

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

МАЛІМОН ЗОЯ ВАСИЛІВНА

УДК 637.56. 579.672

**НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ
КРИТЕРІЇВ ІМПОРТОВАНОЇ ЗАМОРОЖЕНОЇ РИБИ ТА ЇЇ ОЦІНКА
ЗА ЗАЛИШКОВИМИ КІЛЬКОСТЯМИ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ
РЕЧОВИН**

16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор
Кухтин Микола Дмитрович,
Тернопільський національний технічний
університет імені Івана Пулюя,
професор кафедри харчової біотехнології
і хімії

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Якубчак Ольга Миколаївна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
експертизи

кандидат ветеринарних наук, доцент
Богатко Надія Михайлівна,
Білоцерківський національний
аграрний університет,
завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
експертизи

Захист відбудеться «20» червня 2019 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «17» травня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Журенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Риба і морепродукти відносяться до продуктів, які є джерелом легкозасвоюваного білку, містять жири, які є цінним джерелом енергії, макро- та мікроелементів тощо (Berkel B. M. 2004; Mohammed Saud 2011). Проте, завдяки високій харчовій та біологічній цінності риба є поживним середовищем для розвитку мікроорганізмів усіх видів (Pacheco-Aguilar R. 2000; Rey M. S. 2012). Тому рибу відносять до швидкопсувних харчових продуктів, умови та терміни її зберігання вимагають відповідних санітарно-гігієнічних і температурних режимів. Якубчак О. М. (2005), Фотіна Т. І. (2013), Яценко І. В. (2017), Velu S. (2013), Hassan M. A. (2015), Popelka P. (2016) зазначають, що у харчових продуктах, які зберігаються за умов холодильника, домінує психротрофна мікрофлора. Саме з її розвитком пов'язують виникнення органолептичних і хімічних вад у продуктах.

На український ринок риба, рибні продукти імпортного виробництва надходять у замороженому стані та контролюються за мікробіологічними критеріями безпечності (наявність *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*) і критеріями гігієни технологічного процесу (вміст бактерій групи кишкових паличок, мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, *S. aureus*). У дослідженнях Al-Jasser (2014), M. A. Hassan (2015) повідомляється, що охолоджена і заморожена риба найчастіше контамінована психротрофними мікроорганізмами родів *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Moraxella spp.*, *Shewanella spp.* і *Aeromonas spp.*, які можуть спричинити псування риби в процесі її холодильного зберігання. Вживання такої риби в їжу може спричинити харчові токсикоінфекції. Нині у нашій країні відсутні науково-обґрунтовані дослідження щодо обсіменіння риби імпортного виробництва психротрофною мікрофлорою, тому під час контролю замороженої риби не надається належної уваги вивченню контамінації риби психротрофними мікроорганізмами.

Отже, проведення досліджень щодо обсіменіння психротрофними мікроорганізмами замороженої риби та порівняння їх кількості з контамінацією мезофільними мікроорганізмами відіграли основоположну роль у розробленні мікробіологічних критеріїв оцінки замороженої риби.

Слід зазначити, що нині в галузі рибництва для профілактики та лікування хвороб тварин широко застосовують антибактеріальні препарати (Grynevych N., 2018). Безконтрольне використання антибактеріальних препаратів призводить до накопичення їх у рибі та морепродуктах (Akinbowale O. L., 2007; Bayer E. V., 2017). Крім того, використання значної кількості антибіотиків може призвести до появи антибіотикорезистентних бактерій у водному середовищі аквакультури, збільшенні стійких до антибіотиків збудників захворювань риб, а також передачі детермінант резистентності патогенам, що спричиняють хвороби людини (Franzetti L., 2007; Bhowmick P. P., 2008; Grigorakis K., 2011).

Однак, згідно «Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових

продуктах тваринного походження» визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів передбачено у рибі власного виробництва. Водночас, у замороженій рибі, яка імпортується в Україну, визначення залишкових кількостей антибактеріальних речовин не проводиться.

Отже, проведення досліджень замороженої риби, яка імпортується в Україну, за мікробіологічними показниками, зокрема вмістом психротрофної мікрофлори та її оцінка за залишковими кількостями антибактеріальних речовин, є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано в Інституті ветеринарної медицини НААН, вона є частиною науково-дослідної теми «Вивчити особливості формування мікрофлори в охолоджених молоко- та м'ясопродуктах» (номер державної реєстрації 0116U000719, 2016–2018 рр.) та розділом ініціативної теми «Розробка, вивчення та порівняння різних методів і засобів ветеринарно-санітарної оцінки і контролю якості та безпеки продукції тваринного і рослинного походження та кормів» (номер державної реєстрації 0109U001082, 2008–2018 рр.) Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, що виконувалися спільно.

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – наукове обґрунтування мікробіологічних критеріїв імпортованої замороженої риби та її оцінка за залишковими кількостями антибактеріальних речовин.

Для досягнення мети необхідно було виконати такі завдання:

- провести аналіз невідповідностей мікробіологічних критеріїв замороженої риби та рибних продуктів, імпортованих в Україну;
- дослідити обсіменіння мезофільною і психротрофною мікрофлорою замороженої риби, імпортованої в Україну;
- визначити контамінацію мезофільними та психротрофними мікроорганізмами замороженої риби, залежно від хімічних показників її якості;
- удосконалити мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу на підставі оцінювання обсіменіння психротрофною мікрофлорою замороженої риби;
- провести контроль замороженої риби, імпортованої в Україну, на наявність залишкових кількостей антибактеріальних речовин;
- визначити вплив залишкових кількостей антибактеріальних речовин у замороженій рибі на її мікробіологічні та хімічні показники;
- провести токсико-біологічну оцінку м'яса замороженої риби за наявності залишкових кількостей антибактеріальних речовин;
- провести ідентифікацію складу психротрофної мікрофлори замороженої риби за відсутності та наявності у ній залишкових кількостей антибактеріальних речовин;
- визначити чутливість психротрофної мікрофлори, виділеної із м'яса замороженої риби, до антибіотиків за відсутності та наявності залишкових кількостей антибактеріальних речовин.

Об'єкт дослідження – мікробіологічні критерії імпортованої замороженої риби та її оцінка за залишковими кількостями антибактеріальних речовин.

Предмет дослідження – імпортована заморожена риба, мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми, психротрофні мікроорганізми, залишкові кількості антибактеріальних речовин, біологічна цінність та токсичність м'яса риби.

Методи дослідження: органолептичні (визначення зовнішнього вигляду, запаху та консистенції); хімічні (реакція з купруму сульфатом, реакція на пероксидазу, загальний вміст летких сполук азоту, величина рН); мікробіологічні (визначення мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, психротрофних мікроорганізмів, бактерій групи кишкових паличок, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*); культуральні, тинкторіальні, морфологічні та біохімічні властивості бактерій; рідинної хроматографії, імуноферментний аналіз, мікробіологічний метод визначення залишкових кількостей антибактеріальних препаратів; визначення токсичності та біологічної цінності м'яса риби за допомогою тест-організму інфузорії *Tetrachymena pyriformis*; статистичні (обробка цифрових показників результатів досліджень та оцінка їх достовірності за критерієм Стьюдента).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні науково обґрунтовано та визначено мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу на підставі оцінювання обсіменіння психротрофною мікрофлорою замороженої риби. Встановлено, що психротрофна мікрофлора замороженої риби в процесі зберігання в 1,3–2,0 рази переважає вміст мезофільної мікрофлори та більшою мірою характеризує санітарні умови виробничого процесу. Доведено, що у разі задовільних хімічних показників замороженої риби, виявляється в середньому 25 % проб з понаднормованим (більше 50 тис. КУО/г) вмістом мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів та близько 65 % проб замороженої риби з вмістом психротрофної мікрофлори.

Вперше у імпортованій в Україну замороженій рибі виявлено протимікробні препарати із групи антибіотиків аміноглікозидів I–II покоління ($46,7 \pm 0,7$ %) та налідиксову кислоту ($19,0 \pm 0,2$ %). Виявлено антибактеріальні речовини (налідиксова кислота, апраміцин, канаміцин, тіамулін, нафцілін), які не регламентуються національним і Європейським законодавством.

Підтверджено, що залишки антибіотиків тетрациклінового ряду, наявні в м'ясі замороженої риби з перевищенням максимально допустимого рівня, проявляли помірну токсичність на культуру *Tetrachymena pyriformis*, а її відносна біологічна цінність була на 4,12 % нижча, порівняно із пробами риби, в яких відсутні залишки антибактеріальних речовин.

Виявлено, що за умови наявності в замороженій рибі залишкових кількостей антибактеріальних речовин формується резистентна до виявлених антибіотиків психротрофна мікрофлора.

Вперше встановлено, що для об'єктивного контролю замороженої риби, імпортованої в Україну, необхідно передбачити у плані державного моніторингу харчових продуктів тваринного походження дослідження з визначення залишкових кількостей антибактеріальних речовин.

Наукову новизну досліджень підтверджено деклараційним патентом України на корисну модель «Спосіб санітарно-гігієнічної оцінки безпеки замороженої риби за кількістю психротрофних мікроорганізмів».

Практичне значення одержаних результатів. Практична цінність роботи полягає у розробленні мікробіологічних критеріїв замороженої риби з урахуванням її обсіменіння психротрофною мікрофлорою. З цією метою розроблено та запропоновано науково-практичні рекомендації «Ветеринарно-санітарна експертиза замороженої риби за вмістом психротрофних мікроорганізмів» (*затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10/1 від 19.10.2018 р.*), які регламентують порядок контролю замороженої риби за вмістом психротрофної мікрофлори та гігієни технологічного процесу виробництва, температури заморожування і зберігання.

Вивчення та аналіз результатів досліджень щодо наявності залишкових кількостей антибактеріальних речовин у замороженій рибі стали підґрунтям для внесення змін до нормативно-правових актів щодо контролю замороженої риби імпортного виробництва.

Результати наукової роботи впроваджено у Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та регіональних лабораторіях Держпродспоживслужби України, Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів. Отримані результати досліджень використовуються в навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедр: ветеринарно-санітарного інспектування Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького; інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету; іхтіології та зоології Білоцерківського національного аграрного університету; ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету; паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи і гігієни Житомирського національного агроєкологічного університету, паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто здійснено пошук та аналіз літературних джерел, підібрано методи досліджень, організовано і виконано увесь обсяг експериментальних досліджень, проаналізовано та узагальнено, включно з формулюванням мети, основні етапи досліджень, здійснено статистичну обробку одержаних результатів. В дисертації використано ідеї та положення особистої роботи здобувача та опубліковано їх в наукових працях у співавторстві. За участю наукового керівника здійснено узагальнення результатів досліджень, висновків і пропозицій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень за темою дисертації доповідалися та отримали загальне схвалення на: науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 40-річчю заснування Інституту ветеринарної медицини НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017 р., 2018 р.);

Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія та її роль в забезпеченні здоров'я людей та тварин» (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідеміологічні виклики в концепції єдиного здоров'я» (м. Тернопіль, 2018 р.); Міжнародній науково-технічній конференції молодих учених та студентів «Актуальні задачі сучасних технологій» (м. Тернопіль, 2018 р.).

Публікація. За результатами досліджень опубліковано 9 наукових праць, з яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, методичні рекомендації та 2 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 173 сторінках. Список використаної літератури налічує 222 джерела. Дисертацію ілюстровано 16 таблицями та 23 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямів досліджень, матеріали та методи досліджень. Дисертацію виконано впродовж 2016–2019 рр. в Інституті ветеринарної медицини НААН. Окремі дослідження виконано у Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Дніпропетровській регіональній державній лабораторії Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів та Тернопільській дослідній станції Інституту ветеринарної медицини НААН.

Під час виконання дисертації проаналізовано за мікробіологічними показниками 6441 пробу замороженої риби та рибних продуктів, які надійшли на дослідження до Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи упродовж 2013–2017 рр., 18261 пробу риби та рибних продуктів, які досліджено регіональними державними лабораторіями Держпродспоживслужби за вказаний період. Проведено дослідження 680 проб замороженої риби за вмістом мезофільної та психротрофної мікрофлори, 175 проб – за мікробіологічними, органолептичними і хімічними показниками. Досліджено 100 проб замороженої риби на наявність залишкових кількостей антибактеріальних речовин, 63 проби – на хімічні показники за наявності залишкових кількостей антибактеріальних речовин. Проведено токсико-біологічну оцінку 15 проб м'яса замороженої риби за наявності у ній антибіотиків на культурі інфузорії *Tetrachytena pyriformis*. Виділено та ідентифіковано 75 культур психротрофних мікроорганізмів із замороженої риби за відсутності у ній антибактеріальних речовин і 240 культур – за наявності антибіотиків та проведено визначення їх чутливості до антибіотиків.

Дослідження проведено у три етапи (рис. 1).

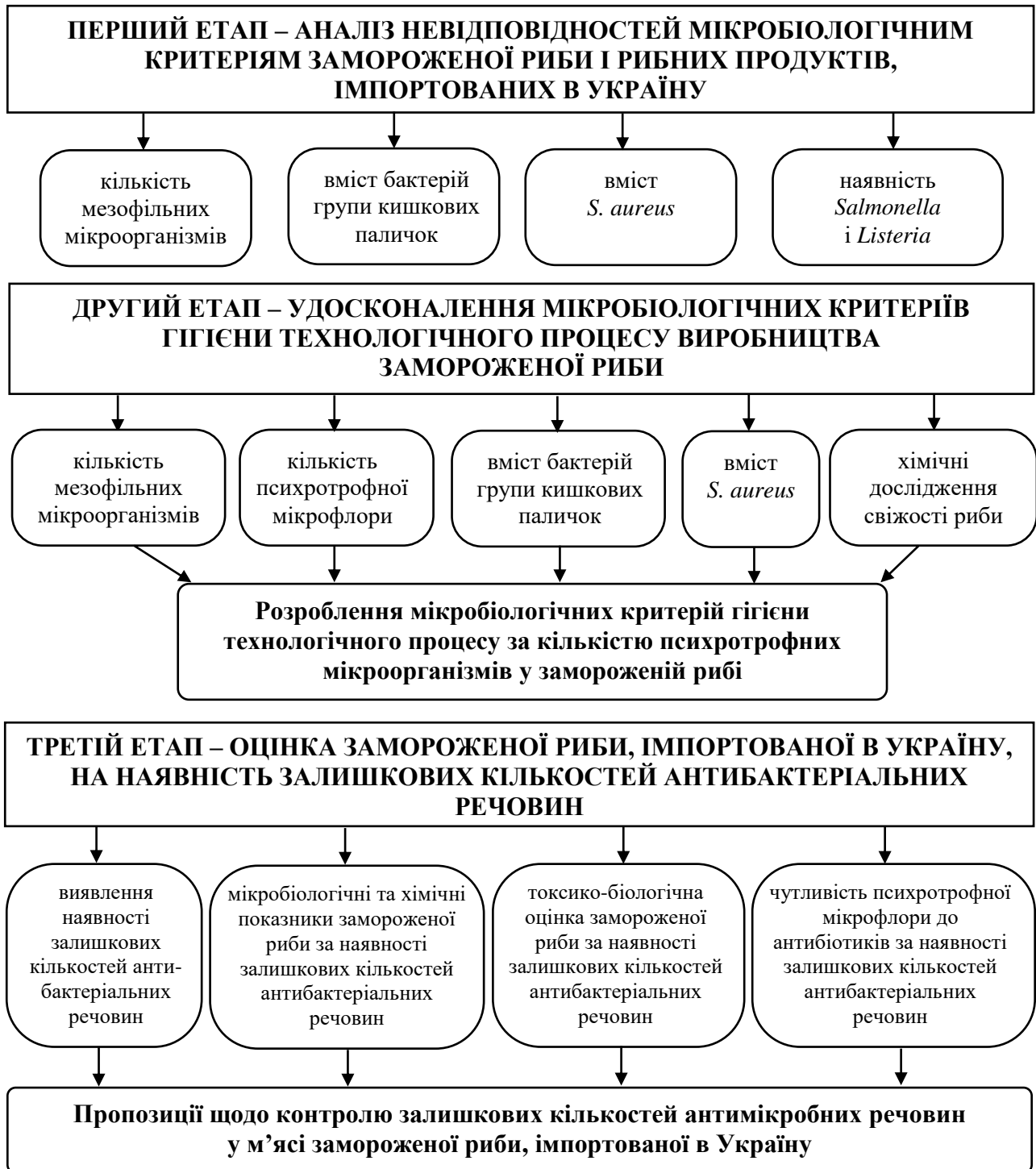


Рис. 1. Схема проведення досліджень

Органолептичні дослідження замороженої риби проводили згідно з ДСТУ 4868:2007.

Підготовку проб замороженої риби до мікробіологічних досліджень проводили згідно з ДСТУ ISO 6887-3:2014. У пробах замороженої риби визначали кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів згідно ДСТУ ISO 4833:2006 та психротрофних мікроорганізмів за температури $6,5 \pm 0,5$ °C (інкубація посівів упродовж 10 діб). Бактерії групи

кишкових паличок визначали методом посіву проби у середовище Кеслер загальноновизнаним методом; *Staphylococcus aureus* – згідно ДСТУ ISO 6888-1:2003; *Salmonella spp.* та *Listeria monocytogenes* – згідно ДСТУ ISO 6579:2006 і ДСТУ ISO 11290-1:2003 відповідно. Мікроскопічні гриби та дріжджі визначали згідно ДСТУ ISO 7954:2006. Для біохімічної ідентифікації грамнегативних неферментуючих психротрофних мікроорганізмів використовували пластини «API 20 Gram-negative Bacilli» («BioMerieux S. A.», Франція). Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними і біохімічними даними згідно з визначником бактерій Берджі (2011). Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводили на середовищі Мюллер-Хінтон (HiMedia, Індія) диско-дифузійним способом за методом Bauer-Kirbi. Приготування мікробних суспензій проводили відповідно до оптичного стандарту мутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland з використанням приладу Densi-LaMeter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія).

Хімічні показники замороженої риби визначали загальноновизнаними стандартними методами, а кількість загального вмісту летких сполук азоту – згідно Регламенту ЕС 2074/2005. Наявність залишкових кількостей антибактеріальних речовин у рибі проводили скринінговим методом РХ/МС/МС (Новожицька Ю. М., 2014) та мікробіологічним скринінг-методом (Новожицька Ю. М., 2016). Підтвердження досліджень на кількісний вміст залишкових кількостей антибактеріальних речовин у м'ясі риби визначали методом рідинної хроматографії на рідинному хроматомаспектометрі «Waters» TQD ACQITY (США) згідно методичних рекомендацій (Новожицька Ю. М., 2014).

Токсико-біологічну оцінку м'яса замороженої риби проводили згідно з «Методичними рекомендаціями по токсико-біологічній оцінці м'яса, м'ясних продуктів і молока з використанням інфузорії *Tetrahymena pyriformis* (експрес метод)» (Лемеш В. М., 1997).

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за загальноновизнаними методами варіаційної статистики з використанням програми Statistic 10. Різницю між порівнюваними величинами вважали вірогідною за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Аналіз невідповідностей мікробіологічним критеріям, виявленим в імпортованій в Україну замороженій рибі та рибних продуктах. Встановлено, що критеріям безпечності не відповідала імпортована заморожена риба та рибні продукти, які надійшли з восьми країн: Норвегії, В'єтнаму, Російської Федерації, Китаю, Нової Зеландії, Італії, США, Великої Британії. Найчастіше не відповідала за мікробіологічними критеріями риба, яка була імпортована з В'єтнаму, що становило 52,9 % від усіх проб з невідповідностями. Отже, отримані дані вказують на необхідність контролю замороженої риби та рибних продуктів за мікробіологічними показниками, незалежно від країни-імпортера. У рибі, яка не відповідала критеріям

безпеки, виявляли *L. monocytogenes* та перевищення рівня мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, що становило по 36,9 % від загальної кількості позитивних проб. Водночас, за вмістом бактерій групи кишкових паличок і *S. aureus* перевищення було відповідно в 1,7 та 8,4 рази ($p < 0,05$) менше, ніж за кількістю *L. monocytogenes*. Це пов'язано з тим, що лістерії відносяться до психротрофної мікрофлори, яка частіше виділяється за технології виробництва замороженої риби.

Обсіменіння мезофільною і психротрофною мікрофлорою замороженої риби, імпортованої в Україну. За результатами досліджень замороженої риби на наявність мезофільної і психротрофної мікрофлори встановлено, що в 25 % проб, в яких виявлено менше 10^1 КУО/г мезофільних бактерій, кількість психротрофних мікроорганізмів перевищувала 10^5 КУО/г. Тобто, дані проби за обсіменінням мезофільною мікрофлорою відповідають нормативним вимогам до замороженої риби згідно ДСТУ 4868:2007, а за вмістом психротрофних мікроорганізмів перевищують показник, встановлений для мезофільних бактерій. Заморожена риба, у якій виявлено обсіменіння мезофільними аеробними та факультативно-анаеробними мікроорганізмами в кількості 10^2 КУО/г, була контамінована психротрофними бактеріями в 1,4–1,8 рази більше ($p < 0,05$). Проби з кількістю мезофільних мікроорганізмів від 10^3 до 10^4 КУО/г були контаміновані психротрофними мікроорганізмами, які в 1,7–6,8 рази ($p < 0,05$) перевищували кількість мезофільних бактерій. Крім того, за такої кількості мезофільних мікроорганізмів реєстрували проби з кількістю психротрофних мікроорганізмів понад 10^5 КУО/г риби. Заморожена риба, яка відповідала нормативу за кількістю мезофільних мікроорганізмів (5×10^4 КУО/г), за кількістю психротрофної мікрофлори не відповідала даному показнику, а перевищувала його в 1,3–2,0 і більше рази.

Також було встановлено, що у холодний період року $63,6 \pm 2,1$ % проб замороженої риби були контаміновані мезофільними мікроорганізмами в кількості менше 10^1 КУО/г. Водночас, у теплий період року виявляли заморожену рибу з такою кількістю мезофільних мікроорганізмів у 7,0 разів ($p < 0,05$) менше. Крім того, у холодний період року виявлено $9,0 \pm 0,2$ % проб риби, які перевищували максимально допустимий рівень мезофільних мікроорганізмів. При цьому у теплий період кількість проб з понаднормовою кількістю мезофільних мікроорганізмів становила $27,3 \pm 0,3$ %.

Під час оцінки проб замороженої риби за обсіменінням мезофільними та психротрофними мікроорганізмами встановлено (рис. 2), що $92,6 \pm 2,5$ % проб відповідали вимогам чинного ДСТУ щодо контамінації мезофільними мікроорганізмами (5×10^4 КУО/г), а $7,4 \pm 0,2$ % проб – перевищували максимально допустимий рівень. Водночас, у цих пробах риби виявлено перевищення обсіменіння психротрофною мікрофлорою в 2,6 рази ($p < 0,05$).

Отже, отримані дані вказують на те, що психротрофна мікрофлора замороженої риби, в процесі її зберігання, кількісно переважає мезофільну мікрофлору та більшою мірою характеризує гігієнічні вимоги виробничого процесу.



Рис. 2. Оцінка проб замороженої риби за контамінацією мезофільними та психротрофними мікроорганізмами

Досліджено обсіменіння замороженої риби мезофільною і психротрофною мікрофлорою, залежно від хімічних показників, які характеризують її свіжість. Встановлено, що у разі задовільних органолептичних, хімічних показників замороженої риби в реакції з купруму сульфатом, на пероксидазу, загальним вмістом летких сполук азоту та величини рН, виявляється в середньому 25 % проб риби з кількістю мезофільних мікроорганізмів понад 50 тис. КУО/г. Також доведено, що психротрофна мікрофлора кількісно переважає мезофільні мікроорганізми замороженої риби. У пробах замороженої риби, які відносилися до свіжої за хімічними показниками, психротрофні мікроорганізми, в середньому в 65 % випадках перевищували показник 50 тис. КУО/г. Отже, отримані дані вказують на необхідність розроблення науково обґрунтованих мікробіологічних критеріїв оцінки замороженої риби за кількістю психротрофних мікроорганізмів.

Визначення мікробіологічного критерію гігієни технологічного процесу замороженої риби на основі оцінювання кількості психротрофної мікрофлори. Результати проведених досліджень щодо контамінації психротрофними мікроорганізмами замороженої риби та порівняння їх кількості з мезофільними бактеріями, дозволили удосконалити мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу, що ґрунтуються на наступних доведених наукових фактах:

1) психротрофні мікроорганізми є холодолюбивими та тривалий час зберігають свою життєдіяльність за умов температур заморожування (-12 — -18 °C), а тому відносяться до «нормальної» мікрофлори замороженої риби і безпечна їх кількість завжди присутня на її поверхні та не становить загрози для споживачів;

2) серед психротрофних мікроорганізмів замороженої риби, в основному, переважають неферментуючі грамнегативні сапрофітні бактерії родів *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* і *Enterobacter* (від 85 до 95 %). Проте, серед видів психротрофних мікроорганізмів роду *Pseudomonas* трапляються умовно-патогенні види, що є небезпечними для здоров'я людини;

3) психротрофні бактерії продукують протеолітичні та ліполітичні ензими, які, внаслідок протеолізу та ліполізу, призводять до псування (вад)

риби. Тому мікробіологічний критерій обсіменіння психротрофною мікрофлорою замороженої риби має бути визначений з урахуванням технології заморожування, транспортування та її зберігання, а наявність кількості психротрофної мікрофлори в рибі, яка призводить до невідповідностей, буде свідчити про неналежну гігієну технологічного процесу та ризику для споживачів;

4) визначений гігієнічний критерій оцінювання замороженої риби за кількістю психротрофної мікрофлори одночасно має характеризувати гігієну технологічного процесу і відповідність харчового продукту вимогам чинних нормативно-правових актів. Крім того, має бути додатковим мікробіологічним показником до вже існуючих методів визначення безпечності замороженої риби і дотримання вимог гігієни під час технологічного процесу виробництва, зберігання і обігу замороженої риби.

Проведено дослідження з визначення динаміки розвитку мікрофлори з різними початковими кількостями мікроорганізмів під час зберігання риби у замороженому стані за температури -18 ± 1 °С. Встановлено (рис. 3), що у пробах замороженої риби в процесі зберігання впродовж 8 місяців з різною початковою кількістю мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, кількість мікроорганізмів зменшилася в 1,6–2,3 раза ($p < 0,05$). Інтенсивність інактивації мезофільних бактерій у пробах з незначним мікробним обсіменінням у середньому в 1,4 раза швидша, порівняно з пробами з більшою кількістю мікроорганізмів.

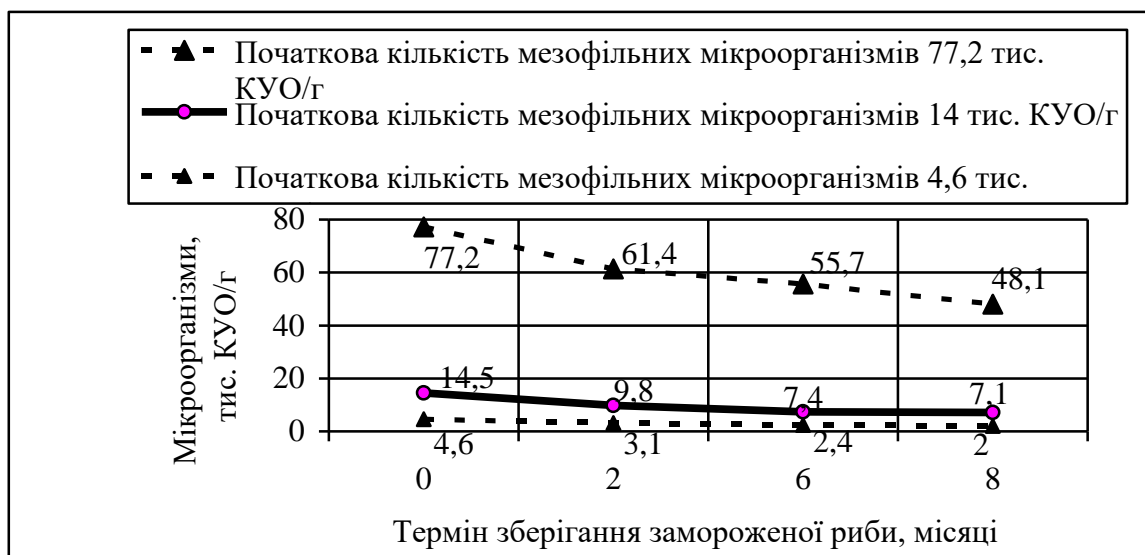


Рис. 3. Зміни мезофільної мікрофлори під час зберігання замороженої риби за температури -18 ± 1 °С упродовж 8 місяців

Це пов'язано з тим, що склад мезофільної мікрофлори із вищим мікробним обсіменінням представлено переважно родами і видами бактерій, які проявляють толерантність до холоду. Водночас, виявлено (рис. 4), що психротрофна мікрофлора замороженої риби упродовж 8 місячного терміну зберігання за температури -18 ± 1 °С не інактивується і є більш стабільною, порівняно з мезофільною. У результаті цього за кількістю психротрофної

мікрофлори замороженої риби, визначеною на будь-якому етапі зберігання, можна судити про її кількість на момент заморожування.

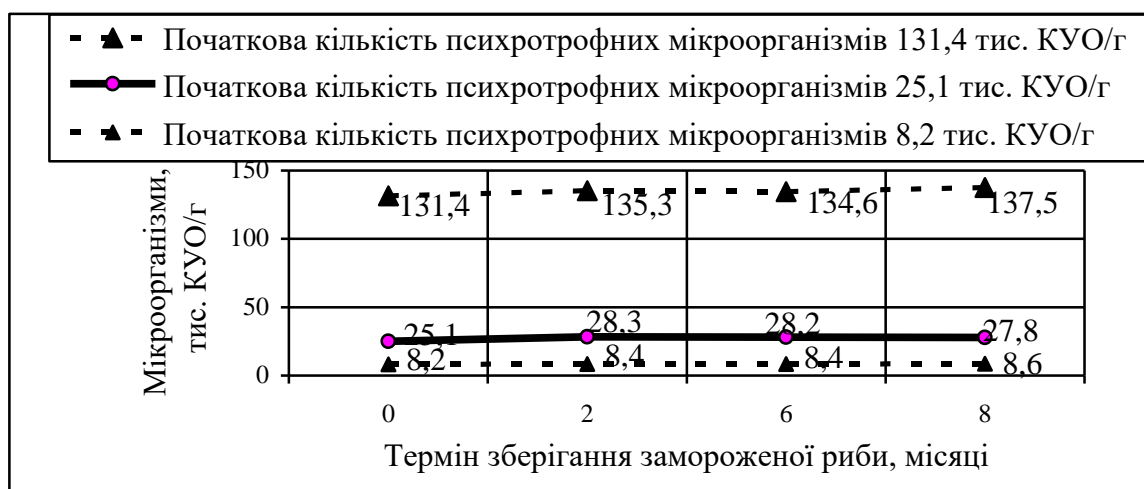


Рис. 4. Зміни психротрофної мікрофлори під час зберігання замороженої риби за температури -18 ± 1 °C упродовж 8 місяців

Отже, на підставі досліджень, з урахуванням європейської методології, було удосконалено мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу виробництва замороженої риби за кількістю психротрофної мікрофлори: $n=5$, $m=10000$ КУО/г риби, $M=50000$ КУО/г риби, $c=3$, де n – кількість проб від однієї партії; c – кількість проб, параметричні значення яких знаходяться між m і M ; m – мінімальне значення кількості психротрофних мікроорганізмів у 1 г риби; M – максимальне значення кількості психротрофних мікроорганізмів у 1 г риби. Якщо за результатами мікробіологічних досліджень п'яти проб риби від однієї партії виявлятимуть кількість психротрофних мікроорганізмів понад 50000 КУО/г (M) хоча б в одній пробі, то таку партію замороженої риби слід вважати незадовільною; у разі виявлення у трьох пробах замороженої риби від 10000 до 50000 КУО/г (між m і M), то партію слід вважати прийнятною; за контамінації всіх п'яти проб замороженої риби менше 10000 КУО/г (m), то таку партію слід розглядати як задовільну.

Таким чином, запропонована модель з використанням мікробіологічних критеріїв гігієни технологічного процесу з урахуванням контамінації психротрофною мікрофлорою замороженої риби характеризує дотримання комплексу гігієнічних вимог на всіх етапах (від заморожування до її обігу) та, в разі потреби, дозволяє вжити відповідних коригувальних дій.

Оцінка замороженої риби, імпортованої в Україну, на наявність залишкових кількостей антибактеріальних речовин. Проведено дослідження замороженої риби імпортного виробництва на наявність залишків антибактеріальних речовин. Встановлено (рис. 5), що $10,5\pm 0,3$ % імпортованої в Україну риби містили антибактеріальні речовини. Це вказує на те, що закордонні виробники та імпортери замороженої риби не завжди дотримуються санітарно-гігієнічних вимог щодо застосування і каренції протимікробних препаратів під час її вирощування або заморожування.

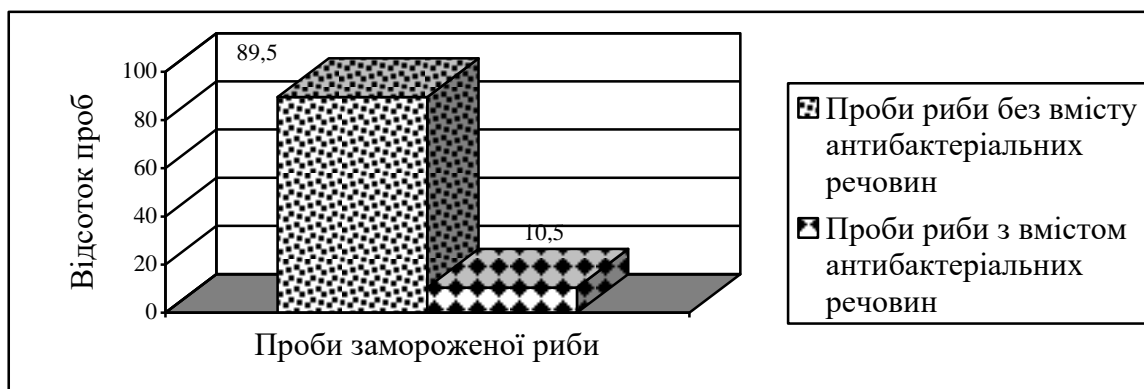


Рис. 5. Виявлення антибактеріальних речовин у замороженій рибі

За ідентифікації наявних антибактеріальних речовин у замороженій рибі встановлено (рис. 6), що найчастіше в імпортованій в Україну замороженій рибі виявляли антибіотики групи аміноглікозидів (апраміцин, канаміцин, гентаміцин, спектиноміцин, паромоміцин, дигідрострептоміцин) – $46,4 \pm 0,7$ % випадків та налідиксову кислоту в $19,0 \pm 0,2$ % від усіх позитивних випадків.

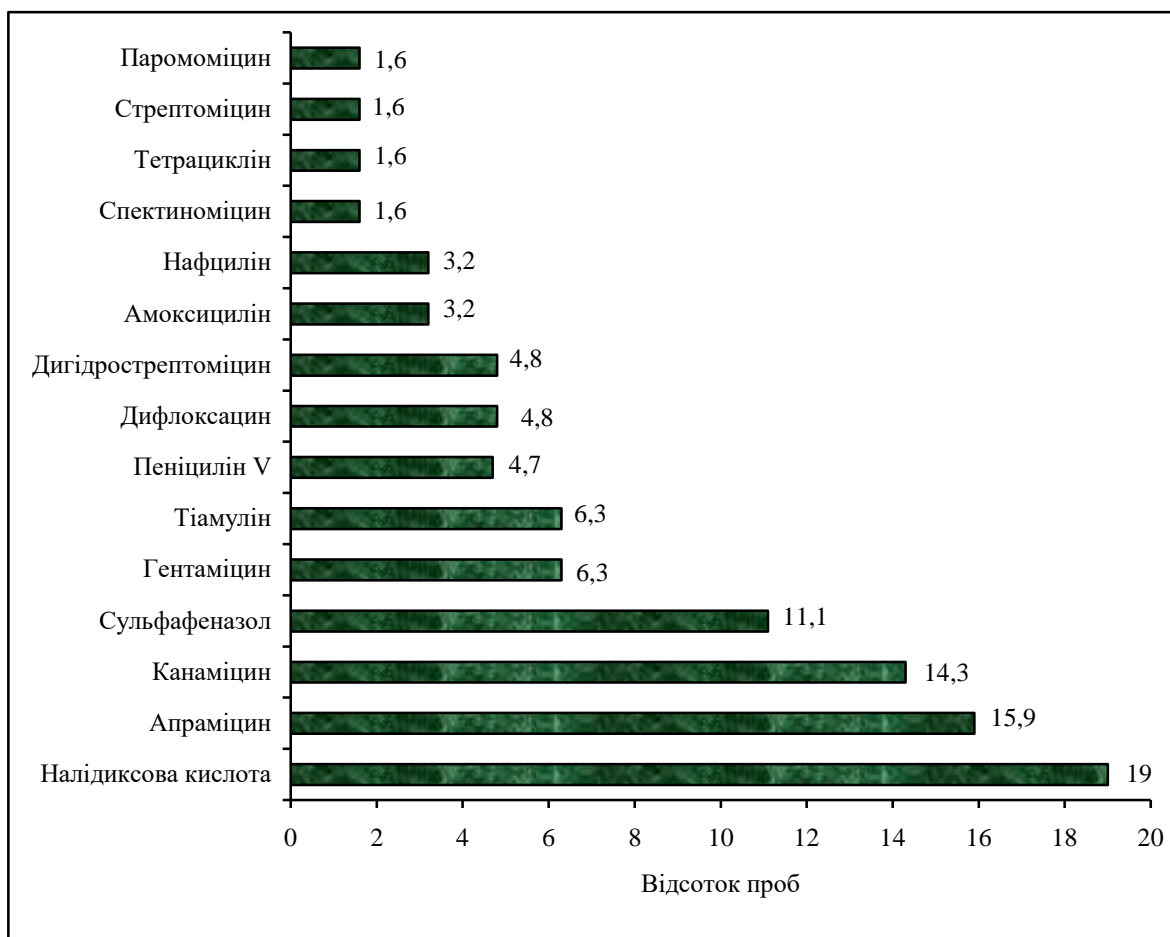


Рис. 6. Найбільш поширені антибактеріальні речовини, виявлені у замороженій рибі

Антибіотики пеніцилінового ряду: пеніцилін, амоксицилін і нафцилін, попри наявність протимікробної дії переважно щодо грампозитивної

мікрофлори, виявляли у $11,1 \pm 0,2$ % випадків. В замороженій рибі виявляли антибіотик тетрациклінової групи – тетрациклін в $1,6 \pm 0,1$ % від усіх виявлених випадків. Найбільш часто виявляли залишки антибактеріальних речовин в таких видах риби як аргентина і камбала – від $11,2 \pm 0,2$ до $14,4 \pm 0,2$ % випадків, а найменше антимікробні субстанції (до 5 %) виявляли у дорадо та горбуші.

Вплив залишкових кількостей антибактеріальних речовин на мікробіологічні та хімічні показники замороженої риби. Виявлені у замороженій рибі залишки антибактеріальних речовин методом рідинної хроматографії (табл. 1) – налідиксова кислота, апраміцин, канаміцин, тіамулін та нафцилін, не регламентуються європейським законодавством. Також встановлено наявність у рибі залишкових кількостей антибіотиків гентаміцину, дифлоксацину і пароміцину на верхній межі максимально допустимих рівнів для даних антибіотиків – 100 мкг/кг. Залишки антибіотиків пеніцилінового ряду – пеніцилін V і амоксицилін – виявляли у рибі в 2 рази менше, порівняно з іншими антибіотиками. Перевищення максимально допустимого рівня залишків антибіотиків у замороженій рибі виявлено для тетрацикліну – $112,5 \pm 7,2$ мкг/кг та спектиноміцину – $342,1 \pm 21,5$ мкг/кг.

Таблиця 1

**Виявлення антибактеріальних речовин
у м'язах замороженої риби ($M \pm m$, $n=63$)**

Назва антибактеріальних речовин	Виявлено у м'язах, мкг/кг	Максимально допустимий рівень, мкг/кг, згідно Регламенту ЄС № 37/2010
Налідиксова кислота	$88,3 \pm 4,2$	не регламентується у рибі
Апраміцин	$920,1 \pm 73,5$	не регламентується у рибі
Канаміцин	$123,7 \pm 56,4$	не регламентується у рибі
Сульфафеназол	$77,5 \pm 5,1$	100
Гентаміцин	$95,1 \pm 7,3$	100
Тіамулін	$79,8 \pm 4,1$	не регламентується у рибі
Пеніцилін V	$24,1 \pm 2,0$	50
Дифлоксацин	$98,7 \pm 7,6$	100
Дигідрострептоміцин	$354,6 \pm 25,2$	500
Амоксицилін	$29,1 \pm 2,4$	50
Нафцилін	$175,4 \pm 11,6$	не регламентується у рибі
Спектиноміцин	$342,1 \pm 21,5$	300
Тетрациклін	$112,5 \pm 7,2$	100
Паромоміцин	$465,8 \pm 30,3$	500

Отже, одержані результати вказують на те, що під час виробництва замороженої риби використовуються антибактеріальні препарати, які не підлягають моніторингу згідно з вимогами національних нормативно-правових актів і Регламентом ЄС № 37/2010.

Результати досліджень обсіменіння мікрофлорою замороженої риби, залежно від виявлених антибактеріальних речовин, наведено в табл. 2.

Встановлено, що за наявності залишків антимікробних речовин у замороженій рибі мікробіологічні показники не перевищували нормативних критеріїв згідно ДСТУ 4868:2007. Найменше обсіменіння риби

мікроорганізмами виявляли за наявності залишкових кількостей антибіотиків фторхінолонової, тетрациклінової груп та аміноглікозидів.

Таблиця 2

**Мікробіологічні показники замороженої риби
із вмістом антибактеріальних речовин ($M \pm m$, $n=63$)**

Назва антибактеріальних речовин	Кількість мезофільних мікроорганізмів, КУО/г	Кількість <i>S. aureus</i> , КУО/г	Титр бактерій групи кишкових паличок
Налідиксова кислота	$8,5 \pm 0,1 \times 10^3$	не виділено	>1
Апраміцин	$2,1 \pm 0,1 \times 10^3$	не виділено	0,1
Канаміцин	$2,5 \pm 0,2 \times 10^2$	не виділено	>1
Сульфафеназол	$7,6 \pm 0,1 \times 10^3$	не виділено	1
Гентаміцин	$7,2 \pm 0,2 \times 10^2$	не виділено	>1
Тіамулін	$4,3 \pm 0,1 \times 10^4$	$8,3 \pm 0,3 \times 10^1$	0,01
Пеніцилін V	$2,7 \pm 0,2 \times 10^4$	$2,8 \pm 0,1 \times 10^2$	0,01
Дифлоксацін	$7,9 \pm 0,2 \times 10^1$	не виділено	>1
Дигідрострептоміцин	$5,1 \pm 0,1 \times 10^3$	$8,2 \pm 0,2 \times 10^1$	0,1
Амоксицилін	$8,4 \pm 0,3 \times 10^3$	не виділено	0,01
Нафцилін	$2,8 \pm 0,2 \times 10^4$	$5,7 \pm 0,1 \times 10^2$	0,01
Спектиноміцин	$2,8 \pm 0,1 \times 10^3$	не виділено	>1
Тетрациклін	$3,5 \pm 0,3 \times 10^2$	не виділено	>1
Паромоміцин	$3,8 \pm 0,3 \times 10^3$	$6,1 \pm 0,2 \times 10^1$	0,01

За результатами досліджень хімічних показників замороженої риби у разі виявлення у ній залишкових кількостей антибактеріальних речовин встановлено (табл. 3), що попри допустимі мікробіологічні параметри, за хімічними показниками не всі проби відповідають ознакам свіжої риби.

Таблиця 3

**Хімічні показники замороженої риби за наявності
залишків антибактеріальних речовин ($M \pm m$, $n=63$)**

Назва антибактеріальних речовин	Реакція з купрум сульфатом	Реакція на пероксидазу	Загальний вміст летких сполук азоту, мг/100 г
Налідиксова кислота	–	+	$11,85 \pm 0,02$
Апраміцин	–	+	$11,24 \pm 0,02$
Канаміцин	–	+	$11,21 \pm 0,02$
Сульфафеназол	+	–	$11,99 \pm 0,03$
Гентаміцин	–	+	$11,14 \pm 0,02$
Тіамулін	+	–	$10,72 \pm 0,02$
Пеніцилін V	+	–	$12,05 \pm 0,03$
Дифлоксацін	–	+	$11,09 \pm 0,02$
Дигідрострептоміцин	–	–	$11,95 \pm 0,02$
Амоксицилін	+	–	$12,10 \pm 0,03$
Нафцилін	+	–	$12,11 \pm 0,02$
Спектиноміцин	–	+	$10,05 \pm 0,02$
Тетрациклін	–	+	$10,04 \pm 0,02$
Паромоміцин	–	+	$11,97 \pm 0,03$

Примітка. (+) – позитивна реакція; (–) – негативна реакція

Так, встановлено позитивну реакцію з купруму сульфатом та негативну реакцію на пероксидазу проб замороженої риби, у яких наявні залишки таких антибактеріальних речовин як сульфафеназол, тіамулін, пеніцилін V, амоксицилін, нафцилін. Це вказує на те, що в даних пробах відбулися значні автолітичні зміни м'язової тканини під впливом власних ферментів. За загальним вмістом летких сполук азоту всі досліджені проби риби були свіжими, оскільки не виявлено перевищення максимально допустимого рівня згідно з Регламентом ЄС № 2074/2005. Отже, отримані дані вказують, що заморожена риба, у якій виявлені залишкові кількості антибактеріальних речовин, за хімічними показниками може бути не свіжою.

Токсико-біологічна оцінка м'яса замороженої риби за наявності залишків антибактеріальних речовин. Встановлено, що заморожена риба, в якій виявлені залишкові кількості антибактеріальних речовин аміноглікозидів, пеніцилінової і фторхінолонової груп, була не токсичною для культури *Tetrachymena pyriformis*, оскільки під час дослідження інфузорії були активні, їх рух природно-поступальний, колоподібний, пригнічення росту чи змін їх форми також не виявляли, порівняно з інфузоріями у контрольній групі. Водночас, у м'ясі риби з вмістом антибіотиків тетрациклінової групи виявляли пригнічення росту та зниження активності і рухливості (до 20 %) інфузорій *Tetrachymena pyriformis*, порівняно з контрольними пробами риби без наявності антибіотиків. Однак, неприродних рухів (маневрних чи коливальних) та патологічних змін форми культур інфузорій не виявляли. Дослідне м'ясо замороженої риби було охарактеризоване як помірно токсичне.

Отже, проведені дослідження вказують на необхідності контролю залишкових кількостей антибактеріальних речовин у замороженій рибі, яка імпортується в Україну. Риба, у якій виявлено перевищення максимально допустимих рівнів антибактеріальних речовин є небезпечною, проявляє помірно токсичну дію на інфузорії *Tetrachymena pyriformis*, а тому не може бути рекомендована для споживання.

Ідентифікація складу психротрофної мікрофлори, виділеної із замороженої риби, за відсутності та наявності залишкових кількостей антибактеріальних речовин. Під час ідентифікації психротрофної мікрофлори, виділеної із замороженої риби за відсутності у ній антибіотиків, встановлено, що найбільшу частку становлять бактерії роду *Acinetobacter* – $39,7 \pm 2,8$ %, третина припадає на рід *Pseudomonas* – $30,1 \pm 1,7$ % і $10,3 \pm 1,1$ % становлять бактерії роду *Enterobacter*. Ідентифіковані три роди бактерій складають основну частку психротрофної мікрофлори замороженої риби – близько 80 %. У межах від $4,5 \pm 0,2$ до $5,3 \pm 0,2$ % виділяли бактерії роду *Alcaligenes*, грампозитивні паличкоподібні та грампозитивні кокові форми бактерій. Найменшу частку в складі виявленої психротрофної мікрофлори складають мікроорганізми роду *Aeromonas* і мікроскопічні гриби від $2,0 \pm 0,1$ до $2,7 \pm 0,2$ %.

Під час ідентифікації психротрофної мікрофлори замороженої риби з наявністю залишкових кількостей антибіотиків встановлено зростання в 1,4 раза ($p < 0,05$) кількості бактерій роду *Enterobacter* і в 1,7 раза ($p < 0,05$)

бактерій роду *Pseudomonas*, які становили половину виділеної мікрофлори. Також виявлено зниження в 1,8 раза ($p < 0,05$) бактерій роду *Acinetobacter*, порівняно з їх кількістю у замороженій рибі без антибіотиків. Таку ж частку складу психротрофної мікрофлори виявлено і в рибі без наявності залишків антибактеріальних речовин (близько 85 %).

Отже, отримані дані вказують на те, що у рибі з наявністю залишкових кількостей антибіотиків відбувається зміна родового складу психротрофної мікрофлори за рахунок зростання бактерій роду *Pseudomonas*, *Enterobacter* та *Aeromonas*, що, ймовірно, пов'язано зі стійкістю вказаних мікроорганізмів до антибактеріальних речовин.

Під час визначення чутливості психротрофних бактерій, виділених із м'яса замороженої риби за відсутності в ній залишкових кількостей антибактеріальних речовин, до антибіотиків виявлено їх чутливість від 80,0 до 100 % випадків. Винятком були *Pseudomonas spp.*, які були стійкими до препаратів пеніцилінової групи.

Водночас, встановлено, що за наявності у замороженій рибі залишкових кількостей антибіотиків тетрациклінової групи виділяється мікрофлора, яка стійка до цих препаратів. Аналогічну закономірність виявлено і за наявності антибіотиків інших груп. Так, у м'ясі замороженої риби визначено залишкові кількості антибіотиків пеніцилінової групи і, як наслідок, виділені психротрофні мікроорганізми проявляли чутливість до пеніциліну (близько 13 %). У разі виявлення у рибі гентаміцину і фторхінолонів, чутливість виділеної мікрофлори до даних препаратів не перевищувала 20 %. Отримані дані результатів досліджень вказують на те, що залишкові кількості антибактеріальних речовин, виявлені у рибі, є джерелом формування у мікроорганізмів генів мультирезистентності до антибіотиків.

Отже, з урахуванням вищенаведених результатів досліджень вважаємо за необхідність передбачити визначення залишкових кількостей антибактеріальних речовин у замороженій рибі, яка імпортується в Україну.

ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено необхідність проведення контролю замороженої риби, імпортованої в Україну, за мікробіологічними показниками, зокрема, психротрофними мікроорганізмами та залишковими кількостями антибактеріальних речовин. Удосконалено мікробіологічні критерії оцінки замороженої риби за кількістю психротрофної мікрофлори.

1. Невідповідності за мікробіологічними критеріями безпечності імпортованої риби та рибних продуктів була пов'язана із перевищенням кількості *L. monocytogenes* і мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, що становило по 36,9 % випадків від загальної кількості позитивних проб. Водночас, за обсіменінням бактеріями групи кишкових паличок і *S. aureus* перевищення було відповідно в 1,7 та 8,4 раза менше, ніж за кількістю мезофільних мікроорганізмів.

2. Виявлено, що кількість психротрофних мікроорганізмів у замороженій рибі вища в 1,3–2,0 рази, ніж мезофільних бактерій. У $92,6 \pm 2,5$ % проб замороженої риби, які відповідали вимогам чинного стандарту за кількістю мезофільних мікроорганізмів, було виявлено перевищення обсіменіння психротрофною мікрофлорою в 2,6 рази.

3. За задовільних показників, що характеризують свіжість замороженої риби, в реакціях: з купруму сульфатом, на пероксидазу, на загальний вміст летких сполук азоту та величини рН виявлено в середньому 25 % проб риби з наявністю мезофільних мікроорганізмів, які не відповідали вимогам чинних нормативно-правових актів. У пробах замороженої риби, які за хімічними показниками відносилися до свіжої, психротрофні мікроорганізми в 65 % випадків перевищували норматив чинного ДСТУ.

4. Удосконалено мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу виробництва замороженої риби за кількістю психротрофної мікрофлори ($n=5$; $c=3$; $m=10000$ КУО/г; $M=50000$ КУО/г), які свідчать про дотримання комплексу гігієнічних заходів від заморожування до обігу.

5. У $10,5 \pm 0,3$ % замороженої риби, яка реалізується в роздрібній торгівлі, виявлено залишки антибактеріальних речовин, зокрема, антибіотики групи аміноглікозидів (апраміцин, канаміцин, гентаміцин, спектиноміцин, паромоміцин, дигідрострептоміцин) у $46,4 \pm 0,7$ % проб та налідиксову кислоту в $19,0 \pm 0,2$ % від усіх позитивних випадків, що не перевищували максимально допустимий рівень, та тетрациклін і спектиноміцин, що перевищували встановлений норматив. Встановлено наявність антибактеріальних речовин у пробах риби, контроль яких не передбачено Регламентом ЄС № 37/2010.

6. Заморожена риба із залишковим вмістом антибактеріальних речовин за кількістю мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, титром бактерій групи кишкових паличок, вмістом *S. aureus*, бактерій роду *Salmonella spp.* та *L. monocytogenes* відповідала мікробіологічним нормативам.

7. Виявлено позитивну реакцію з купруму сульфатом та негативну реакцію на пероксидазу у пробах замороженої риби, які містили залишки антибактеріальних речовин: сульфафеназолу, тіамуліну, пеніциліну V, амоксициліну, нафциліну. Це вказує на значні автолітичні зміни м'язової тканини замороженої риби під впливом власних ферментів і за таких змін риба характеризується як не свіжа.

8. Встановлено, що заморожена риба із залишками антибактеріальних речовин: аміноглікозидів, пеніцилінової і фторхінолонової груп, що не перевищували максимально допустимий рівень, не проявляла токсичний вплив на інфузорію *Tetrachymena pyriformis*. Заморожена риба із залишками антибіотиків тетрациклінового ряду, що перевищували максимально допустимий рівень, проявляла помірну токсичність на культуру *Tetrachymena pyriformis*, а відносна біологічна цінність такої риби знижувалася на 4,12 %.

9. У замороженій рибі із залишковими кількостями антибіотиків виявлено зміну родового складу психротрофної мікрофлори, яка відбувалася за рахунок збільшення чисельності бактерій родів *Enterobacter* в 1,4 рази, *Aeromonas* – в 1,6 рази та *Pseudomonas* – в 1,7 рази.

10. Найпоширеніші види психротрофної мікрофлори, які виділені із замороженої риби за відсутності в ній залишкових кількостей антибактеріальних речовин, були високочутливими до антибіотиків: пеніцилінової, тетрациклінової, фторхінолонової груп та аміноглікозидів. У замороженій рибі із залишковими кількостями антибактеріальних речовин формується резистентна до виявлених антибіотиків мікрофлора.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Мікробіологічними критеріями гігієни технологічного процесу необхідно вважати оцінювання кількісного вмісту психротрофної мікрофлори замороженої риби: $n=5$; $c=3$; $m=10000$ КУО/г; $M=50000$ КУО/г.

2. З метою об'єктивного контролю залишкових кількостей антибактеріальних речовин передбачати їх визначення у замороженій рибі імпортного виробництва.

3. Рекомендується використовувати у практиці ветеринарної медицини спосіб санітарно-гігієнічної оцінки безпечності замороженої риби за кількістю психротрофних мікроорганізмів.

4. Результати досліджень увійшли до науково-практичних рекомендацій «Ветеринарно-санітарна експертиза замороженої риби за вмістом психротрофних мікроорганізмів» (затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10/1 від 19.10.2018 р.), які можуть використовуватися у науково-дослідних закладах і профільних установах ветеринарної медицини.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

1. **Малімон З. В.**, Кухтин М. Д., Гриневич Н. Є., Азиркіна І. М. Ветеринарно-санітарна оцінка замороженої риби імпортованої в Україну на наявність залишків антибактеріальних субстанцій. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини і біотехнологій імені С. З. Ґжицького. 2018. Т. 20. № 88. С. 36–41. (Здобувачем проведено дослідження замороженої риби на наявність залишкових кількостей антибактеріальних препаратів та проведено аналіз отриманих результатів).

2. **Малімон З. В.**, Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б. Токсико-біологічна оцінка м'яса замороженої риби за наявності залишків антибактеріальних препаратів. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини і біотехнологій імені С. З. Ґжицького. 2018. Т. 20. № (92). С. 125–129. (Здобувачем визначено токсико-біологічну оцінку і визначення відносної біологічної цінності м'яса замороженої риби за наявності у ній залишкових кількостей антибактеріальних препаратів та проведено аналіз отриманих результатів).

3. **Малімон З. В.**, Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б. Контамінація мезофільними та психротрофними мікроорганізмами замороженої риби залежно від

біохімічних показників якості. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2018. № 6 (3). С. 39–43. *(Здобувачем проведено хімічні дослідження замороженої риби: реакції з міді сульфату, на пероксидазу, загальних летких азотистих основ, рН та мікробіологічні дослідження на наявність мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів і психротрофної мікрофлори).*

4. Гаркавенко Т. О., **Малімон З. В.** Аналіз невідповідностей мікробіологічним критеріям, виявлених в імпортованій до України мороженій рибі і рибній продукції. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. 30. (2). С. 85–91. *(Здобувачем проведено аналіз результатів мікробіологічних досліджень імпортованої до України замороженої риби і рибних продуктів у період з 2013–2017 рр.).*

5. Малімон З. В. Характеристика мікробіологічних показників замороженої риби за наявності залишків антибактеріальних препаратів. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2018. № 2. С. 92–96.

Стаття у науковому виданні іншої держави

6. **Zoya Malimon**, Mykola Kukhtyn, Tetyana Garkavenko, Natalia Grynevych, Yulia Horiuk, Victor Horiuk. Microbiological Indicators of Frozen Fish and Sensitivity of Psychrotrophic Microflora to Antibiotics in the Absence and Presence of Residual Amounts of Antibacterial Drugs. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2019. 10 (1). P. 507–518. *(Здобувачем проведено мікробіологічні досліджень та порівняння стійкості до антибіотиків у мікрофлорі виділеної із замороженої риби за наявності антибактеріальних препаратів та за їх відсутності, аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).*

Методичні рекомендації

7. **Малімон З. В.**, Гаркавенко Т. О., Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б. Ветеринарно-санітарна експертиза замороженої риби за вмістом психротрофних мікроорганізмів: [методичні рекомендації]. Тернопіль, 2018. 15 с. *(Розглянуто та затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10/1 від 19.10.2018 р. Здобувачем виконано відбір проб замороженої риби, підготовлено їх для мікробіологічних досліджень, проведення досліджень з визначення кількісного вмісту психротрофної мікрофлори та взято участь у написанні рекомендацій).*

Тези наукових доповідей:

8. **Малімон З. В.**, Кухтин М. Д. Проблема залишків антибактеріальних субстанцій у замороженій рибі імпортованій в Україну. Актуальні задачі сучасних технологій: VII Міжнародна науково-технічна конференція молодих учених та студентів, м. Тернопіль, 28–29 листопада 2018 року: тези доповіді. Тернопіль, 2018. С. 113. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження з визначення залишкових кількостей антибактеріальних препаратів у замороженій рибі, імпортованій в Україну, та підготовлено матеріали до друку).*

9. **Малімон З. В.**, Кухтин М. Д. Аналіз замороженої риби імпортованої в Україну за мікробіологічними показниками. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених, присвячена відзначенню 100-річчя Національної академії аграрних наук України, м. Київ, 19 липня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 59–60. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та підготовлено матеріали до друку).*

АНОТАЦІЯ

Малімон З. В. Наукове обґрунтування мікробіологічних критеріїв імпортованої замороженої риби та її оцінка за залишковими кількостями антибактеріальних речовин. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Дисертаційне дослідження спрямовано на обґрунтування мікробіологічних критеріїв замороженої риби, імпортованої в Україну, та її контролю за залишковими кількостями антибактеріальних речовин. Особливу увагу акцентовано на мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу з урахуванням визначення кількості психротрофних мікроорганізмів у замороженій рибі. Встановлено, що психротрофна мікрофлора замороженої риби в 1,3–2,0 рази переважає кількість мезофільної мікрофлори та більшою мірою характеризує гігієнічні вимоги виробничого процесу. Виявлено, що $92,6 \pm 2,5$ % проб замороженої риби за кількістю мезофільних мікроорганізмів відповідали вимогам чинного стандарту. Водночас, під час контролю цієї риби за кількістю психротрофної мікрофлори встановлено, що проб, які перевищували показник 5×10^4 КУО/г було в 2,6 рази ($p < 0,05$) більше, ніж проб, контамінованих мезофільними аеробними та факультативно-анаеробними мікроорганізмами. Розроблено мікробіологічні критерії гігієни технологічного процесу виготовлення замороженої риби за кількістю психротрофної мікрофлори, які свідчать про дотримання гігієнічних вимог: $n=5$; $c=3$; $m=10000$ КУО/г; $M=50000$ КУО/г.

Встановлено, що найчастіше в імпортованій в Україну замороженій рибі виявляли антибактеріальні речовини із групи антибіотиків аміноглікозидів I–II покоління ($46,7 \pm 0,7$ %) та налідиксову кислоту ($19,0 \pm 0,2$ %) від загальної кількості встановлених позитивних випадків, що не перевищували максимально допустимий рівень. Крім того, доведено, що у замороженій рибі імпортного виробництва використовуються антибактеріальні речовини, дослідження яких не передбачено як планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів, так і Регламентом ЄС 37/2010.

Ключові слова: заморожена риба, психротрофні мікроорганізми, мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми, мікробіологічні критерії, залишкові кількості антибактеріальних речовин, чутливість до антибіотиків.

АННОТАЦИЯ

Малимон З. В. Научное обоснование микробиологических критериев импортируемой замороженной рыбы и ее оценка по остаточным количествам антибактериальных веществ. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.09 «Ветеринарно-санитарная экспертиза». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Диссертационное исследование направлено на обоснование микробиологических критериев замороженной рыбы, импортируемой в Украину, и ее оценки на наличие остаточных количеств антибактериальных веществ. Особое внимание акцентировано на микробиологические критерии гигиены технологического процесса с учетом определения количества психротрофной микрофлоры в замороженной рыбе. Установлено, что количество психротрофной микрофлоры замороженной рыбы в 1,3–2,0 раза превышает количество мезофильных бактерий и в большей степени характеризует гигиенические требования производственного процесса. Выявлено, что $92,6 \pm 2,5$ % проб замороженной рыбы с количеством мезофильных микроорганизмов соответствовали требованиям действующего стандарта. В то же время, при оценке этой рыбы, контаминированной психротрофной микрофлорой, установлено, что проб, превышающих показатель 5×10^4 КОЕ/г, в 2,6 раза ($p < 0,05$) больше, чем проб с количеством мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Установлено, что в пробах замороженной рыбы в процессе хранения при температуре -18°C в течение 8 месяцев с разным начальным количеством мезофильных микроорганизмов, их количество уменьшалось в 1,6–2,3 раза ($p < 0,05$). Интенсивность инаktivации мезофильных бактерий в пробах с незначительным микробным обсеменением была в 1,4 раза быстрее, по сравнению с пробами с большим количеством микроорганизмов.

В то же время, установлено, что психротрофная микрофлора замороженной рыбы в течение 8 месячного срока хранения при температуре -18°C не инаktivируется и является более стабильной, по сравнению с мезофильными бактериями. Выявлено незначительный рост микроскопических грибов в пробах замороженной рыбы с большим микробным обсеменением. Разработаны микробиологические критерии гигиены технологического процесса с учетом количества психротрофной микрофлоры в замороженной рыбе, что свидетельствует о соблюдении комплекса гигиенических требований: $n=5$, $c=3$; $m=10000$ КОЕ/г, $M=50000$ КОЕ/г. Предложенный план трех уровней оценивания замороженной рыбы по этому критерию характеризует соблюдение комплекса гигиенических требований при производстве и обороте замороженной рыбы, а также, при необходимости, позволяет вовремя принять соответствующие корректирующие действия.

Установлено, что чаще всего в импортированной в Украину замороженной рыбе выявляли антибактериальные вещества из группы

антибиотиков аминогликозидов I–II поколения ($46,7 \pm 0,7$ %) и налидиксовую кислоту ($19,0 \pm 0,2$ %) от общего количества положительных результатов. Выявлено, что в замороженной рыбе импортного производства используются антибактериальные вещества, контроль которых не предусмотрен планом как национального мониторинга остатков ветеринарных препаратов, так и Регламентом ЕС 37/2010.

В рыбе установлено наличие остаточных количеств антибиотиков: гентамицина, дифлоксацина и паромидина на верхней границе максимально допустимого уровня для данных антибиотиков – 100 мкг/кг. По сравнению с другими антибиотиками, остаточные количества пенициллинового ряда – пенициллин V и амоксициллин – выявляли в 2 раза меньше (максимально допустимый уровень для указанных антибиотиков – 50 мкг/кг). Обнаружено превышение максимально допустимого уровня остатков антибиотиков в замороженной рыбе для тетрациклина ($112,5 \pm 7,2$ мкг/кг при норме 100 мкг/кг) и для спектиномицина ($342,1 \pm 21,5$ мкг/кг при допустимом уровне 300 мкг/кг). На основании проведенных исследований предложено предусмотреть национальным законодательством исследования по определению остаточных количеств антибактериальных веществ в рыбе, которая импортируется в Украину.

Установлено, что при наличии остатков антимикробных веществ в замороженной рыбе, ее микробиологические показатели не превышали установленные в ДСТУ 4868:2007 нормативы. Меньше всего микробное обсеменение рыбы выявляли при наличии остаточных количеств антибиотиков фторхинолоновой, тетрациклиновой групп и аминогликозидов.

Исследование химических показателей замороженной рыбы, которые характеризуют ее свежесть, при наличии в ней остатков антибактериальных веществ, которые не превышали максимально допустимый уровень, соответствовали показателям свежей рыбы.

Установлено, что остаточные количества антибиотиков тетрациклинового ряда, которые выявлены в мясе замороженной рыбы в количестве, превышающем максимально допустимый уровень, проявляли умеренную токсичность на культуру *Tetrachymena pyriformis*, а относительная биологическая ценность рыбы была на 4,12 % ниже, по сравнению с контрольными образцами рыбы. Подтверждена необходимость проведения контроля остаточных количеств антибактериальных веществ в замороженной рыбе, которая импортируется в Украину.

Показано, что состав психротрофной микрофлоры замороженной рыбы при отсутствии в ней остатков антибактериальных веществ на 80 % представлен тремя родами бактерий: *Acinetobacter* – $39,7 \pm 2,8$ %, *Pseudomonas* – $30,1 \pm 2,4$ % и *Enterobacter* – $10,3 \pm 1,1$ %. В то же время, в замороженной рыбе с наличием остатков антибиотиков, по сравнению с микрофлорой замороженной рыбы без антибиотиков, установлен рост бактерий родов *Enterobacter* в 1,4 раза ($p < 0,05$), *Pseudomonas* – в 1,7 раза – до $50,7 \pm 3,7$ % ($p < 0,05$) и уменьшение в 1,8 раза ($p < 0,05$) бактерий рода *Acinetobacter* – до $21,6 \pm 1,4$ %.

При определении чувствительности психротрофных бактерий, выделенных из мяса замороженной рыбы при отсутствии остаточных количеств антибактериальных веществ, установлено, что чувствительными были 80,0–100 % штаммов. В то же время, установлено, что при наличии в замороженной рыбе остаточных количеств антибиотиков: тетрациклиновой, фторхинолоновой групп и аминогликозидов, штаммы психротрофных бактерий проявляли устойчивость к препаратам этих фармакологических групп.

Ключевые слова: замороженная рыба, психротрофная микрофлора, мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, микробиологические критерии, остаточные количества антибактериальных веществ, чувствительность к антибиотикам.

ANNOTATION

Malimon Z. V. Scientific Substantiation of Microbiological of Imported Frozen Fish and Its Assessment on Antibiotic Residues. – The Manuscript.

The thesis is submitted for the scientific degree of the candidate of veterinary sciences on specialty 16.00.09 «Veterinary and Sanitary Examination». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis research directed to justify of microbiological criteria of frozen fish imported into Ukraine, and its assessment on antibiotic residues. The special attention is focused on process microbiological hygiene criteria which are based on enumeration of psychrotrophic microorganisms in frozen fish. It has been established that the psychrotrophic microflora of frozen fish is quantitatively dominated than the of mesophilic microflora in 1.3–2.0 times and more characterizes the sanitary conditions of the production process. It has been found that the enumeration of mesophilic microorganisms in 92.6 ± 2.5 % samples of frozen fish was conformed to current requirements of the national standard. At the same time, in assessing such fish, the content of the psychrotrophic microflora in that samples were exceeded than 5×10^4 CFU/g and was in 2.6 times ($p < 0.05$) more than the samples which were contaminated of mesophilic aerobic and facultative anaerobes microorganisms.

It has been developed of process microbiological hygiene criteria which are based on enumeration of psychrotrophic microorganisms, which demonstrate to the compliance of a complex of hygienic measures from freezing to retail: $n=5$; $c=3$; $m=10000$ CFU/g; $M=50000$ CFU/g.

It was found that most of the frozen fish imported into Ukraine had antimicrobials from the group of aminoglycosides I–II generation (46.7 ± 0.7 %) and nalidixic acid (19.0 ± 0.2 %) from total positive samples. It was found that imported frozen fish contented antibacterial substances, researches of which are not provided as in the state monitoring plan for residues of veterinary medicines, as in the Regulation EU 37/2010.

Key words: frozen fish, psychrotrophic, mesophilic microflora, microbiological criteria, antibiotic residues, sensitivity to antibiotics.

Підписано до друку 38.07.1;
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16
Обл.-вид.арк. 0,9
Зам. № 3; 2624

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55

