. – том 1. - №3. – 4-12

21. Wang, H. Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment./ H. Wang, L.Ren, X.Yu, J. Hu, Y. Chen, G. He, Q.Jiang.// Food Control.-2017.-80.- P. 217-225.
22. WHO, FAO, OIE. Monitoring global progress on antimicrobial resistance. 2018 . http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA0486EN/
23. Wise, R. Antimicrobial resistance is a major threat to public health / Brit Med J.// R.Wise.- 1998.- 317.- P.609–610.
24. Hawkey, P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance/ Brit Med J.// P.M. Hawkey.- 1998.- 317.- P.657–660.
25. Tomasz, A. b-lactam antibiotic resistance in Gram positive bacteria pathogens of upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms/ A. Tomasz, R. Munaz// Microbial Drug Resistance.- 1995.-1:.- P.103–109.
26. Musser, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights/ J.M. Musser// Clin Microbiol.- 1995.-8.- P.496–514
27. Livermore, D.M. Lactamases in laboratory and clinical resistance/ Clin Microbiol// D.M. Livermore.- 1995.-8.- P.557–584
28. Garcia-Bustos, J., A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci/ J. Garcia-Bustos, A. Tomasz //Proc Natl Acad Sci USA/.- 1990.- 87.- P.5415-5419
29. Hall, C.W. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria/ C.W. Hall, T.-F. Mah// FEMS Microbiol.- 2017.-10.-P.1093
30. Van den Bergh, B. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters/ B. Van den Bergh, M. Fauvart, J. Michiels// FEMS Microbiol.- 2017.- 10.- P.1093
31. Latha, C. Prevalence of Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Staphylococcus aureus, and Salmonella enterica Typhimurium in meat and meat

products using multiplex polymerase chain reaction/ C. Latha, C.J. Anu, V.J. Ajaykumar, B. Sunil// Vet World.- 2017.- 10(8).- P.927–931

32. Abebe, E. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens/ E. Abebe, G. Gugsa, M.Ahmed// J Trop Med.- 2020; -.4674235
33. Ebrahimi, A. A comparative study of the antibacterial properties of milk from different domestic animals/ A. Ebrahimi, M-H. Moosavy, S.A. Khatibi, Z. Barabadi, A. Hajibemani // Int J Dairy Technol.- 2021.-74(2).- P. 425–430.
34. Khatibi, S.A., Effect of nanoliposomes containing Zataria multiflora Boiss. essential oil on gene expression of Shiga toxin 2 in Escherichia coli O157:H7 / S.A. Khatibi, A. Misaghi, M.H. Moosavy, A. Akhondzadeh Basti, S. Mohamadian, A. Khanjari // J Appl Microbiol.- 2018.-124(2).-P.389–397
35. Khatibi, S.A. Encapsulation of Zataria multiflora Bioss. essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against Escherichia coli O157:H7 / S.A. Khatibi, A. Misaghi, M-H. Moosavy, A.A. Basti, M.K. Koohi, P. Khosravi, et al. // J Food Process Preserv.- 2017.-41(3).-e12955.
36. Moosavy, M-H. Behaviour of Listeria monocytogenes in Lighvan cheese following artificial contamination during making, ripening and storage in different conditions/ M-H. Moosavy, S. Esmaeili, A.M. Mortazavian, E. Mostafavi, B. Habibi-Asl, H. Hosseini, et al.// Int J Dairy Technol.- 2017.-70(3).- P.365–371.
37. Adzitey, F. Incidence and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated from beef (meat muscle, liver and kidney) samples in Wa abattoir/ F.Adzitey// Cogent Food Agric.- 2020.- 6(1).-1718269
38. Khatibi, S.A. Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review/ S.A. Khatibi, S. Hamidi, M.R. Siahi-Shadbad// Crit Rev Food Sci Nutr.- 2020.-1–P.22
39. Khatibi, S.A. Application of liquid-liquid extraction for the determination of antibiotics in the foodstuff: recent trends and developments/ S.A. Khatibi, S. Hamidi, M.R. Siahi-Shadbad// Crit Rev Anal Chem.- 2020.-1.–P.16

40. Ahmed, A.M. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 isolated from meat and dairy products/ A.M. Ahmed, T. Shimamoto// Int J Food Microbiol.- 2015.- 193-. P.68-73.
41. Doğruer, Y. Presence and antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes in retail meat and meat products / Y. Doğruer, N. Telli, E. Telli, A. Güner // Int J Biol Res. -2015.-3.- P.76
42. Chajęcka-Wierzchowska, W. Diversity of antibiotic resistance genes in Enterococcus strains isolated from ready-to-eat meat products / W. Chajęcka-Wierzchowska, A. Zadernowska, Ł. Łaniewska-Trokenheim // J Food Sci. .- 2016.-81(11).- M2799–m2807
43. Aguilar-Montes de Oca S. Phenotypic and genotypic profile of clinical and animal multidrug-resistant Salmonella enterica isolates from Mexico / S. Aguilar-Montes de Oca, M. Talavera-Rojas, E. Soriano-Vargas, J. Barba-León, J. Vázquez-Navarrete, J. Acosta-Dibarrat, et al. // J Appl Microbiol. 2018.-124(1).- P. 67–74
44. Jaja I.F. Molecular characterisation of antibiotic-resistant Salmonella enterica isolates recovered from meat in South Africa / I.F. Jaja, N.L. Bhembe, E. Green, J. Oguttu, V. Muchenje //Acta Trop.-2019.-190.-129
45. González-Gutiérrez, M. Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from Northwest Spain/ M. González-Gutiérrez, C. García-Fernández, C. Alonso-Calleja, R. Capita// Food Sci Nutr.- 2020.- 8(2).-P.777–785
46. Coetzee, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among Escherichia coli isolated from South African patients/ J. Coetzee, C. Corcoran, E. Prentice, M. Moodley, M. Mendelson, L. Poirel. et al..// S Afr Med J.- 2016.- 106(5).- P.35–36
47. Liu, YY. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study/ YY. Liu, Liu, Y. Wang, TR. Walsh, LX. Yi, R. Zhang, J. Spencer et al.// Lancet Infect Dis.- 2016.- 16(2).- P.161–168

48. D'Costa, VM. Sampling the antibiotic resistome/ VM. D'Costa, KM. McGrann, DW. Hughes, GD. Wright// Science.- 2006.- 311(5759).- P.374–377
49. Riesenfeld, CS. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities// CS. Riesenfeld, PD. Schloss, J. Handelsman// Annu Rev Genet.- 2004.- 38.- P.525–552
50. da Costa, PM. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment/ PM. da Costa, L. Loureiro, AJ. Matos// Int J Environ Res Public Health.- 2013.- 10(1).- P.278–294
51. Founou. LL, Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective/ LL. Founou, RC. Founou, SY. Essack// *Front Microbiol.*- 2016.- 7.- 1881
52. Hamers, FF. European Centre for Disease Prevention and Control issues guidance for the introduction of human papillomavirus (HPV) vaccines in European Union countries/ FF. Hamers,// *Euro Surveill.*- 2008.- 13(4).- 1854– P.61
53. Alfredson DA, Antibiotic resistance and resistance mechanisms in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli/ DA. Alfredson, V.Korolik //FEMS Microbiol Lett.- 2007.- 277(2).- P123–132
54. Koluman. A, Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends/ A. Koluman, A. Dikici//Crit Rev Microbiol .- 2013.- 39(1).- P.57–69
55. Olsen. SJ, Multidrug-resistant Salmonella Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization/ SJ. Olsen, M. Ying, MF. Davis, M. Deasy, B. Holland, L. Iampietro et al.// Emerg Infect Dis.- 2004.-10(5).-P.932–935
56. Huttner. A, Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum/ A. Huttner, S. Harbarth, J. Carlet, S. Cosgrove, H. Goossens, A. Holmes et al.. //Antimicrob Resist Infect Control.- 2013.-2.- P.31.

57. Hummel. A, Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food./ A. Hummel, WH. Holzapfel, CM. Franz//Syst Appl Microbiol.- 2007.- 30(1).- 1–P.7
58. Werner. G, Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficke/ G. Werner, TM. Coque, CM. Franz, E. Grohmann, K. Hegstad, L. Jensen et al.// Int J Med Microbiol.- 2013.-303(6-7).- P.360–379
59. Staley. C, Environmental and animal-associated enterococci/ C. Staley, GM. Dunny, MJ. Sadowsky// Adv Appl Microbiol.- 2014.- 87.- P147–186
60. Carniel. E, Plasmids and pathogenicity islands of Yersinia/ E Carniel, J. Hacker, JB. Kaper// Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes. Berlin, Heidelberg: Springer.- 2002.- P. 89-108.
61. Preston MA, Antimicrobial susceptibility of pathogenic Yersinia enterocolitica isolated in Canada from 1972 to 1990/ MA. Preston, S. Brown, AA. Borczyk, G. Riley, C. Krishnan// Antimicrob Agents Chemother.- 1994.- 38(9).-2121 -2124
62. Pham, J.N. Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of Yersinia enterocolitica / J.N. Pham, S.M. Bell, J.Y. Lanzarone // J Antimicrob Chemother.- 1991.-28(1).- P.13–8.
63. Fong, D.H. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry / D.H. Fong, A.M. Berghuis // EMBO J.- 2002.- 21(10).-2323–2331
64. FAO. Guidelines for risk analysis of food borne antimicrobial resistance (cac/gl77-2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO); 2011.
65. FAO. Biosecurity in food and agriculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003
66. ГОСТ Р 55481-2013 Мясо и мясные продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.- М.: Стандартинформ, 2019. – 9 с.
67. ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий Listeria monocytogenes.- М.: Стандартинформ, 2014. – 29 с.

68. ГОСТ 31659-2012 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.- М.: Стандартинформ, 2014. – 25 с.
69. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST / R. C. Edgar //.-2010.- 26.-2460–2461.
70. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, M100S, 29th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2019; Volume 39.
71. ГОСТ 8558.1-2015 Продукты мясные. Методы определения нитрита.- М.: Стандартинформ, 2016. – 12 с.
72. ГОСТ Р 51478-99 Мясо и мясные продукты. Контрольный метод определения концентрации водородных ионов (pH).- М.: Стандартинформ, 2018. – 7 с.
73. ГОСТ 23042-2015 Мясо и мясные продукты. Методы определения жира.- М.: Стандартинформ, 2019. –13 с.
74. ГОСТ Р 55479-2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения амино-аммиачного азота.- М.: Стандартинформ, 2018. – 8 с.
75. ГОСТ Р 55810-2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения тиобарбитурового числа.- М.: Стандартинформ, 2018. – 8 с.
76. ГОСТ Р 55480-2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения кислотного числа.- М.: Стандартинформ, 2018. – 8 с.
77. ГОСТ 25011-2017 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка.- М.: Стандартинформ, 2018. – 16 с.
78. ГОСТ 34118-2017 Мясо и мясные продукты. Метод определения перекисного числа.- М.: Стандартинформ, 2018. – 12 с.
79. ГОСТ 31747-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).- М.: Стандартинформ, 2013. – 20 с.
80. ГОСТ 29185-2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях. - М.: Стандартинформ, 2015. – 16 с.

81. ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus. - М.: Стандартинформ, 2013. – 28 с.
82. ГОСТ 30726-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Escherichia coli.- М.: Стандартинформ, 2013. – 6 с.
83. ГОСТ 10444.11-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов.- М.: Стандартинформ, 2014. – 14 с.
84. ГОСТ ISO 21807-2015 Микробиология пищевой продукции и кормов. Определение активности воды.- М.: Стандартинформ, 2016. – 9 с.
85. Кузлякина, Ю. А. Повышение эффективности и контроля опасных факторов производства свинины от поля до прилавка: дис. … канд.техн.наук: 05.02.23/ Кузлякина Юлия Алексеевна.- М., 2014 – С.147.
86. Кузьмин, А.М. Метод анализа видов и последствий отказов /А.М. Кузьмин // Методы менеджмента качества.- 2004.- №11.- с.35.53
87. Alizadeh-Hesar, M. Clonal dissemination of a single Shigella sonnei strain among Iranian children during fall 2012 in Tehran IR Iran / Alizadeh-Hesar, M. Bakhshi, B., Najar-Peerayeh, S. // Infect. Genet. Evol. .- 2015.-34.- P. 260-266
88. Ram, P.K. Part II. Analysis of data gaps pertaining to Shigella infections in low and medium human development index countries, 1984–2005 / Ram, P.K., Crump, J.A., Gupta, S.K. Miller, M.A., Mintz, E.D. // Epidemiol. Infect. .- 2008.- 136 .- P. 577-603
89. Zaidi, M.B. Shigella: a highly virulent and elusive pathogen / Zaidi, M.B., Estrada-García, T. // Curr. Trop. Med. – 2014.- P. 81-87
90. Gyles, C.L. Escherichia coli, продуцирующая токсин шига : обзор / Gyles, C.L. // J. Anim. Sci. .- 2007.- 85.- P. E45 - E62
91. Sartz, L. An outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination / Sartz, L., Jong, B. De., Hjertqvist, M.

Plym-Forshell, L. Asterlund, R. Loefdahl, S. Osterman, B. Stahl, A. Eriksson, E. Hansson, H.B. Karpman, D. / Epidemiol. Infect. – 2008.-№136.- P. 370-380

92. Schimmer, B. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx(2)-positive Escherichia coli O103:H25 traced to cured mutton sausages / Schimmer, B., Nygard, K. Eriksen, H.M. Lassen, J. Lindstedt, B.A. Brandal, L.T. Kapperud, G., Aavitsland P. // BMC Infect. Dis. – 2008.- № 8 .- P. 10
93. Ethelberg, S. Outbreak of Non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli infection from consumption of beef sausage / Ethelberg, S. Smith, B. Torpdahl, M. Lisby, M. Boel, J. Jensen, T. Nielsen, E.M. Molbak K. - Clin. Infect. Dis.- 2009.- 48.- P. E78-E81
94. Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов Методические указания МУ 2.3.2.2789-10 2.3.2. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – С.104
95. Кузнецова О.А. Теоретические и практические аспекты анализа ипрогнозирования рисков в технологии мяса и мясной продукции: дисс. … доктор техн. наук: 05.18.04, 05.02.23 / Кузнецова Оксана Александровна. – Москва, 2017. – 279 с.

Приложение 1

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по
экономическим связям и маркетингу
_____ С.А. Горбатов
«10» мая 2022 г.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ **СТО 00419779-012-2022**

Мясо и мясные продукты

Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

Москва
2022

I. Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным Законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании»; правила применения стандартов организации – ГОСТ Р 1.4 – 2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения»

Сведения о стандарте организации:

1. РАЗРАБОТАН ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом по ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН № 21 от «20» мая 2022 г.

3. Стандарт организации подготовлен на основе Технологической инструкции по производству сырокопчёных колбас по ГОСТ Р 55456-2013 «Колбасы сырокопченые. Технические условия»

4. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт организации не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения **ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН**

II. Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Общие положения 5
4.Общие требования 6
5. Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы 6
6. Отбор и подготовка проб 7
7. Порядок проведения исследования 7

Приложение (справочное). Пределы обнаружения антибиотиков 9

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

Дата введения – 2022–05–20

1 Область применения

1.1 Стандарт организации (далее – СТО) распространяется на организацию и порядок проведения входного контроля мясного сырья на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ в рамках входного производственного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 55481 Мясо и мясные продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р ИСО 6887-2 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов

ГОСТ Р ИСО 17604 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб с туши для микробиологического анализа

ГОСТ 7702.2.0 Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 21239 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 427 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 31598 Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29227 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1 Общие требования

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

3 Общие положения

3.1 Требования СТО применяют при входном контроле мясного сырья, поступающего для производства сырокопченых колбасных изделий.

3.2 Определение наличия остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ проводят в лабораториях, в том числе производственных, имеющих лицензию на работу с микроорганизмами.

4 Общие требования

4.1 Общие требования проведения микробиологических исследований – по ГОСТ ISO 7218.

4.2 Требования к подготовке и тестированию питательных сред – по ГОСТ ISO 11133.

4.3 Требования безопасности при работе с микроорганизмами – по [1]

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по ГОСТ ISO 7218 со следующими дополнениями:

ножницы по ГОСТ 21239;

пинцеты по ГОСТ 21241;

линейка по ГОСТ 427;

ротационный гомогенизатор (блендер);

pH-метр, имеющий точность калибровки ± 0,1 ед. pH при 25 °С;

центрифуга со скоростью вращения не менее 3000 об/мин;

термостат, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;

термостат, обеспечивающий поддержание температуры (65 ± 1) °С;

стерилизатор паровой по ГОСТ 31598;

колбы плоскодонные различной вместимости по ГОСТ 25336;

дозаторы переменного объема;

наконечники к дозаторам;

пипетки градуированные вместимостью 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ по ГОСТ 29227;

пипетки градуированные вместимостью 2 $см^3$ с ценой деления 0,02 $см^3$ по ГОСТ 29227;

пробирки различной вместимости по ГОСТ 25336;

пробирки центрифужные;

флаконы разной вместимости;

чашки Петри полимерные диаметром 90 мм.

пробочное сверло диаметром 9 мм;

лента воздухонепроницаемая эластичная;

бромкрезоловый пурпурный, ч.д.а.;

вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144;

стандартные образцы антибиотиков;

тест-культура: *Bacillus stearothermophilus (Geobacillus stearothermophilus)* ВКМ В-718 или *Bacillus stearothermophilus (Geobacillus stearothermophilus)* АТСС 7953[1)];

тест-набор, включающий агаризованную питательную среду, суспензию спор *Geobacillus stearothermophilus*, индикатор бромкрезоловый пурпурный во флаконах по 12 или 120 см^3,

пробочное сверло[2)];

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования и посуды с техническими характеристиками не ниже, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор и подготовку проб проводят в соответствии ГОСТ ISO 7218, ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 31904, ГОСТ Р ИСО 6887-2 и ГОСТ 26669 с учетом нижеследующего.

Лабораторная проба должна быть представительной, без повреждений и температурных изменений при транспортировании и хранении. Допускается предоставление проб в замороженном виде.

6.2 С поверхности и глубины (суммарно) лабораторной пробы (без обжига поверхности), с помощью стерильных ножниц и пинцетов, отбирают пробу и измельчают на ротационном гомогенизаторе. Затем от нее отбирают навеску массой не менее (25,0±0,5) г и помещают в пакет для гомогенизации или в другую емкость по выбору лаборатории.

[1)] Депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов и в Американской коллекции типовых культур соответственно.

[2)] Например, тест-набор «Антибиотест». Данная информация является рекомендуемой, приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность

6.3 Проба, которая была бы репрезентативной для данной партии продукции.

7 Порядок проведения исследования

7.1 Входной контроль мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ – по ГОСТ Р 55481 «Мясо и мясные

продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ».

7.2 Объектами входного контроля являются все виды мясного сырья (туши, полутуши, четвертины, отруба, блоки и др.)

7.3 В случае выявления остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ проводят повторное исследование удвоенной выборки, взятой из той же партии. Результаты повторных испытаний являются окончательными и распространяются на всю партию.

7.4 По результатам входного контроля принимается решение о рациональных направлениях использования мясного сырья в зависимости от наличия антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

7.5 Не допускается для производства сырокопченых колбас использование мясного сырья в случае наличия антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

Приложение А
(справочное)
Пределы обнаружения антибиотиков

А.1 Пределы обнаружения некоторых антибиотиков приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Группа антибиотиков	Наименование антибиотиков	Предел обнаружения, мг/кг
Аминогликозиды	Гентамицин	0,05
	Канамицин	1,0
	Неомицин	0,5
	Паромомицин	0,5
	Стрептомицин	0,5
	Спектиномицин	0,4
Пенициллины	Амоксициллин	0,05
	Ампициллин	0,05
	Бензилпенициллин	0,05
	Диклоксациллин	0,3
	Клоксациллин	0,3
	Нафциллин	0,3
	Оксациллин	0,3
Тетрациклиновая группа	Доксициклин	0,1
	Окситетрациклин	0,1
	Тетрациклин	0,1
	Хлортетрациклин	0,1
Цефалоспорины	Цефалексин	0,2
	Цефапирин	0,05
	Цефкином	0,05
Хинолоны	Данофлоксацин	4,0
	Дифлоксацин	4,0
	Марбофлоксацин	3,0
	Ципрофлоксацин	2,0
Флорфениколы	Флорфеникол	20,0

Линкозамиды	Линкомицин	0,1
Макролиды	Спирамицин	20,0
	Тилозин	0,2
	Тилмикозин	5,0
Плевромутилины	Вальнемулин	0,5
	Тиамулин	10,0
Амфениколы	Тиамфеникол	5,0
Полимиксины	Колистин	15,0
Производные диаминопиримидина	Триметоприм	0,2
Нитрофураны	Фуразолидон	0,1
Полипептиды	Бацитрацин	3,0

Библиография

[1] СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

УДК 664.93:006.037 ОКС 67.020

Ключевые слова: сырокопченые колбасы, мясное сырье, антибиотики, входной контроль, антимикробные и химиотерапевтические вещества

Приложение 2

Расчет экономической эффективности использования СТО «Мясо и мясные продукты. Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ»

Данная статья содержит в себе затраты на приобретение, изготовление либо аренду инструментов, аппаратов, контрольно-измерительных приборов и прочих специальных устройств, необходимых для проведения исследований.

В данном случае химическая посуда и оборудование для исследований не приобретались специально, а были арендованы на время работы.

Таблица 1 – расчет стоимости посуды и расходных материалов для проведения анализа определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

Посуда	Кол-во, шт.	Цена за единицу, руб.	Стоимость, руб.
Цилиндр мерный, 25 мл, класс 2, ц.д. 0,5 мл, с носиком и пластиковым основанием	1	160,0	160,0
Центрифужная пробирка Eppendorf объемом 1,5 мл	1	10,20	10,20
Чашка Петри полимерные диаметром 90 мм	1	15,0	15,0
Наконечники объемом до 200 мкл	1	4,9	4,9
Наконечники объемом до 1000 мкл	1	5	5
Пакет для отбора образцов	1	13,56	13,56
		Итого:	208,66

Арендная плата за пользование химической посудой рассчитывалась, исходя из стоимости посуды, 15 % амортизации и срока аренды – 1 месяц. Арендная плата = (208,66·0,15)/12 = 2,61 руб.

Таблица 3 – Расчет стоимости химических реактивов для проведения анализа определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

Материалы (реактивы)	Объем	Стоимость, руб.	Количество реактива, на 1 анализ	Сумма, руб.
Физиологический раствор	1000 мл	201,79	25 мл	0,40
Питательная среда по Кундрату со спорами *Bacillus stearothermophilus*	100 мл	250,00	10	25, 00
			Итого:	25,40

Таблица 2 – Расчет стоимости оборудования для проведения анализа определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

Наименование оборудования и приборов	Количество единиц	Стоимость, руб.
Центрифуга со скоростью вращения не менее 3000 об/мин	1	60 000,00
Термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С	1	50 00,00
Термостат, поддерживающий температуру (65±1) °С	1	50 00,00
Весы аналитические (ц.д.0,0001г)	1	44 000,0
Баня водяная лабораторная	1	45 212,0
Холодильник бытовой электрический	1	28 000,0
Дозаторы пипеточные	2	14 300,0
ротационный гомогенизатор (блендер)	1	1 500,0
	Итого	293 013

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из стоимости оборудования, 15 % амортизации и срока аренды – 1 месяц.

Арендная плата = (293 013·0,15)/12 = 3 662,65 р.

<u>На один анализ:</u>

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из количества дней в месяце (30) и проведение анализа в двух параллелях.

Арендная плата = [3 662,65/30]*2 = 244,18 р.

Таблица 3 – Суммарные затраты на проведение для проведения анализа определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ

№ п/п	Статьи затрат	Сумма, руб.
1	Арендная плата за пользование химической посудой и расходных материалов	208,66
2	Стоимость химических реактивов на 1 анализ	25,40
3	Арендная плата за использование специального оборудования на 1 анализ	244,18
	Итого:	478,24

Предложенные подходы по определению остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас, изложенные в СТО, позволят значительно повысить уровень контроля и как следствие безопасность мясной продукции.