

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт экологической и пищевой биотехнологии

Микробиология молока

Учебно-методическое пособие



Новосибирск, 2024

УДК 579.67:637,1(075)

ББК 36.95-1,я73

М 597

Кафедра Экологии

Составители: канд. биол. наук, доц. *Л.А. Литвина*,
ст. преп. *В.Г. Горских*,
ст. преп. *И.Ю. Анфилофьева*

Рецензент канд. биол. наук *О.Г. Грачева*

Микробиология молока: учебно-методическое пособие / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составители: Л.А. Литвина, В.Г. Горских, И.Ю. Анфилофьева. – 3-е изд., доп. и исп. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2024. – 105 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов очного и заочного отделений по направлению подготовки 06.03.01 Биология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья, 19.03.03 Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания, 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции и 36.03.02 Зоотехния.

Данное пособие может быть использовано на лабораторно-практических занятиях по дисциплинам микробиологического профиля.

Утверждено и рекомендовано к изданию учебно-методическим советом Института экологической и пищевой биотехнологии (протокол №5 от 17 июня 2024 года).

© Новосибирский ГАУ, 2024

ВВЕДЕНИЕ

В мифах многих народов мира присутствует выкармливание знаменитых богов и героев молоком животных (Зевс был вскормлен молоком козы Амалфеи, основатели Рима Ромул и Рем – молоком волчицы, и т.п.). Авиценна был убеждён, что козье молоко позволяет сохранить здоровье и ясность ума. Гиппократ исцелил множество пациентов от чахотки с помощью козьего молока. Ценность молока для человека не подлежит сомнению, тем более что человек вскармливается материнским молоком.

Задача современного производителя молока – донести его до покупателя как можно в менее измененном виде по сравнению с полученным сырым молоком. Вместе с тем сырое молоко является скоропортящимся продуктом, поэтому оно должно обязательно подвергнуться предварительной термической обработке. При этой обработке одновременно с сапрофитными микроорганизмами уничтожаются и патогенные микроорганизмы, которые могли попасть в молоко. В разных странах молоко упаковывают по-разному. Наиболее ходовой ёмкостью упаковки молока в розничной торговле в США является пластиковая канистра – галлон (1 галл. = 4,55 л), а в нашей стране молоко, как правило, упаковывается в литровые и пол-литровые тетрапаки; в настоящее время есть и пластиковые литровые бутылки.

Институтом питания РАМН были разработаны рекомендуемые нормы потребления цельного молока на 1 человека в год – 116 кг. Молоко – уникальный по пищевой ценности и значению для организма природный продукт, непревзойденный по своей усвояемости и полезности, содержащий почти все необходимые вещества. В молоке содержится три полноценных белка (казеин, альбумин, глобулин), жир, усвояемый организмом человека на 96%, углеводы, в том числе лактоза, придающая молоку слегка сладкий вкус, а также различные минеральные вещества (макро- и микроэлементы) и витамины, которые связаны с белками и поэтому хорошо усваиваются.

Раздел микробиологии «Микробиология молока» предусматривает изучение биологических свойств микроорганизмов сырого молока, методов сохранения молока, роли микроорганизмов в процессах порчи молока. Освоение теоретических основ микробиологии молока способствует дальнейшему пониманию особенностей приготовления молочных продуктов, ориентирует будущих специалистов на необходимость обеспечения высокого уровня санитарно-гигиенического состояния производства, предупреждение потерь и изготовление доброкачественной продукции.

В настоящее время большое внимание уделяется безопасности пищевой продукции, о чем свидетельствует целый ряд принятых Федеральных Законов – ФЗ от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (посл. измен.). На безопасность пищевых продуктов направлен Федеральный закон от 2 января 2000 г № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (посл. измен.), который регулирует отношения в области обеспечения качества пищевых продуктов и их безопасности для здоровья человека. Этот закон неоднократно дополнялся и изменялся. В последней редакции закона дается следующее определение безопасности пищевых продуктов:

«безопасность пищевых продуктов – 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». Молоко, а также изготавливаемые на его основе молочные продукты, являются повседневным продуктом питания населения, поэтому особенно важно обращать внимание на безопасность молока для здоровья человека. Соблюдение санитарно-гигиенических условий получения молока, кормление коров доброкачественными кормами, правильная обработка и хранение продукта являются надежной гарантией качества молока.

Данное учебно-методическое пособие основывается на требованиях документа «Технический регламент на молоко и молочную продукцию», принятого Решением Совета Евразийской экономической комиссии (посл. изменен.), целью которого является (статья 3):

1. Защита жизни и здоровья граждан.

2. Предупреждение действий, вводящих в заблуждение потребителей, и обеспечение достоверности информации о наименовании, составе и потребительских свойствах молока и молочной продукции.

Технический регламент устанавливает требования к производству, хранению, перевозке и реализации молока и молочной продукции, а также требования к упаковке, маркировке, этикетке молока и продуктов его переработки.

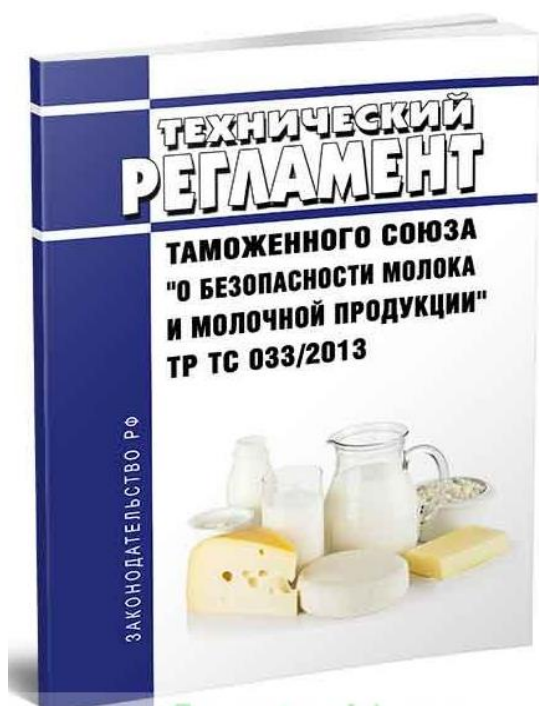
Настоящее учебно-методическое пособие составлено в соответствии с Федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования по направлениям подготовки:

- 06.03.01 Биология.
- 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья.
- 19.03.03 Продукты питания животного происхождения.
- 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания.
- 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции
- 36.03.02 Зоотехния.

1. ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ НА МОЛОКО И МОЛОЧНУЮ ПРОДУКЦИЮ

1.1 Основные понятия, используемые в ТР ТС 033/2013

С 1 мая 2014 года вступил в силу технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013), утвержденный решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9



октября 2013 года № 67. Таким образом, требования безопасности к молоку и молочной продукции, к процессам их производства, хранения, перевозки, реализации и утилизации, а также требования к маркировке и упаковке молока и молочной продукции стали обязательными для исполнения на территории Российской Федерации, Республик Беларусь и Казахстан, входящих в Таможенный союз (в Армении и Киргизии имеются некоторые особенности, связанные с национальными традициями).

Для целей применения настоящего технического регламента используются понятия, установленные техническим регламентом Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (ТР ТС 021/2011), утвержденным Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 года № 880 (далее – технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (ТР ТС 021/2011), техническим регламентом Таможенного союза "Пищевая продукция в части ее маркировки" (ТР ТС 022/2011), а также следующие основные понятия и их определения:

- **«молоко»** – продукт нормальной физиологической секреции молочных желез сельскохозяйственных животных, получен от одного или нескольких животных в период лактации при одном и более доении, без каких-либо добавлений к этому продукту или извлечений каких-либо веществ из него;

- **сырое молоко** – молоко, не подвергавшееся термической обработке при температуре более чем 40 °С или обработке, в результате которой изменяются его составные части;

- **цельное молоко** – молоко, составные части которого не подвергались воздействию посредством их регулирования;

- **обезжиренное молоко** – молоко с массовой долей жира менее 0,5%, полученное в результате отделения жира от молока;

- **сырое обезжиренное молоко** – обезжиренное молоко, не подвергавшееся термической обработке при температуре более чем 45 °С;

- **питьевое молоко** – молоко с массовой долей жира не более 9%, произведенное из сырого молока и (или) молочных продуктов и подвергнутое термической обработке или другой обработке в целях регулирования его составных частей (без применения сухого цельного молока, сухого обезжиренного молока);

- **топленое молоко** – молоко питьевое, подвергнутое термической обработке от 85 до 99 °С с выдержкой не менее чем в течение трех часов до достижения специфических органолептических свойств;

- **пастеризованное, стерилизованное и ультрапастеризованное (ультравысокотемпературнообработанное) молоко** – молоко питьевое, подвергнутое термической обработке в целях соблюдения установленных требований микробиологическим показателям безопасности;

- **сливки** – молочный продукт, который произведен из молока, представляет собой эмульсию жира и молочной плазмы, и массовая доля жира, в котором составляет не менее чем 9%;

- **сырые сливки** – сливки, не подвергшиеся термической обработке при температуре более чем 45 °С;

- **питьевые сливки** – сливки, подвергнутые термической обработке (как минимум пастеризацией) и расфасованные в потребительскую тару.

- **сливочное масло** – масло из коровьего молока, массовая доля жира в котором составляет от 50 до 85% включительно.

- **сладко-сливочное масло** – произведенное из пастеризованных сливок;
- **сухой молочный остаток** – остаток после высушивания навески молока до постоянного веса при температуре 102-105 °С;
- **сухой обезжиренный молочный остаток** – показатель натуральности молока. Если он составляет менее 8%, то считается, что молоко разбавлено водой».

1.2 Требования к безопасности сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок (ТР ТС 033/2013 Раздел 5)

1. Условия получения от с.-х. животных молока, перевозки, реализации и утилизации сырого молока, сырого обезжиренного молока и сырых сливок, молочных продуктов непромышленного производства должны соответствовать требованиям законодательства РФ о ветеринарии.

2. Сырое молоко должно быть получено от здоровых с.-х. животных на территории, благополучной в отношении инфекционных и других общих для человека и животных заболеваний.

3. Не допускается использование в пищу сырого молока, полученного в течение первых 7 дней после дня отела животных и в течение 5 дней до дня их запуска (перед их отелом) и (или) от больных животных и находящихся на карантине животных.

4. Изготовитель должен обеспечивать безопасность сырого молока в целях отсутствия в нем остаточных количеств ингибирующих, моющих, дезинфицирующих и нейтрализующих веществ, стимуляторов роста животных (в том числе гормональных препаратов), лекарственных средств (в том числе антибиотиков), применяемых в животноводстве в целях откорма, лечения скота и (или) профилактики его заболеваний.

5. Молоко, получаемое от разных видов с.-х. животных, за исключением коровьего молока, должно соответствовать показателям, установленным стандартами, нормативными документами федеральных органов исполнительной власти, сводами правил и (или) техническими документами.

6. Массовая доля сухих обезжиренных веществ в коровьем сыром молоке

должна составлять не менее чем 8,2%. Плотность коровьего молока, массовая доля жира в котором составляет 3,5%, должна быть не менее чем 1027 кг/м³ при температуре 20 °С или не менее, чем эквивалентное значение для молока, массовая доля жира в котором другая.

7. К сырному молоку, используемому для производства пищевых продуктов с определенными потребительскими свойствами (для получения продуктов детского питания, для производства молока стерилизованного и сгущенного, сыра имеются дополнительные требования.

8. Уровни содержания потенциально опасных веществ в сыром молоке, сыром обезжиренном молоке, сырых сливках не должны превышать допустимые уровни, установленные в приложениях №1-4 к техническому регламенту Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (ТР ТС 021/2011) и в приложении №4 к настоящему техническому регламенту (таблица 1).

9. Показатели микробиологической безопасности и содержания соматических клеток коровьего сырого молока, сырого обезжиренного молока и сырых сливок не должны превышать установленный в приложении 2 к настоящему Техническому регламенту допустимый уровень (таблица 2).

10. Решение об использовании сырого молока, сырого обезжиренного молока и сырых сливок, не соответствующих требованиям безопасности к допустимым уровням содержания потенциально опасных веществ, микроорганизмов и соматических клеток, принимает изготовитель в соответствии с требованиями законодательства РФ о ветеринарии, законодательства РФ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и законодательства в области экологической безопасности.

Рассмотрим более подробно содержание приложений к Техническому регламенту.

В таблице 1 «Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в сыром молоке» в соответствии с «Техническим регламентом на молоко и молочную продукцию» приводится перечень потенциально опасных веществ в сыром молоке. Среди них названы продукты жизнедеятельности микроорга-

низмов – токсины и антибиотики. Афлатоксин М₁ (продукт жизнедеятельности гриба *Aspergillus flavus*) относится к классу поликетидов, допускается в количестве 0,0005 мг/кг (л), т.к. является сильным биологическим ядом, отрицательно влияющим на функцию печени человека, а также снижающим иммунитет.

Таблица 1 – Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в сыром молоке, сыром обезжиренном молоке и сырых сливках

Продукт	Потенциально опасные вещества	Допустимый уровень, мг/кг (л), не более
Сырое молоко, сырое обезжиренное молоко, сырые сливки	Токсичные элементы: Свинец	0,1
	Мышьяк	0,05
	Кадмий	0,03
	Ртуть	0,005
	Микотоксины: Афлатоксин М ₁	0,0005
	Антибиотики: Левомецитин Тетрациклиновая группа Стрептомицин Пенициллин	Менее 0,01 Менее 0,01 ед/г Менее 0,5 ед/г Менее 0,01 ед/г
	Ингибирующие вещества	Не допускаются
	Пестициды: Гексахлорциклогексан (альфа-, бета-, гамма-изомеры)	0,05 (1,25 для сливок в пересчете на жир)

Другим показателем, который имеет отношение к показателям безопасности молока, является наличие в нем допустимых уровней антибиотиков (левомицетин, тетрациклиновая группа, стрептомицин, пенициллин) (таблица 1). Допустимые уровни этих антибиотиков следующие: левомицетин, тетрациклиновая группа и пенициллин менее 0,01 ед. /г, стрептомицин – менее 0,5 ед/г.

Левомецитин – продукт жизнедеятельности актиномицета *Streptomyces venezuelae*, антибиотики тетрациклинового ряда продуцируются актиномицетами *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*. Эти антибиотики относятся к антибиотикам широкого спектра действия, нарушающим синтез белка у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в связи с чем угнетаю-

ще действуют на микрофлору кишечника человека и могут приводить к дисбактериозу.

Пенициллин – продукт жизнедеятельности грибов рода *Penicillium* (*Penicillium notatum*, *Pen. chrysogenum*), тормозит синтез пептидогликана, являющегося основным компонентом клеточной стенки бактерий, поэтому действует преимущественно на грамположительные микроорганизмы.

Вместе с тем, все названные антибиотики могут вызывать при употреблении их с молоком угнетение нормальной микрофлоры кишечника, развитие вторичных грибковых инфекций, аллергизацию населения, вплоть до проявлений анафилаксии.

Определение токсинов и антибиотиков, как продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, проводится специальными методами. Наличие афлатоксина М₁ в молоке узнают методом очистки с помощью иммуноаффинной хроматографии и определения методом однонаправленной тонкослойной хроматографии по ГОСТ 34049-2017 «Определение содержания афлатоксина М₁ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием».

Наличие антибиотиков определяется со споровой культурой тест-микроба, чувствительного к антибиотикам, по ГОСТ 32254-2013 «Инструментальный экспресс-метод определения антибиотиков» с изменениями от 22 сентября 2016 г. №1, проводят качественное определение антибиотиков в сыром, пастеризованном и предварительно восстановленном сухом молоке с помощью микроорганизмов *Bac.stearothermophilus* и индикаторов бромкрезолпурпур и бриллиантовый черный. Допускается хранить приготовленные на исследование пробы молока при температуре 5±1 °С не более 24 ч. Контрольный образец, сухого молока, не содержащий антибиотики, растворяют в дистиллированной воде при температуре 40±2 °С, аккуратно встряхивают до полного растворения, не допуская пенообразования, и охлаждают до температуры 4±2 °С. Необходимый объем дистиллированной воды для растворения (5 см³ или 100 см³) указывается в сопроводительной документации к контрольному образцу.

Допустимые уровни содержания не предусмотренных пестицидов, антибиотиков, сульфаниламидов и пищевых добавок с антибиотическими свойствами контролируются в порядке, установленном законодательством РФ в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов.

При использовании химических методов определения пенициллина, стрептомицина и антибиотиков этой группы, антибиотиков тетрациклиновой группы пересчет их фактического содержания в единицах в грамме производится исходя из активности стандарта.

В таблице 2 «Допустимые уровни содержания микроорганизмов и соматических клеток в сыром молоке, сыром обезжиренном молоке и сырых сливках», расшифровываются значения основных показателей, определяющих санитарное состояние сырого молока:

- КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (при наличии в продуктах питания повышенного микробного числа у людей отмечаются расстройства желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся повышением температуры тела, рвотой, диареей, явлениями дисбактериоза);

- КОЕ – колониеобразующие единицы – одна живая микробная клетка, из которой вырастает видимая глазом колония микроорганизмов. Количество КОЕ позволяет определить количество микроорганизмов в единице объема;

- БГКП – бактерии группы кишечных палочек – санитарно-показательные микроорганизмы, постоянно обитающие в естественных полостях организма человека или животного и в большом количестве выделяющиеся во внешнюю среду. БГКП не допускается в определенной массе продукта, измеряемой в граммах;

- сальмонеллы – патогенные микроорганизмы, которые могут попасть в молоко от животных и вызвать заболевание у человека; не допускаются в определенной массе продукта, измеряемой в граммах;

- соматические клетки – учитывается содержание соматических клеток в 1 см³/г (соматические клетки – клетки ткани молочных ходов и альвеол,

участвующих в секреции молока). Повышенное содержание соматических клеток может свидетельствовать о нарушении секреции или об инфекции.

Таблица 2 – Допустимые уровни содержания микроорганизмов и соматических клеток в сыром молоке, сыром обезжиренном молоке и сырых сливках

Продукт	КМАФАнМ*, КОЕ / см ³ (г), не более	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются		Содержание соматических клеток в 1 см ³ (г), не более
		БГКП* (коли- формы)	патогенные микроор- ганизмы, в том числе сальмонеллы	
Молоко сырое, сорт	5x10 ⁵	-	25	7,5x10 ⁵
Молоко сырое обезжиренное, сорт	5x10 ⁵	-	25	-
Сливки сырые	5x10 ⁵	-	25	-
Сырое моло- ко для произ- водства:				
а) детского питания	3x10 ⁵	-	25	5 x10 ⁵
б) сыров и стерилизован- ного молока	5x10 ⁵	-	25	5 x10 ⁵

П р и м е ч а н и е:

*КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

*КОЕ – колониеобразующие единицы.

*БГКП – бактерии группы кишечных палочек.

2. МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРОГО МОЛОКА

Молоко является одним из самых полезных и ценных продуктов питания человека. По пищевой ценности оно может заменить любой продукт, но, ни один продукт не заменит молока. Со времен глубокой древности молоко использовалось в лечебных целях. «Источником здоровья», «белой кровью» называли молоко древние философы, т.к. молоко является фильтратом крови. Молоко различных животных несколько отличается по составу, но в целом оно богато белками – 33 г/л, жирами – 35, углеводами – 47 г/л, незаменимыми аминокислотами, витаминами (до 30 видов) и минеральными веществами (макро- и микроэлементами). Если все количество белков принять за 100%, то молоко коровье содержит белков в виде казеина 82%, альбумина – 12, глобулинов – 6%. Калорийность 100 г молока доходит до 660 ккал.

Средний химический состав молока коровьего приведен в приложении 1, сравнительный биохимический состав женского, коровьего и козьего молока – в приложении 2.

Молоко, благодаря своему составу, является прекрасной питательной средой для микроорганизмов, поэтому необходимо особенно тщательно оберегать его от попадания микроорганизмов.

В естественных условиях молоко поступает из молочной железы коровы непосредственно в ротовую полость теленка, при этом бактериальное загрязнение молока из окружающей среды минимально. Однако молоко свежесвыдоенное никогда не бывает стерильным, оно содержит от нескольких сотен до тысяч бактерий в 1 мл. Эти микроорганизмы попадают в молоко непосредственно из соскового канала молочной железы – это так называемое секреторное обсеменение молока, или его нормальная бактериальная флора. Многие годы, в зависимости от количества микроорганизмов (КМАФАнМ) определяли сорт молока (таблица 2) высший, первый, второй – в соответствии.

Например, сырое молоко высшего сорта должно было содержать КМАФАнМ не более $1 \cdot 10^5$ КОЕ в 1 г (см^3), БГКП не допускались, сальмонеллы

должны отсутствовать в 25 г сырого молока, а соматических клеток не должно быть более $4 \cdot 10^5$ в 1 г (см^3). В настоящем Техническом регламенте указаний на сорт молока нет.

Нормальная **бактериальная микробиота** молока представлена микроорганизмами – эпифитами, обитающими на растениях. Они сапротрофы, не опасны для здоровья человека. Тем не менее, большое количество этих микроорганизмов в молоке приведет к его быстрой порче, поэтому рекомендуется проводить сдаивание первых струек молока в отдельную посуду. При этом удаляются микробные пробки соскового канала и уменьшается микробное обсеменение молока, что будет способствовать лучшей его сохранности.

2.1 Основные представители нормальной микробиоты сырого молока

Молоко, даже полученное при соблюдении всех санитарных норм, не является стерильным продуктом, т.к. в момент выдаивания оно подвергается бактериальному обсеменению микроорганизмами, которые находятся в сосковом канале вымени. Количество таких микроорганизмов в момент выдаивания незначительно – от 1 до нескольких тысяч в 1 мл. В основном это сапрофитные микроорганизмы, относящиеся к молочнокислым бактериям и коккам: молочнокислый стрептококк (*Lactococcus lactis*), сливочный стрептококк (*Lactococcus cremoris*), термофильный стрептококк (*Streptococcus thermophilus*). Они представляют собой нормальную микробиоту молока. В процессе хранения молока происходит размножение микроорганизмов, поэтому очень важно соблюдать правила хранения сырого молока.

***Lactococcus lactis* (молочнокислый стрептококк).** На мясо-пептонном агаре дает точечные круглые колонии, в толще агара – чечевицеобразные. В микроскопических препаратах это грамположительные кокки, неподвижные, спор и капсул не образуют, формируют короткие цепочки. Факультативно-анаэробные микроорганизмы. В биохимическом отношении активно сбраживают лактозу или глюкозу. Мезофилы, оптимальная температура роста 30 °С.

***Lactococcus cremoris* (сливочный стрептококк).** Форма колоний такая же, как и у *Str. lactis*. В микроскопических препаратах это грамположительные кокки, неподвижные, спор и капсул не образуют, формируют длинные цепочки. Факультативно-анаэробные микроорганизмы. В биохимическом отношении активно сбраживают мальтозу, декстрин и сахарозу. Сливочный стрептококк растет при температуре 20-25 °С, максимальная температура 35-38 °С.

***Streptococcus thermophilus* (термофильный стрептококк).** Форма и расположение клеток термофильного стрептококка идентичны форме и расположению клеток сливочного стрептококка. Клетки термофильного стрептококка несколько крупнее. Оптимальная температура развития 40-45 °С, максимальная – 45-50 °С. Термофильный стрептококк не сбраживает мальтозы, декстрина и салицина, не разлагает казеина, не сбраживает сахарозы.

В выводных протоках вымени могут обитать: ***Ent. liquefaciens* (энтерококк), представители семейства *Micrococcaceae*, представители бактерий рода *Corynebacterium*.** *Corynebacterium* – палочки с булабовидными утолщениями на концах, грамположительные, неподвижны, спор не образуют, аэробы или факультативные анаэробы.

Комменсалами вымени могут быть молочнокислые палочки рода ***Lactobacterium* – *Lactobacterium plantarum*,** представитель эпифитной микрофлоры растений, откуда он также может попасть на вымя.

Названные микроорганизмы могут постоянно встречаться в сыром молоке, поэтому их считают представителями нормальной микрофлоры молока.

2.2 Постсекреторное обсеменение молока

Постсекреторное обсеменение молока из окружающей среды и оборудования

Постсекреторное обсеменение молока связано с условиями содержания животного, окружающей средой, в которой животное находится, состоянием инвентаря, а также зависит от соблюдения гигиенических норм персоналом,

участвующим в процессе получения и обработки молока. В ряде хозяйств существуют молокопроводы для непосредственной передачи молока от вымени в ёмкости, что исключает постсекреторное обсеменение. Источники постсекреторного бактериального загрязнения молока – кожа вымени, шерстный покров коровы, воздух помещения, руки, одежда доярок, а также доильная аппаратура и подойник. Количество микроорганизмов в воздухе, являющемся источником обсеменения молока, напрямую зависит от чистоты помещения в целом, состояния подстилки, времени уборки навоза, времени раздачи кормов, особенно силоса.

Содержание микроорганизмов в молоке, выдоенном машинным способом, при хорошем санитарно-гигиеническом состоянии доильной установки почти на 10% меньше, чем в молоке, выдоенном вручную. Это связано с тем, что молочно-хозяйственный инвентарь готовят заранее – он тщательно промывает, очищен и дезинфицирован. Необходимо предъявлять повышенные требования к состоянию воды, в которой промывается инвентарь с тем, чтобы с водой не было внесено посторонних микроорганизмов.

Последующее обсеменение молока может происходить при недостаточно удовлетворительном санитарно-гигиеническом состоянии молочных фляг, ёмкостей для молока и охлаждающих ванн. Требования к организации мойки и дезинфекции производственных помещений и оборудования» содержит следующие пункты:

«1. Мойка и дезинфекция производственных помещений, оборудования, инвентаря, тары, транспортных средств должны обеспечивать безопасность продуктов переработки молока, предотвращать возможность вторичного их загрязнения и проводиться с периодичностью, установленной программой производственного контроля.

2. Средства, используемые для проведения мойки и дезинфекции, должны быть экологически безопасными и разрешенными для использования в пищевой промышленности Федеральным органом исполнительной власти, осу-

ществляющим функции по контролю и надзору в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, защиты прав потребителей.

3. Мойка и дезинфекция резервуаров для производства и хранения молока и продуктов его переработки осуществляется не позднее чем через 2 часа после каждого опорожнения резервуаров. Оборудование, не используемое после мойки и дезинфекции более чем 6 часов, повторно дезинфицируется перед началом работы».

Постсекреторное обсеменение молока **персоналом**

Дополнительное обсеменение молока может происходить и от обслуживающего персонала, поэтому необходим контроль за состоянием здоровья и санитарной грамотностью персонала.

В связи со сказанным необходимы особые требования к изготовителям, продавцам и переработчикам молока, которые изложены в ФЗ РФ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию», в ст. 22 «Гигиенические требования к работникам изготовителя или продавца молока и продуктов переработки молока»:

Работники, занятые в процессах производства, хранения, перевозки, реализации и утилизации молока и продуктов его переработки, обязаны:

1. «проходить медицинские осмотры (обследования) при поступлении на работу и периодические медицинские осмотры (обследования);
2. пройти гигиеническое обучение перед поступлением на работу и аттестацию в установленном порядке;
3. иметь личную медицинскую книжку установленного образца».

Работники изготовителя молока и продуктов переработки должны работать в чистой спецодежде (халате с поясом, шапочке) и перед работой тщательно вымыть руки и тщательно их продезинфицировать (СанПиН 2.3.4.551-96).

Вывод: постсекреторное обсеменение молока может происходить из разных источников: с посуды, из почвы, из воздуха, с вымени коровы, из навоза, с рук доярок, из кормов. Совокупность этих микроорганизмов (дрожжи, плесени,

различные сапрофитные бактерии – представители родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Serratia*, бактерии группы кишечной палочки и др.) составляет так называемую постороннюю микрофлору сырого молока.

2.3 Основные представители посторонней микробиоты

Факультативно-анаэробные

микроорганизмы

Escherichia coli (кишечная палочка) – мелкая палочка, грамотрицательная, спор и капсул не образует, подвижная, встречаются и неподвижные штаммы. Принимает активное участие в разложении белка в кишечнике, является постоянным обитателем кишечника животных и человека.

БГКП (бактерии группы кишечных палочек), коли-формы: микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (энтеробактериacea) родов эшерихия (*Escherichia*), цитробактер (*Citrobacter*), энтеробактер (*Enterobacter*), клебсиелла (*Klebsiella*), серратия (*Serratia*); бесспорные, грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа. Микроорганизмы, входящие в семейство, являются представителями кишечной микрофлоры.

Род *Escherichia* включает следующие виды микроорганизмов (типичные представители): *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergussonii*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*.

Род *Citrobacter* включает виды: *Citrobacter colicivorum*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*.

Род *Enterobacter* объединяет виды: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae* и др.

Proteus vulgaris (вульгарный протей) – полиморфная палочка, резко изменяющая форму и размеры на питательных средах. По Граму не окрашивается, т.е. грамотрицательная, подвижная, перитрих. Во время роста на плотной питательной среде может перемещаться по наклонной поверхности, давая пол-

зущий рост. Широко распространена в природе, способна размножаться во внешней среде, откуда может попасть в молоко.

Enterococcus faecalis (фекальный энтерококк). Энтерококки, наряду с бактериями группы кишечных палочек, являются постоянными обитателями кишечника человека и теплокровных животных, в большом количестве выделяются во внешнюю среду, устойчивы к неблагоприятным внешним воздействиям, могут попасть в молоко.

Serratia marcescens (чудесная палочка) распространена повсеместно в окружающей среде, может обитать даже на руках персонала. Образует на питательной среде кроваво-красный пигмент – продигиозин. На МПА колонии напоминают кровавые пятна, округлые, с ровными краями, приподнятые в центре, слизистой консистенции. На МПБ образует равномерную муть красного цвета. Микроб подвижен. В мазках видны мелкие грамотрицательные палочки.

Аэробные спорообразующие микроорганизмы

Перечисленные ниже микроорганизмы могут попасть в сырое молоко из почвы, воздуха помещений. Они являются активными аммонификаторами, приводящими к быстрой порче молока.

Bac.mycoides (корневидная, или грибовидная, бацилла) широко распространена в почвах. На плотной питательной среде (МПА) рост колоний напоминает мицелий, откуда и название *mycoides*, что означает грибовидный. На жидкой питательной среде (МПБ) рост в виде кусочка ваты, который расположен на дне, среда же прозрачная. В препаратах – крупная, грамположительная, подвижная палочка, образует споры овальной формы. Перитрих – жгутики расположены по всей поверхности клетки. По типу питания хемоорганогетеротроф.

Bac.mesentericus (картофельная бацилла) постоянно обитает в почве, на растениях. На плотной питательной среде (МПА) образует сухие матовые складчатые колонии. Складки колоний напоминают складки брыжейки, откуда и название *mesentericus*. На жидкой питательной среде рост поверхностный, в

виде сухой пленки. В микроскопических препаратах палочки по форме напоминают предыдущий вид. Образует овальные споры, подвижная, перитрих. Окрашивается грамположительно. Хемоорганогетеротроф.

Bac.megaterium (капустная бацилла) – обитатель почвы. На среде МПА колонии блестящие, с волокнисто-бахромчатыми краями, на жидкой питательной среде (МПБ) вызывает слабое помутнение. Крупная спорообразующая палочка, окрашивается грамположительно. Подвижность слабая. Палочки со спорами в препаратах чаще располагаются в виде цепочки. Хемоорганогетеротроф.

Bac.subtilis (сенная бацилла) очень широко распространена в природе и является энергичным аммонификатором. На среде МПА образует сухие складчатые непрозрачные колонии, на МПБ пленку на поверхности. В препаратах это крупные палочки, подвижные, перитрихи, образуют овальные споры. Палочки окрашиваются грамположительно. По типу питания – хемоорганогетеротроф.

Аэробные неспорообразующие палочки

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) распространена повсеместно, её выделяют из почвы, воды, с растений и от животных. Особенно долго сохраняется в воде. На плотных средах колонии напоминают колонии *E. coli*, в бульонных культурах образует слизь, продуцирует сине-зеленый пигмент – пиоцианин. В препарат мелкая палочка, не образует спор, грамотрицательная. Является сильным аммонификатором. Хемоорганотроф, оптимальная температура роста 30-37 °C.

Alcaligenes faecalis (фекальный щелочеобразователь) широко распространен в почве и воде, может входить в микроценоз кишечника теплокровных, сильный аммонификатор. На питательных средах образует непигментированные либо серовато-белые, от прозрачных до мутных, плоские или слегка выпуклые круглые, гладкие (изредка шероховатые) колонии с неправильным краем. В мазках прямые или слегка изогнутые палочки средних размеров или коккобактерии, размером 0,5-1,2×1-3 мкм. Грамотрицательные палочки, подвиж-

ны, перитрихи, спор не образуют. Хемоорганогетеротроф, облигатный аэроб. Оптимальная температура роста 20-37 °С.

Анаэробные спорообразующие микроорганизмы

(клостридии)

В почве, наряду с аэробами, находятся анаэробы, которые также могут попасть в молоко и способствовать его порче.

Clostridium putrificum – небольшая спорообразующая палочка, по форме напоминающая барабанную. Один из наиболее распространенных возбудителей анаэробного разложения белков, клетчатки, образует большое количество газов. Сбраживает глюкозу; другие углеводы не сбраживает.

Clostridium sporogenes – мелкая палочка с центральным расположением споры. В отличие от предыдущей, обладает сильными протеолитическими свойствами. На средах с белком образует аммиак и другие продукты аммонификации. В процессе аммонификации образуются аммиачные соли, которые окисляются и переходят в соли азотной кислоты (нитраты).

Clostridium perfringens – грамположительная, строго анаэробная спорообразующая, неподвижная палочка, обитающая в кишечнике человека и животных. *Cl. perfringens* широко распространена в природе, может быть выделена из воды, почвы и сточных вод. На питательных средах может образовывать S- и R-колонии.

Пастеризация не предотвращает порчу молока, т.к. споры клостридий при этом не погибают.

Дрожжи и плесени

Дрожжи и плесени относятся к царству грибов, аэробы, споры их распространены во внешней среде и могут попасть в молоко.

Дрожжи (аскомицеты) – это одноклеточные организмы, не образующие мицелий, в мазках – клетки круглой, овальной или продолговатой (удлиненной) формы, длиной от 2,5 до 30 мкм, часто почкующиеся.

Плесневые грибы называют нитчатыми грибами или гифомицетами, т.к. тело плесневых грибов состоит из тонких ветвящихся нитей – гиф, без перегородок или септированных на клетке. Гифы образуют боковые выросты и разветвления, от вегетативных гифов поднимаются гифы, несущие плодовые тела. В зависимости от строения мицелия плесени бывают одноклеточными и многоклеточными. К одноклеточным плесневым грибам относят грибы из родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*. К многоклеточным плесневым грибам относят следующие роды: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Catenularia*, *Alternaria*, *Geotrichum* и др.

Вывод: микробиота молока может быть очень обильной. Если молоко не подвергнуть своевременной обработке (пастеризации или стерилизации), то микроорганизмы в нем начинают развиваться.

Контрольные вопросы

1. *Дайте характеристику микрофлоры сырого молока.*
2. *Основные представители нормальной микрофлоры молока сырого.*
3. *Понятие «нормальная бактериальная флора молока».*
4. *Постсекреторное обсеменение молока.*
5. *Гигиенические требования к работникам изготовителя или переработчика молока.*
6. *Основные представители факультативно-анаэробных микроорганизмов посторонней микрофлоры молока.*
7. *Представители аэробных спорообразующих микроорганизмов молока.*
8. *Представители аэробных неспорообразующих микроорганизмов молока.*
9. *Представители анаэробных спорообразующих микроорганизмов молока.*
10. *Дрожжи и плесени молока.*

3. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ МОЛОКА

Развитие микроорганизмов сырого молока происходит по определенным закономерностям, установленным основоположником отечественной микробиологии молока и молочных продуктов С.А. Королевым (1874-1932), изложенным в его книге «Основы технической микробиологии молочного дела». Развитие микроорганизмов в молоке проходит несколько фаз. Динамика развития микроорганизмов в молоке связана с сукцессионными процессами, т. е. последовательной сменой сообществ одних видов микроорганизмов сообществами других видов.

Антимикробная (бактерицидная или бактериостатическая) фаза характеризуется задержкой роста микроорганизмов и частичным их отмиранием. Находящиеся в молоке микроорганизмы в первое время не размножаются, так как в свежесвыдоенном молоке есть специфические вещества, препятствующие развитию микроорганизмов (лизоцимы, нормальные антитела, лейкоциты, антибиотические вещества группы лактенинов, ферменты). В молоке обнаружено 4 группы лизоцимов, находящихся непосредственно в молоке и вырабатываемых в вымени (лизоцимы М, О, Т, В), которые вызывают лизис микроорганизмов; γ - и β - глобулины, нейтрализующие бактерии; фагоциты (лейкоциты), поглощающие и растворяющие живые и погибшие микроорганизмы; лактенины, связанные с β - глобулинами; антитоксические факторы и др. В этот период отсутствуют биохимические и органолептические изменения молока.

Продолжительность антимикробной фазы непосредственно связана с температурой хранения сырого молока и исходным количеством микроорганизмов. С повышением температуры ускоряется размножение микроорганизмов, а действие антимикробных факторов снижается; при температуре 55 °С все антимикробные вещества инактивируются. Для сохранения активности антимикробных веществ молоко необходимо быстро охладить, т.к. длительность этой фазы составляет, по данным некоторых исследователей, при температуре 0 °С – 48 ч, при 5 °С – 36 ч, при 10 °С – 24 ч, а при 25 °С – 6 ч. Поэтому техниче-

ский регламент на молоко предусматривает сохранение свежесвыдоенного молока при низкой температуре – 0-6 °С. Микроорганизмы – психрофилы хорошо сохраняются и при пониженной температуре молока, они в дальнейшем проявляют результаты своей деятельности.

Таким образом, низкая температура обеспечивает задержку развития микроорганизмов и способствует сохранению антимикробных факторов молока.

Фаза смешанной микробиоты. Само название фазы указывает, что в ходе этой фазы наблюдается развитие разных групп микроорганизмов. Это связано с тем, что антимикробные факторы молока со временем инактивируются. Из различных групп микроорганизмов, находящихся в молоке, в этот период преобладают аммонификаторы (гнилостные микроорганизмы). Это объясняется нейтральной реакцией молока (рН 6,6–7,2-7,5), титруемая кислотность 16-18 градусов Тернера (18 °Т). Данная среда наиболее благоприятна для развития этой группы микроорганизмов. В эту фазу молоко теряет сладкий вкус, т.к. большинство микроорганизмов использует лактозу в качестве источника углерода. Начинают расщепляться белки. Продолжительность фазы может составлять 12-18 ч в зависимости от температуры хранения и наличия в нем исходной микробиоты. Развитие микроорганизмов приводит к подкислению среды, что создает благоприятные условия для развития молочнокислых микроорганизмов. В кислой среде деятельность гнилостных бактерий замедляется, а многие микроорганизмы погибают. Начинается развитие следующей фазы, фазы молочнокислых микроорганизмов. Если температура хранения молока в эту фазу ниже температуры 10 °С, фаза молочнокислых микроорганизмов не наступает, т.к. они относятся к мезофилам и термофилам.

Фаза молочнокислых микроорганизмов. Начало повышения кислотности является началом данной фазы. Развиваются молочнокислые стрептококки, которые хорошо растут при рН 6,2-5,0 и подкисляют молоко до 60 °Т за счет сбраживания углеводов молока до молочной кислоты. Происходит сквашивание, белок коагулирует в кислой среде, образуя плотный сгусток. Молоко при-

обретает ярко выраженный кислый вкус. При достижении рН среды 4,5 (120 °Т) начинают отмирать и сами стрептококки, которые постепенно вытесняются молочнокислыми палочками, более устойчивыми к кислой среде (оптимальной для палочек является рН 3,5-5,0). Молочнокислые микроорганизмы осуществляют протеолиз белков молока с освобождением свободных аминокислот. При этом кокки расщепляют до 17% белка, а молочнокислые палочки – до 30%.

Увеличение количества молочнокислых палочек приводит к дальнейшему накоплению кислот, понижению рН, а кислотность молока может достигать 250-300 °Т. В такой среде отмирают и молочнокислые палочки. Накопившаяся в процессе этой фазы молочная кислота приводит к гибели всех молочнокислых микроорганизмов. Продолжительность фазы молочнокислых микроорганизмов велика (2-3 недели), поскольку молочная кислота останавливает все процессы, т.е. происходит консервирование молока. На самом деле это молоко превращается в кисломолочный продукт. Высокая кислотность, наличие свободных аминокислот, антибиотиков молочнокислых микроорганизмов (низинов) формируют высокие пробиотические свойства молока в данной фазе. В начале этой фазы продукт может использоваться в производстве сыра или масла, а особенности этой фазы учитывают при производстве кисломолочных продуктов.

Фаза развития плесневых грибов и дрожжей. Споры плесневых грибов и дрожжей часто находятся в воздухе, попадают в молоко и хорошо там сохраняются даже при охлаждении молока, т.к. являются психрофилами. Грибы и дрожжи используют молочную кислоту, накопившуюся в предыдущей фазе, в качестве источника углерода. Количество их постепенно увеличивается, т.к. они являются ацидофилами (рН 3,5-5,0). Отмечается появление островков молочной плесени. Грибы разлагают белки молока с образованием щелочных продуктов, в результате чего повышается рН среды, она перестает быть кислой и достигает нейтральных значений. Среда вновь становится пригодной для развития гнилостных бактерий – аммонификаторов, и маслянокислых микроорганизмов. В результате развития микроорганизмов полностью исчезает сгусток молока, т.к. белок разлагается аммонификаторами с образованием аммиака.

Молоко приобретает жидкую консистенцию, накапливаются газы, продукт становится полностью не пригодным к употреблению.

Вывод: необходимо обеспечить условия наименьшего обсеменения сырого молока микроорганизмами при его получении, своевременное охлаждение для торможения роста микроорганизмов, а затем предотвращение развития микроорганизмов путем специальных методов обработки молока – пастеризации или стерилизации.

Контрольные вопросы

- 1. Дайте характеристику антимикробной фазы молока.*
- 2. Что такое фаза смешанной микробиоты?*
- 3. Охарактеризуйте фазу молочнокислых микроорганизмов.*
- 4. Дайте характеристику фазы развития плесневых грибов и дрожжей.*

4. МЕТОДЫ АНАЛИЗА СЫРОГО МОЛОКА

Пробы сырого молока для микробиологических исследований берут раньше, чем для физико-химических и органолептических исследований. Технический регламент предусматривает проведение для сырого молока редуцтазной пробы и сычужно-бродильной пробы.

4.1 Метод определения уровня бактериальной обсемененности сырого молока – редуцтазная проба по ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа.

В процессе жизнедеятельности бактерии выделяют в окружающую среду наряду с другими окислительно-восстановительными ферментами анаэробные дегидразы (по старой классификации называемые редуцтазами). Существует зависимость между количеством мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в молоке и содержанием в нем редуцтаз, что дает возможность использовать редуцтазную пробу как косвенный показатель уровня бактериальной обсемененности сырого молока.

Сущность метода. Метод основан на восстановлении резазурина окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности изменения окраски резазурина оценивают бактериальную обсемененность сырого молока. (Резазурин (англ. *resazurin*) – ароматическое соединение, окислительно-восстановительный индикатор, синий краситель, который при окислении приобретает розовый цвет).

Проведение анализа. Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения.

В пробирки наливают по 1 см³ рабочего раствора резазурина и по 10 см³ исследуемого сырого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки помещают в редуцтазник с температурой воды 37±1 °С.

При отсутствии редуцтазника допускается использовать водяную баню, обеспечивающую поддержание температуры 37±1 °С.

Вода в редуцтазнике или водяной бане после погружения пробирок с сы-

рым молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше, температуру 37 ± 1 °С поддерживают в течение всего времени определения.

Пробирки с сырым молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от прямых солнечных лучей (редуктазник должен быть плотно закрыт крышкой).

Время погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа.

Показания снимают через 1 ч. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают.

По истечении 1 ч пробирки вынимают из редуктазника, осторожно переворачивают. Пробирки с молоком, имеющим окраску от серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком, оставляют в редуктазнике еще на 30 мин.

Обработка результатов. В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета молоко относят к одному из классов в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Изменение цвета резазурина в соответствии уровнем бактериальной обсемененности молока

Класс	Продолжительность изменения цвета	Окраска молока	Ориентировочное количество бактерий в 1 см^3 молока
I	Через 1 ч	От серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком	До 500 тыс.
II	Через 1 ч	Сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая	От 500 тыс. до 4 млн
<p><i>Примечания</i></p> <p>1. Для оценки качества сырого молока при бактериальной обсемененности до 100 тыс. в 1 см^3 используют посев на чашки Петри на среду КМАФАнМ.</p> <p>2. При бактериальной обсемененности сырого молока до 300 тыс. время выдержки проб составляет 1,5 ч. Окраска сырого молока – от серо-сиреневой до сиреневой со слабым серым оттенком.</p> <p>3. Цвет сырого молока от бледно-розового до белого через 1 ч выдержки свидетельствует о бактериальной обсеменности свыше 4 млн жизнеспособных клеток.</p>			

Для определения класса сырого молока по редуктазной пробе с резазури-

ном прилагается специальная цветовая шкала.

4.2 Сычужно-бродильная проба по ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа

Важным показателем для дальнейшего использования молока с целью производства сыра является сычужно-бродильная проба. Сычужный фермент – фермент класса гидролаз, вырабатываемый в сычуге новорожденных жвачных, который способствует переработке коровьего молока. Препарат готовится из высушенных сычугов телят и ягнят. В настоящее время подобный фермент получается микробиологическим путем, по аминокислотному составу он аналогичен сычужному ферменту и используется для производства сыров

Сущность метода. Метод основан на способности сырого молока свертываться под действием сычужного фермента и микроорганизмов сырого молока. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество сырого молока на его пригодность для производства сыра.

Проведение анализа. В чисто вымытые широкие пробирки, хорошо просушенные и ополоснутые два-три раза сырым молоком, из которого отбирают пробу, наливают около 30 см³ молока. Затем вносят в каждую пробирку по 1 см³ раствора контрольного образца сычужного фермента хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в водяную баню или термостат при температуре 38±1 °С, после чего вынимают из бани и проводят визуальную оценку.

Обработка результатов. По результатам визуальной оценки сырое молоко относят к одному из трех классов, указанных в таблице 4.

Таблица 4 – Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется
II	Удовлетворительное	Сгусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1-10), разорван, но не вспучен
III	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл вверх или вместо сгустка образуется хлопьевидная масса

Сырое молоко с оценкой «хорошее» и «удовлетворительное» (I и II класс соответственно) считается пригодным для производства сыра, молоко с оценкой «неудовлетворительное» (III класс) – не пригодным для производства сыра.

Контрольные вопросы

- 1. Понятие о кислотности молока.*
- 2. Проведение пробы на редуктазу (резазуриновая проба).*
- 3. Сущность сычужно-бродильной пробы.*

5. ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МОЛОКА

Основными показателями микробиологической безопасности молока являются следующие: КМАФАнМ, БГКП, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, стафилококки, листерии, дрожжи, плесени. Допустимые уровни содержания микроорганизмов в продуктах переработки молока при выпуске их в обращение рассматриваются в техническом регламенте (таблица 5). Расшифровка гигиенических нормативов по микробиологическим показателям безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов включает в себя следующие группы микроорганизмов:

«1) **санитарно-показательные**, к которым относятся количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – (КМАФАнМ), бактерии группы кишечных палочек – (БГКП), (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки;

2) **условно-патогенные микроорганизмы**, к которым относятся *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Proteus*, *Bac. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*;

3) **патогенные микроорганизмы**, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*, бактерии рода *Yersinia*;

4) **микроорганизмы порчи** – дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы;

5) **микроорганизмы заквасочной микробиоты** и пробиотические микроорганизмы (молочнокислые микроорганизмы, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, ацидофильные бактерии и другие) в продуктах с нормируемым уровнем биотехнологической микрофлоры и в пробиотических продуктах».

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу: нормируется масса продукта, в котором не допускается наличие бактерий группы кишечных палочек, большинства условно-

патогенных микроорганизмов, а также патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество колониеобразующих единиц в 1 г (см³) продукта (КОЕ/г, см³).

5.1 Санитарно-показательные микроорганизмы

Санитарно-показательными микроорганизмами считаются те микроорганизмы, которые легко обнаружить и вырастить на питательных средах. Они выделяются из организма человека и животных в больших количествах и хорошо сохраняются в окружающей среде.

Санитарно-показательные микроорганизмы должны удовлетворять следующим требованиям:

- постоянно обитать в естественных полостях организма человека или животного и в большом количестве выделяться во внешнюю среду;
- продолжительность выживания во внешней среде санитарно-показательных микроорганизмов должна быть такой же или несколько большей, чем соответствующих патогенных микробов;
- быть более устойчивыми к воздействию физических и химических факторов внешней среды, чем патогенные микроорганизмы;
- не должны размножаться во внешней среде;
- должны легко выделяться из объектов внешней среды, не подавляться сапрофитами;
- при попадании во внешнюю среду не должны быстро изменять свои биологические свойства.

Из постоянных обитателей толстого отдела кишечника в качестве санитарно-показательных микроорганизмов приняты следующие: КМАФАнМ, бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (энтерококки).

Таблица 5 – Допустимые уровни содержания микроорганизмов в продуктах переработки молока при выпуске их в обращение

Продукт, группа продуктов	КМА- ФАНМ, КОЕ/см ³ (г), не более	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускается				Дрожжи, плесни, КОЕ/см ³ (г), не более
		БГКП (коли- формы)	патогенные микроорга- низмы, в т.ч. сальмонеллы	стафило- кокки S. aureus	листерии L. mono- cytogenes	
1	2	3	4	5	6	7
Питьеовое молоко, питьеовые сливки, молочный напиток, молочная сыворотка, пахта, продукты на их основе, термически обработанные, в том числе: питьеовое молоко, молочный напиток в потребительской таре, в том числе						
пастеризованные	1x10 ⁵	0,01	25	1	25	-
стерилизованные, ультрапастеризованные (УВТ) (с асептическим розливом)	<p>Требования промышленной стерильности:</p> <p>1. После термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение 3-5 суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменения вкуса и консистенции.</p> <p>2. После термостатной выдержки допускаются изменения:</p> <p>а) титруемой кислотности не более чем на 2 °Т;</p> <p>б) КМАФАнМ не более 10 КОЕ/см³.</p>					
ультрапастеризованные (без асептического розлива)	100	10,0	100	10,0	25	-
топленые	2,5x10 ³	0,1	25	-	25	-

1	2	3	4	5	6	7
обогащенные витаминами, макро-, микро-элементами, лактулозой, пребиотиками	В соответствии с требованиями, установленными для питьевого молока при различных процессах термической обработки					
во флягах, в цистернах	2×10^5	0,01	25	0,1	25	-
Молочная сыворотка и пахта в потребительской таре пастеризованные	1×10^5	0,01	25	1,0	25	-
Сливки и их продукты на их основе, в том числе: в потребительской таре, в том числе:						
пастеризованные	1×10^5	0,01	25	1,0	25	-
стерилизованные	<p>Требования промышленной стерильности:</p> <p>1. После термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение 3-5 суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции.</p> <p>2. После термостатной выдержки допускаются изменения:</p> <p>а) титруемой кислотности не более чем на 2 °Т;</p> <p>б) КМАФАнМ не более 10 КОЕ/см³ (г).</p>					

Метод определения количества мезофильных аэробных
и факультативно-анаэробных микроорганизмов
(КМАФАнМ) по ГОСТ Р 52415-2005

В связи с тем, что количество микроорганизмов сырого молока имеет большое значение для дальнейшей его сохранности, для сырого молока предусмотрен норматив по количеству мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). По ГОСТу «КМАФАнМ – это количество микроорганизмов, вырастающих и образующих видимые колонии на твердом питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С. Они определяются по количеству выросших на питательной среде колоний или колониеобразующих единиц (КОЕ). Количество КОЕ рассчитывается на 1 г исходного молока (КОЕ/г, см³). Поскольку молоко содержит огромное количество микроорганизмов, то перед посевом молока проводят его многократное разведение, иначе учет колоний станет невозможным. В зависимости от содержания КМАФАнМ определяют сорт молока. При определении сорта молока учитываются соматические клетки, среди клеток могут находиться и лейкоциты, свидетельствующие о воспалительных процессах в вымени, поэтому считается, что у здоровых коров эпителиальные клетки вымени должны составлять 60-70% общего количества соматических клеток (таблица 2).

Сущность метода. Метод основан на подсчете колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на питательной среде КМАФАнМ (таблица 2) при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч.

Проведение анализа. Выбор разведения для посева, и количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения (таблица 6).

Посев. Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает от 15 до 300 колоний. Делают посев из разведений, указанных в таблице 6.

Таблица 6 – Рекомендуемые разведения молока для посева КМАФАнМ

Наименование продукта	Объем или масса продукта, рекомендуемые для посева		
	2	3	4
1			
Сырые молоко и сливки, см ³	0,001	0,0001	0,00001
Пахта для промышленной переработки, см ³	0,001	0,0001	0,00001
Пастеризованные молоко, сливки, пахта и сыворотка и пастеризованные молочные напитки, коктейли, кисели, см ³	0,1	0,01	0,001
Ультрапастеризованное молоко без асептического розлива, см ³	1,0	0,1	-
Топленое молоко, см ³	0,1	0,01	-
Сгущенные с сахаром молоко или сливки, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром, сгущенные продукты из пахты, сыворотки, см ³	0,1	0,01	0,001

Каждое из разведений должно быть засеяно в количестве 1 см³ в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито 14±1 см³ расплавленной и охлажденной до температуры 40-45 °С питательной средой для определения КМАФАнМ.

Допускается посев исследуемого продукта на чашки Петри из одного и тоже же разведения в количестве 1,0 и 0,1 см³.

Сразу после заливки среды содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала.

Допускается проведение двух параллельных определений, т. е. проведение посева каждого разведения на две чашки Петри.

Культивирование. После застывания среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат при температуре 30±1 °С на 72 ч.

Обработка результатов. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4-10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чаш-

ки. При подсчете колоний рекомендуется использовать счетчики.

При большом количестве колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых сектора, подсчитывают количество колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднеарифметическое значение количества колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов вычисляют как среднеарифметическое или как средневзвешенное значение.

Показатель КМАФАнМ характеризует общее количество микроорганизмов в молоке, в основном сапрофитных, и в целом не может отражать санитарно-гигиеническое состояние молока, т.к. не позволяет определить наличие кишечной палочки, стафилококков, сальмонелл и других микроорганизмов, представляющих опасность для человека. Поэтому необходимо проводить дополнительные исследования, свидетельствующие о санитарном благополучии молока.

Метод определения бактерий группы кишечных палочек (БГКП) по ГОСТ 31747-2012

Одним из основных показателей санитарного состояния молока является наличие в нем бактерии группы кишечной палочки. (БГКП). Согласно новому ГОСТ 31747-2012 «бактерии группы кишечных палочек, БГКП, коли-формы: микроорганизмы семейства энтеробактерий родов эшерихия, цитробактер, энтеробактер, клебсиелла, серрация; бесспорные, грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа».

Эти микроорганизмы являются естественными обитателями кишечника человека и животных, постоянно присутствуют в фекалиях и навозе и выделяются в окружающую среду. Поэтому они являются показателями косвенного загрязнения молока не только кишечной палочкой, но и, возможно, другими, в

том числе патогенными микроорганизмами. Бактерии группы кишечной палочки относятся к одному семейству – *Enterobacteriaceae*, т.к. имеют много общего в морфологических и культуральных свойствах (поэтому их называют коли-морфными бактериями). **По морфологии** бактерии группы кишечных палочек – короткие (длина 1-3 мкм, ширина 0,5-0,8 мкм) полиморфные, подвижные и неподвижные грамотрицательные палочки, не образующие спор. **Культуральные свойства** – бактерии хорошо растут на простых питательных средах: мясопептонном бульоне (МПБ), мясопептонном агаре (МПА).

На МПБ дают обильный рост при значительном помутнении среды; осадок небольшой, сероватого цвета, легко разбивающийся. Образуют пристеночное кольцо, плёнка на поверхности бульона обычно отсутствует. На МПА колонии прозрачные с серовато-голубым отливом, легко сливающиеся между собой. На среде Эндо образуют плоские красные колонии средней величины. Красные колонии могут быть с тёмным металлическим блеском (*E. coli*) или без блеска (*E. aerogenes*). Для лактозоотрицательных вариантов кишечной палочки характерны бесцветные колонии. Им свойственна широкая приспособительная изменчивость, в результате которой возникают разнообразные варианты, что усложняет их классификацию.

Колиморфные бактерии различаются по **биохимической активности** (ферментативные свойства) и **антигенной структуре**.

Биохимическая активность. Большинство бактерий группы кишечных палочек (БГКП) не разжижают желатину, свертывают молоко, расщепляют пептоны с образованием аминов, аммиака, сероводорода, обладают высокой ферментативной активностью в отношении лактозы, глюкозы и других сахаров, а также спиртов. Не обладают оксидазной активностью. По способности расщеплять лактозу при температуре 37 °С БГКП делят на лактозоотрицательные и лактозоположительные кишечные палочки (ЛКП), или колиформные по международным стандартам. Из группы ЛКП выделяются фекальные кишечные палочки (ФКП), способные ферментировать лактозу при температуре 44,5 °С. К ним относится *E. coli*, не растущая на цитратной среде.

Дифференциация бактерий группы кишечных палочек проводится с учетом различий физиологических свойств микроорганизмов. На этой основе разработаны специальные тесты, используемые для распознавания фекальных и нефекальных кишечных палочек, основным из которых является комплекс признаков ТИМАЦ (ТЛИМАЦ):

Т – температурный тест;

И – тест индолообразования;

М – реакция с метиленовым красным;

А – реакция на ацетилметилкарбинол (реакция Фогес-Проскауэра);

Ц – цитратный тест;

Л – ферментация лактозы.

Температурный тест проводят на среде Эйкмана с большим содержанием углеводов. Определяется способность бактерий к газообразованию при температуре 44-46 °С. Бактерии рода *Escherichia* обладают этой способностью, а рода *Citrobacter*, *Enterobacter* – нет. Этот тест может проводиться на среде Кесслера. По способности образовывать индол на бульоне Хоттингера с триптофаном бактерии рода *Escherichia* отличаются тем, что способны его образовывать, а рода *Citrobacter*, *Enterobacter* – нет. Ацетилметилкарбинол образуют бактерии рода *Enterobacter*, а бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter* такой способностью не обладают.

Санитарно-показательное значение различных видов бактерий группы кишечных палочек неодинаково. Обнаружение бактерий рода *Escherichia* свидетельствует о свежем фекальном загрязнении, что имеет большое санитарное и эпидемиологическое значение. *Citrobacter* и *Enterobacter* являются показателем более давнего фекального загрязнения.

Определения бактерий группы кишечных палочек по ГОСТ можно проводить несколькими методами.

а) Метод определения БГКП по признакам роста на жидкой среде Кесслер.

Сущность метода. Метод основан на способности БГКП сбрасывать в

питательной среде лактозу с образованием газа и кислоты при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Признак роста БГКП на жидкой среде Кесслер – визуально наблюдаемое накопление газа в поплавке.

Проведение анализа. Посев продуктов или их разведений в жидкую среду Кесслер (приложение 4), проводят в количествах, указанных в таблице 7.

Таблица 7 – Рекомендуемые разведения молока для посева

Наименование продукта	Засеваемые объем или масса продукта
Сырые молоко и сливки, см ³	От 0,1 до 0,00001
Пахта для промышленной переработки, молочная сыворотка для производства напитков, см ³	От 0,1 до 0,01
Молочная сыворотка для производства других пищевых продуктов, см ³	От 0,1 до 0,001
Отобранные после пастеризации молоко и сливки, ультрапастеризованное молоко (без асептического розлива), см ³	10
Пастеризованные молоко и сливки, молоко с компонентами, кисломолочные продукты и напитки с компонентами и без компонентов, жидкий ЗЦМ, см ³	1; 0,1; 0,01

По 1 см³ соответствующих разведений продукта засевают в пробирку с 5 см³ жидкой среды Кесслер. Каждое разведение засевается в одну пробирку со средой.

Посев 10 см³ пастеризованного молока, отобранного после пастеризатора, 10 см³ закваски на чистых культурах, 3 см³ кефирной закваски, 10 см³ замороженного бактериального концентрата или 10 см³ разведения 1:10 стуженных молочных продуктов с сахаром проводят в колбы с 40-50 см³ жидкой среды Кесслер.

Пробирки или колбы с посевами помещают в термостат при температуре 37 ± 1 °С на 18-24 ч. Окончательный результат снимают через 24 ч для всех продуктов, кроме мороженого. Для мороженого продолжительность культивирования посевов 48 ч.

Обработка результатов. При снятии результатов пробирки или колбы с

посевами просматривают и визуально определяют наличие или отсутствие газа в поплавках.

При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в данном объеме продукта.

При отсутствии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии БГКП в нем.

б) Определение количества БГКП на твердой питательной среде АЖФК для продуктов сыроделия и маслоделия

Сущность метода. Метод основан на способности БГКП давать рост и образовывать типичные колонии на твердой питательной среде АЖФК (приложение 5) при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч и предназначен для количественного подсчета БГКП в молоке и продуктах переработки молока.

Проведение анализа. При определении БГКП на среде АЖФК для проведения посева рекомендуется выбирать разведения, в котором БГКП должны отсутствовать, и два предыдущих.

Посев на среду можно проводить двумя способами – поверхностным и глубинным.

При поверхностном способе посева перед выполнением анализа проводят подготовку питательной среды. Для этого свежеприготовленную среду или среду после хранения, расплавленную на водяной бане, охлаждают до температуры $50,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ и разливают в стерильные чашки Петри по $12\text{--}15\text{ см}^3$. Дно чашки должно быть равномерно покрыто слоем среды высотой около 2 мм. Чашки оставляют полуоткрытыми для подсушивания на 60 ± 5 мин в стерильных условиях (в боксе или специально обработанном термостате). После подсушивания среды чашки закрывают, маркируют и используют для проведения анализа.

При поверхностном способе посева каждое из выбранных разведений засевают по 0,1 или $0,2\text{ см}^3$ и равномерно по всей поверхности втирают посевной материал в питательную среду стерильным шпателем Дригальского.

При глубинном способе посева каждое разведение должно быть засеяно по 1 см^3 в отдельную чашку Петри и залито расплавленной и охлажденной до

температуры 45 °С средой. После внесения среды содержимое чашки тщательно перемешивают путем легкого вращательного движения для равномерного распределения посевного материала. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности для застывания агара.

Допускается проведение двух параллельных определений, т. е. проведение посева каждого разведения на две чашки Петри.

После посева чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в термостат с температурой 37 ± 1 °С на 16-24 ч. Подсчет колоний проводят через 24 ч.

Обработка результатов. При поверхностном посеве БГКП образуют розовато-фиолетовые колонии диаметром больше 0,5 мм с более светлым по сравнению с центром ореолом, которые подлежат подсчету.

При поверхностном посеве для пересчета результатов на 1 г или 1 см³ продукта число колоний, выросших на каждой чашке Петри, умножают на 10 и на соответствующее разведение при посеве 0,1 см³; умножают на 5 и на соответствующее разведение при посеве 0,2 см³.

При глубинном посеве БГКП образуют мелкие колонии до 0,5 мм красного цвета (вокруг колоний обычно образуется красный ореол), которые подлежат подсчету.

Подсчитанное число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на соответствующее разведение.

Количество БГКП продукта вычисляют как среднеарифметическое или как средневзвешенное значение.

Вывод: обильная микрофлора сырого молока может привести к его быстрой порче, поэтому необходимо определить показатели свежести и санитарного состояния молока. Этими показателями является **КМАФАнМ** (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), **БГКП** (бактерии группы кишечных палочек), а также патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы. Эти исследования соответствуют требованиям Сан-

ПиН 2.3.2.560-96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов».

Микробиоту молока нужно свести до минимума, поэтому необходим строгий контроль за санитарным состоянием молочного хозяйства, быстрое охлаждение молока с последующей пастеризацией.

5.2 Условно-патогенные микроорганизмы

Условно-патогенные микроорганизмы, как правило, лишены болезнетворных свойств и не вызывают инфекционных заболеваний у человека, но при снижении иммунитета могут вызвать различные поражения. Эти микроорганизмы способны к длительному существованию во внешней среде. К условно-патогенным микроорганизмам относятся *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Proteus*, *B. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*.

5.2.1 Кишечная палочка (*Escherichia coli*)

При наличии в продуктах питания кишечной палочки у людей отмечаются расстройства желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся повышением температуры тела, рвотой, диареей, явлениями дисбактериоза. В настоящее время *E. coli* определяется в молоке по ГОСТ 31747-2012 (дата введения 2013-07-01) в составе бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

5.2.2. Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) ГОСТ 30347-2016

Отрицательное влияние на молоко и молочные продукты оказывают заболевания животных, среди которых наибольшее значение имеет мастит коров (воспалительные процессы в молочной железе, вызываемые чаще всего *Staphylococcus aureus*). Вымя больных коров является резервуаром энтеротоксигенных культур этого микроорганизма, которые при попадании в молоко вызывают тяжелые пищевые отравления людей.

Интоксикации стафилококковой природы характеризуются тем, что они развиваются в результате воздействия на организм энтеротоксинов, а не живых микробных клеток. Кипячение и стерилизация продуктов убивают стафилокок-

ки, но не разрушает токсины. Окончательная инактивация наступает только после 2,5-3 ч кипячения. В этой связи при выявлении причин пищевых отравлений необходимо определять, как патогенные микроорганизмы, так и энтеротоксины.

Источником патогенных стафилококков, попадающих в молоко, может быть и больной человек при несоблюдении им санитарно-гигиенических правил.

Одним из наиболее перспективных и быстро развивающихся методов исследования биологически активных веществ, в том числе токсинов, является иммуноферментный анализ. Технология иммуноферментного анализа постоянно совершенствуется, повышается чувствительность и специфичность тест-систем, подбираются наиболее удобные условия работы, сокращается число этапов проведения исследований, что уменьшает вероятность ошибки при выполнении анализа.

При микробиологическом методе исследования определение коагулоположительных стафилококков (КПС) проводится высевом продукта на жидкие и/или плотные питательные среды. При небольшом обсеменении продуктов стафилококками проводится посев в жидкую среду накопления. Непосредственный посев на плотные питательные среды рекомендуется проводить при высоком обсеменении исследуемых продуктов КПС. Определение стафилококков проводится в соответствии с ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Метод определения *Staphylococcus aureus*». Стандарт распространяется на молоко и молочные продукты, закваски, бактериальные концентраты и препараты и устанавливает два метода определения *Staphylococcus aureus* в определенном объеме или навеске продукта: определение количества с предварительным обогащением; определение количества без предварительного обогащения.

- Метод определения КПС с использованием жидких питательных сред по ГОСТ 30347-2016 (дата введения 2017-09-01)

Готовят десятикратные разведения исследуемого продукта, засевают по 1 мл каждого из разведений в пробирки с жидкой питательной средой, перемешивают со средой, избегая попадания воздуха, и сверху заливают расплавленным 2%-м водным агаром. Пробирки инкубируют течение 24 ч при температуре 37 °С. В случае использования специальных диагностических сред при росте КПС наблюдаются изменения в среде: почернение среды или наличие черного осадка при использовании среды Джиолитти и Каптони и желтое окрашивание обогащенного лактозно-солевого бульона.

Для подтверждения присутствия КПС делают, пересев петлей из бульона на среду Берд-Наркера так, чтобы получить отдельные колонии. Чашки с посевами термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Типичные колонии КПС черные и блестящие, с узкой серо-белой полосой и окружены прозрачной зоной в непрозрачной среде.

Колонии проверяют на коагулазную активность. Токсигенные стафилококки коагулируют плазму крови. Для постановки реакции используют сухую плазму кролика. В стерильные пробирки набирают 0,5 мл разведенной плазмы и вносят по одной петле суточной агаровой культуры. Одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной в качестве контроля. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С. Учет результатов производят через 3 и 24 ч. При положительной реакции плазмокоагуляции в пробирке образуется сгусток различной степени плотности.

- Метод определения КПС с использованием плотных питательных сред по ГОСТ 30347-2016.

Наиболее часто в качестве плотных питательных сред используют молочно-солевой агар.

На поверхность питательной среды в чашки Петри наносят по 0,1 мл десятикратных разведений исследуемого продукта и тщательно растирают по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки с засеянными средам и помещают в термостат при температуре 37 °С на 24-48 ч. Просматривают посевы на

чашках и из отдельных типичных колоний готовят препараты, окрашивая их по Граму, и микроскопируют.

Колонии стафилококков на молочно-солевом агаре имеют форму дисков диаметром 2-4 мм с ровными краями от белого до лимонно-желтого цвета. На желточном солевом агаре вокруг колоний наблюдаются радужные венчики и зоны помутнения среды. Подсчитывают количество выросших колоний при посеве продукта на плотных средах и производят пересчет их числа на 1 г или 1 мл. Не менее 5 характерных колоний грамположительных кокков с каждой чашки Петри отсеивают на скошенный мясо-пептонный агар. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Из культур, выросших на скошенном агаре, после предварительной проверки на чистоту ставят реакцию плазмокоагуляции.

В настоящее время разработан наиболее современный метод твердофазного иммуноферментного анализа «Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах» (Методические указания МУК 4.2.2429-08. (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29 октября 2008 г.) «Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29 октября 2008 г.). Дата введения: 15 декабря 2008 г. Область применения: «Настоящие методические указания устанавливают методы качественного определения стафилококковых энтеротоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах животного происхождения (в молоке, молочных продуктах и сырах, в мясе и мясопродуктах; в птице и птицепродуктах) на основе твердофазного иммуноферментного анализа».

5.3 Патогенные микроорганизмы

Патогенные микроорганизмы вызывают инфекционные заболевания у здоровых лиц, эти микроорганизмы способны активно проникать в организм и проявляться специфическими поражениями.

5.3.1 Определение сальмонелл (*Salmonella*)

Сальмонелла (лат. *Salmonella*) – род неспороносных бактерий, имеющих

форму палочек (длина 1-7 мкм, ширина около 0,3-0,7 мкм). Род назван от имени американского патолога Д.Э. Сальмона (Daniel Elmer Salmon; 1850-1914). Сальмонеллы грамотрицательны; факультативные анаэробы; большинство подвижно (благодаря перитрихально расположенным жгутикам). На плотных питательных средах образуют круглые колонии серовато-белого цвета, при росте на бульоне – помутнение и осадок. Сальмонеллы сбраживают углеводы (глюкозу, маннозу, ксилозу, декстрин) и спирты (инозит, дульцит) с образованием кислоты, а иногда и газа.

Сальмонеллы могут выжить в течение недели вне живого организма. Они могут находиться в высушенных экскрементах более 2,5 лет. Ультрафиолетовое излучение и тепло ускоряют их смерть, они погибают при нагревании до температуры 55 °С за один час или до температуры 60 °С в течение получаса. Сальмонеллы не погибают при замораживании.

Поселяясь на стенках кишечника, «новоприбывшие» сальмонеллы выделяют токсин TTSS-1, который уничтожает конкурентов, т.е. представителей нормальной микрофлоры.

Сальмонеллез – острое, тяжело протекающее заболевание желудочно-кишечного тракта, сопровождающееся резким повышением температуры, рвотой, диареей, истощением, приводящее к тяжелым последствиям. Определение сальмонелл, приготовление сред для их обнаружения проводится по ГОСТ ISO 6785-2015 «Молоко и молочная продукция» Обнаружение *Salmonella spp.* (Дата введения 2017-07-01).

5.3.2 Определение листерий (*Listeria monocytogenes*)

Listeria monocytogenes – возбудитель листериоза. Источник возбудителя листериоза – больные и переболевшие животные, листерионосители, в молоко которых попадают листерии. *Listeria monocytogenes* способна сохраняться и размножаться в условиях холодильных камер. Согласно систематике микроорганизмов Берджи, род *Listeria* состоит из 7 видов, бактерии которых различно проявляют себя в процессе патогенеза. Патогенными являются 2 вида: *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. *Listeria monocytogenes* – аэробная, факультативно-

анаэробная, подвижная, полиморфная, грамположительная мелкая палочка (длиной 0,5-2,0 мкм; шириной 0,3-0,5 мкм) с закругленными концами, спор и капсул не образует. В мазках палочки расположены под углом в виде римской цифры V, иногда цепочкой или в виде частокола.

По ГОСТ 32031-2012 (дата введения 2014-07-01), бактерии рода *Listeria* – грамположительные неспорообразующие короткие палочки с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках (0,4-0,5 x 0,5-2,0 мкм), реже образуют длинные нити. *Listeria monocytogenes*: вид бактерий рода *Listeria*, патогенный для человека и животных, принадлежность к которому устанавливают путем дифференциации от непатогенных видов *Listeria* по культуральным, биохимическим и биологическим свойствам. В ГОСТе приведены питательные среды и методы учета микроорганизмов.

6. МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ПОРОКИ МОЛОКА

Присутствие большого количества бактерий в молоке в условиях неправильного хранения может привести к его порче, которую часто называют пороками молока микробного происхождения. Эти пороки связаны с развитием определенных групп микроорганизмов, попавших в молоко – аммонификаторов, кишечной палочки, маслянокислых бактерий, плесневых грибов, дрожжей и др. При этом меняется органолептика молока – его консистенция, запах, вкус, цвет. Молоко может приобрести тягучую консистенцию, хлопья, горький вкус, неприятный запах, красный или голубоватый цвет. Рассмотрим более подробно пороки молока в соответствии с вызывающими их микроорганизмами.

Аммонификаторы проявляют свое действие в нейтральной и слабощелочной средах, поэтому при большом их количестве они могут развиваться до фазы молочнокислых бактерий или после фазы плесневых грибов и дрожжей, когда молоко вновь приобретает щелочную реакцию. К гнилостным аэробам относятся спорообразующие *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium*, *Bac. subtilis*; к гнилостным анаэробам – *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens*. В процессе разложения белков изменяется консистенция, образуются газы (аммиак), молоко приобретает горький вкус.

Маслянокислые клостридии *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* и др. в большом количестве содержатся в почве, на растениях, на предметах ухода за животными и могут попасть в молоко. Являясь аммонификаторами, одновременно вызывают маслянокислое брожение, в результате которого лактоза и лактаты молока расщепляются с образованием масляной, уксусной и других кислот, с бурным газообразованием и неприятным запахом, в результате чего молоко становится непригодным. Пастеризация не предотвращает порчу молока, т. к. споры при этом не погибают.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*), обладая незначительной протеолитической активностью, расщепляет белки молока на стадии пептонов, одновременно активно сбраживает лактозу с образованием кислоты и газа, в резуль-

тате в кислой среде белок молока быстро свертывается. По мере накопления газа плотная масса сгустка белка разрывается и наступает её разжижение, такой продукт не имеет питательной ценности, не имеет товарного вида и не пригоден к употреблению.

Неспорообразующие гнилостные палочки – рода *Pseudomonas* вызывают пороки молока с изменением его цвета: *Pseudomonas fluorescens* образует флюоресцирующий пигмент зеленовато-желтого цвета, *Pseudomonas aeruginosa* – сине-зеленый пигмент, а палочки *Serratia marcescens* (семейство *Enterobacteriaceae*) при развитии в молоке выделяют красный пигмент.

Вульгарный протей (*Proteus vulgaris*) является сильным аммонификатором, обладает высокой протеолитической активностью, вызывает порчу молока. Микроорганизмы рода *Proteus* выделяются из кишечника у 5-10% здоровых людей, а также содержатся в навозе крупного рогатого скота, лошадей и других животных. Во вторую фазу сырого молока их рост и размножение подавляется молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы рода *Proteus* мезофилы, поэтому погибают при пастеризации. В случае их попадания в стерильное молоко отмечается бурный рост бактерий с разложением белка и порчей продукта (при температуре 25 °С через 48 ч отмечается накопление бактерий до 1-2 млрд в 1 см³). Употребление в пищу продукта с бактериями рода *Proteus* служит причиной пищевого отравления.

Бактерии вида *Alcaligenes viscolactis* – облигатные аэробы, представляют собой короткие палочки, располагающиеся поодиночке, перитрихи. Изменяют консистенцию молока, придавая ему «тягучесть».

Плесневые грибы и их споры могут быть в кормах, на оборудовании, аппаратуре. Являются аэробами, развиваются на поверхности молока, разлагают жиры, в результате молоко приобретает горький вкус и травянистый запах и к употреблению непригодно.

Возбудители мастита (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*), туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*), ящура

(вирус семейства *Picornaviridae*) придают молоку желтый или голубоватый оттенок. При мастите в молоке могут появиться хлопья.

Термоустойчивые молочнокислые бактерии – группа микроорганизмов, выдерживающих кратковременное нагревание молока при температуре 85-90 °С, поэтому, сохранившись в молоке, могут вызывать в дальнейшем порчу пастеризованного молока или молочной продукции. Это грамположительные, не образующие спор и капсул неподвижные бактерии. Оптимум их развития 45-55 °С, они вызывают сквашивание молока с образованием сгустка без газа. Устойчивы к действию дезинфицирующих средств, поэтому встречаются на молочном оборудовании; борьба с ними затруднена. Обнаружение этих микроорганизмов проводят, культивируя на стерильном молоке смывы с оборудования в течение 16-24 ч при температуре 42 °С, а затем просматривая микроскопические препараты.

Самые типичные пороки молока, приводящие к изменению его органолептики, приводятся в таблице 8.

Таблица 8 – Органолептические пороки молока ГОСТ Р 52054-2003

Пороки	Причины
Пороки цвета: голубой	Разбавление водой, снятие жира, туберкулез вымени, хранение в цинковой посуде
синий	Пигментообразующие микроорганизмы, скормливание большого количества трав, содержащих синий пигмент (водяной перец, незабудка и др.)
жёлтый	Стрептококковый мастит, примесь молозива, скормливание большого количества трав, содержащих жёлтый пигмент (зубровка, лютик, люцерна и др.)
Пороки запаха: аммиачный	Хранение молока в открытой таре на ферме, бактерии группы кишечной палочки
лекарственный и химический	Применение лекарств при лечении дойных коров, совместное хранение молока, лекарств или химикатов.
прогорклый	Масляно-кислое брожение
спиртовой	Спиртовое брожение при хранении загрязненного молока при низкой температуре
затхлый и гни- лостный	Гнилостные и анаэробные бактерии в плотно закрытом неохлажденном молоке

Пороки вкуса: рыбный	Кормление коров рыбной мукой, водорослями
кормовой	Избыточное кормление коров силосом, сенажом, корнеплодами
соленый	Молоко стародойных коров, молозиво, мастит, туберкулез
металлический	Хранение молока в луженой и ржавой посуде
мыльный	Поедание хвоща, добавление соды, туберкулез вымени, хранение неохлажденного молока в закрытой таре
Пороки консистенции: пенистое	Дрожжи, кишечная палочка, масляно-кислое брожение
водянистое	Разбавление водой, кормление водянистыми кормами, катаральный мастит, туберкулез, течка
слизистое	Слизеобразующие бактерии, ящур, молозиво, мастит
творожистое	Скисание молока, мастит

Контрольные вопросы

- 1. Причины порчи молока.*
- 2. Аммонификаторы, вызывающие порчу молока.*
- 3. Неспорообразующие гнилостные палочки, вызывающие порчу молока.*
- 4. Грибы, вызывающие порчу молока.*
- 5. Термоустойчивые молочнокислые бактерии, как причина порчи молока.*

7. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕХНИЧЕСКИ ВРЕДНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРЧИ) МОЛОКА И ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА ДЛЯ ВНУТРИЗАВОДСКОГО КОНТРОЛЯ (ГОСТ 31747-2012)

7.1 Метод определения общего количества психротрофных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Сущность метода. Метод основан на подсчете колоний психротрофных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на твердой питательной среде КМАФАнМ при температуре 7 ± 1 °С в течение 7-10 суток и предназначен для оценки санитарно-гигиенических условий получения, хранения и транспортирования сырого молока, а также выявления причин микробиологической порчи продуктов переработки молока.

Проведение анализа. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9 – Количество засеваемого продукта для определения микроорганизмов

Наименование продукта	Объем или масса продукта, рекомендуемые для посева		
Сырое молоко и сливки, см ³	0,01	0,001	0,0001
Продукты переработки молока*, см ³ или г	0,1	0,01	0,001
<i>Примечание:</i> * При выявлении причины пороков, связанных с развитием психротрофных микроорганизмов.			

Для определения общего количества психротрофных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает не менее 15 и не более 300 колоний. Из каждой пробы делают посев из разведений, указанных в таблице 6. Каждое из разведений должно быть засеяно в количестве 1 см³ в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито 10-15 см³ расплавленной и охлажденной до температуры 40-45 °С питательной среды КМАФАнМ (приложение 4).

Допускается посев исследуемого продукта на чашки Петри из одного и того же разведения в количестве 1,0 и 0,1 см³.

После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой 7±1 °С на 7-10 сут.

Обработка результатов. Подсчитывают количество психротрофных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ или 1 г сырого молока, сырых сливок или продуктов переработки молока.

Количество микроорганизмов в 1 см³ или 1 г продукта X по каждой чашке Петри вычисляют по формуле (1).

$$X = n \cdot 10^m, \quad (1)$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – количество десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое, полученное по всем чашкам.

Средневзвешенное значение количества микроорганизмов при проведении двух параллельных определений рассчитывают в соответствии с ГОСТ Р 51446.

7.2 Метод определения общего количества термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Сущность метода. Метод основан на подсчете колоний термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на твердой питательной среде КМАФАнМ при температуре 44±1 °С в течение 72 ч, и предназначен для оценки санитарно-гигиенических условий получения сырого молока и выявления источника микробиологической порчи продуктов переработки молока.

Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10 – Количество засеваемого продукта для определения микроорганизмов

Наименование продукта	Объем или масса продукта, рекомендуемые для посева		
	2	3	4
1			
Сырое молоко и сливки, см ³	0,1	0,01	0,001
Масло из коровьего молока, масляная паста, спреды, г	0,1	0,01	0,001
Плавленый сыр и плавленые сырные продукты, г	0,1	0,01	0,001
Сухие продукты из молока, сливок, пахты, сыворотки, г	0,1	0,01	-

Для определения общего количества термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает от 15 до 300 колоний. Из каждой пробы делают посев из разведений, указанных в таблице 7. Каждое из разведений должно быть засеяно в количестве 1 см³ в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито 10-15 см³ расплавленной и охлажденной до температуры 40-45 °С питательной среды КМАФАнМ.

Допускается проведение двух параллельных определений, т. е. проведение посева каждого разведения на две чашки Петри.

После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в термостат с температурой 44±1°С на 72 ч.

Обработка результатов. Количество термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ или 1 г сырого молока, сырых сливок или продуктов переработки молока подсчитывают, как и в предыдущем методе (пункт 7.1)

7.3 Метод определения спор аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Сущность метода. Метод основан на посеве предварительно прогретого при температуре 88±2 °С в течение 12±2 мин посевного материала в питательную среду КМАФАнМ с последующим культивированием посевов при темпе-

ратуре 30 ± 1 °C в течение 72 ч и подсчете видимых колоний. Метод предназначен для оценки санитарно-гигиенических показателей сырья и выявления источника микробиологической порчи продуктов переработки молока.

Проведение анализа. Для определения количества спор аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводят посев 0,1 и 0,01 см³ (г) продукта.

Посевной материал (разведения продукта) прогревают в водяной бане при температуре 88 ± 2 °C в течение 12 ± 2 мин, охлаждают до температуры 23 ± 1 °C.

Из каждого подготовленного разведения делают посев по 1 см³ на одну чашку Петри с заранее промаркированной крышкой. Каждую чашку Петри заливают 10-15 см³ питательной среды КМАФАнМ, охлажденной до температуры 45 ± 1 °C, тщательно перемешивают и оставляют до застывания.

Допускается проведение двух параллельных определений, то есть проведение посева каждого разведения на две чашки Петри.

После застывания сред чашки Петри переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре 30 ± 1 °C на 48-72 ч.

Обработка результатов. Для подсчета выбирают чашки, на которых выросло от 5 до 150 колоний спорных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Количество спор аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ или 1 г сырого молока, сырых сливок или продуктов переработки молока подсчитывают, как и в предыдущем методе (пункт 7.1).

7.4 Метод определения спор мезофильных анаэробных бактерий (ГОСТ 32012-2012)

Настоящий стандарт распространяется на сырое и подвергнутое тепловой обработке молоко, сыры и устанавливает методы определения в них содержания спор мезофильных анаэробных бактерий.

Метод основан на высеве определенного количества прогретых при температуре 75 ± 1 °C в течение 30 ± 3 °C мин проб молока сыра в плотные или жидкие питательные среды, культивировании посевов в течение 72 ч при 37 ± 1 °C,

регистрации видимых признаков роста микроорганизмов, определении их наиболее вероятного числа.

Проведение анализа. Для определения количества спор мезофильных анаэробных бактерий в молоке и сырах проводят посев 1 см^3 исследуемого образца (для молока – нулевое, первое и второе, а для сыра – первое и второе разведения) в пробирку с $10\pm 2\text{ см}^3$ питательной среды, выдержанной перед анализом в кипящей водяной бане в течение 30 мин и охлажденной до температуры $40\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.

Каждый образец исследуемых молока и сыра выбранных разведений засевают в две пробирки с питательной средой, внося посевной материал на дно пробирки, не допуская взбалтывания среды и не выдувая посевной материал.

Сверху посевы заливают слоем предварительно расплавленного и охлажденного до температуры $45\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ водного агара. Высота слоя водного агара должна быть не менее $20\pm 5\text{ мм}$.

Пробирки с посевом помещают в термостат при температуре $37\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ на 72 ч.

Обработка результатов. Наличие спор мезофильных анаэробных бактерий, засеянных в объемах исследуемого образца молока или сыра, определяют по появлению разрывов агарного столбика, образуемых при росте этих бактерий газами.

Наиболее вероятное число спор мезофильных анаэробных бактерий при анализе молока определяют по числу пробирок, в которых они дали рост (таблице 11).

Результаты, в которых количество пробирок с видимыми признаками роста мезофильных анаэробных бактерий при посевах $1; 0,1$ и $0,01\text{ см}^3$ молока, не могут быть использованы для расчета, т.к. в 95% случаях они вызваны несовершенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. В данных случаях исследования повторяют.

Среды для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий готовятся по ГОСТ 25102-90, отбор проб и подготовка их к анализу –

по ГОСТ 139298, ГОСТ 9225, ГОСТ 26809.

Таблица 11 – Наиболее вероятное число спор мезофильных анаэробных бактерий при анализе молока

Кол-во пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 см ³ , шт.	Кол-во пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 см ³ , шт.
1 см ³	0,1 см ³	0,01 см ³		1 см ³	0,1 см ³	0,01 см ³	
1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	0	0,0	1	1	2	-
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	-	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	-
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	-	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	-
0	2	1	-	2	1	0	6,0
0	2	2	-	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	-	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0 и более

7.5 Метод определения дрожжей и плесневых грибов (ГОСТ 33566-2015)

Метод основан на высеve определенного количества продукта или его разведений в селективную агаризованную среду, культивировании посевов в аэробных условиях при температуре 24 °С в течение 5 дней, подсчете всех видимых колоний плесневых грибов и дрожжей, типичных по макро- и (или) микроскопической морфологии, и пересчете их количества на 1 г (мл) продукта.

Масса (объем) навески для приготовления исходного разведения должна составлять не менее 10 г (мл), а для непосредственного высева в питательную среду Сабуро – не менее 1 г (мл). Из навески продуктов готовят исходное и ряд десятикратных разведений.

По 1 мл продукта или его разведений высевают параллельно в две чашки Петри. В каждую чашку Петри, содержащую продукт или его разведение, добавляют не позднее чем через 15 мин 14-15 мл расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С агаризованной среды. Посевы тщательно перемешивают вращательным движением чашки Петри и оставляют на столе в горизонтальном положении для застывания. После застывания агаризованной среды посевы для предотвращения высыхания агара оставляют крышками вверх и термостатируют при температуре 24 °С в течение 5 дней. Через 3 дня термостатирования проводят предварительный учет типичных колоний, а через 5 дней – окончательный. Через 5 дней просматривают посевы и отбирают чашки, на которых выросло от 5 до 50 изолированных колоний плесневых грибов или от 15 до 150 – дрожжей.

Развитие плесневых грибов на поверхности плотной среды характеризуется появлением пушистого паутинообразного или ватообразного роста. Дрожжи на поверхности среды образуют белые или матовые колонии с ровными краями и выраженным центром. Под агаром – это мелкие или средних размеров белые колонии; в глубине агара – чечевицеобразные колонии чаще красного цвета с выступающим иногда над поверхностью агара ростом.

Для подтверждения роста дрожжей проводят их изучение. Для этого готовят фиксированные препараты и окрашивают метиленовой синью в течение 3-5 мин, а затем промывают водопроводной водой, подсушивают и микроскопируют. Метиленовая синь окрашивает фон препарата значительно слабее, чем дрожжевые клетки. Дрожжевые клетки значительно крупнее бактериальных, диаметр их достигает 8-14 мкм. Форма их разнообразна: яйцевидная, эллиптическая, цилиндрическая, лимоновидная, шаровидная. Под микроскопом часто видно почкование у дрожжей в виде бугорков на поверхности клетки.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. Уточняют число плесневых грибов на чашках, где выросло от 5 до 50 колоний, и (или) дрожжей от 15 до 150 колоний и пересчитывают на 1 г (мл) продукта. Для этого находят среднее арифметическое числа колоний плесневых грибов и (или) дрожжей, округ-

ляют его согласно методу 1 при определении большого количества бактерий, умножают на степень разведения и делят на количество посевного материала (масса, объем), внесенного в чашку.

Количество плесневых грибов и дрожжей записывают в виде числа: (от 1 до 9,9) • 10ⁿ. Например, 150 клеток в 1 г записывают как 1,5 • 10² КОЕ/г. При применении метода, посева продукта непосредственно в жидкую среду посеvy термостатируют при температуре 24 °С в течение 72 ч, отмечают, есть или нет рост плесневых грибов и (или) дрожжей. Результаты записывают как «обнаружены (не обнаружены) плесневые грибы и (или) дрожжи в анализируемой массе продукта».

Контрольные вопросы

1. Понятие КМАФАнМ.
2. Нормативы КМАФАнМ (КОЕ/см³, г) в сыром молоке.
3. Показатели САНПиНа для сальмонелл, листерии моноцитогенес и золотистого стафилококка в молоке.
4. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.
5. Особенности БГКП.

8. МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ СЫРОГО МОЛОКА

Федеральный закон РФ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» содержит статью 9. «Понятия процессов производства продуктов переработки молока и требования к процессам, связанным с обязательными требованиями к сырому молоку и продуктам его переработки», в которой приняты следующие понятия и требования, связанные с подготовкой молока:

«1) **очистка сырого молока** – процесс освобождения сырого молока от механических примесей и (или) микроорганизмов. Очистка сырого молока осуществляется изготовителями сырого молока или изготовителями продуктов переработки молока без применения центробежной силы в целях обеспечения соответствия сырого молока требованиям к его чистоте или с применением центробежной силы и специального оборудования в целях обеспечения соответствия сырого молока требованиям к его чистоте и освобождения его от микроорганизмов;

2) **фильтрация** – процесс освобождения сырого молока и продуктов переработки молока от механических примесей. Фильтрация осуществляется без применения центробежной силы;

3) **сепарирование** – процесс разделения сырого молока или продуктов переработки молока на две фракции с пониженным и повышенным содержанием жира;

4) **нормализация** – процесс регулирования содержания и соотношения составных частей молока в сыром молоке или продуктах переработки молока для достижения показателей, установленных стандартами, нормативными документами федеральных органов исполнительной власти, сводами правил и (или) техническими документами. Нормализация осуществляется путем изъятия из продукта или добавления в продукт составных частей молока, молочных продуктов и (или) их отдельных составных частей в целях снижения или повышения значений массовой доли жира, массовой доли белка и (или) массовой доли сухих веществ;

5) **термизация** – процесс термической обработки сырого молока или продуктов переработки молока. Термизация осуществляется при температуре 60-68 °С с выдержкой до 30 секунд, при этом сохраняется активность щелочной фосфатазы молока;

6) **пастеризация** – процесс термической обработки сырого молока или продуктов его переработки. Пастеризация осуществляется при различных режимах (температура, время) при температуре 63-120 °С с выдержкой, обеспечивающей снижение количества любых патогенных микроорганизмов в сыром молоке и продуктах его переработки до уровней, при которых эти микроорганизмы не наносят существенный вред здоровью человека. Низкотемпературная пастеризация осуществляется при температуре не выше 76 °С и сопровождается инаktivацией щелочной фосфатазы. Высокотемпературная пастеризация осуществляется при различных режимах (температура, время) при температуре 77-100 °С и сопровождается инаktivацией как фосфатазы, так и пероксидазы. Контроль эффективности пастеризации осуществляется одним из следующих методов:

а) биохимическим методом (в зависимости от температуры пастеризации проба на фосфатазу или проба на пероксидазу, ферментные пробы) путем испытания проб молока или продуктов его переработки. Отбор таких проб осуществляется из каждого резервуара после его наполнения пастеризованным продуктом;

б) микробиологическим методом путем испытания проб молока или продуктов его переработки на наличие санитарно-индикаторных микроорганизмов. Отбор таких проб осуществляется после охлаждения продуктов, прошедших термическую обработку. Периодичность контроля эффективности пастеризации устанавливается программой производственного контроля;

7) **стерилизация** – процесс термической обработки сырого молока или продуктов его переработки. Стерилизация осуществляется при выше 100 °С с выдержкой, обеспечивающей соответствие готового продукта переработки молока требованиям промышленной стерильности. Контроль эффективности сте-

рилизации осуществляется путем испытания проб молока и продуктов его переработки в целях проверки их соответствия требованиям промышленной стерильности. Периодичность контроля эффективности стерилизации и ультрапастеризации устанавливается программой производственного контроля;

8) **ультрастерилизация** – процесс термической обработки сырого молока и продуктов его переработки. Ультрастерилизация осуществляется в потоке в закрытой системе с выдержкой не менее чем две секунды одним из следующих способов:

а) путем контакта обрабатываемого продукта с нагретой поверхностью при температуре 125-140 °С;

б) путем прямого смешивания стерильного пара с обрабатываемым продуктом при температуре 135-140 °С. Ультрапастеризация с последующим асептическим упаковыванием обеспечивает соответствие продукта требованиям промышленной стерильности. Контроль эффективности ультрапастеризации осуществляется путем испытания проб молока и продуктов его переработки в целях проверки их соответствия требованиям настоящего Федерального закона. Периодичность контроля эффективности ультрапастеризации устанавливается программой производственного контроля;

9) **созревание** – процесс выдержки молока, а также сливок, других продуктов переработки молока или их смесей при определенных режимах. Созревание осуществляется в целях обеспечения достижения характерных для конкретного продукта органолептических, микробиологических, физико-химических или структурно-механических свойств;

10) **охлаждение** – процесс снижения температуры молока и продуктов его переработки до уровня, при котором приостанавливается развитие в них микроорганизмов и окислительных процессов. Охлаждение подвергнутых термической обработке молока и продуктов его переработки (за исключением мороженого, сыров, сырных продуктов, сухих, концентрированных, сгущенных, стерилизованных продуктов переработки молока) осуществляется до температуры не выше +6 °С в течение двух часов. При производстве кисломолочных

продуктов температура молока, сливок или нормализованной смеси исходных продуктов переработки молока после пастеризации должна быть снижена до температуры сквашивания. Не допускается выдерживать пастеризованные молоко, сливки или нормализованную смесь исходных продуктов переработки молока при температуре сквашивания без закваски. Охлаждение смесей для мороженого осуществляется до температуры 3 ± 3 °С в течение не более чем два часа. Продолжительность хранения охлажденных смесей для мороженого не должна превышать:

- а) 48 часов при температуре от 0 до 2 °С;
- б) 36 часов при температуре от 2 до 4 °С;
- в) 24 часа при температуре от 4 до 6 °С.

11) **сублимация** – процесс, применяемый при производстве сублимированных продуктов переработки молока. Сублимация осуществляется путем удаления влаги из замороженного продукта переработки молока с помощью вакуума с последующим досушиванием при температуре не выше 45 °С до достижения значений массовой доли сухих веществ 95% и более».

Контрольные вопросы

- 1. Объясните, для чего нужны очистка, фильтрование, сепарирование и нормализация молока.*
- 2. Термизация молока и её отличие от пастеризации.*
- 3. Стерилизация молока и её разновидности.*

9. ТРЕБОВАНИЯ К БЕЗОПАСНОСТИ СЫРОГО МОЛОКА

В соответствии с «Техническим регламентом» (статья 5 «Требования к безопасности сырого молока и сырых сливок»), к сырому молоку предъявляются следующие требования:

«1. Условия получения от сельскохозяйственных животных молока, перевозки, реализации и утилизации сырого молока и сырых сливок, молочных продуктов непромышленного производства должны соответствовать требованиям законодательства РФ о ветеринарии.

2. Сырое молоко должно быть получено от здоровых с.-х. животных на территории, благополучной в отношении инфекционных и других общих для человека и животных заболеваний.

3. Не допускается использование в пищу сырого молока, полученного в течение первых семи дней после дня отела животных и в течение пяти дней до дня их запуска (перед их отелом) и (или) от больных животных и находящихся на карантине животных.

4. Изготовитель должен обеспечивать безопасность сырого молока в целях отсутствия в нем остаточных количеств ингибирующих, моющих, дезинфицирующих и нейтрализующих веществ, стимуляторов роста животных (в том числе гормональных препаратов), лекарственных средств (в том числе антибиотиков), применяемых в животноводстве в целях откорма, лечения скота и (или) профилактики его заболеваний.

5. Молоко, получаемое от разных видов с.-х. животных, за исключением коровьего молока, должно соответствовать показателям, установленным стандартами, нормативными документами федеральных органов исполнительной власти, сводами правил и (или) техническими документами.

6. Массовая доля сухих обезжиренных веществ в коровьем сыром молоке должна составлять не менее чем 8,2%. Плотность коровьего молока, массовая доля жира в котором составляет 3,5%, должна быть не менее чем 1027 кг/м³ при

температуре 20 °С или не менее чем эквивалентное значение для молока, массовая доля жира в котором другая.

7. Показатели микробиологической безопасности и содержания соматических клеток коровьего сырого молока и сырых сливок не должны превышать установленный в приложении 2 к настоящему ФЗ допустимый уровень (таблица 2).

8. К сырому молоку, используемому для производства пищевых продуктов с определенными потребительскими свойствами (для детского, диетического питания) могут предъявляться дополнительные требования».

Решение об использовании сырого молока и сырых сливок, не соответствующих требованиям безопасности к допустимым уровням содержания потенциально опасных веществ, микроорганизмов и соматических клеток, принимает изготовитель в соответствии с требованиями законодательства РФ о ветеринарии, законодательства РФ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и законодательства в области экологической безопасности.

В соответствии с «Техническим регламентом» (статья 6 «Требования к специальным технологическим процессам при производстве, хранении, перевозке и утилизации сырого молока и сырых сливок») необходимо соблюдать следующие требования:

«1. Сырое молоко после доения сельскохозяйственных животных должно быть очищено и охлаждено до температуры 4 ± 2 °С в течение 2 часов.

2. Допускается хранение сырого молока изготовителем при температуре 4 ± 2 °С не более чем 24 часа с учетом времени перевозки, хранение сырых сливок при температуре не выше чем 8 °С не более чем 36 часов с учетом времени перевозки.

3. Допускается предварительная термическая обработка, включая пастеризацию, сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок изготовителем в случаях:

1) кислотности сырого молока, сырого обезжиренного молока от 19-21 °Т, кислотности сырых сливок до 17-19 °Т;

2) хранения сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок более чем 6 часов;

3) перевозки сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок, продолжительность которой превышает допустимый период их хранения, но не более чем на 25%».

При применении предварительной термической обработки сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок, в том числе пастеризации, режимы термической обработки (температура, период проведения) указываются в сопроводительной документации.

В соответствии с «Техническим регламентом» (статья 17. «Требования к реализации молока и продуктов его переработки»): «Продавцы при реализации сырого молока на с.-х. рынках обязаны предъявить потребителям документы, выданные органом исполнительной власти субъекта РФ, уполномоченным на проведение государственного контроля (надзора) в сфере ветеринарии, и подтверждающие безопасность сырого молока, а также **довести до потребителей информацию о необходимости обязательного кипячения сырого молока**».

«При реализации пастеризованного молока на розничных рынках (включая сельскохозяйственные рынки) путем розлива из транспортной или другой тары продавцы (юридические лица и индивидуальные предприниматели) обязаны предъявлять декларацию о соответствии и довести до потребителей информацию о необходимости обязательного кипячения пастеризованного молока».

10. ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ ЧЕЛОВЕКУ ЧЕРЕЗ МОЛОКО

Через молоко человеку могут передаваться возбудители многих инфекционных заболеваний, если они попали в него от больных животных, больных людей или от бактерионосителей, из окружающей среды во время транспортировки молока или его переработки.

В молоке микроорганизмы способны не только долго сохраняться, но и активно размножаться. Стафилококки, развиваясь, синтезируют экзотоксин, который вызывает тяжелое пищевое отравление у человека.

Инфекционные заболевания, общие для животных и человека, носят название зооантропонозов. К зооантропонозам относится около 100 заболеваний различной этиологии, но для молока, через которое могут передаваться возбудители, особенно актуальны туберкулёз, бруцеллёз, сальмонеллёз, ящур, лихорадка Ку.

Характеристика заболеваний

Туберкулёз – хроническое заболевание, возбудителями которого могут быть различные виды микобактерий. Наиболее патогенной для человека является *Mycobacterium tuberculosis*, для крупного рогатого скота – *M. bovis*, но этот вид может вызывать заболевание и у человека. Микроорганизмы выделяются от больного животного вместе с молоком. Молоко при туберкулезе вымени изменяет цвет – оно становится зеленовато-желтым, с хлопьями. Особенности состава туберкулезной палочки (наличие большого количества жиров и воска в наружной микрокапсуле) обеспечивают бактериям длительную сохранность в окружающей среде, а также устойчивость к воздействию спиртов и кислот. В высушенном состоянии микобактерии сохраняются 2-7 мес., в молоке до 10 дней, а в сливочном масле на холоде – до 300 дней, в сырах – до 200 дней. Обычные химические дезинфицирующие средства против туберкулезных бактерий малоэффективны. Микобактерии погибают при температуре 63 °С в течение 6 мин, при температуре 85 °С через 30 мин. Молоко от больных живот-

ных подвергают кипячению и используют животным при откорме в этом хозяйстве.

Бруцеллёз – хроническое инфекционно-аллергическое заболевание, вызываемое микроорганизмами рода *Brucella*. Возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота – *Brucella abortus* – передается человеку при непосредственном контакте с животным. Попад в молоко, бруцеллы длительно сохраняются в нем: в охлажденном молоке – до 8 дней, в замороженном – до 60, в сквашенном – до 4, в сливках – до 10, в масле – 40-60, в сырах – до 40 дней. Бруцеллы чувствительны к высокой температуре: при температуре 65 °С они погибают через 15 мин, при 70 °С – через 5 мин. Молоко от больных животных пастеризуют при 70 °С в течение 30 мин.

Сальмонеллёзы – общее название острых желудочно-кишечных заболеваний, вызываемых сальмонеллезными (паратифозными) бактериями рода *Salmonella*, которые вместе с молоком могут попадать в организм человека. Сальмонеллезом болеют телята, а взрослые животные могут длительно оставаться бактерионосителями и бактериовыделителями. Источники загрязнения молока сальмонеллами – больные животные, корма, вода, а также обслуживающий персонал (люди, переболевшие сальмонеллезом, могут оставаться долгое время бактерионосителями). Сальмонеллы длительно сохраняются во внешней среде (в пыли, навозе) – до 3 мес. Под действием дезинфицирующих средств (20%-я взвесь гашеной извести, 3%-й раствор гидроксида натрия и др.) сальмонеллы погибают быстро. Кипячение мгновенно убивает микроорганизмы.

Мастит (воспаление вымени) может быть вызван микроорганизмами, которые проникли в молочную железу. Более 90% инфекционных маститов вызывают стафилококки (*Staphylococcus aureus*) и стрептококки (*Streptococcus agalactiae*). Энтеротоксигенные стафилококки могут быть причиной тяжелых отравлений людей, особенно детей, поскольку стафилококковый энтеротоксин не разрушается при пастеризации. Маститы могут быть вызваны и другими микроорганизмами – *E. coli*, бациллами разных видов, что является следствием

неправильного содержания и доения коров, приводящего к повреждению вымени.

Больные маститом коровы служат источником соматических клеток и микрофлоры в молоке, а также ингибирующих веществ в виде остаточных количеств химиотерапевтических препаратов, применяемых для лечения, что ведет к нарушению технологии приготовления сыров, молочнокислой продукции, низкое качество которых негативно сказывается на состоянии здоровья человека. При развитии мастита у коров снижаются не только надой молока, но и меняется его качество. Реакция молока становится щелочной, в нем уменьшается количество казеина, лактозы, жира, появляются хлопья и сгустки, увеличивается количество лейкоцитов. При микроскопии молока можно обнаружить гроздья стафилококков или длинные цепочки стрептококков.

Молоко маститных коров вызывает у человека тяжелые пищевые отравления, поэтому употреблять его нельзя. Для лечения маститов применяют антибиотики, которые затем выделяются с молоком, поэтому в течение нескольких дней такое молоко нельзя использовать для получения молочных продуктов.

Ящур – тяжелое, острое, сильно контагиозное вирусное заболевание копытных животных, передающееся человеку при контакте с больными животными и полученными от них продуктами. Возбудитель ящура – один из самых мелких вирусов. Возбудителем ящура является РНК-содержащий вирус *Picornavirus* из рода *Aphthovirus*. Его размеры составляют 30 нм. Встречается семь типов и множество вариантов этих типов вируса, различающихся географической зоной распространения и относительной избирательностью видов животных.

Вирус ящура отличается очень высокой способностью к поражению и весьма устойчив во внешней среде. В шерсти животных он сохраняется до 4 недель, на одежде – до 3,5 месяца. Вирус ящура в свежем молоке сохраняется до 12 ч, в охлажденном – до 2 недель, в молоке при комнатной температуре – 25-30 ч, в холодильнике (4 °C) – до 9-12 дней, в сливках и в несоленом масле – до 4-25 дней, в колбасных изделиях – до 50 дней. При пастеризации молока ви-

рус гибнет через минуту, при кипячении – через 5 мин. Быстро погибает при высокой кислотности среды, под воздействием дезинфицирующих веществ, УФ-облучения. Молоко от больных ящуром животных пастеризуют при температуре 80 °С в течение 5 мин. Обеззараженное молоко перерабатывают в топленое масло или используют в корм животным. Человек в обычных условиях болеет ящуром редко. Первые признаки заболевания – головная боль, тошнота, высокая температура, высыпания на слизистые губы и языка. В группе риска находятся работники животноводства и перерабатывающей промышленности.

Лихорадка Ку. Природно-очаговая инфекция. Название связано с первыми буквами английского слова *Querency* (неясный), т.е. при первых описаниях заболевания возбудитель не был установлен. Впоследствии было выяснено, что возбудителем является риккетсия *Coxiella burnetii*. Основное эпидемиологическое значение имеют млекопитающие – крупный и мелкий рогатый скот, выделяющие риккетсии с испражнениями, мочой, молоком, околоплодными водами. Заражение людей в сельскохозяйственных очагах происходит воздушно-пылевым путем при обработке загрязненных животными шерсти, пуха, меха, щетины, кожи; пищевым путем при употреблении в пищу загрязненного молока и молочных продуктов, через загрязненные руки; при контакте с инфицированными животными во время ухода за ними, их убое и разделке туш.

Coxiella burnetii весьма устойчивы во внешней среде, в том числе к действию различных физических и химических факторов. В высохшей моче инфицированных животных они выживают на протяжении нескольких недель, а в фекалиях сохраняются многие месяцы, в шерсти и не хлорированной воде – от 4 до 16 месяцев. В масле и сыре при температуре +4 °С остаются жизнеспособными более года.

При действии 1%-го раствора фенола они сохраняют жизнеспособность в течение 1 суток, 0,5%-го раствора хлорамина – 4 суток. Однако микроорганизм очень чувствителен к жирорастворителям. Так, 70° спирт убивает их через 1 мин, а 3-5%-й раствор фенола, 3%-й раствор хлорамина, 2%-й раствор хлорной извести – в течение 2-5 мин. Для дезинфекции помещений и предметов ухода за

скотом применяют 2%-е растворы NaOH и формальдегида, 3%-й раствор креолина, раствор хлорной извести с 2%-м содержанием активного хлора [1].

Низкие температуры (от -4 до -70 °C) создают особо благоприятные условия для сохранения *Coxiella burnetii*, а сочетание таких температур с лиофильным высушиванием обеспечивает консервацию их на протяжении многих лет. При этом вирулентные свойства *Coxiella burnetii* либо вовсе не изменяются, либо, снижаясь в процессе хранения, достаточно быстро восстанавливаются при пассировании на лабораторных животных.

В зараженном молоке полная гибель *Coxiella burnetii* происходит только после кипячения его не менее 10 мин.

Контрольные вопросы

1. Назовите заболевания бактериальной природы, передаваемые через молоко.
2. Назовите заболевания вирусной природы, передаваемые через молоко.

11. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ СТУДЕНТАМИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

11.1 Лабораторное занятие №1

Цель работы: определение показателей санитарного состояния молока в соответствии с требованиями «Технического регламента на молоко и молочную продукцию».

Для решения поставленной цели на лабораторном занятии № 1 необходимо выполнить следующие **задачи**:

1. Стерильно взять пробу молока.
2. Дать органолептическую оценку молока.
3. Подготовить молоко для посева, сделав разведение молока.
4. Провести посев для определения КМАФАнМ.
5. Провести посев для определения БГКП.
6. Подписать чашки с посевами, указав разведение молока, фамилию студента, дату.
7. Поставить чашки с посевами в термостат.

Взятие пробы

Взятие пробы осуществляют по ГОСТ 26809.1-2014 «Молоко и молочная продукция. Правила приёмки, методы отбора и подготовка проб к анализу». Расфасованные продукты для анализа должны быть представлены в оригинальной упаковке. Исследуемые пробы описываются по следующей схеме:

1. номер пробы;
2. наименование предприятия-изготовителя;
3. наименование и сорт продукта;
4. дата и час выработки продукта;
5. дата и час отбора пробы;
6. объем необходимых анализов;
7. обозначение нормативно-технической документации, по которой вырабатывался продукт.

Отбор проб для микробиологических анализов проводится в первую очередь.

Методика проведения органолептической оценки молока

Качество молока оценивают по органолептическим показателям, которые включают внешний вид, консистенцию, вкус, запах, цвет молока, и на основании этого устанавливают наличие тех или иных пороков. Отбор проб проводят не ранее чем через 2 ч после выдаивания.

Вкус и запах определяют по ГОСТ 28283-2015. Настоящий стандарт распространяется на сырое и термически обработанное коровье молоко. Оценку вкуса проводят выборочно после кипячения пробы, а оценку запаха – в 10-20 мл молока, подогретого до температуры 35 °С.

Таблица 12 – Оценка органолептических показателей молока в баллах

Запах и вкус	Оценка	Баллы
Чистый, приятный, слегка сладковатый	Отлично	5
Недостаточно выраженный, пустой, без посторонних запахов и привкусов	Хорошо	4
Слабовыраженный нечистый, слабовыраженный кормовой (силоса, корнеплодов и др.), хлевный, липолизный, затхлый, посторонний запах и вкус, слабовыраженный горький, соленый вкус	Удовлетворительно	3
Выраженный нечистый, выраженный кормовой, в т.ч. лука, чеснока, полыни и др. трав, придающих молоку горький вкус и/или специфический запах, выраженный окисленный, хлевный, липолизный, затхлый запах и вкус, соленый вкус	Плохо	2
Горький, прогорклый, плесневелый, гнилостный; запах и вкус нефтепродуктов, лекарственных, моющих, дезинфицирующих средств и др. химикатов	Плохо	1

Определение внешнего вида, цвета и консистенции проводят по ГОСТ 31449-2013.

Цвет молока определяют при дневном свете в цилиндре из бесцветного стекла.

Консистенция молока определяется при переливании пробы молока в цилиндр из бесцветного стекла. Коровье молоко должно быть густой однородной жидкостью без осадка и сгустков. Молоко, полученное от коров, больных маститом, может быть слизистой консистенции и содержать сгустки и хлопья. Сгустки и хлопья могут образовываться в прокисшем молоке, а также при быстром охлаждении жирного молока. Для того чтобы выяснить причину образования хлопьев и сгустков, молоко нагревают до температуры 30-40 °С. При этом хлопья жира, в отличие от маститных, растворяются.

Органолептические показатели сырого молока связаны с его качеством и представлены в табл.12 и 13 (органолептические пороки молока и причины их появления представлены в табл. 8).

Таблица 13 – Органолептические показатели сырого молока по ГОСТ

Наименование показателя	Характеристика
Консистенция	Однородная жидкость без осадка и хлопьев
Вкус и запах	Чистый, без посторонних запахов и привкусов, не свойственных свежему молоку. Допускается слабовыраженный кормовой привкус и запах
Цвет	От белого до светло-кремового

Цвет нормального молока от здоровых коров – белый или слегка желтоватый. Желтоватый оттенок зависит от каротина и липохромов молочного жира. Определяют цвет молока в стеклянном цилиндре при отражающем дневном свете.

При заболевании животных желтухой, пироплазмозом, при поедании ко-
ровами некоторых растений (например, зубровки) цвет молока может быть из-
лишне желтый. Маститы, туберкулез вымени, ряд микроорганизмов, вырабаты-

вающих пигменты, и такие растения, как валовик, хвощ полевой, придают молоку розовый, синеватый, голубой оттенки.

Запах молока приятный, специфичный. Определяют его при переливании из доильного ведра в молокомер или во время открывания сосуда, в котором доставлено молоко.

При неправильном получении и хранении молока оно приобретает посторонние запахи – хлевный, затхлый, аммиачный, рыбный, силосный, нефтепродуктов. Кроме того, запахи могут быть связаны с развитием кишечных палочек или флюоресцирующих палочек (*Pseudomonas fluorescens*), разлагающих азотистые соединения молока с образованием летучих веществ, имеющих разнообразные запахи.

Вкус молока от здоровых коров слегка сладковатый. Определяют вкус так: берут глоток молока, стараясь смочить им всю полость рта до корня языка. Ртом надо захватить побольше воздуха и медленно выдыхать через нос. При исследовании молоко должно иметь комнатную температуру. Слабые привкусы молока лучше выявляются при повышенной температуре. Слишком холодное молоко надо подогреть до температуры примерно 30 °С.

При поедании коровами полыни, лука, полевой горчицы вкус молока будет горьким. Молоко коров, больных маститом, туберкулезом, и стародойное имеет соленый вкус. Прогорклый вкус связан с изменением жира, который вызывают микроорганизмы, обладающие липолитической активностью (*Pseudomonas fluorescens* и др). Горький вкус может быть связан с длительным хранением молока при низких температурах (ниже 10 °С), т.к. происходит пептонизация молока, вызываемая маммококками (*Ent. liquefaciens*) и гнилостными микроорганизмами, разлагающими белки молока до пептонов, имеющих горький вкус.

Некоторые микроорганизмы придают молоку мыльный или щелочной вкус, причиной которого является бактериальное разложение белков и омыление жиров.

Консистенция нормального молока однородная, без наличия слизи, хлопьев белка и не тягучая. Определяют консистенцию при медленном переливании молока из цилиндра или стакана в другие сосуды. Молоко, разбавленное водой или обратом, а также полученное от коров, больных туберкулезом и катаральным воспалением, имеет излишне жидкую, водянистую консистенцию. Ослизнение и тягучесть молока – один из распространенных пороков.

Загрязнение молока некоторыми микроорганизмами придает ему творожистую консистенцию.

Пороки кормового происхождения (вкус лука, чеснока, сурепки и др.) обнаруживаются сразу после выдаивания молока; пороки бактериального происхождения (появление синего, красного оттенка и т.п.) выявляются при хранении.

Использование молока с выраженными пороками в каждом отдельном случае решается зоотехником, ветеринарным врачом и работниками меднадзора.

Органолептические показатели питьевого молока, согласно Техническому регламенту, соответствуют следующим параметрам: по внешнему виду – непрозрачная жидкость, имеет жидкую, однородную нетягучую консистенцию. Вкус – характерный для молока с легким привкусом кипячения. Допускается сладковатый привкус. Цвет белый, допускается с синеватым оттенком для обезжиренного молока, со светло-кремовым оттенком для стерилизованного молока».

Органолептические показатели питьевого молока определяются по ГОСТ 31450-2013 (таблица 14).

Ход работы

1. Молоко хорошо перемешать. Взять пробу молока. В стерильную посуду с ватно-марлевой пробкой отлить 100-200 мл продукта.

2. Определить органолептические показатели молока согласно методике определения, описанной выше.

3. Результаты исследований оформить в виде таблицы, по форме таблице 13.

Таблица 14 – Органолептические показатели питьевого молока

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид	Непрозрачная жидкость. Для жирных и высокожирных продуктов допускается незначительный отстой жира, исчезающий при перемешивании.
Консистенция	Жидкая, однородная не тягучая, слегка вязкая. Без хлопьев белка и сбившихся комочков жира.
Вкус и запах	Характерные для молока, без посторонних привкусов и запахов, с легким привкусом кипячения. Для топленого и стерилизованного молока – выраженный привкус кипячения. Для восстановленного и рекомбинированного допускается сладковатый привкус.
Цвет	Белый, равномерный по всей массе, для топленого и стерилизованного с кремовым оттенком, для обезжиренного – со слегка синеватым оттенком.

Подготовка пробы для определения КМАФАнМ в молоке

Качество молока и сохранность во многом зависят от того, какое количество микроорганизмов в нем содержится.

Чтобы определить содержание микроорганизмов в 1 мл молока, нужно сделать посевы предварительно разведенного молока для уменьшения количества бактерий.

Ход работы

Взять стерильной пипеткой возле пламени спиртовки 1 мл исследуемого молока и внести в пробирку с 9 мл физиологического раствора, получается разведение 1:10. Далее из этой пробирки взять 1 мл суспензии и внести в следующую пробирку с физиологическим раствором, при этом получается разведение молока 1:100 и т.д. (рисунок 1).

Посев для определения КМАФАнМ

Определение КМАФАнМ в молоке проводится из подготовленных заранее разведений.

Ход работы

Из каждого полученного разведения сделать посев на чашки Петри с МПА. Для этого взять стерильной пипеткой по 1 мл из каждого разведения молока, внести его в чашку Петри, распределить равномерно по чашке стерильным шпателем Дригальского и поставить чашки с посевами в термостат на 48 ч при температуре 32 °С.

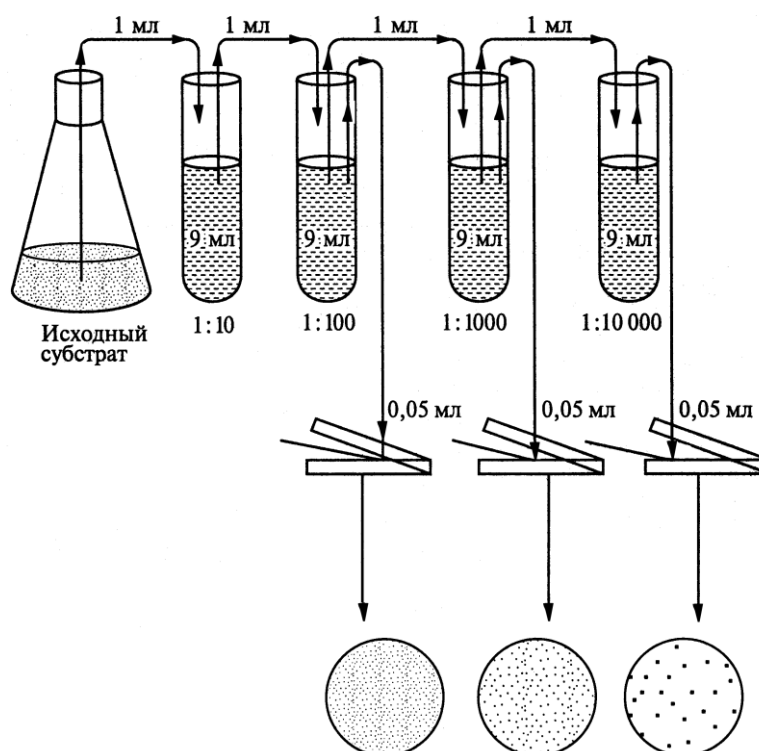


Рисунок 1 - Схема приготовления разведений суспензии микроорганизмов и посева молока (в первой пробирке разведение молока 1:10, во второй 1:100, в третьей 1: 1000, в четвертой 1:10000), в колбе исследуемое молоко

Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) на среде Кесслер

В молочной промышленности БГКП выявляют на среде Кесслера. Метод основан на способности БГКП сбраживать в среде Кесслера лактозу, в результате чего образуются кислота и газ. Среда Кесслера является накопительной, которая способствует развитию БГКП. Состав среды Кесслера приведен в прил.3.

В среду Кесслера производят посев в количествах, указанных в табл. 15.

Ход работы

По 1 мл соответствующих разведений продукта засеять в пробирки с 5 мл среды Кесслера. Посев 10 мл пастеризованного молока произвести в колбочки с 40-50 мл среды Кесслера.

Таблица 15 – Объемы продукта для посева при определении БГКП

Наименование продукта	Засеваемый объем, мл	Количество пробирок со средой, засеваемых из каждого разведения
Молоко и сливки сырые	От 0,1 до 0,00001	1
Молоко и сливки, отобранные после пастеризации	10	1
Молоко и сливки пастеризованные, молоко с наполнителями, кисломолочные продукты и напитки с наполнителями и без наполнителей	1; 0,1	3

Пробирки с посевами поместить в термостат при температуре 37 °С на 18-24 ч.

Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) на среде Эндо

Среда Эндо является избирательной (или селективной) средой для энтеробактерий. Основным её компонентом является лактоза. Лактозоположительные штаммы *E.coli* дают на среде красные колонии, т.к. молочная кислота, образующаяся при сбраживании лактозы, реагирует с сульфатом натрия и фуксин восстанавливает свой цвет до красного. Лактозонегативные штаммы дают бесцветные или слегка розовые колонии. Состав среды Эндо приведен в приложении 3.

Ход работы

Из каждого полученного разведения сделать посев на чашки Петри с питательной средой Эндо. Для этого взять стерильной пипеткой по 1 мл из каждого разведения молока, приготовленного согласно рис 1, внести его в чашку Петри, распределить равномерно по чашке стерильным шпателем Дригальского и поставить чашки с посевами в термостат на 24 ч при температуре 37 °С.

Определение соматических клеток в молоке (ГОСТ 23453-2014)

Метод основан на взаимодействии препарата «Мастоприм» с соматическими клетками, в результате которого изменяется консистенция молока.

Ход работы

В луночку пластинки ПМК-1 внести 1 мл тщательно перемешанного молока и добавить 1 мл водного раствора препарата «Мастоприм». Молоко с препаратом интенсивно перемешать стеклянной палочкой в течение 10 с. Полученную смесь из луночки пластинки при непрерывном интенсивном перемешивании поднять палочкой вверх на 50-70 мм, после чего в течение не более 60 с оценить результаты анализа.

Оценка результатов. Количество соматических клеток в исследуемом молоке установить по консистенции молока.

1. Однородная жидкость или слабый сгусток, который слегка тянется за палочкой в виде нити, – до 500 тыс.

2. Выраженный сгусток, при перемешивании которого хорошо видна выемка на дне луночки пластинки, сгусток не выбрасывается из луночки – от 500 тыс. до 1 млн.

3. Плотный сгусток, который выбрасывается палочкой из луночки пластинки, – свыше 1 млн.

Для более точного определения количества соматических клеток используют вискозиметр.

11.2 Лабораторное занятие №2

Цель работы: учёт микроорганизмов молока

Для решения поставленной цели на лабораторном занятии № 2 необходимо выполнить следующие **задачи**:

1. Провести учет КМАФАнМ.
2. Провести учет БГКП.
3. Сделать вывод о качестве молока.

Ход работы

Учет результатов КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов)

Количество выросших колоний подсчитать на каждой чашке. Общее количество бактерий в 1 мл в единицах вычислить по формуле:

$$X = n \cdot 10^m, \quad (2)$$

где X – КМАФАнМ (КОЕ/мл);

n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принять среднее арифметическое, полученное по всем чашкам. Результаты записать в таблицу 16.

Таблица 16 – Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в молоке и молочных продуктах

Наименование продукта	Норматив, КОЕ/мл	Результаты, КОЕ/мл	Вывод
Молоко сырое	$5 \cdot 10^5$		
Молоко пастеризованное			
в потребительской таре	$1 \cdot 10^5$		
во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$		
Сливки пастеризованные			
в потребительской таре	$1 \cdot 10^5$		
во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$		
Молоко топленое	$2,5 \cdot 10^3$		

Учет результатов БГКП (бактерии группы кишечных палочек)

Просмотреть пробирки с посевами и по наличию в них газообразования определить количество БГКП. При отсутствии газообразования через 18-24 ч продукт считают не загрязненным БГКП.

Если при контроле цельномолочных продуктов (пастеризованного молока и сливок, кисломолочных напитков) БГКП обнаружены в объеме менее 0,3 мл (т.е. газообразование обнаружено в 5-6 пробирках), то провести дальнейшую идентификацию.

Для идентификации из пробирок, в которых наблюдается брожение, провести посев на среду Эндо. Чашки с посевами поместить крышками вниз в термостат с температурой 37 °С на 18-24 ч. Если газообразование обнаружено в пробирках с большим разведением и отсутствует в пробирках с предыдущим разведением, то на среду Эндо высевают из всех пробирок с предыдущим разведением. При отсутствии на среде Эндо палочек, типичных для БГКП, продукт считают не загрязненным кишечными палочками.

При обнаружении бесцветных колоний на чашках со средой Эндо в условиях работы лабораторий, расположенных на территории молочных предприятий, во избежание пропуска патогенных бактерий семейства кишечных палочек указанные чашки должны передаваться лаборатории СЭС для дальнейшего изучения.

Из изолированных колоний, характерных для БГКП, сделать фиксированные мазки-препараты, окрасить по Граму и рассмотреть под микроскопом.

Грамотрицательные палочки пересеять на среду Козера и среду с глюкозой. Пробирки с посевами поместить в термостат при температуре 37 °С, на среду с глюкозой – при 43 °С на 18-24 ч. Наличие кислоты и газа в среде с глюкозой и отсутствие роста на цитратной среде Козера указывает на присутствие бактерий группы кишечной палочки (цитратотрицательной разновидности). Изменение оливково-зеленого цвета среды Козера на васильковый свидетельствует о том, что обнаруженные БГКП относятся к цитратположительным разновидностям, которые не учитывают.

При определении БГКП в молоке и молочных продуктах пользуются термином коли-титр (наименьшее количество продукта, в котором обнаруживается хотя бы одна клетка кишечной палочки).

Результат определяют по данным таблицы 17 следующим образом:

а) если ни в одной пробирке не обнаружено газообразования, то считают, что коли-титр более 3 мл;

б) если в одной пробирке с 1 мл продукта обнаружены признаки брожения, то считают, что коли-титр 3 мл;

в) если брожение обнаружено более чем в одной пробирке с 1 мл продукта или хотя бы в одной из пробирок с 0,1 мл, то считают, что коли-титр менее 0,3 мл;

г) если брожение обнаружено во всех пробирках от обоих разведений или в трех пробирках одного (любого) разведения и в двух пробирках другого, то считают, что коли-титр 0,3 мл.

Таблица 17 – Коли-титр пастеризованного молока

Вариант	Наличие кишечных палочек в пробирках с количеством засеянного продукта, мл						Коли-титр, мл
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
1	2	3	4	5	6	7	8
а	-	-	-	-	-	-	>3
б	+	-	-	-	-	-	3
в	+	+	+	+	+	-	<0,3
	+	+	-	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	
г	Во всех остальных вариантах						0,3

Результаты испытаний занести в таблице 18. Сравнить полученные результаты с нормативными показателями по СанПиН 2.3.2.1078-01, сделать вывод о качестве исследуемого продукта.

Таблица 18 – БГКП в молоке и молочных продуктах

Наименование продукта	Масса продукта, мл, в которой не допускаются БГКП		Вывод
	норматив	результаты	
1	2	3	4
Молоко сырое			
высший сорт	-		
первый сорт	-		
второй сорт	-		
Молоко пастеризованное			
в потребительской таре	0,01		
во флягах и цистернах	0,01		
Сливки пастеризованные			
в потребительской таре	0,01		
во флягах	0,01		
Молоко топленое	1,0		

11.3 Лабораторное занятие №3

Цель работы: определение бактериальной обсемененности молока косвенными методами

Для решения поставленной цели на лабораторном занятии № 3 необходимо выполнить следующие **задачи**:

1. Провести редуктазную пробу с метиленовым синим.
2. Провести редуктазную пробу с резазурином.
3. Определить титруемую кислотность молока.
4. Сделать соответствующие выводы.

Ход работы

Проведение редуктазной пробы с метиленовым синим

Для выполнения работы в пробирку налить стерильной пипеткой 5 мл молока, добавить одну каплю 1%-го раствора метиловой сини, взболтать и поставить в водяную баню с температурой 38-40 °С, заметить время. Опыт счи-

тают законченным в момент полного обесцвечивания метиловой сини (наличие синего кольца в верхней части пробирки не принимают во внимание).

Качество молока оценить, исходя из времени обесцвечивания, по таблице 19.

Таблица 19 – Определение качества молока по времени его обесцвечивания (редуктазная проба с метиленовым синим)

Сорт молока	Время обесцвечивания, ч	Примерное количество бактерий, млн
Высший	Более 5 ч	0,5
Первый	От 5 до 2 ч	0,5 - 4
Второй	2 ч и менее	4 - 20
Несортное	20 мин	20

Проведение редуктазной пробы с резазурином

Резазуриновая проба служит для косвенного определения количества бактерий в молоке:

1. В стерильную пробирку отмерить пипеткой 1 мл рабочего раствора резазурина и 10 мл молока.

2. Закрывать пробирку резиновой стерильной пробкой, медленно переворачивая 3 раза пробирку, размешать её содержимое и поставить в водяную баню при температуре 38-40 °С. Уровень воды в редуктазнике после погружения пробирки должен быть несколько выше уровня жидкости в пробирке. Предхранять пробирки от прямых солнечных лучей.

3. Время погружения пробирки в водяную баню считать началом анализа. Через 20 мин и через 1 ч, не встряхивая и не переворачивая пробирку, осмотреть изменения окраски.

4. Пользуясь таблице 20, определить качество молока и установить его класс. Появление окрашивания молока при удалении пробирки из водяной бани и при встряхивании не учитывают.

Таблица 20 – Определение качества молока по времени его обесцвечивания (редуктазная проба с применением резазурина)

Продолжительность изменения цвета	Окраска молока	Количество бактерий в 1 мл молока	Класс	Качество молока
Через 1 ч	Сине-стальная	Менее 500 тыс	I	Хорошее
Через 1 ч	Сиреневая или сине-фиолетовая	От 500 тыс до 4 млн	II	Удовлетворительное
Через 1 ч	Розовая или белая	От 4 до 20 млн	III	Плохое
До 20 мин	Белая	Свыше 20 млн	IV	Очень плохое

Определение титруемой кислотности молока (ГОСТ Р 54669-2011)

Определение титруемой кислотности молока не относится непосредственно к микробиологическим исследованиям, но является показателем качества сырого молока.

Метод основан на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, раствором гидроокиси натрия в присутствии индикатора фенолфталеина. Определять кислотность необходимо для установления сорта молока, а также для пастеризации и определения пригодности молока к переработке его на молочные продукты. Кислотность молока определяют титрованием его щелочью до стойкого изменения цвета индикатора, свидетельствующего о том, что титрование проведено правильно.

Титруемая кислотность свежего молока (16-18 °Т) обуславливается кислотным характером казеина, наличием в нем фосфорно-кислых, лимонно-кислых солей и растворенной углекислоты. Спустя некоторое время после доеяния, по мере развития микроорганизмов, сбраживающих молочный сахар, в молоке накапливается молочная кислота, повышающая титруемую кислотность. По кислотности молока судят о его свежести. Кислотность молока выражается в условных градусах или градусах Тернера, обозначаемых °Т.

Один градус Тернера (°Т) соответствует содержанию в продукте 9 мг молочной кислоты. Кислотность парного молока соответствует 16-18 °Т

(высший сорт), молока первого сорта – 16-18 °Т. Молоко второго сорта имеет кислотность 16-20 °Т. рН нормального свежего молока составляет 6,47-6,67.

Методика определения титруемой

кислотности молока

В колбу ёмкостью 100 мл отмерить пипеткой 10 мл исследуемого молока и 20 мл дистиллированной воды. Воду прибавляют для того, чтобы отчетливее уловить розовый оттенок при титровании. В смесь добавить 3 капли 1%-го спиртового раствора фенолфталеина и размешать.

1. Из бюретки (отметив уровень щелочи) по каплям прибавить в колбу при постоянном помешивании 0,1н. раствор едкого натра (или калия) до появления слабо-розового окрашивания, соответствующего контрольному эталону окраски, не исчезающего в течение минуты.

2. Отсчитать количество миллилитров щелочи, пошедшей на титрование 10 мл молока.

3. Для выражения кислотности молока в условных градусах количество миллилитров щелочи, израсходованной на титрование 10 мл молока, умножить на 10, т.е. сделать перерасчет на 100 мл молока. Расхождение между параллельными определениями должно быть не более 1 °Т.

Иногда кислотность выражают в граммах молочной кислоты (устанавливают процент кислотности). Для этого надо количество градусов титрования умножить на 0,009 (количество граммов молочной кислоты, эквивалентное 1 мл 0,1 н. щелочи).

В отдельных случаях для титрования берут 5, 10, 20 мл молока, однако расчет всегда ведут на 100 частей молока.

При отсутствии дистиллированной воды можно вести определение и без неё. При этом результаты должны быть понижены на 2 °Т, так как в неразбавленном водой молоке труднее уловить розовый оттенок и, кроме того, при разбавлении молока водой снижается кислотность вследствие частичного гидролиза солей молока.

Сделать выводы по результатам исследования молока на лабораторных занятиях, записать их в рабочую тетрадь и обсудить результаты с преподавателем.

Контрольные вопросы

- 1. Органолептические показатели молока.*
- 2. Подготовка молока к посеву.*
- 3. Прямые методы определения бактериальной обсемененности молока.*
- 4. Косвенные методы определения бактериальной обсемененности молока.*
- 5. Что такое редуктаза и какими методами она определяется?*

Библиографический список

1. *Еремина И.А.* Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. пособие. – Кемерово: КемТИПП, 2004. – 80 с.
2. *Жарикова Г.Г.* Микробиология, санитария и гигиена пищевых продуктов: практикум / Г.Г. Жарикова, А.О. Козьмина. – Москва: ГЕЛАМН, 2001. – 256 с.
3. *Королева Н.С.* Санитарная микробиология молока и молочных продуктов / Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – Москва: Пищевая промышленность. – 1980. – 255 с.
4. *Королева Н.С.* Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. – Москва: Легкая и пищевая промышленность. – 1984. – 168 с.
5. *Кугенев П.В.* Практикум по молочному делу / П.В. Кугенев, Н.В. Барабанщиков. – Москва: Колос, 1978. – 240 с.
6. *Медико-биологические требования* и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов. – Москва: Изд-во стандартов, 1996.
7. *Микробиологические основы* молочного производства: справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина; под ред. канд. техн. наук Я.И. Костина. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
8. *Микробиология, санитария и гигиена: учебник для вузов* / К.А. Мудрецова-Висс, А.А Кудряшова, В.П. Дедюхина. – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. – 321 с.
9. *Микробиология* продуктов животного происхождения: Пер. с нем. / Г.-Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 592 с.
10. *Моисеева Е.Л.* Микробиология мясных и молочных продуктов при холодильном хранении. – М.: Агропромиздат, 1988. – 223 с.
11. *Санитарная микробиология* / Н.В. Билетова, Р.П. Корнелаева и др.; под ред. С.Я. Любашенко. – Москва: Пищевая промышленность. – 1980. – 352 с.

12. *СанПиН 1.3.2322-08* Санитарно-эпидемиологические правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

13. *Степаненко П.П.* Микробиология молока и молочных продуктов. – Москва: Колос, 1996. – 271 с.

14. *Степаненко П.П.* Микробиология молока и молочных продуктов: учебник для вузов. – Москва, 2003. – 415 с.

15. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 033/2013).

16. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 О безопасности пищевой продукции.

17. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 Пищевая продукция в части ее маркировки.

18. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30.03.1999 г. № 52-ФЗ (последняя редакция).

19. Федеральный закон "О качестве и безопасности пищевых продуктов" от 02.01.2000 г. № 29-ФЗ (последняя редакция).

20. ГОСТ Р 54669-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности.

21. ГОСТ 32254-2013 Инструментальный экспресс-метод определения антибиотиков.

22. ГОСТ 34049-2017 Молоко и кисломолочные продукты. Определение содержания афлатоксина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием.

23. ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа.

24. ГОСТ Р 52415-2005 Молоко натуральное коровье – сырье. Люминесцентный метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

25. ГОСТ 31747-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

26. ГОСТ 30347-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*.

27. ГОСТ ISO 6785-2015 Молоко и молочная продукция. Обнаружение *Salmonella* spp.

28. ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.

29. ГОСТ 32012-2012 Молоко и молочная продукция. Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных микроорганизмов.

30. ГОСТ 33566-2015 Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов.

31. ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приёмки, методы отбора и подготовка проб к анализу.

32. ГОСТ 28283-2015 Молоко коровье. Метод органолептической оценки запаха и вкуса.

33. ГОСТ 31449-2013 Молоко коровье сырое. Технические условия.

34. ГОСТ 31450-2013 Молоко питьевое. Технические условия.

35. ГОСТ 23453-2014 Молоко сырое. Методы определения соматических клеток.

36. ГОСТ Р 54669-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности.

Средний химический состав молока коровьего

Вода – 87,4%.

Сухие вещества – 12,6%.

Молочный жир – 3,5%.

Сухой обезжиренный молочный остаток – 9,0%.

Белки – 3,2%.

Казеин – 2,6 %.

Сывороточные белки – 0,6%.

Молочный сахар лактоза – 4,7÷4,9%.

Минеральные вещества – 0,8%.

Небелковые азотистые соединения – 0,02÷0,08%.

Витамины, пигменты, ферменты, гормоны – микроколичества.

Газы – 5÷7 см³ на 100 см³ молока.

Углекислый газ – 50÷70%.

Азот – 2 ÷30%.

Кислород – 5÷10%.

Аммиак – следы.

Минеральные вещества молока

Исследование минерального состава золы молока с применением полярографии, ионометрии, атомно-адсорбционной спектроскопии и других современных методов показало наличие в нём более 50 элементов. Они подразделяются на макро- и микроэлементы.

Макроэлементы

Основными минеральными веществами молока являются макроэлементы: кальций, магний, калий, натрий, фосфор, хлор и сера, а также соли – фосфаты, цитраты и хлориды.

Кальций (Са) является наиболее важным макроэлементом молока. Он содержится в легко усваиваемой форме и хорошо сбалансирован с фосфором. Содержание кальция в коровьем молоке колеблется от 100 до 140 мг%. Его количество зависит от рационов кормления, породы животного, стадии лактации и времени года. Летом содержание Са ниже, чем зимой.

Кальций присутствует в молоке в трех формах:

- в виде свободного или ионизированного кальция – 11 % от всего кальция ($8,4 \div 11,6$ мг%);
- в виде фосфатов и цитратов кальция – около 66%;
- кальция, прочно связанного с казеином – около 23%.

До сих пор не выяснено, в какой форме находятся в молоке фосфаты и цитраты Са. Это могут быть фосфат Са, гидрофосфат Са, дигидроксофосфат Са и более сложные соединения. Однако известно, что большая часть этих солей находится в коллоидном состоянии и небольшая (20-30%) – в виде истинных растворов.

Фосфор (Р). Содержание фосфора колеблется от 74 до 130 м%. Оно мало меняется в течение года, лишь незначительно снижается весной, а больше зависит от рационов кормления, породы животного и стадии лактации. Фосфор содержится в молоке в минеральной и органической формах. Неорганические соединения представлены фосфатами кальция и других металлов, их содержание составляет около $45 \div 100$ мг%. Органические соединения – это фосфор в составе казеина, фосфолипидов, фосфорных эфиров углеводов, ряда ферментов, нуклеиновых кислот.

Магний (Mg). Количество магния в молоке незначительно и составляет $12 \div 14$ мг%. Магний является необходимым компонентом животного организма – он играет важную роль в развитии иммунитета новорождённого, увеличивает его устойчивость к кишечным заболеваниям, улучшает их рост и развитие, а также необходим для нормальной жизнедеятельности микрофлоры рубца, положительно влияет на продуктивность взрослых животных. Магний, вероятно, встречается в молоке в тех же химических соединениях, что и Са. Состав солей

Mg аналогичен составу солей Ca, но на долю солей, находящихся в истинном растворе, приходится 65÷75% Mg.

Калий (K) и натрий (Na). Содержание K в молоке колеблется от 135 до 170 мг%, Na – от 30 до 77 мг%. Их количество зависит от физиологического состояния животных и незначительно изменяется в течение года – к концу года повышается содержание натрия и понижается – калия.

Соли калия и натрия содержатся в молоке в ионно-молекулярном состоянии в виде хорошо диссоциирующих хлоридов, фосфатов и цитратов. Они имеют большое физиологическое значение. Хлориды натрия и калия обеспечивают определённую величину осмотического давления крови и молока, что необходимо для нормальных процессов жизнедеятельности. Фосфаты и карбонаты калия и натрия входят в состав буферных систем молока, поддерживающих постоянство концентрации водородных ионов в узких пределах. Кроме того, фосфаты и цитраты калия и натрия создают в молоке условия для растворения плохо растворимых в чистой воде солей кальция и магния. Таким образом, они обеспечивают солевое равновесие, т.е. определённое соотношение между ионами кальция и анионами фосфорной и лимонной кислот, способствующих растворению. От него зависит количество ионизированного кальция, который, в свою очередь, влияет на дисперсность мицелл казеина и их тепловую стабильность.

Содержание хлора (Cl) (хлоридов) в молоке колеблется от 90 до 120 мг%. Резкое повышение концентрации хлоридов (на 25-30%) наблюдается при заболевании животных маститом.

Микроэлементы

Микроэлементами принято считать минеральные вещества, концентрация которых невелика и измеряется в микрограммах на 1 кг продукта. К ним относятся железо, медь, цинк, марганец, кобальт, йод, молибден, фтор, алюминий, кремний, селен, олово, хром, свинец и др.

В молоке микроэлементы связаны с оболочками жировых шариков (Fe, Cu), казеином и сывороточными белками (I, Se, Zn, Al), входят в состав фер-

ментов (Fe, Mo, Mn, Zn, Se), витаминов (Co). Их количество в молоке значительно колеблется в зависимости от состава кормов, почвы, воды, состояния здоровья животного, а также условий обработки и хранения молока.

Микроэлементы обеспечивают построение и активность жизненно важных ферментов, витаминов, гормонов, без которых невозможно превращение поступающих в организм животного (человека) пищевых веществ. Также от поступления многих микроэлементов зависит жизнедеятельность микроорганизмов рубца жвачных животных, участвующих в переваривании корма и синтезе многих важных соединений (витаминов, аминокислот).

Селен (Se). Дефицит селена вызывает у животных и у человека замедленный рост, сосудистую патологию, дегенеративные изменения поджелудочной железы и репродуктивных органов. Выяснено, что селен является важнейшим антиоксидантом – он входит в состав фермента глутатионпероксидазы, который препятствует пероксидному окислению липидов в клеточных мембранах и подавляет свободные радикалы.

Йод (I). Дефицит йода в среде вызывает гипофункцию щитовидной железы у животных, что отрицательно отражается на качестве молока. Ежедневное введение в рацион коров йодида калия, муки из морских водорослей улучшает функцию щитовидной железы и увеличивает содержание йода в молоке.

Цинк (Zn). Дефицит цинка может вызвать замедление роста и полового созревания у животных, нарушение процессов пищеварения.

Многие микроэлементы могут попадать в молоко дополнительно после дойки с оборудования, из тары и воды. Количество внесённых микроэлементов может в несколько раз превышать количество натуральных. В результате появляются посторонние привкусы, понижается устойчивость при хранении, кроме того, происходит загрязнение молока токсичными элементами и радионуклидами, что представляет угрозу для здоровья человека.

**Сравнительный состав женского, коровьего
и козьего молока, г/л**

Вид молока	Белки	Жиры	Углеводы	Калорийность, ккал
Женское	14	35	75	690
Коровье	33	35	47	660
Козье	41	44	44	800

**Содержание аминокислот в женском и
коровьем молоке, % к белку**

Аминокислота	Женское молоко	Коровье молоко
Валин	8,19	6,6
Лейцин	10,58	9,6
Изолейцин	6,35	5,5
Треонин	5,76	4,3
Фенилаланин	5,05	5,2
Лизин	10,95	7,8
Метионин	2,85	2,5
Триптофан	2,29	1,4
Гистидин	3,2	1,9

**Содержание витаминов в женском и
коровьем молоке, мг %**

Витамин	Женское молоко	Коровье молоко
А	0,037	0,082
D	0,00012	0,0002
Е	0,63	0,180
В ₁	0,015	0,041
В ₂	0,038	0,144
В ₆	0,022	0,044
В ₁₂	0,000045	0,0034
РР	0,279	0,1
С	4,24	1,54
Биотин	0,001	0,0022
Пантотеновая кислота	0,154	0,233

**Сравнительная характеристика женского, коровьего молока и
молочных смесей, адаптированных заменителей грудного
молока, в расчете на 100 мл**

Показатели	Зрелое женское молоко	Коровье молоко	Адаптированная смесь (обновлен.)
Белок, г	0,9-1,3	3,3-3,5	1,5-1,9
Сывороточный протеин/казеин, %	80/20 или 60/40	18/82	60/40
Жир, г	3,9-4,5	3,2-3,5	3,0-3,8
Линолевая кислота, % от количества жира	13,6	3,8	15- 16
Углеводы, г	7,0	4,5-4,8	6,9-8,0
Энергетическая ценность, ккал	65	65	67-70
Осмослярность, мосм/л	260-270	400-420	250-280*

П р и м е ч а н и е:

**Адаптированные молочные смеси для детей с малой массой тела при рождении (меньше 2,5 кг) имеют меньшую осмослярность – в пределах 230-250 мосм/л (миллиосмоль на литр).*

**Содержание минеральных веществ в женском и
коровьем молоке, мг/л**

Минеральные вещества	Женское молоко	Коровье молоко
Калий	55,0	140,0
Кальций	34,0	130,0
Магний	4,0	—
Натрий	19,3	60,0
Фосфор	16,6	40,0
Сера	15,0	—
Хлор	40,0	100,0
Железо	0,16	—
Медь	0,04	0,007
Марганец	0,0007	—
Цинк	0,12	—

Приготовление питательной среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) по ГОСТ Р 53430-2009

В колбу достаточной вместимости помещают навеску сухой питательной среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Масса навески среды – от 40 до 50 г (определяется инструкцией производителя). Навеску среды растворяют в 1000 см³ воды. Допускается использование дистиллированной воды.

Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения среды. При наличии осадка фильтруют и устанавливают значение рН 7,0±0,2. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 15 ±1 мин.

Питательные среды для определения БГКП по ГОСТ Р 53430-2009

Среда Кесслер

Среда Кесслера предназначена для обнаружения бактерий группы кишечной палочки по признаку ферментации лактозы при санитарном обследовании пищевых продуктов (молоко, вода) и объектов внешней среды.

Состав среды, г/л

Пептон	7,0
Панкреатический гидролизат рыбной муки	3,0
Лактоза	10,0
Желчь очищенная сухая	3,0
Кристаллический фиолетовый	0,04
Натрий карбонат	0,02±0,05
рН готовой среды	7,5±0,2

Приготовление жидкой питательной среды Кесслера. В колбу достаточной вместимости помещают навеску 16,0±0,1 г сухой питательной среды Кесслера, добавляют небольшое количество воды и перемешивают. Объем раствора

доводят водой до 1000 см³. Допускается использование дистиллированной воды.

Смесь кипятят, постоянно перемешивая, до полного растворения. При наличии нерастворимого при кипячении осадка среду фильтруют и устанавливают значение pH 7,4±0,2. Среду разливают в пробирки с поплавками по 5 см³ или колбы с поплавками по 40-50 см³ и стерилизуют при температуре 121±1 °С в течение 11±1 мин.

Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый или темно-синий цвет, и поплавки должны быть полностью заполнены средой.

Среда АЖФК (агар желчный фиолетово-красный)

Приготовление твердой питательной среды АЖФК (агар желчный фиолетово-красный). В 1 дм³ дистиллированной воды вносят 35,0±0,1 г сухой среды тщательно перемешивают, затем нагревают и кипятят при помешивании 5 мин. Среду готовят непосредственно перед посевом.

Готовая среда должна иметь фиолетово-красный цвет.

Допускается хранение в течение 7 сут при температуре 4±2 °С приготовленной и разлитой в пробирки среды, прокипяченной на водяной бане или пастеризованной текучим паром в автоклаве 30,0 ±0,5 мин.

Среда Эндо

Среда Эндо – дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий. Названа по имени предложившего её японского бактериолога Шигеру Эндо (1869-1937). Обладает слабыми селективными свойствами, компоненты среды подавляют рост грамположительных бактерий.

Состав среды, г/л

Пептон ферментативный	10,0
Гидролизат казеина неглубокой степени расщепления ферментативный сухой	10,0
Дрожжевой экстракт	1,0
Натрия хлорид	3,4

Натрия сульфит	0,8
Натрия гидроортофосфат	0,75
Лактоза	10,0
Фуксин основной	0,2
Агар микробиологический	10,5±2,5
pH	7,3±0,2

Приготовление среды Эндо. Сухой порошок в количестве 35,5 г размешать в 1 л дистиллированной воды, нагреть до кипения и кипятить 3 мин до полного расплавления агара. Горячую среду профильтровать через ватно-марлевый фильтр и снова довести до кипения. Среду охладить до температуры 45-50 °С и разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-5 мм. После застывания среду подсушить в термостате при температуре 37±1 °С в течение 40-60 мин. Готовая среда прозрачная или слегка опалесцирующая бледно-розового цвета.

Среду необходимо использовать в день приготовления. Хранить до посева в темноте.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. Технический регламент на молоко и молочную продукцию.....	6
1.1 Основные понятия, используемые в ТР ТС 033/2013.....	6
1.2 Требования к безопасности сырого молока, сырого обезжиренного молока, сырых сливок.....	8
2. Микробиология сырого молока.....	14
2.1 Основные представители нормальной микрофлоры сырого молока....	15
2.2 Постсекреторное обсеменение молока.....	16
Постсекреторное обсеменение молока из окружающей среды и обо- рудования.....	16
Постсекреторное обсеменение молока персоналом.....	18
2.3 Основные представители посторонней микрофлоры.....	19
Факультативно-анаэробные микроорганизмы.....	19
Аэробные спорообразующие микроорганизмы.....	20
Аэробные неспорообразующие палочки.....	21
Анаэробные спорообразующие микроорганизмы (клостридии)	21
Дрожжи и плесени.....	22
3. Динамика развития микроорганизмов молока.....	24
4. Методы анализа сырого молока.....	28
4.1 Методы определения уровня бактериальной обсеменённости сырого молока – редуктазная проба.....	28
4.2 Сычужно-бродильная проба.....	30
5. Показатели микробиологической безопасности молока.....	32
5.1 Санитарно-показательные микроорганизмы.....	33
Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ).....	36
Метод определения бактерий группы кишечных палочек (БГКП).....	38
5.2 Условно-патогенные микроорганизмы.....	44
5.2.1 Кишечная палочка.....	44
5.2.2 Золотистый стафилококк.....	44
5.3 Патогенные микроорганизмы.....	47
5.3.1 Определение сальмонеллы.....	47
5.3.2 Определение листерии.....	48
6. Микроорганизмы, вызывающие пороки молока.....	50
7. Методы определения технически вредных микроорганизмов (микроор- ганизмов порчи) молока и продуктов переработки молока для внутриза- водского контроля.....	54
7.1 Метод определения общего количества психротрофных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.....	54
7.2 Метод определения общего количества термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.....	55
7.3 Метод определения спор аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.....	56

7.4 Метод определения спор мезофильных анаэробных бактерий.....	57
7.5 Метод определения дрожжей и плесневых грибов.....	59
8. Методы обработки сырого молока.....	62
9. Требования к безопасности сырого молока.....	66
10. Возбудители инфекционных заболеваний, передаваемые человеку че- рез молоко.....	69
11. Методика выполнения студентами лабораторных работ.....	74
Лабораторное занятие №1	74
Лабораторное занятие №2	82
Лабораторное занятие №3	86
Библиографический список	90
Приложения	93

Литвина Лидия Алексеевна,
Горских Валерий Гаррьевич,
Анфилофьева Ирина Юрьевна

Микробиология молока

Учебно-методическое пособие

Печатается в авторской редакции
Оператор электронной верстки Н.Е. Карачева

Подписано в печать _____ г.
Формат 60×84 1 /16. Объем ____ уч.-изд. л., 6,6 усл. печ. л.
Тираж ____ экз. Изд. № ____ . Заказ № ____ .

Отпечатано в Издательском центре «Золотой колос»
630039, РФ, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, офис 106
Тел. факс (383) 267-09-10. E-mail: 2134539@mail.ru