

УДК 619:614.31:637.12

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА КОРОВЬЕГО МОЛОКА С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ

***Пульчеровская Л.П., кандидат биологических наук, доцент,
pulcherovskaya.lidia@yandex.ru
Ковалева Е.Н., кандидат биологических наук, доцент,
new2706@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ***

***Ключевые слова:** молоко коровье, ветеринарно-санитарная экспертиза, органолептические исследования, физико-химические исследования, бактериологический посев, колиформные бактерии.*

Работа посвящена исследованию коровьего молока с целью выявления в нем колиформных бактерий.

Молоко и молочные продукты в питании людей имеют большое значение. В нормах питания человека, разработанных институтом питания РАМН, предусматривается потребность в питательных веществах на одну треть удовлетворять за счет молока и молочных продуктов. Каждый житель нашей страны должен в год употребить 350 - 450 кг продуктов молочного происхождения.

Высокая питательная ценность молока позволяет отнести его к категории диетических и терапевтических продуктов. В молоке содержится большое количество веществ, необходимых для роста и развития человеческого организма, в том числе и это очень важно, легко усваиваемые белки, жиры, молочные углеводы, минеральные вещества и витамины. Включение молока и молочных продуктов в пищевые рационы повышает биологическую ценность и улучшает их усваиваемость.

Однако молоко и молочные продукты, в тоже время, являются отличной питательной средой для различных микроорганизмов, в том числе опасных для здоровья человека и животных. В молоке обычно встречаются молочнокислые, колиформные, маслянокислые, пропионовокислые и гнилостные бактерии.

Колиформные бактерии сбраживают лактозу до молочной кислоты и других органических кислот, углекислого газа и этанола. Кроме того, они разрушают белки молока, в результате чего появляется посторонний запах. Некоторые виды бактерий являются причиной мастита у коров. Однако, колиформные бактерии, как правило, погибают при пастеризации молока.

Исходя из выше сказанного, целью наших исследований явилось проведение ветеринарно-санитарной экспертизы цельного коровьего молока с целью выявления колиформных бактерий.

В соответствии с целью нам необходимо было решить следующие задачи: отобрать пробы коровьего молока для выполнения исследований; выделить колиформные бактерии из исследуемых проб молока и дать ветеринарно-санитарную оценку исследуемым пробам молока.

Согласно «Технологического регламента на молоко», утвержденного Федеральным законом №88-ФЗ от 12.06.2008г. 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.

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

Материалом для исследования послужили 2 пробы цельного молока, приобретенного в частном секторе (в пластиковой бутылке и стеклянной банке) и 4 пробы цельного питьевого пастеризованного молока, реализуемого через торговую сеть г. Ульяновска разных производителей.

Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП) позволяет определить соблюдение режима санитарно-гигиенических условий производства молока.

Сущность данного метода заключается в способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу. При этом в среде Кесслера в поплавке образуется газ вследствие расщепления лактозы.

В пробирки, содержащие по 5 см³ свежеприготовленной среды Кесслера сплывком, вносили по 1 см³ испытуемой взвеси (разведения 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) стерильной пипеткой вместимостью 1 см³ с широким концом из 6 проб.

Пробирки со средой Кесслера помещали в термостат с температурой 37 °С на 18-20 ч.

В пробах с 3 по 6 через 24ч роста на среде Кесслера не обнаружено, цвет среды остался без изменений т.е темно-фиолетового цвета (рисунок 1). В пробах 1 и 2 цвет среды изменен и наблюдали газообразование (рисунок 2).



Рисунок 1 - Учет результатов. Пробы 3-6 - результат отрицательный

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты исследований проб на наличие БГКП

Разведение/ пробы	№1	№2	№3	№4	№5	№6
10^{-1}	+	+	-	-	-	-
10^{-2}	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-

Из таблицы видно, что БГКП в анализируемых пробах пастеризованного молока не обнаружено (пробы 3-6), что свидетельствует о соблюдении ветеринарно-санитарных правил при производстве пастеризованного молока и соответствии требованиям нормативно-технической документации. В пробах 1 и 2 (из пластиковой бутылки) обнаружены БГКП в титре 0,1 (изменение цвета среды Кесслера и газообразование в поплавке) (рис.2). Из измененных сред произвели посев на среду Эндо и через 24 часа изучили культуральные и морфологические свойства выросших микроорганизмов. На среде Эндо наблюдали характерный рост лактозоположительных и лактозоотрицательных бактерий характерных для семейства *Enterobacteriaceae*.

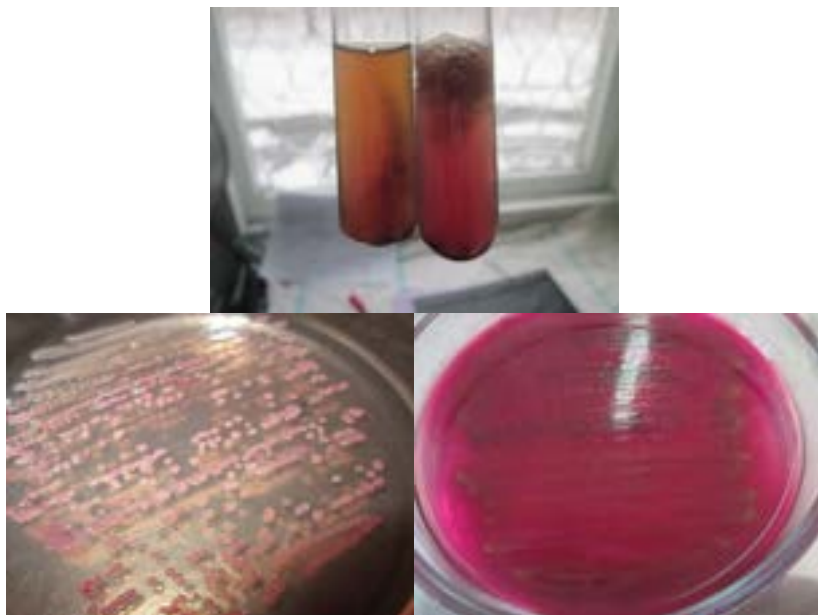
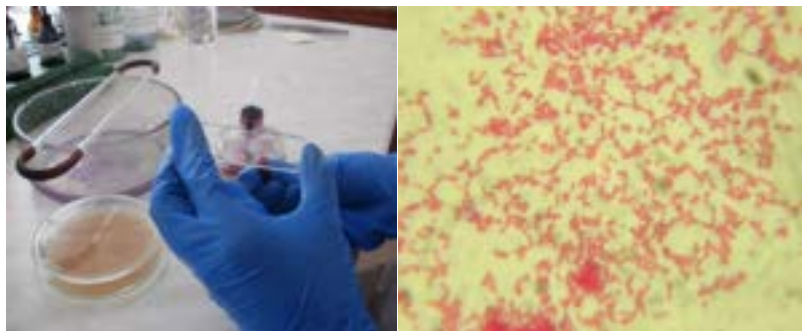


Рисунок 2 - Учет результатов. Рост БГКП на среде Кесслера и агаре Эндо – пробы 1 и 2

Со среды Эндо отвили изолированные колонии в МПБ для получения чистых культур с целью дальнейшего изучения биологических свойств выросших микроорганизмов.

Первичные бульонные культуры, полученные после пересева колоний с вышеназванных сред, микроскопировали (окраска по Граму рисунок 3) с целью изучения морфологии и тинкториальных свойств и получили следующий результат - мелкие грамотрицательные палочки с закруглёнными концами, не образующие спор и капсул, располагающиеся одиночно и попарно, подвергали дальнейшему изучению с целью родовой и видовой идентификации, а также определения патогенных свойств.



а б

Рисунок 3 - Окраска бактерий по методу Грамма:

а- приготовление мазка-препарата; б- морфология исследуемых микроорганизмов

Далее изучали ферментативные свойства выросших микроорганизмов. (рисунок 4)

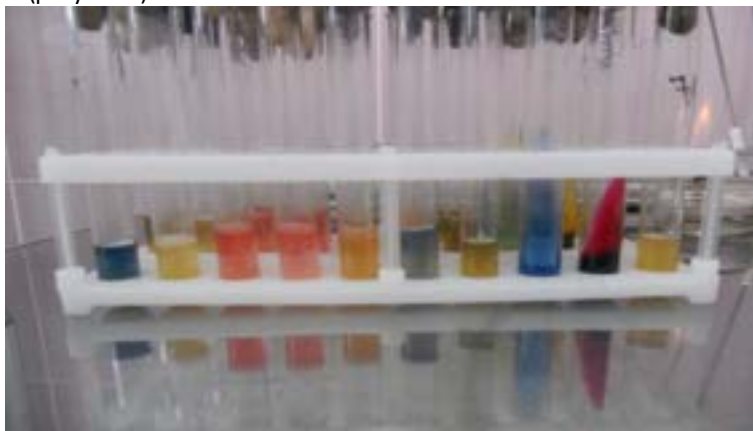


Рисунок 4 - Биохимические свойства выросших бактерий

Типирование проводили согласно таблицы 2. Выделенные микроорганизмы по ферментативным свойствам нами были отнесены к семейству *Enterobacteriaceae* родам *Citrobacter* и *Enterobacter*.

Для определения патогенных свойств выделенные культуры засеивали на кровяной агар и получили рост микроорганизмов не обладающих гемолитическими свойствами. Микроорганизмы не обладали гемолитическими свойствами.

Таблица 2 - Дифференциально-диагностические признаки выделенных микроорганизмов

Тесты	<i>Escherichia</i>	<i>Citrodacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Hafnia</i> (22-24C)
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	(K)
Лактоза	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Сахароза	±	±	+	+	-	±	-	±	±
Маннит	+	+	+	+	+	-	-	±	+
Дульцит	±	±	-	±	±	-	-	-	-
Мальтоза	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Сорбит	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Реакция с метилротом	+	+	-	±	+	+	+	+	-
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	+	±	-	±	-	-	+
Среда Симмонса	-	+	+	+	+	±	-	-	+
Индол	+	±	-	±	-	±	+	+	-
Сероводород	-	±	-	-	+	±	-	±	-

Примечания:

“+” - ферментация сахара с образованием кислоты и газа, рост на среде Симмонса, образование индола и т.д.

“-” - отрицательный результат

“±” - различные показатели

Из таблицы и проведенных исследований видно, что в пробах 1-2 обнаружили БГКП. Выделенные микроорганизмы не обладали патогенными

свойствами были отнесены к родам *Citrobacter* и *Enterobacter*. В пробах пастеризованного молока с 3 по 6 БГКП отсутствовали.

В исследуемых пробах молока, также определяли органолептические и физико-химические показатели.

Экспертиза молока при изучении органолептических показателей включала показатели: внешний вид и консистенция, вкус и запах, цвет.

Цвет молока, налитого в цилиндр из бесцветного стекла, устанавливали при отраженном дневном свете.

Консистенцию определяли при медленном переливании молока тонкой струйкой по стенке цилиндра. В струйке и по оставшемуся после нее следу на стекле легко устанавливали не только консистенцию, но и наличие хлопьев, загрязнений, молозива и т. д.

Запах проверяли в проветренном помещении при комнатной температуре в момент открывания сосуда и при переливании молока. Чтобы лучше улавливался запах, молоко предварительно подогрели до 40 - 50 °С.

Вкус пастеризованного молока определяли, смачивая им поверхность языка.

Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3- Результаты органолептических исследований

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013	Норма по ГОСТ 31450-2013	Результат исследования	Вывод
1	<i>Консистенция.</i> Однородная жидкость без осадка и хлопьев.	<i>Консистенция.</i> Однородная жидкость без осадка и хлопьев.	<i>Консистенция.</i> Однородная жидкость без осадка и хлопьев.	Соответствует
2				Соответствует
3	Замораживанию не допускается.	Замораживанию не допускается.	<i>Вкус и запах.</i> Чистый, без посторонних запахов и привкусов, не свойственных свежему натуральному молоку.	Соответствует
4	<i>Вкус и запах.</i> Чистый, без посторонних запахов и привкусов, не свойственных свежему натуральному молоку.	<i>Вкус и запах.</i> Чистый, без посторонних запахов и привкусов, не свойственных свежему натуральному молоку.	<i>Вкус и запах.</i> чистые, без посторонних запахов привкусов, не свойственны х свежему натуральному у молоку.	Соответствует
5	Допускается слабый кормовой привкус.	Допускается слабый кормовой привкус.	<i>Цвет.</i> От белого до светлого-кремового	Соответствует
6	<i>Цвет.</i> От белого до светлого-кремового	<i>Цвет.</i> От белого до светлого-кремового	<i>Цвет.</i> Белый.	Соответствует

Из таблицы видно, что все исследуемые пробы цельного молока соответствовали требованиям ТР ТС 033/2013 и ГОСТ 31450-2013.

Основными физико-химическими показателями молока являются: массовая доля жира, плотность, кислотность, температура. Молоко по физико-химическим показателям должно соответствовать нормам, указанным в таблице 4.

Таблица 4 - Физико-химические и микробиологические показатели молока

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля жира, %, не менее	2,8
Массовая доля белка, %, не менее	2,8
Кислотность, °Т	От 16,0 до 21,0 включ.
Массовая доля сухих обезжиренных веществ молока (СОМО), %, не менее	8,2
Группа чистоты, не ниже	II
Плотность, кг/м ³ , не менее	1027,0
Температура замерзания, °С, не выше минус	0,520
Содержание соматических клеток в 1 см ³ , не более	4,0·10

Титруемую кислотность исследуемых образцов молока проводили согласно ГОСТ Р 54669-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности».

Таблица 5- Результаты проведенных исследований по определению кислотности в пробах цельного молока

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013	Норма по ГОСТ 31450-	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	16,0-21,0	16,0-21,0	20,0±1	°Т	Соответствует
2	16,0-21,0	16,0-21,0	20,0±1	°Т	Соответствует
3	16,0-21,0	16,0-21,0	20,0±1	°Т	Соответствует
4	16,0-21,0	16,0-21,0	20,0±1	°Т	Соответствует
5	16,0-21,0	16,0-21,0	19,0±1	°Т	Соответствует
6	16,0-21,0	16,0-21,0	16,0±1	°Т	Соответствует

Из таблицы видно, что все исследуемые пробы молока имели показатели кислотности в пределах от 16,0 до 20,0, что соответствует требованиям действующей нормативно-технической документации.

Плотность в исследуемых пробах молока проводили в соответствии с ГОСТ Р 54758-2011 “Молоко и продукты переработки молока. Методы определения плотности”. Определение проводили с помощью ареометра.

Таблица 6 - Результаты определения показателей плотности исследуемых проб молока коровьего

№ пробы	Норма по ТР ТС	Норма по ГОСТ Р	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	1027,0	1027,0	1027,0±0,1	кг/м ³	Соответствует
2	1027,0	1027,0	1027,0±0,1	кг/м ³	Соответствует
3	1027,0	1027,0	1027,0±0,1	кг/м ³	Соответствует
4	1027,0	1027,0	1027,0±0,1	кг/м ³	Соответствует
5	1027,0	1027,0	1028,0±0,1	кг/м ³	Соответствует
6	1027,0	1027,0	1027,0±0,1	кг/м ³	Соответствует

Из таблицы видно, что плотность исследуемых проб молока находилась в пределах от 1027,0 до 1028,0, что соответствует требованиям действующей нормативно-технической документации.

Определение проводили в соответствии с ГОСТ 34454-2018 «Производство молочной. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля». Метод основан на минерализации органического вещества анализируемой пробы продукта концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора с образованием сернокислого аммония, переведении его в аммиак, отгонке последнего в раствор борной кислоты, количественном учете аммиака титриметрическим методом и расчете массовой доли белка в анализируемой пробе.

Таблица 7 - Результаты определения показателей массовой доли белка в исследуемых пробах цельного молока

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013 (не менее)	Норма по ГОСТ 34454-2018 (не менее)	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	2,8	2,8	3,31±0,01	%	Соответствует
2	2,8	2,8	3,31±0,01	%	Соответствует
3	2,8	2,8	3,35±0,01	%	Соответствует
4	2,8	2,8	3,33±0,01	%	Соответствует
5	2,8	2,8	3,31±0,01	%	Соответствует
6	2,8	2,8	3,35±0,01	%	Соответствует

Из таблицы видно, что массовая доля белка исследуемого молока находилась в пределах от 3,31±0,01 до 3,35±0,01%, что соответствует требованиям нормативно-технической документации.

Определение массовой доли жира в молоке основан на выделении жира из молока под действием серной кислоты и изоамилового спирта с последующим центрифугированием и на измерении объема выделившегося жира в градуированной части жиромера (Рис.5).



Рисунок 5 - Определение жира в молоке с помощью жиромера

За результат измерений принимали среднее арифметическое значение результатов двух параллельных наблюдений, расхождение между которыми (сходимость) не превышало 0,1 %. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты определения массовой доли жира в исследуемых пробах молока

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013 (не менее)	Норма по ГОСТ 31450-2013 (не менее)	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	2,5	2,5	4,7±0,1	%	Соответствует
2	2,5	2,5	3,9±0,1	%	Соответствует
3	2,5	2,5	2,51±0,1	%	Соответствует
4	2,5	2,5	2,52±0,1	%	Соответствует
5	-	-	2,5±0,1	%	Соответствует
6	-	-	2,5±0,1	%	Соответствует

Из таблицы видно, что массовая доля жира цельного молока использованного для выполнения выпускной квалификационной работы находилась в пределах 2,5±0,1 до 4,7±0,1% (3,9±0,1 до 4,7±0,1 в пробах сырого молока приобретенного на рынке (1 и 2), в пастеризованном молоке приобретенном в магазине (3-6 пробы) находилась в пределах от 2,5±0,1 до 2,52±0,1%), что соответствует требованиям нормативно-технической документации.

Определение массовой доли сухих обезжиренных веществ проводили по ГОСТ Р 54761-2011 – Молоко и молочная продукция. Методы определения массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка.

Массовую долю сухого вещества в продукте определяли высушиванием анализируемой пробы при температуре 102 °С.

За окончательный результат определения для каждой исследуемой пробы принимали среднеарифметическое значение двух параллельных определений, округленное до первого десятичного знака. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты определения содержания СОМО в анализируемых пробах

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013 (не менее)	Норма по ГОСТ 31450-2013	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	8,2	Не регламентирует	9,8±0,1	%	Соответствует
2	8,2		9,8±0,1	%	Соответствует
3	8,2		9,7±0,1	%	Соответствует
4	8,2		9,8±0,1	%	Соответствует
5	8,2		9,8±0,1	%	Соответствует
6	8,2		9,6±0,1	%	Соответствует

Из таблицы видно, что содержание СОМО в анализируемых пробах молока находилась в пределах от $9,6 \pm 0,1$ до $9,8 \pm 0,1\%$, что соответствует требованиям нормативно-технической документации.

Контроль качества пастеризации проводили по ГОСТ 3623-2015 «Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации.» Метод основан на разложении перекиси водорода ферментом пероксидазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при разложении перекиси водорода активный кислород окисляет йодистый калий, освобождая йод, образующий с крахмалом соединение синего цвета.

В результате проведенных исследований в 4-х пробах пастеризованного молока фермент пероксидаза не обнаружен, а в 2-х пробах цельного сырого молока фермент пероксидаза присутствовал. Полученные результаты соответствуют заявленным показателям.

Молоко, содержащее антибиотики, снижает пищевую ценность молочного продукта, отрицательно влияет на здоровье людей, способствует возникновению аллергий. Кроме того, такое молоко и приготовленные из него продукты могут содержать антибиотикоустойчивые штаммы патогенных бактерий, которые образуют токсины, не разрушающиеся при пастеризации и вызывающие пищевые отравления у людей (например, золотистый стафилококк).

Исследования проводили согласно ГОСТ 23454-2016 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ». Результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Учет результатов по определению антибиотиков в пастеризованном молоке

№ пробы	Норма по ТР ТС 033/2013 (не более)	Норма по 23454-2016	Результат исследования	Единица измерения	Вывод
1	Тетрациклиновая группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01, Левомецетин 0,05	Не регламентируется	Не обнаружено	Ед/г	Соответствует
2	Тетрациклиновая группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01, Левомецетин 0,05		Не обнаружено	Ед/г	Соответствует
3	Тетрациклиновая группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01,		Не обнаружено	Ед/г	Соответствует

	Левомецетин 0,05			твует
4	Тетрациклинова группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01, Левомецетин 0,05		Не обнаружено	Ед/г Соответствует
5	Тетрациклинова группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01, Левомецетин 0,05		Не обнаружено	Ед/г Соответствует
6	Тетрациклинова группа – 0,01, Стрептомицин – 0,5, Пеницилин – 0,01, Левомецетин 0,05		Не обнаружено	Ед/г Соответствует

Из таблицы видно, что антибиотики в анализируемых пробах цельного коровьего молока отсутствовали, что соответствует требованиям действующей нормативно-технической документации.

На основании проведенных исследований отобранных проб молока по микробиологическим показателям в пробах цельного молока, приобретенного в частном секторе (в пластиковой бутылке и стеклянной банке) 1 и 2 были обнаружены БГКП. Выделенные микроорганизмы, не обладающие патогенными свойствами были отнесены к родам *Citrobacter* и *Enterobacter*. В пробах пастеризованного молока с 3 по 6 БГКП отсутствовали.

Также все пробы молока дополнительно подвергали органолептическим и физико-химическим исследованиям. В результате было установлено, что все они соответствуют требованиям действующей нормативно-технической документации.

Библиографический список

1. Контаминация пищевых продуктов инфекционным объектом *SERRATIA MARCESCENS*./ Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. // Актуал. вопр. контроля инфекц. болезней животных / Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии.-Покров, 2014.-Ч. 2.-С. 270-275.-Рез. англ.-библиогр.: С.274. Шифр 15-79.

2. Роль бактерий рода *SERRATIA* при производстве и сохранности пищевой продукции./ Мухин Е.Б., Пекарская Н.П., Шапинова Д.Р., Зиятдинова А.Р., Рахматуллова А.Р., Агапова К.А., Пульчеровская Л.П., Ефрейторова Е.О. В сборнике: Студенческий

научный форум - 2015. VII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. 2015.

3. Разработка биотехнологических параметров для обнаружения бактерий вида *SERRATIA MARCESCENS* в пищевых продуктах и объектах окружающей среды//Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Молофеева Н.И. В сборнике: Биотехнология: реальность и перспективы. Международная научно-практическая конференция. 2014. С. 14-17.

4. Кремнийсодержащие добавки для получения качественной и безопасной продукции животноводства/Дежаткина С., Исайчев В., Дежаткин М., Пульчеровская Л., Мерчина С., Зялалов Ш. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2021. № 11. С. 52-59.

5. Методы индикации и идентификации бактерий вида *SERRATIA MARCESCENS* в объектах окружающей среды и пищевых продуктов/ Пульчеровская Л.П., Ефрейторова Е.О., Васильев Д.А. В сборнике: Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности. Международная научно-практическая конференция, посвященная 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. 2015. С. 247-250.

6. Индикация и идентификация колиформных бактерий в воде открытых водоемов/Гранкина А., Пульчеровская Л.П. В сборнике: Студенческий научный форум - 2017. IX Международная студенческая электронная научная конференция. 2017.

7. Распространенность бактерий вида *S. marcescens* в объектах окружающей среды и пищевых продуктах/Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. 2016. С. 204-211.

8. Индикация и идентификация бактерий вида *SERRATIA MARCESCENS*, в водопроводной воде хозяйственно-питьевого водоснабжения/Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VI Международной научно-практической конференции. 2015. С. 68-70.

VETERINARY AND SANITARY EXAMINATION COW'S MILK IN ORDER TO IDENTIFY COLIFORM BACTERIA

Pulcherovskaya L.P., Kovaleva E.N.

Keywords: cow's milk, veterinary and sanitary examination, organoleptic studies, physico-chemical studies, bacteriological sowing, coliform bacteria.

The work is devoted to the study of cow's milk in order to identify coliform bacteria in it.