

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
ІНСТИТУТ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

Н.М. ШУЛЬГА, А.О. БОВКУН, Л.А. МЛЕЧКО

***МІКРОСКОПІЮВАННЯ
У САНІТАРНО-
МІКРОБІОЛОГІЧНОМУ КОНТРОЛІ
ВИРОБНИЦТВА МОЛОЧНИХ
ПРОДУКТІВ***

Навчальний посібник

Київ 2008

УДК 637.075

Рецензент: к.б.н. Борщ Г.Г.

МІКРОСКОПЮВАННЯ У САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНОМУ КОНТРОЛІ ВИРОБНИЦТВА МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Навчальний посібник. - К.: ІПДО НУХТ, 2008. – 49 с.

ISBN

У посібнику розглянуто влаштування сучасного біологічного мікроскопу, будову освітлювальної, відтворюючої та візуалізуючої частини цього оптичного приладу. Детально подано настанови щодо роботи з мікроскопом, правила його технічного обслуговування. Розглянуто техніку приготування мікропрепаратів живих культур та фіксованих фарбованих препаратів, способи контролю чистоти заквасок, обладнання і якості готових продуктів з використанням методу мікроскопії.

Особливу увагу у посібнику приділено характеристиці важливої у молокопереробній галузі мікрофлори: заквашувальних бактерій, сторонніх, санітарно-показових та патогенних мікроорганізмів. Подано морфологічні, культуральні та деякі біохімічні властивості бактерій з відповідними ілюстраціями, наведено джерела забруднення молочних продуктів та спричинені сторонньою мікрофлорою вади. Видання доповнено переліками національних і міждержавних стандартів та нормативних і методичних документів щодо санітарно-мікробіологічного контролю у молочній промисловості.

Посібник призначено для студентів вузів, слухачів ІПДО НУХТ, фахівців молочної промисловості, працівників лабораторій.

Автори: Н.М.Шульга, А.О.Бовкун,
Л.А.Млечко

Редактор:

ISBN

© Н.М.Шульга, А.О.Бовкун,
Л.А.Млечко
© ІПДО НУХТ, 2008

ЗМІСТ

	Стор.
Вступ	4
Розділ 1. Сучасний мікроскоп. Влаштування та правила роботи з ним	5
1.1. Основні характеристики та види мікроскопів	5
1.2. Влаштування сучасного світлового біологічного мікроскопу	7
1.3. Порядок роботи з мікроскопом	12
1.4. Технічне обслуговування мікроскопу	14
Розділ 2. Техніка мікроскопіювання	
2.1. Мікроскопіювання препаратів живих культур	15
2.2. Мікроскопіювання фіксованих фарбованих препаратів	16
2.3. Застосування мікроскопіювання у мікробіологічному контролі	19
Розділ 3. Характеристика деяких важливих мікроорганізмів	
3.1. Заквашувальна мікрофлора	22
3.2. Технічно-шкідлива мікрофлора	31
3.3. Санітарно-показові та патогенні мікроорганізми	37
Перелік національних та міждержавних стандартів щодо санітарно-мікробіологічного контролю виробництва молочних продуктів, чинних в Україні станом на 1.09.2008 р.	42
Перелік основних нормативних та методичних документів щодо методів і порядку санітарно-мікробіологічного контролю виробництва молочних продуктів	45
Список використаної літератури	48

ВСТУП

Мікроорганізми у молочній промисловості відіграють особливу роль. Виробництво всіх кисломолочних продуктів, сирів, кисловершкового масла ґрунтується на використанні мікробіологічних процесів. Спеціально підібрані заквашувальні композиції застосовуються у вигляді бактеріальних концентратів як для виготовлення виробничих заквасок, так і для безпосереднього внесення у молоко. Від їхньої чистоти та активності залежить якість кисломолочної продукції.

В той же час виникнення вад та псування цих продуктів, а також продуктів, виготовлених без участі заквашувальних бактерій (питне молоко, вершки, солодко вершкове масло, сухі та консервовані молочні продукти, морозиво) спричиняються розвитком сторонньої, небажаної мікрофлори. У молоко та молочні продукти можуть потрапляти і патогенні (хворобливі) мікроорганізми. Якщо складаються сприятливі умови для їхнього розвитку (порушення технологічного процесу виробництва чи режимів зберігання, розгерметизація пакування тощо), то такі продукти можуть стати причиною серйозних харчових отруєнь. Така небезпека на сучасному етапі посилюється у зв'язку з погіршенням якості сировини, концентрацією виробництва, широким асортиментом продукції, тенденцією до подовження тривалості її зберігання. Протягом останніх років з'явилися нові пріоритети щодо мікробіологічної безпеки молочних продуктів. Серед них особливе значення надається збудникам з підвищеною агресивністю та зміненими біологічними властивостями, такими як ентерогенні штами кишкової палички, анаеробні клостридії, психротрофні мікроорганізми, сапрофітні бактерії. На тлі підвищення хронічної захворюваності населення, розповсюдження імунodefіцитів збільшуються ризики для споживачів продукції.

Таким чином проблема пильного мікробіологічного контролю продукції та санітарного стану виробництва нині особливо гостро стоїть у молокопереробній галузі. Поряд з методами кількісного підрахунку певних груп бактерій із застосуванням рідких і твердих поживних середовищ лабораторія повинна застосовувати й інструментальні методи дослідження та ідентифікації бактерій. Зокрема, на сучасному етапі жодна лабораторія не може обійтися без мікроскопу, а її працівники повинні володіти технікою мікроскопіювання.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ МІКРОСКОП. ВЛАШТУВАННЯ ТА ПРАВИЛА РОБОТИ З НИМ

1.1. Основні характеристики та види мікроскопів

Розрізнявальна здатність людського ока становить близько 100 мікрометрів (0,1 мм). Це приблизно відповідає товщині волосини. Щоб побачити об'єкти меншого розміру, необхідно мати спеціальне устаткування. Історія мікроскопа розпочалась кілька століть тому, коли спочатку з'явилися відшліфовані скельця, знайомі нам як лупи. Їх можна назвати пращурами сучасних мікроскопів. Винайдений голландським дослідником Антоні ван Левенгуком наприкінці XVII століття прилад на основі двухлінзової системи відкрив людству нові обрії, і насамперед, можливість дослідити світ живих клітин.

Відповідь на питання, що таке мікроскоп, полягає у самій назві цього приладу. Мікроскоп (від грецького малий та розглядати) – це оптичний інструмент, що дозволяє отримувати збільшене зображення дрібних об'єктів та деталей їхньої будови, розміри яких знаходяться поза межами розрізнявальної здатності людського ока.

Мікроскопи можуть бути простими та складними. Простий мікроскоп – це одна система лінз, наприклад, звичайна лупа. Комбінація двох або більше ступенів збільшення складає складний мікроскоп. Він має вищі показники збільшення, розрізнявальної здатності та контрасту.

Розрізнявальна здатність – це мінімальна відстань, на якій знаходяться дві точки, коли вони ще не зливаються в одну. Тобто цей показник свідчить про чіткість отриманого зображення двох близьких ліній. Чим більшою є розрізнявальна здатність мікроскопа, тим дрібніші об'єкти можливо спостерігати. Сучасний світловий мікроскоп приблизно у 500 раз підвищує можливість людського ока розрізняти дрібні об'єкти та має розрізнявальну здатність 0,2 мкм. Слід зазначити, що розрізнявальна здатність та збільшення не тотожні поняття. Якщо за допомогою мікроскопа отримати фотографії двох ліній, розташованих на відстані, меншій за 0,2 мкм, то збільшуючи зображення, ці лінії будуть зливатися в одну. Таким чином, можна отримати велике збільшення, але не поліпшити його розділення.

Підвищити даний показник можливо двома шляхами: освітлюючи об'єкт короткими променями світла, наприклад, ультрафіолетовими, або збільшуючи показник заломлення середовища (n), що межує з лінзою, щоб наблизити його до показника заломлення скла, на якому знаходиться об'єкт ($n_{\text{скла}} = 1,5$). В цілому мікроскопічний об'єкт можливо розглядати у трьох типах системи: сухій – між лінзою об'єктива та об'єктом знаходиться повітря ($n = 1,0$), водній – між лінзою об'єктива та об'єктом знаходиться крапля води ($n = 1,30$), масляній – лінза об'єктива занурюють у краплю імерсійного масла ($n = 1,52$).

Ще однією характеристикою мікроскопу є контраст зображення – це розрізнення яскравості зображення та фону. Якщо ця різниця менша за 3-4%, то об'єкти не можливо розпізнати, зображення залишається невидимим. На контраст впливають як властивості об'єкту, що змінюють світловий потік порівняно з фоном, так і здатність оптики зафіксувати різницю у властивостях світлових променів.

Нині ринок багатий на широкий асортимент різноманітних мікроскопів. Велика кількість видів мікроскопів залежить від того, що у сучасній науці практично жодна сфера не обходиться без цього приладу. Найчастіше використовують **оптичні лабораторні мікроскопи** таких видів:

- *світловий біологічний мікроскоп*. Його застосовують для біологічних та медичних досліджень прозорих об'єктів. Для такого мікроскопу характерним є широкий діапазон збільшень, а також наявність револьверної головки, що дає змогу швидко змінювати вибрану лінзу, та відповідно, ступень збільшення (від 50 до 2000 разів). У моделях такого типу доступні режими світлого та темного полів, фазовий контраст та поляризоване світло. Можливості цього приладу обмежені природою світла. Фізичні властивості світла – колір (довжина хвилі), яскравість (амплітуда хвилі), фаза, густина та напрямок розповсюдження світлового потоку – всі ці параметри впливають на роботу світлового мікроскопу.

- *стереомікроскоп*. Він забезпечує дійсне об'ємне (тривимірне) сприйняття мікроб'єкту та збільшує зображення від 3,5 до 88 разів. Такий прилад складається з двох окремих мікроскопічних систем. Сфера його застосування – складання мініатюрних електронних компонентів, технічний контроль, хірургічні операції.

- *люмінесцентний мікроскоп*. Робота цього приладу ґрунтується на освітленні зразку ультрафіолетовим світлом. Поглинаючи хвилі певної довжини, об'єкт випромінює видиме люмінесцентне світло. Такий мікроскоп використовують у біології та у медицині для діагностики.

- *темнопільний мікроскоп*. Його застосовують для отримання зображення прозорих живих об'єктів. Зразок у ньому розглядають за «косого» освітлення так, щоб прямі промені світла не мали змоги потрапити в об'єкти. Зображення формується світлом, яке дифраговане на об'єктив, внаслідок чого об'єкт виглядає дуже світлим на темному фоні.

- *фазово-контрастний мікроскоп*. Такий мікроскоп працює за допомогою спеціальних приладів, які зсувають за фазою на половину довжини хвилі частину світла, що проходить крізь об'єкти, завдяки чому досягається контраст зображення. Його застосовують для дослідження прозорих об'єктів.

Електронний мікроскоп, на відміну від оптичних приладів, дає змогу отримувати збільшення об'єктів у сотні тисяч разів, використовуючи для їхнього освітлення електрони. Завдяки цьому досліджують такі дрібні деталі, які неможливо розрізнити у оптичному мікроскопі. Зображення у ньому формується за допомогою електричних та магнітних полів. Сфера

застосування мікроскопів такого типу – наукові дослідження у різних галузях біології, фізики, хімії, медицини.

Рентгенівський мікроскоп – прилад для досліджень мікроскопічної будови речовин за допомогою рентгенівського випромінювання. Розрізнявальна здатність такого мікроскопу вдвічі вища за можливість оптичних приладів.

1.2. Влаштування сучасного світлового біологічного мікроскопу

Функціональні та конструктивно-технологічні частини мікроскопу призначені для забезпечення його стабільної роботи та одержання стійкого, максимально чіткого збільшеного зображення об'єкта.

Мікроскоп включає три основні функціональні частини:

1. Освітлювальна частина. Її призначення – створення світлового потоку, який дає змогу освітити об'єкт таким чином, щоб інші частини мікроскопу максимально точно виконували свої функції. Освітлювальна частина мікроскопу скрізного світла розташована за об'єктом під об'єктивом у прямих мікроскопах та попереду об'єкту над об'єктивом у інвертованих. Освітлювальна частина включає джерело світла (лампа та електричний блок живлення) та оптико-механічну систему (колектор, конденсор, польова та апертурна регульовані чи ірисові діафрагми).

2. Відтворююча частина. Її призначення – відтворення об'єкту у площині зображення з необхідною для дослідження якістю зображення та збільшення. Ця система забезпечує першу стадію збільшення та розташована після об'єктива до площини зображення мікроскопа. Відтворююча частина включає об'єктив і проміжну оптичну систему.

3. Візуалізуюча частина. Функція цієї частини – одержання реального зображення об'єкта оком людини, на фотоплівці чи комп'ютерному моніторі з додатковим збільшенням (друга стадія збільшення). Її розташування – між площиною зображення об'єктива та очима спостерігача (камерою, фотокамерою). Візуалізуюча частина складається з моно- чи бінокулярної насадки, системи додаткового збільшення, а також системи аналізу, документування зображення з відповідними елементами (комп'ютерні програми, принтери, тощо).

Серед конструктивних частин мікроскопу виділяють оптичну та механічну.

Схему монокулярного світлового мікроскопу наведено на рис.1.

Об'єктив – одна з найважливіших частин мікроскопа, оскільки він визначає корисне збільшення об'єкту. Об'єктиви – оптичні системи, що призначені для побудови мікроскопічного зображення з відповідним збільшенням, розрізнявальною здатністю, точністю відтворення за кольором та формою об'єкта досліджень. Вони мають складну конструкцію, яка включає кілька окремих лінз та компонентів, зібраних з 2-х чи 3-х лінз.

Кількість лінз обумовлена призначенням мікроскопу. Чим вище якість зображення об'єктиву, тим складніша його оптична схема.

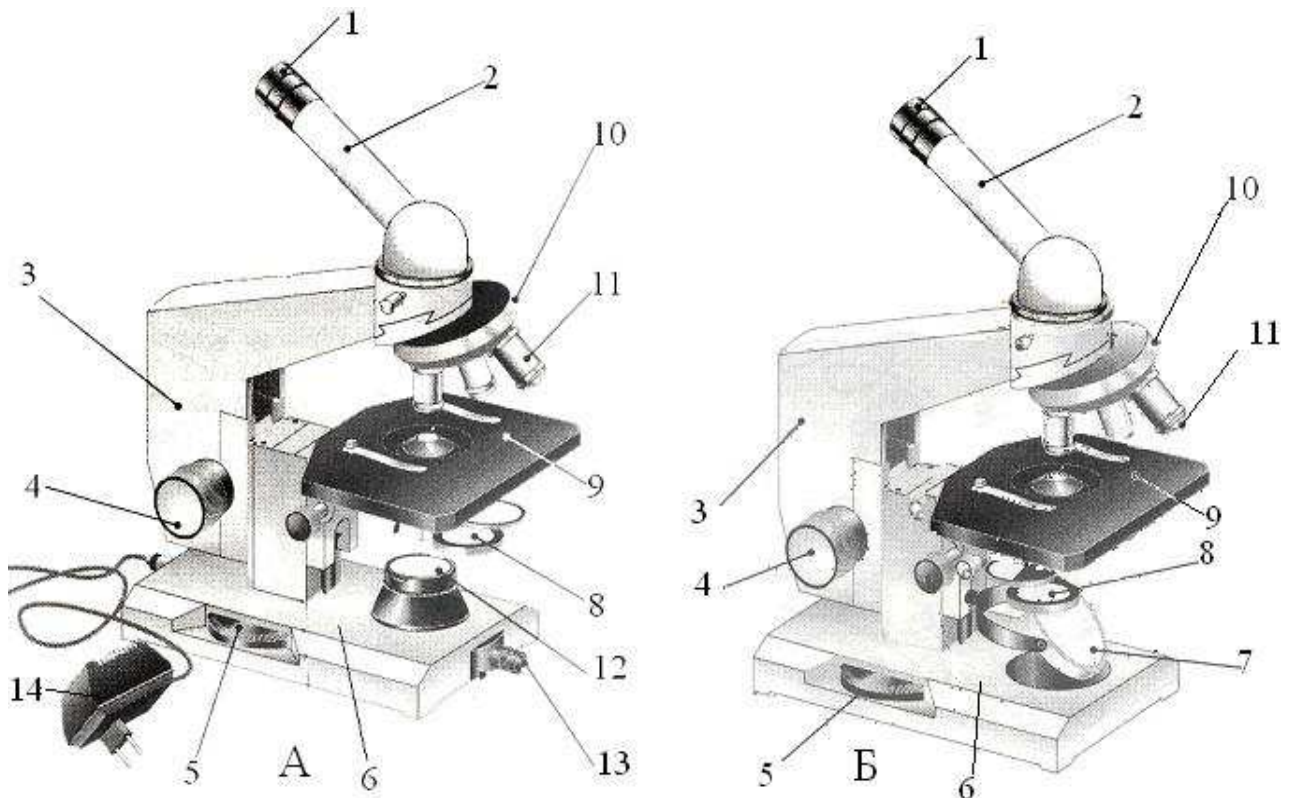


Рис. 1. Влаштування світлових мікроскопів (А - МИКМЕД-1; Б – БИОЛАМ):

1 - окуляр, 2 - тубус, 3 - тубусотримач, 4 - гвинт грубого налаштування, 5 - мікрогвинт, 6 - підставка, 7 - дзеркало, 8 - конденсор, ірисова діафрагма та світлофільтр, 9 - предметний стіл, 10 – револьверний пристрій, 11 – об'єктив, 12 - корпус колекторної лінзи, 13 - патрон с лампою, 14 – електричний блок живлення.

Збільшення об'єктиву залежить від фокусної відстані фронтальної лінзи та, відповідно, від її кривизни. З підвищенням кривизни фронтальної лінзи зменшується фокусна відстань, тому чим вище збільшення дає об'єктив, тим нижче його слід опускати над площиною препарату. Так, при роботі з 8х об'єктивом відстань між лінзою об'єктиву та досліджуваним об'єктом становить 8,53 мм, при 40х – 0,4 мм, при 90х – 0,1 мм.

Зображення, отримане за допомогою лінз об'єктиву, має низку недоліків – аберацій. Найістотніші – сферична (кожна крапка об'єкта відображається як коло, зображення нечітке, розмите) та хроматична (зображення набуває забарвлення, якого об'єкт насправді не має). Об'єктиви, у яких ці аберації скоректовано неповністю, називають ахроматами. Вони містять до шести лінз та дають найчіткіше зображення у центральній частині поля зору. Досконаліші об'єктиви – апохромати – складаються з 10-12 лінз, вони характеризуються хроматичною похибкою, у 10 разів меншою, ніж

ахромати. Планохромати повністю усувають викривлення поля зору, їх застосовують під час макрофотографування. Така класифікація об'єтивів заснована на принципі розрахункової якості зображення. Крім цього, об'єтиви групують за параметричними та конструктивними ознаками, а також за методами дослідження.

За параметричними ознаками вирізняють:

- об'єтиви малих (до 10х), середніх (до 50х) та великих збільшень (понад 50х), а також об'єтиви з надвеликим збільшенням (понад 100х);
- об'єтиви зі збільшеною робочою відстанню (вільною відстанню між об'єктом та нижнім краєм лінзи);
- об'єтиви, що забезпечують спостереження у межах нормального лінійного поля (до 18 мм), широкопольні об'єтиви (до 22,5 мм) та надширокопольні;
- об'єтиви стандартні (45 мм, 33 мм) та нестандартні за висотою та інші.

За конструктивними ознаками існує така класифікація:

- об'єтиви з пружинною оправою або без неї;
- об'єтиви з вмонтованою ірисовою діафрагмою;
- об'єтиви з коректуючою оправою, яка забезпечує рух оптичних елементів всередині об'єктива та інші.

За методами дослідження розділяють:

- об'єтиви для роботи з покривним склом чи без нього;
- об'єтиви скрізного та відбитого світла, люмінесцентні, поляризаційні, фазові об'єтиви, тощо;
- імерсійні та безімерсійні об'єтиви.

Імерсія (від латинського - занурення) - рідина, що заповнює простір між об'єктом спостереження та об'єктивом. Найчастіше застосовують масляну імерсію (кедрова олія чи спеціальні синтетичні масла), а також водну. Імерсію застосовують у тих випадках, коли необхідно підвищити розрізняльну здатність мікроскопу. Вона забезпечує підвищення видимості об'єкта, збільшення глибини досліджуваного шару, що залежить від показника заломлення середовища, а також зменшує кількість розсіяного світла за рахунок уникнення відблисків.

Інформацію про об'єktiv маркують на його корпусі з позначенням таких параметрів: збільшення (8х, 40х, 90х, 100х), числова апертура (0,20; 0,65), додаткове літерне маркування, яке характеризує призначення об'єктива.

Окуляр – оптична система, призначена для побудови мікроскопічного зображення на сітчатці ока спостерігача. У загальному вигляді окуляр складається з групи лінз, вмонтованих у металевий циліндр. Між лінзами розташована постійна діафрагма, яка визначає межі поля зору. Нижня лінза фокусує зображення об'єкта, побудоване об'єктивом у площині діафрагми, а верхня призначена для безпосереднього спостереження. Окуляр класифікують за такими ж принципами, як і об'єтиви: звичайні та плоского поля, з винесеним зіницями для людей з дефектами зору, ширококутові,

тощо. Збільшення окулярів зазвичай позначено на них цифрами: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$, $\times 20$. Окуляри не виявляють нових деталей будови, а лише дає пряме збільшення зображення досліджуваного об'єкта, отримане об'єктивом.

Для визначення загального збільшення мікроскопа необхідно помножити збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Бінокуляри мають додаткове збільшення насадки (вона призначена для спостереження об'єкта одночасно обома очами).

У старих моделях мікроскопів для спрямування променів світла крізь конденсор та отвір предметного столика на об'єкт застосовують *дзеркало*. Воно має дві поверхні: пласку та ввігнуту. У лабораторіях з розсіяним світлом налаштовують для роботи ввігнуте дзеркало.

У сучасних моделях мікроскопів вмонтовано освітлювальну систему з корпусу колекторної лінзи, патрону з лампою та електричного блоку живлення. Яскравість накаливання лампи також можливо регулювати спеціальним тумблером.

Конденсор складається з 2-3 лінз, вставлених у металевий циліндр. Він призначений для того, щоб зібрати віддзеркалене світло у пучок та спрямувати його у площину мікроскопічного препарату. В разі підйому чи опускання конденсора за допомогою спеціального гвинта відповідно концентрується чи розсіюється світло, що потрапляє від дзеркала на об'єкт.

Ірисова діафрагма розташована між дзеркалом та конденсором. Її призначення – зміна діаметру світлового потоку, спрямованого дзеркалом через конденсор на об'єкт відповідно до діаметру фронтальної лінзи об'єктива. Вона складається з тонких металевих чи пластикових пластинок, які за допомогою важеля можна з'єднати, повністю закриваючи нижню лінзу конденсора, або розвести, збільшуючи потік світла.

Кільце з матовим склом чи *світлофільтром* зменшує рівень освітлення об'єкта. Воно розташоване під діафрагмою та пересувається у горизонтальній площині.

Механічна частина мікроскопа складається з підставки, коробки з гвинтами налаштування тубуса та тубусотримача, кронштейна конденсора та гвинта його переміщення, револьвера і предметного стола.

Підставка – це основа мікроскопа, на якій кріпляться всі інші його складові частини.

Тубусотримач - це блок, на якому закріплені вузли зміни об'єтивів, механізм грубого та точного налаштування різкості зображення мікроскопа, кріплення предметного столика, вузол змінних насадок.

Тубус або трубка – циліндр, у який зверху вставляють окуляри. Тубус рухомо з'єднаний з головою тубусотримача, його фіксують стопорним гвинтом у певному положенні. Послабивши стопорний гвинт, тубус можна зняти.

Гвинт грубого налаштування використовують для значного переміщення тубусотримача та, відповідно, об'єктива з метою фокусування об'єкта при малому збільшенні.

Коробка з механізмом *мікрогвинта* побудована на принципі взаємопов'язаних шестерень та нерухомо прикріплена до підставки. Цей гвинт необхідний для незначного переміщення тубусотримача та, відповідно, об'єктива на відстань мікрометрів. Повний оберт цього гвинта пересуває тубусотримач на 100 мкм, а на одну позначку – на 2 мкм. Для уникнення псування мікрогвинта дозволяється проводити його налаштування не більше ніж на півоберта.

Револьвер призначений для швидкої зміни об'єктивів, які загвинчуються у його гнізда. Сучасні мікроскопи можуть бути оснащені трьох- або чотирьохгніздовими револьверними насадками. Центроване положення об'єктива забезпечує засувка, розташована всередині револьвера.

Предметний стіл призначений для розташування на ньому препарату. В середині столика розташований круглий отвір, куди входить фронтальна лінза конденсора. Предметний стіл також обладнаний двома затискачами, які дозволяють зафіксувати препарат. Більшість мікроскопів оснащено додатковими приладами з координатною розміткою, за допомогою яких можна плавно та безперервно переміщувати об'єкт у площині предметного столика мікроскопа і отримувати можливість вводити у поле зору ту чи іншу частину досліджуваного об'єкта.

Сучасні мікроскопи часто укомплектовують додатковими приладами: рисувальними апаратами, за допомогою яких можливо не лише спостерігати за об'єктами, але й відтворювати зображення. З розвитком техніки мікроскопи почали оснащувати фото- та відеокамерами, що значно розширило можливості дослідників. Крім якісних досліджень сучасний мікроскоп дає змогу проводити й кількісні – вимірювати розмір мікроскопічних предметів за допомогою гвинтового окулярного чи цифрового мікрометра. Нові моделі цифрових мікроскопів мають можливість підключення до комп'ютеру з наступною обробкою даних досліджень за допомогою спеціальних програм.

Нині на ринку представлено широкий асортимент біологічних мікроскопів для роботи у лабораторії різних виробників. Найпопулярніші моделі – виробництва Росії «Биомед», «Микромед», «Микмед», «Биолам» («Ломо»), США «Levenhuk BioView», Іспанії «Motic», Німеччини «Konus», світових виробників «Olympus», «Nikon» та інші. Це мікроскопи з моно-, бі- чи тринокулярними насадками (рис. 2), трьох- чи чотирьохревольверні, виконані на високому технічному рівні.

Під час вибору нового мікроскопу для мікробіологічних досліджень необхідно звертати увагу на якість об'єктивів (збільшення, числова апертура, розрізнявальна здатність), наявність змінних окулярів та можливість їх додаткового фокусування для забезпечення чіткого зображення, якість галогенового освітлювача і конденсора, легкість та зручність регулювання приладу, комплектацію столиком з механізмом для переміщення мікропрепарату у полі зору.



А



Б



В

Рис. 2. Сучасні мікроскопи: А - монокуляр, Б - бінокуляр, В - тринокуляр

1.3. Порядок роботи з мікроскопом

Під час роботи з мікроскопом слід дотримуватися таких настанов. Загальне налаштування мікроскопу:

- Перед початком роботи мікроскоп необхідно оглянути, м'якою серветкою витерти від пилу та забруднень об'єктиви, окуляри, дзеркало та електроосвітлювач.
- Працювати з мікроскопом слід сидячи. Прилад необхідно встановити перед собою на 2-3 см від краю стола таким чином, щоб окуляри були розташовані на рівні очей, а лікті знайшли зручну опору на столі. Під час роботи не слід рухати мікроскоп.
- Необхідно повністю відкрити діафрагму та підняти конденсор у крайнє верхнє положення для досягнення максимального рівня освітлення.
- Якщо мікроскоп оснащений освітлювачем, необхідно спочатку під'єднати його до джерела живлення, лише потім ввімкнути лампу та встановити бажану яскравість світла. У іншому випадку необхідно встановити освітлення у полі зору мікроскопу, використовуючи електроосвітлювач чи дзеркало. Спостерігаючи в окуляр та користуючись дзеркалом з ввігнутою стороною, потрібно спрямувати світло від вікна в об'єктив, а потім максимально та рівномірно освітити поле зору.
- Скорегувати яскравість освітлення можна кількома способами. Для усунення сильного світла необхідно прикрити діафрагму чи зменшити накал лампи, однак при цьому зображення набуває жовтого забарвлення внаслідок зниження температури лампи. Інший спосіб полягає в застосуванні світлофільтрів. Можливо використовувати набір нейтральних фільтрів з різними коефіцієнтами світло поглинання та підібрати такий, що буде максимально зручний для роботи.

Робота з сухими об'єктивами (збільшення 4х, 8х, 10х, 40х):

- Роботу з мікроскопом завжди потрібно розпочинати з малого збільшення.
- Підготовлений мікропрепарат необхідно покласти на предметний столик так, щоб досліджуваний об'єкт знаходився безпосередньо під об'єктивом. Предметне скло слід зафіксувати затискачами. Спостерігаючи збоку, за допомогою макрогвинта опускати об'єктив доти, поки відстань між нижньою лінзою та мікропрепаратом не досягне 4-5 мм.
- Дивлячись в окуляр, необхідно плавно обертати гвинт грубого налаштування, щоб скерувати об'єктив до такого положення, коли буде видно зображення. Необхідно уникати контакту фронтальної лінзи об'єктиву зі склом, щоб запобігти пошкодженню. Для детального налаштування можна скористатися мікрогвинтом.
- Пересуваючи препарат, необхідно знайти зручне поле зору та розташувати його по центру.
- Якщо конструкцією мікроскопа передбачено регулювання окулярів, необхідно їх налаштувати так, щоб зображення було чітко сфокусоване.
- Для одержання якісного зображення необхідно використовувати лише чисті, знежирені предметні та покривні скельця без будь-яких пошкоджень (подряпин, сколів).
- Після перегляду мікропрепарату револьверну насадку необхідно повернути у робоче положення найменшого об'єктиву та зняти предметне скло зі столика.

Для дослідження об'єкта при великому збільшенні з **використанням масляної імерсійної системи (об'єктиви 90х, 100х)** слід керуватися такими додатковими настановами:

- На підготовлений мікропрепарат на предметному склі необхідно нанести краплю імерсійного масла. Імерсійне масло слід наносити лише на сухий препарат, інакше внаслідок утворення водно-масляної емульсії якість зображення різко знизиться.
- Варто пересвідчитися у якості імерсійного масла: воно повинно бути прозорим світло-жовтого кольору, без домішок та бульбашок повітря, зі слабким специфічним запахом, оскільки неякісне імерсійне масло не лише погіршує зображення, але й спричиняє помутніння об'єктива. Якісне імерсійне масло зберігає свої властивості у закритій скляній ємності за температури 20°C - не менше 12 місяців, за температури 50 °C – не менше 3 місяців, у відкритій посудині – не менше 10 діб.
- Спочатку потрібно встановити обрану ділянку у центр поля зору мікроскопу за малого збільшення, фіксуючи предметне скло затискачем. Потім обертом револьверної насадки змінити об'єктив на імерсійний так, щоб він зайняв робоче положення.
- Спостерігаючи збоку, за допомогою макрогвинта необхідно опустити об'єктив до його занурення у імерсійне масло. Потім за допомогою мікрометричного гвинта, дивлячись у окуляр, потрібно підняти тубус, поки

не з'явиться пофарбований фон. Чіткого зображення можна досягти, користуючись налаштуванням мікрогвинта. Обертати мікрогвинт слід обережно, без застосування сили, щоб запобігти пошкодженню фронтальної лінзи.

- Після роботи з імерсійною системою, необхідно підняти об'єктив, повернути револьверну насадку для встановлення малого збільшення та зняти препарат зі столика. Імерсійне масло з об'єктива потрібно зняти чистою фланелевою серветкою чи фільтрувальним папером. Плівку імерсійного масла, яка утворюється на об'єктиві, необхідно видалити серветкою, змоченою в органічних розчинниках (чистий спирт, авіаційний бензин, петролейний ефір).

1.4. Технічне обслуговування мікроскопу

- Мікроскоп необхідно зберігати у сухому прохолодному місці. Не бажано тримати мікроскоп біля батарей центрального опалення та вікон з інтенсивними сонячними променями, а поряд з розчинами лугів, кислот та інших речовин, що можуть спричинити корозію металевих деталей. Завжди після роботи слід накривати мікроскоп чохлом, щоб запобігти накопиченню пилу.

- Періодично слід прибирати пил та забруднення з механічних частин мікроскопа. Регулярно слід змащувати рухомі частини невеликою кількістю антикорозійною сумішшю. Необхідно слідкувати за чистотою оптичної системи мікроскопа.

- Не варто торкатися лінз руками, оскільки наявність відбитків пальців різко погіршує якість зображення. В разі забруднення лінз необхідно ретельно протерти їх м'якою серветкою та спиртом. Також потрібно не допускати забруднення масляних об'єктивів залишками масла.

- Положення лінз у оптичній системі мікроскопа точно відкаліброване. Не можна виймати лінзи з об'єктивів, окулярів чи конденсора самотійно.

- Необхідно уникати самотійного демонтажу механізму мікроскопа, а проводити ремонт, використовуючи лише змінні частини (об'єктиви, окуляри, бінокулярна насадка, лампа). В разі виникнення серйозніших поломок необхідно звернутися до спеціалістів.

- Якщо мікроскопом тривалий час не будуть користуватися, необхідно зняти об'єктив та окуляр і зберігати їх у герметичній коробці. На місце окуляра потрібно вставити спеціальну захисну кришку, щоб уникнути потрапляння пилу всередину приладу.

- Перед підключенням мікроскопу, оснащеного електричним блоком живлення, необхідно пересвідчитися, що вимикач освітлювальної системи знаходиться у положенні «вимкнено».

- При необхідності транспортування мікроскопу на далекі відстані необхідно упакувати прилад та уникати різких струсів та ударів.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКА МІКРОСКОПЮВАННЯ

2.1. Мікроскопіювання препаратів живих культур

Сукупність технологій приготування об'єктів для дослідження та практичного використання мікроскопа називають мікроскопіюванням.

Для визначення форми бактерій, їх здатності до спороутворення, рухливості достатньо дослідити їх у живому стані у препаратах «розчавлена» та «висяча крапля». Для дослідження актиноміцетів та грибів виконують препарат «відбиток».

Приготування препарату «розчавлена крапля»

На чисте предметне скло наносять невелику краплю стерильної води чи фізіологічного розчину. Бактеріологічною петлею, прокаленою у полум'ї пальника чи спиртівки та охолодженою, вміщують досліджуваний матеріал у краплю води та перемішують до одержання однорідної суспензії. В разі дослідження культури з рідкого середовища краплю води можна не наносити. Покривне скло ставлять на ребро біля краю краплі з мікроорганізмами та поступово опускають, намагаючись, щоб між скельцями не утворилися бульбашки повітря. Ручкою петлі прижимають покривне скло до предметного. Надлишок рідини, що виступила з-під покривного скла, усувають фільтрувальним папером. Приготовлений препарат відразу ж досліджують у сухій системі, оскільки рідина висихає і мікроскопіювання ускладнюється.

У такому препараті можна встановити форму та розміри бактерій, рухливості, наявності спор. Спори у водному препараті відрізняються від коків чітким контуром, вони відбивають світло та здаються темними і блискучими. В разі дослідження рухливості бактерій важливо відрізнити справжній рух за допомогою жгутиків (самі жгутики у препараті побачити не вдасться) від броунівського, коли клітини залишаються на місці, виконуючи коливальні рухи, чи перемішуються зі струмом рідини.

Під час мікробіологічного контролю молочних продуктів приготування «розчавленої краплі» буде доречним при ідентифікації дріжджів та бактерій групи кишкової палички, дослідженні сторонньої мікрофлори сировини і молочних продуктів, змивів з обладнання, повітря. Такий препарат швидко готується, не потребує додаткових реактивів, але він є недовговічним.

Препарат «висяча крапля» також застосовують для спостереження рухливості бактерій, здатності до спороутворення. Для приготування препарату невелику краплю суспензії мікроорганізмів наносять на покривне скло, перевертають його краплею донизу та вміщують на спеціальне предметне скло з лункою. Краї лунки попередньо змащують вазеліном. Крапля залишається герметично зафіксованою у вологій камері, що дає змогу спостерігати за об'єктом тривалий час.

Препарат «відбиток» виконують для ознайомлення з формою спор та міцелію плісняв, мікроскопічних грибів. Його приготування здійснюють

наступним чином. Чисте покривне скельце накладають на газон мікроорганізму, злегка натискають на нього пінцетом та відразу ж знімають, намагаючись не пошкодити відбиток. На предметне скло наносять краплю стерильної води чи фізіологічного розчину і вміщують отриманий препарат відбитком вниз. Мікроскопіювання проводять у сухій системі.

2.2. Мікроскопіювання фіксованих фарбованих препаратів

Для орієнтовної характеристики мікрофлори молока та кисломолочних продуктів готують фіксовані мікробіологічні препарати, пофарбовані спеціальними барвниками.

Фарбування мікроорганізмів – складний фізико-хімічний процес, де важливу роль відіграють явища електроадсорбції, капілярності, хімічної спорідненості між барвником та об'єктом. Деякі барвники характеризуються вибірковою спорідненістю до окремих складових мікробної клітини та застосовуються для їх виокремлення.

Для фарбування бактерій використовують анілінові барвники (основні, кислі та нейтральні). Найбільше значення мають основні реактиви: основний фуксин, сафранін (червоне забарвлення), генціановий фіолетовий, метиленовий синій, малахітовий зелений. Для фарбування препаратів зазвичай готують спиртові, водно-спиртові та водні розчини.

Фіксований препарат готують для виявлення морфологічних особливостей та кількісного підрахунку, перевірки чистоти культури тощо. Такі препарати можна зберігати тривалий час, вони мають високу контрастність, дають змогу диференційовано визначати клітинну структуру, робота з ними є безпечною.

У мікробіологічному контролі молочних продуктів для фарбування препаратів, як правило, застосовують метиленову синь.

Готування розчину метиленового синього.

Спочатку готують концентрований базовий спиртовий розчин. Для цього 10 г порошку метиленового синього змішують з 100 см³ 96 % етилового спирту. Розчин вміщують у термостат за температури (37±1) °С, витримують протягом 24 год та фільтрують у термостаті за цієї ж температури. Зберігають концентрований базовий розчин метиленового синього у ємності, захищеній від світла, не довше трьох місяців.

Робочий розчин для фарбування препаратів готують наступним чином. До 30 см³ концентрованого базового розчину метиленового синього додають 100 см³ дистильованої води та 1 см³ розчину гідрооксиду калію з масовою часткою 10 г/дм³. Термін зберігання робочого розчину барвника – не більше 1 місяця.

Приготування фіксованих фарбованих препаратів складається з кількох етапів:

- *Приготування мазка.* На знежирене предметне скло наносять невелику краплю стерильної води чи фізіологічного розчину. Бактеріологічною петлею, прокаленою у полум'ї пальника чи спиртівки та

охолодженою, вміщують досліджуваний матеріал (наприклад, колонію з твердого поживного середовища) у краплю води, перемішують до одержання однорідної суспензії та розподіляють тонким шаром на площі 1-2 см². В разі дослідження культури з рідкого середовища (заквасок, кисломолочних продуктів) краплю води можна не наносити.

- *Сушіння мазка.* Одержаний препарат сушать за кімнатної температури чи у потоці теплого повітря високо над полум'ям пальника, тримаючи скло мазком догори, інакше клітини мікроорганізмів деформуються.

- *Фіксування.* Метою цієї операції є знищити бактерії, забезпечити добру адгезію (прилипання) мазка до скла, підготування мазок до фарбування. Для фіксування сухий препарат кілька раз проводять крізь полум'я пальника (до легкого опіку руки від дотику до скла).

- *Фарбування.* Фіксований препарат покривають розчином барвника. Для одержання більш чистих препаратів барвник наливають на фільтрувальний папір, покладений поверх препарату. Слідкують, щоб під час фарбування розчин барвника на мазку не висихав. Через 1-3 хвилини мазок промивають слабким струмом води доти, поки вода, що стікає, не стане прозорою. Препарат обережно промокають фільтрувальним папером або сушать на повітрі та переглядають під мікроскопом.

Під час виконання простих методів фарбування використовують один барвник, в цьому випадку фарбується вся клітина і добре видно її форми і розміри. Складні методи полягають у послідовному фарбуванні двома або декількома барвниками, при цьому забарвлюється не вся клітина, а лише окремі її структури. У правильно виконаному фарбованому та добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а забарвлення набувають лише клітини мікроорганізмів або їх структури.

У мікробіологічній практиці з-поміж складних методів фарбування найчастіше застосовують *фарбування за Грамом*. Цей спосіб вперше було запропоновано датським вченим Х.Грамом у 1884 році. Суть методу полягає у тому, що під час обробки генціановим фіолетовим та йодом у клітинах одних мікроорганізмів утворюються стійкий, нерозчинний у спирті комплекс. Такі бактерії відносять до грам позитивних, вони залишаються забарвленими у синє-фіолетовий колір. Грамнегативні бактерії знебарвлюються при обробці спиртом і їх ідентифікують, додатково фарбуючи препарат контрастним барвником – водним фуксином. Таким чином, механізм фарбування за Грамом ґрунтується на особливостях хімічного складу та будови клітинних стінок бактерій.

Готування реактивів для фарбування за Грамом

- *Розчин фуксину основного*

Спочатку готують насичений розчин фуксину основного для цього 10 г порошку фуксину основного кристалічного змішують з 100 см³ 96 % етилового спирту. Розчин ставлять у термостат і витримують за температури (37±1) °С протягом 24 год, періодично перемішуючи. Упродовж зазначеного часу значна частина фарби розчиняється, і на дні колби лишається осад, який

свідчить про насичення розчину. Для приготування робочого розчину фуксину основного до 1 см³ насиченого розчину цього барвника додають 9 см³ дистильованої води. Термін зберігання насиченого розчину – не більше 3 місяців, робочого – не більше 1 місяця за температури (0– 5) °С.

- *Розчин карболового генціанового фіолетового*

1 г генціанового фіолетового розтирають у ступці з 2 г кристалічної карболової кислоти. Невеликими порціями додають 10 см³ 96 % етилового спирту. Після отримання гомогенної суспензії додають за постійного перемішування 100 см³ дистильованої води. Розчин фільтрують крізь паперовий фільтр. Розчин є нестійким до світла, тому його необхідно зберігати у ємностях з темного скла. Термін зберігання барвника - не довше 3 місяців за температури (0– 5) °С.

- *Розчин Люголя*

У порцеляновій ступці розтирають 1 г йоду кристалічного і 2 г йодиду калію, додають порціями по 5 см³ дистильовану воду до повного розчинення реактивів. Зберігають у темній склянці.

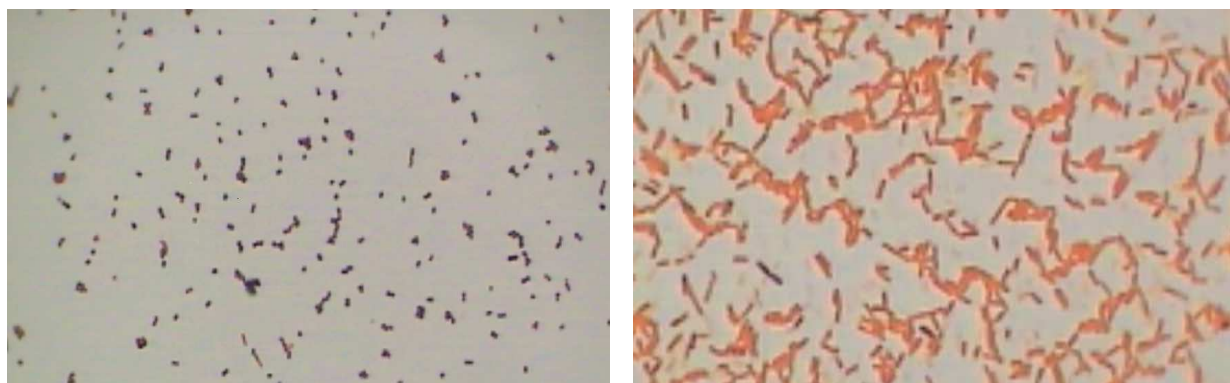
Для фарбування беруть клітини молодих культур бактерій (18—24 год), оскільки з віком у бактеріальній популяції збільшується кількість мертвих клітин, які фарбуються як грамнегативні.

Фарбування за Грамом проводять наступним чином. Готують фіксований мазок мікроорганізмів за методикою, наведеною вище. Мазок має бути тонким. Фіксований мазок накривають клаптиком фільтрувального паперу і наносять на нього розчин карболового генціанового фіолетового. Препарат фарбують упродовж 2 хвилин. Знімають папір, зливають фарбу, мазок промивають водою і наливають на нього розчин Люголю. Через 2 хвилини розчин зливають, а скельце кілька раз занурюють у ємність з 96% етиловим спиртом упродовж 30-60 секунд, поки з мазка не перестане стікати фарба. Знебарвлення слід проводити дуже швидко, щоб не вимити фарбу з грампозитивних клітин. Мазок швидко промивають водою, додатково наносять на нього водний фуксин і витримують упродовж (1-2) хв. Додаткове контрастне фарбування розчином фуксину має бути короткотривалим, щоб не замаскувати попередньо нанесену фарбу. Препарат знову промивають водою, висушують фільтрувальним папером чи на повітрі та мікроскопіюють.

Можливо заздалегідь приготувати паперові смужки, просочені розчином кристалічного фіолетового (папір для фарбування за Синьовим). Для цього у 100 см³ 96 % етилового спирту розчиняють 1 г кристалічного фіолетового та 1 см³ гліцерину. Фарбу наливають в місткість. Фільтрувальний папір нарізають смужками шириною приблизно 2 см та довжиною 30-40 см. Смужки занурюють на 30-60 секунд у фарбу так, щоб вони рівномірно пофарбувалися. Папірці висушують, розрізають на шматочки та довжиною 4-5 см. Смужки зберігають необмежений час у банках з темного скла з притертими корками. Під час виконання аналізу фіксований мазок накривають такою паперовою смужкою та наносять поверх невелику кількість води, яка повністю вбирається папером. Витримують 2 хвилини та

знімають пінцетом паперову смужку. Подальші операції виконують за стандартною методикою, як описано вище.

У полі зору мікроскопу грампозитивні бактерії мають синє-фіолетове забарвлення, а грамнегативні – червоне (рис. 3). Всі заквашувальні культури у молочній галузі (молочнокислі, біфідо-, пропіоновокислі бактерії), а також деякі представники сторонньої мікрофлори (маслянокислі бактерії, мікрококи, спороутворювальні термостійкі бацили, стафілококи) є грампозитивними. Коліформні, гнилісні мікроорганізми, сальмонели – грамнегативні. Таким чином метод фарбування за Грамом у практиці мікробіологічного контролю може бути використаний для ідентифікації санітарно-показових бактерій групи кишкової палички.



А

Б

Рис. 3. Мікрофотографії бактерій: А – грампозитивні, Б – грамнегативні

Попереднє визначення належності бактерій до грампозитивних чи грамнегативних можна також проводити за допомогою експрес-аналізу з 3% водним розчином КОН. Для цього на предметне скло наносять краплю розчину лугу та додають досліджувану культуру. За допомогою бактеріальної петлі розмішують упродовж 1 хвилини. Якщо суспензія мікроорганізмів стає в'язкою чи драглеподібною, то культура відноситься до грамнегативних, у іншому випадку – грампозитивних.

2.3. Застосування мікроскопіювання у мікробіологічному контролі

Згідно з Інструкцією щодо мікробіологічного контролю на підприємствах молочної промисловості мікроскопіювання проводять під час контролю чистоти закваски та якості готових кисломолочних продуктів, для підтвердження типових колоній дріжджів, біфідо- та пропіоновокислих бактерій, при визначенні наявності термостійких бацил у змивах з обладнання тощо.

Чистоту закваски, а також співвідношення між компонентами закваски, перевіряють щоденно в разі приготування виробничої закваски, та періодично при використанні бактеріальних препаратів прямого внесення.

Мікроскопічні препарати заквасок переглядають не менші, ніж у 10 полях зору. Мікроскопічна картина повинна відповідати складу мікрофлори, зазначеній на маркуванні вихідної заквашувальної культури. У таблиці 1 подано сучасні назви мікроорганізмів та відповідні попередні аналоги, що зустрічаються у літературі та нормативній документації.

Таблиця 1

Родові та видові назви бактерій згідно з сучасною номенклатурою

Сучасна назва: рід, вид згідно з [16]	Попередня назва
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
<i>Lactococcus</i>	Стрептококи групи N роду <i>Streptococcus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> або <i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i> або <i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Streptococcus acetoinicus</i>
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Streptococcus citrovorum</i> , <i>Leuconostoc citrovorum</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Leuconostoc dextranicum</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>

Закваски для виробництва простокваші, сметани, сиру кисломолочного, твердих сичужних сирів з низькою температурою другого нагрівання (типу російського, голландського тощо) як правило, містять мезофільні лактококи *Lactococcus lactis* ssp.

lactis, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Часто для прискорення кислотоутворення до складу цих заквасок залучають термофільні стрептококи *Streptococcus thermophilus*. Бактеріальні препарати для сичужних сирів можуть містити лактобацили видів *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus plantarum* (чи у симбіозі з лактококами, чи як окремі захисні культури).

У заквасці, призначеній для виробництва ряжанки, варенцю повинні бути присутні термофільні стрептококи *S. thermophilus*.

Мікрофлора йогурту складається переважно з термофільного стрептококу та невеликої кількості болгарської палички. До складу біойогурту залучають культури ацидофільної палички, а біфідойогурту – біфідобактерії. Останні є складовою мікрофлори таких кисломолочних продуктів профілактичної дії як «Симбівіт», «Біфівіт» тощо.

Ацидофілін та інші кисломолочні напої типу «Наріне» виробляють, використовуючи ацидофільні палички.

Для виробництва сичужних сирів швейцарської групи застосовують заквашувальні культури, які містять термофільний стрептокок, лактобацили *Lactobacillus helveticus* чи *Lactobacillus lactis*, а також пропіоновокислі бактерії.

У кефірній заквасці присутні лактококи, термофільні стрептококи, палички, дріжджі, оцтовокислі бактерії.

Якщо виникає сумнів у мікробіологічній чистоті заквасок, а при мікроскопію ванні сторонню мікрофлору виявити не вдається, із заквашувальних культур роблять посіви від нульового до 4-5 розведення у стерильне знежирене молоко. Посіви інкубують упродовж 3 діб за рекомендованої для даного виду закваски температури. З кожного сквашеного розведення готують мікроскопічні препарати та переглядають їх, відмічаючи наявність чи відсутність сторонніх мікроорганізмів. Застосування такого методу дає можливість виявити у заквашувальній культурі сторонню мікрофлору у невеликій кількості (менше тисячі у 1 см³), що неможливо встановити безпосереднім мікроскопіюванням.

В разі підозри забруднення продукту термостійкими молочнокислими паличками готують розведення досліджуваної проби. Засівають пробірки зі стерильним знежиреним молоком від нульового до 4-5 розведення, інкубують за температури 42°C упродовж 3 діб. З утворених згустків готують мікроскопічні препарати та переглядають їх під мікроскопом для встановлення наявності термостійких паличок.

Для виявлення термостійких паличок на технологічному обладнанні стерильним тампоном, змоченим стерильним фізіологічним розчином, протирають досліджувану ділянку. Тампон занурюють у пробірку зі стерильним молоком та витримують за температури 42°Т упродовж 24-42 годин. Після інкубування переглядають приготовлений мікроскопічний препарат, фіксуючи наявність чи відсутність забруднення.

РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЯКИХ ВАЖЛИВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

3.1. Заквашувальна мікрофлора

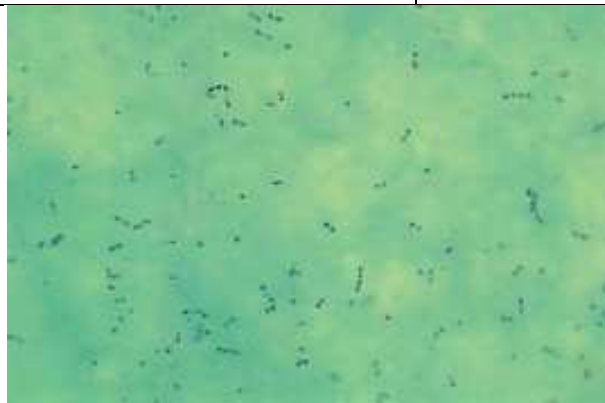
Молочнокислі бактерії – специфічна група мікроорганізмів, які зумовлюють молочнокисле бродіння. Поряд з основним продуктом бродіння – молочною кислотою – утворюються побічні: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, спирти, тощо. Перші наукові дослідження цих мікроорганізмів провів Луї Пастер, результати яких він опублікував у 1857 р. З тих пір лактобактерії постійно у центрі уваги спеціалістів. У природі молочнокислі бактерії представлені у вигляді шаровидних (коків) та паличковидних (лактобацили) форми. Всі молочнокислі бактерії грампозитивні, спор не утворюють, нерухливі, каталазонегативні.

Рід *Lactococcus* об'єднує кілька підвидів: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* – молочний лактокок, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* – вершковий лактокок, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* – ароматоутворюючий лактокок. Ці мікроорганізми широко використовуються у молочній промисловості у складі заквашувальних культур для простокваші, сметани, сиру кисломолочного, сичужних сирів, є основною складовою мікрофлори кефірного грибка. За морфологічними ознаками вони схожі між собою: сферичні чи овальні клітини розміром 0,5-1,2х0,5-1,5 мкм, які розташовані попарно чи у вигляді коротких ланцюжків. У молодих культурах деякі штами *L. lactis* ssp. *cremoris* можуть формувати слизову капсулу та характеризуються утворенням довших ланцюжків (рис. 4). Властивості бактерій роду *Lactococcus* зведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Властивості бактерій роду *Lactococcus*

Назва показника	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Відношення до кисню	Факультативні анаероби		
Температура росту:	Мезофіли		
оптимальна	28-32°C	26-30°C	28-32°C
гранична	10-42°C	10-42°C	10-38°C
Тривалість сквашування молока	4-12 год.	8-48 год.	5-16 год.
Гранична кислотність у молоці	110-130 °Т	80-110°Т	100-120°Т
Граничні рН росту	4,5-8,5 од.рН	4,5-8,0 од.рН	4,5-8,5 од.рН
Максимальний % NaCl	6%	4%	2%
Продукти метаболізму	молочна кислота (гомо-ферментативні)	молочна кислота, CO ₂ , діацетил, ацетоїн (гетеро-ферментативні)	молочна кислота (гомо-ферментативні)



А



Б

Рис. 4. *Lactococcus*: А – *L. lactis* ssp. *lactis*, Б – *L. lactis* ssp. *cremoris*

Серед бактерій роду *Leuconostoc* промислове значення має вид *Leuconostoc mesenteroides* (підвиди *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*). Використовуються у складі заквасок для сметани, сичужних сирів з низькою температурою другого нагрівання типу «Едам», обумовлюючи утворення вічок сиру, кисломолочних напоїв, є

складовою мікрофлори кефірного грибка. Лейконостоки мають сферичні дещо витягнуті клітини розміром 0,5-0,7х0,7-1,2 мкм, часто оточені слизовою капсулою (рис. 5). Розташовуються парами чи ланцюжками.

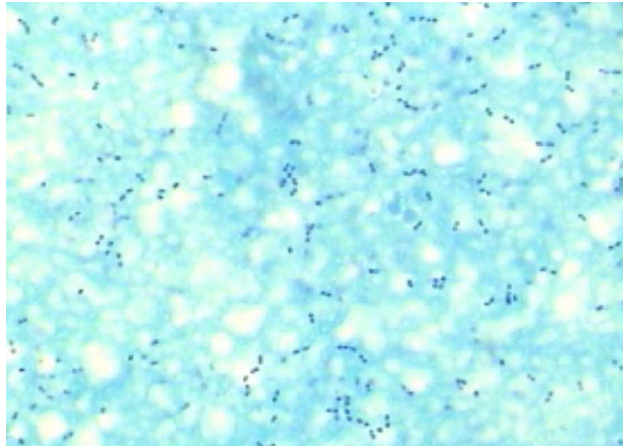


Рис. 5. *Leuconostoc mesenteroides*

Відношення до кисню: факультативний анаероб

Температура росту: мезофіли, оптимальна – 22-30 °С, гранична – 10-42 °С

Тривалість сквашування молока: від 48 год. до 5 діб

Гранична кислотність у молоці: 60-110 °Т

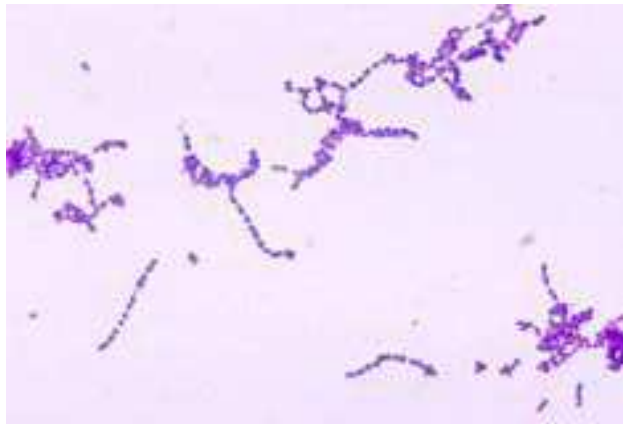
Граничні рН росту: 4,5-8,0 од.рН

Максимальний % NaCl: 3%

Продукти метаболізму: оцтова і молочна кислоти, CO₂, діацетил, ацетоїн (гетероферментативні)

Особливості: деякі штами утворюють слиз у середовищах з декстрином чи сахарозою. Штами, які не утворюють слиз, не витримують нагрівання до 55°C упродовж 30 хв, слизеутворюючі штами зберігають життєздатність у цукрових розчинах за температури 80-85°C. Лейконостоки володіють ліполітичною активністю (здатні розщеплювати жир).

Серед бактерій **роду *Streptococcus*** промислове значення має вид *Streptococcus thermophilus*. Вони є основною складовою заквасок для ряжанки, йогурту та інших кисломолочних напоїв, сирів з високою температурою другого нагрівання, часто залучають при виробництві сметани, сиру кисломолочного. У мікропрепараті термофільний стрептокок має вигляд шароподібних чи овальних клітин діаметром 0,7-2,0 мкм, частіше розташованих довгими звитими ланцюжками, рідше – парами (рис. 6). Їх клітини значно крупніші, ніж лактококи.

Рис. 6. *Streptococcus thermophilus*

Відношення до кисню: факультативний анаероб

Температура росту: термофіл, оптимальна – 37-42 °С, гранична – 15-52 °С

Тривалість сквашування молока: 3,5-7 год.

Гранична кислотність у молоці: 110-120°Т

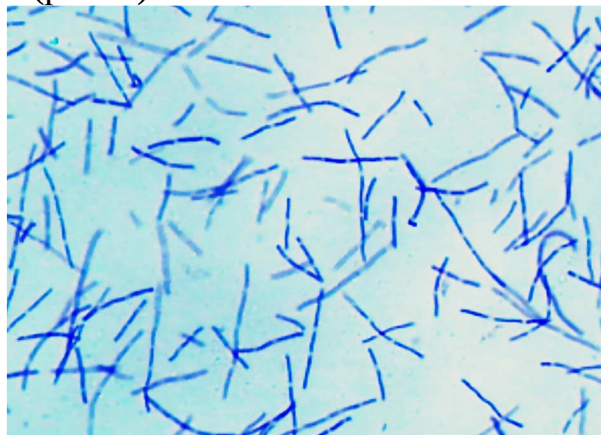
Граничні рН росту: 4,5-8,0 од.рН

Максимальний % NaCl: 6,5%

Продукти метаболізму: молочна кислота, ацетоїн (проміжне положення між гомо- та гетеро ферментативними бактеріями)

Особливості: серед *Streptococcus thermophilus* розрізняють слизоутворюючі штами, які у молоці утворюють в'язкі згустки, та неслизоутворюючі, що формують щільний згусток з незначним відділенням сироватки. Термофільні стрептококи володіють термостійкістю, витримуючи температуру 75°С упродовж 15 хв, тому часто залишається після пастеризації у молоці.

Lactobacillus acidophilus використовують під час виробництва ацидофільних продуктів, біойогурту, функціональних молочних продуктів, інколи – твердих сирів. Клітини паличкоподібні, зазвичай правильної форми, довжиною від 2 до 20 мкм, товщиною близько 1,0 мкм, поодинокі чи в коротких ланцюжках (рис. 7).

Рис. 7. *L. acidophilus*

Відношення до кисню: факультативний анаероб чи мікроаерофіл

Температура росту: термофіли, оптимальна – 36-38°С, гранична – 20-55°С

Тривалість сквашування молока: 3-5 год.

Гранична кислотність у молоці: 200-350 °Т

Граничні рН росту: 3,5-9,0 од.рН

Максимальний % NaCl: 3%

Продукти метаболізму: молочна кислота (гомоферментативні)

Особливості: ацидофільні палички здатні пригнічувати розвиток шкідливих бактерій (володіють антагоністичною активністю). Їх бактерицидні властивості обумовлені утворенням специфічних антибіотичних речовин, дія яких посилюється у присутності молочної кислоти, завдяки чому *L. acidophilus* відносять до пробіотичних культур.

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus залучають до складу заквасок для виробництва йогурту, айрану та інших кисломолочних продуктів, сичужних сирів. Це довгі та короткі палички від 5 до 40 мкм товщиною 1,0-1,5 мкм, часто розташовані у вигляді ланцюжків (рис. 8). При фарбуванні мікропрепаратів метиленовим синім у клітинах інколи спостерігаються чітко виражені метакроматичні зерна, нерівномірно пофарбовані ділянки протоплазми, що обумовлено несприятливими умовами культивування.



Рис. 8. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*

Відношення до кисню: факультативний анаероб чи мікроаерофіл

Температура росту: термофіли, оптимальна – 40-45°C, гранична – 22-53 °С

Тривалість сквашування молока: 3-5 год.

Гранична кислотність у молоці: 200-300 °Т

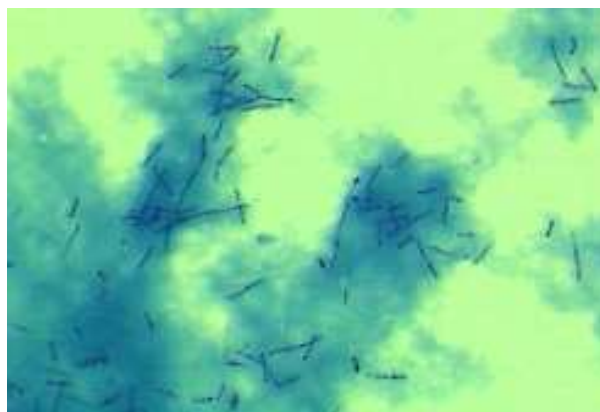
Граничні рН росту: 3,5-8,5 од.рН

Максимальний % NaCl: 3%

Продукти метаболізму: молочна кислота (гомоферментативні)

Особливості: здатні пригнічувати розвиток сторонньої мікрофлори.

Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis – лактобацили, які застосовують у виробництві сичужних сирів. Їх морфологія схожа: палички від 5 до 20 мкм товщиною близько 1,0 мкм, поодинокі та у коротких ланцюжках (рис. 9).

Рис. 9. *L. helveticus*

Відношення до кисню: Факультативні анаероби

Температура росту: термофіли, оптимальна – 40-42 °С, гранична – 22-53 °С

Тривалість сквашування молока: 4-6 год.

Гранична кислотність у молоці: 200-300 °Т

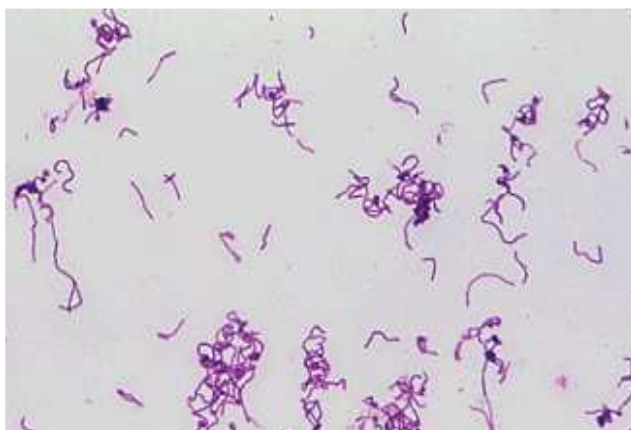
Граничні рН росту: 3,5-8,5 од.рН

Максимальний % NaCl: 4%

Продукти метаболізму: молочна кислота (гомоферментативні)

Особливості: володіють високою протеолітичною активністю (здатні швидко розщеплювати білки молока), завдяки чому прискорюють визрівання сирів.

Lactobacillus casei ssp. casei*, *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum беруть участь у визріванні сирів з низькою температурою другого нагрівання, використовуються у виробництві кисломолочних напоїв функціонального призначення, виявляються у складі мікрофлори кефірного грибка. За морфологічними ознаками ці бактерії між собою майже не відрізняються. Це тонкі короткі палички товщиною від 0,5 до 1,0 мкм та довжиною від 2 до 4 мкм, часто зігнуті, розташовані поодинокі чи у ланцюжках (рис 10). Мікропрепарати цих паличок, вирощених у молоці, фарбуються не чітко. Властивості зазначених бактерій – у таблиці 3.

Рис. 10. *L. casei ssp. casei*

Таблиця 3

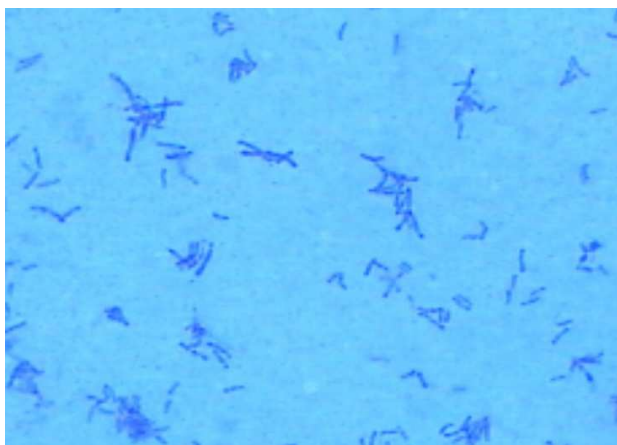
Властивості *L. casei* та *L. plantarum*

Назва показника	<i>L. casei ssp. casei</i> ,	<i>L. casei ssp. rhamnosus</i>
-----------------	------------------------------	--------------------------------

	<i>L. plantarum</i>	
Відношення до кисню:	факультативні анаероби чи мікроаерофіли	
Температура росту:	мезофільні	термофільні
оптимальна	30-35°C	37-45°C
гранична	15-43°C	22-52°C
Тривалість сквашування молока	12-72 год.	12-48 год.
Гранична кислотність у молоці	160-180 °Т	
Граничні рН росту	3,5-8,5 од.рН	
Максимальний % NaCl	6,5%	
Продукти метаболізму	молочна кислота, частково оцтова кислота, CO ₂ , діацетил (гетероферментативні)	
Особливості	характеризуються найвищою серед молочнокислих бактерій солестійкістю, здатністю рости у безвуглеводних середовищах, володіють антагоністичною активністю щодо сторонніх мікроорганізмів, в т.ч. маслянокислих бактерій	

Біфідобактерії – це облігатна та домінуюча частина кишкової мікрофлори людини і теплокровних тварин. Вони проявляють високу антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, добре приживаються у кишковому тракті.

Серед представників **роду *Bifidobacterium*** у молочній промисловості в основному використовують види: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*. Їх практичне застосування - у виробництві ферментованих молочних продуктів функціонального призначення. Клітини біфідобактерій є надзвичайно варіабельними за формою паличками: прямі, вигнуті, зігнуті, розгалужені, роздвоєні Y- чи V-форми, булавовидні чи гантелевидні товщиною 0,5-1,3 мкм та довжиною 1,5-8 мкм. Клітини розташовуються поодинокі, парами чи у вигляді «китайських ієрогліфів» (рис. 11). Грампозитивні, спор та капсул не утворюють, нерухливі, каталазонегативні. При культивуванні біфідобактерій у млоці чи печінковому бульйоні розгалуження зникає, клітини стають грамваріабельними, не чітко фарбуються, з'являється багато гранульованих форм, які схожі на коки. Грануляцію також можна спостерігати у середовищах з високим вмістом сухих речовин.

Рис. 11. *B. Bifidum*

Відношення до кисню: анаероби, але у процесі культивування набувають здатності розвиватися у присутності деякої кількості кисню

Температура росту: термофіли, оптимальна – 36-38°C, гранична – 20-50 °C

Тривалість сквашування молока: від 12 год. до 5 діб, залежить від способу підготовки інокуляту, наявності стимулюючих ростових речовин

Гранична кислотність у молоці: 120-130 °T

Граничні pH росту: 4,5-8,5 од.pH

Максимальний % NaCl: 6%

Продукти метаболізму: молочна та оцтова кислота у співвідношенні 2:3.

Пропіоновокислі бактерії є незамінними мікроорганізмами у сироробства під час виробництва сирів швейцарської групи («Ементаль», «Радомер» тощо), обумовлюючи специфічний солодкуватий присмак та великі вічки сирів цього виду. Промислово важливий вид - ***Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii***, які здатні до ферментування лактози. Це палочки, здатні змінювати форму, товщиною 0,5-0,8 мкм та 1-5 мкм у довжину, часто булавовидної форми з одним закругленим кінцем, а іншим – звуженим, деякі клітини можуть бути коковидними, роздвоєними чи розгалуженими, але ниткоподібні форми відсутні. Розташування клітин поодинокі, у парах, коротких ланцюжках, V- чи Y-конфігураціях, а також групами у вигляді «китайських ієрогліфів» (рис. 12). Грампозитивні, нерухливі, спор не утворюють, каталазопозитивні.

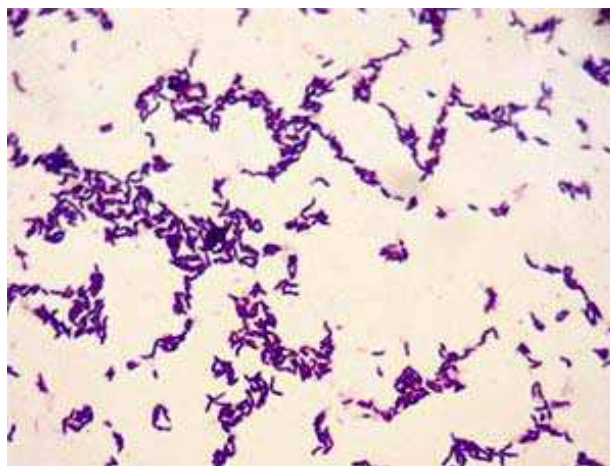


Рис. 12. *P. freudenreichii*

Відношення до кисню: факультативні анаероби, але краще ростуть у анаеробних умовах

Температура росту: мезофіли, оптимальна – 30-32°C, гранична – 15-45 °C

pH росту: оптимальна – 7,0 од.рН, гранична - 4,5-8,0 од.рН

Максимальний % NaCl: 2%

Продукти метаболізму: пропіонова та оцтова кислота, CO₂, ароматичні сполуки, спирти

Особливості: синтезують вітамін B₁₂ та фолієву кислоту, незамінних для організму людини, завдяки продукуванню бактеріоцинів та пропіонової кислоти пригнічують розвиток сторонніх мікроорганізмів. У виробництві сирів розвиваються лише у «бродильній камері», ріст пропіоновокислих бактерій стимулюють лактобацили.

Кефірні грибки - це природний симбіоз молочнокислих, пропіоновокислих, оцтовокислих бактерій та дріжджів. Вони є окремими живими тілами, здатними до самостійного розвитку та відтворення. Співвідношення між мікроорганізмами кефірних грибків є динамічним і істотно залежить від багатьох факторів, як-то температури, складу молока, способу його оброблення, терміну сквашування, тощо. Повністю відтворити цю природну систему в лабораторних умовах ще не вдалося нікому. Для виробництва кефіру можна застосовувати безпосередньо кефірні грибки та отриману з їхнім використанням кефірну грибкову закваску.

До нормальної мікрофлори кефірної закваски відносять такі основні групи бактерій: гомо- і гетероферментативні молочнокислі мікроорганізми родів *Lactococcus*, *Leuconostoc* молочнокислі палички *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, дріжджі (лактозоброджуючі *Kluyveromyces marxianus* та ті, що не ферментують лактозу - *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces exiguus*); оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti* (рис. 13). Роль цих мікроорганізмів є важливою, оскільки саме вони, розвиваючись у тісному симбіозі під час ферментування молока, забезпечують специфічні органолептичні показники та функціональну активність готового продукту.

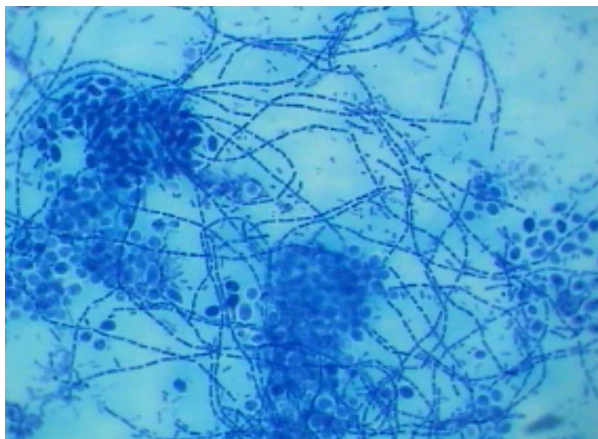
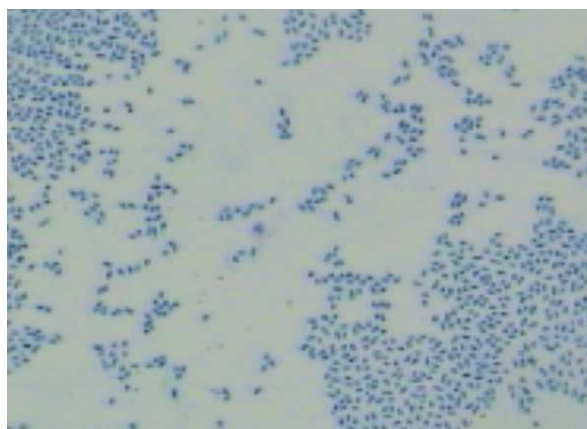


Рис. 13. Грибкова кефірна закваска

Оцтовокислі бактерії – типовий вид *Acetobacter aceti* – є обов'язковою складовою мікрофлори симбіотичної грибкової кефірної закваски. Це дрібні прямі чи злегка зігнуті палички товщиною 0,6-0,8 мкм та довжиною 1,0-4,0 мкм. Зустрічаються еліпсоподібні, подовжені, розгалужені чи коковидні форми, які розташовані хаотично – поодинокі, у парах, у ланцюжках (рис. 14). Клітини рухливі, жгутики розташовані перитрихіально, зустрічаються нерухомі штами. За Грамом фарбуються негативно, у старих культурах деякі штами стають грамваріабельними. Спор та капсул не утворюють, каталазопозитивні.

Рис. 14. *A. aceti*

Відношення до кисню: аероби

Температура росту: мезофіли, оптимальна – 25-30°C, гранична – 5-42°C

pH росту: оптимальна – 5,4-6,3 од.рН, гранична 4,0-7,5 од. рН

Продукти метаболізму: окислюють етанол, накопичуючи 5-9% оцтової кислоти, гідролізують лактати з утворенням CO₂

Особливості: у молоці у чистій культурі практично не ростуть, оскільки не зброджують лактозу. Добре розвиваються у кефірній заквасці у симбіозі з молочнокислими бактеріями та дріжджами за температури 20°C, однак при надмірному розвитку ацетобактерій спостерігається вада – тягучість та слизкість кефірної закваски та кефіру. В інших молочних продуктах *A. aceti* є сторонньою мікрофлорою, яка спричиняє аналогічну ваду.

3.2. Технічно-шкідлива мікрофлора

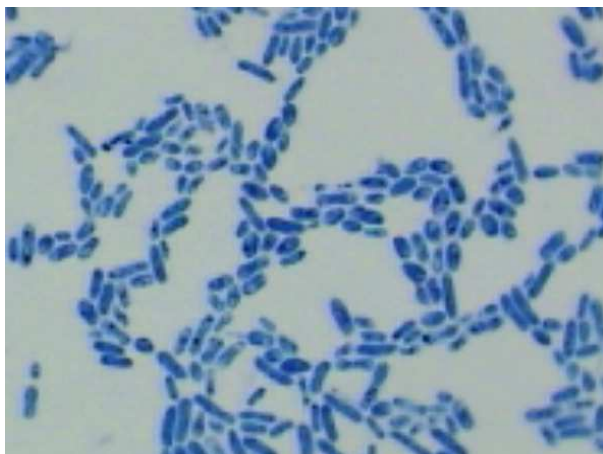
Дріжджі. Класифікація дріжджів ґрунтується на різниці у характері їх вегетативного розмноження (ділення, почкування), спороутворенні, а також морфологічним та фізіологічним ознаками. У молоці та молочних продуктах зустрічаються дріжджі, які утворюють спори, та неспороутворювальні. Можливість дріжджів розвиватися у молоці обумовлена їх здатністю до ферментування лактози та наявністю у продукті молочнокислої мікрофлори, що володіє лактозою активністю.

У молочній промисловості дріжджі як заквашувальна мікрофлора застосовуються у виробництві кефіру (грибкова кефірна закваска), айрану, кумису. Це дріжджі, які здатні зброджувати лактозу з утворенням етанолу, CO₂, органічних кислот.

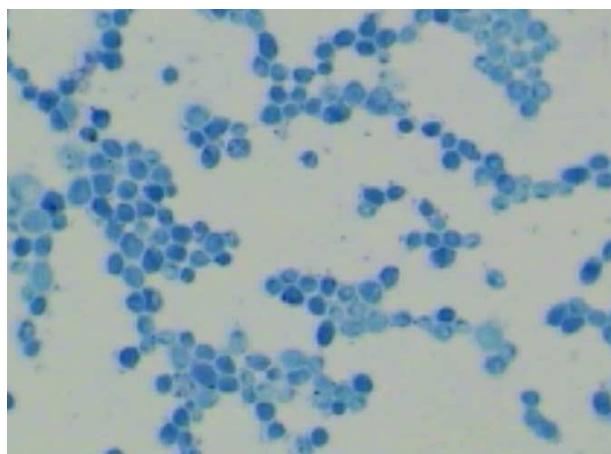
Дріжджі, які утворюють на поверхні кисломолочних продуктів, сироватки плівку під час зберігання – *Candida mycoderma* – неспороутворювальні, не здатні до спиртового бродіння та газоутворення, але окислюють вуглеводи.

Так звані «дикі» дріжджі не зброджують лактозу, але ферментують інші вуглеводи з утворенням вуглекислого газу, добре розвиваються з молочнокислими бактеріями. Зустрічаються осмотолерантні види, здатні розвиватися за вмісту цукру понад 40%.

Форма клітин у дріжджів різних видів може бути від сферичної чи овальної до витягнутої циліндричної (рис. 15). Дріжджі нерухомі, капсул не утворюють, аскміцети утворюють спори, які формуються всередині клітини по 2, 4, 8 та більше штук. Величина клітин варіює у широких межах від 2-5х3-7 мкм до 15 мкм.



А



Б

Рис. 15. Дріжджі: А- *Sacharomyces*, Б – *Torulopsis*

Відношення до кисню: аероби чи факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 25-30°C, мінімальна – 5-12°C (деякі види можуть розвиватися за температури мінус 3°C), максимальна – 40 °C

pH росту: оптимальна – 4,5-6,0 од. pH, гранична – 3,0-9,0 од.pH

Температура загибелі вегетативних клітин – 65-70°C з витримкою 15-20с

Температура загибелі спор – 75-85°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина, повітря, цукор, фруктові-ягідні наповнювачі, вода, пил, обладнання, стіни цехів та підвалів

Продукти метаболізму: спирти, CO₂, кислоти

Вади продуктів: спиртові смак та запах, надмірне газоутворення, бомбаж консервів, спучування сирів, сиру кисломолочного, сиркових виробів та інших кисломолочних продуктів, запакованих у герметичну тару.

Плісняви. Під назвою «плісняви» об'єднують представників різних класів грибів. Вегетативне тіло грибів організовано у вигляді міцелію (пухнастий павутиноподібний наліт різного забарвлення). Плісняви розмножуються спорами та ділянками міцелію. Міцелій таких грибів, як *Mucor*, *Rhizopus* несептований, на окремих його гілочках утворюються спорангієносці з шаровидними спорангіями, заповненими ендоспорами. Міцелій аскоміцетів (*Penicillium*, *Aspergillus*) септований, вони утворюють переважно конідіальні спораношення.

Будову колоній та міцелію, його розгалуження, розташування спораносців можна вивчати на агаризованому поживному середовищі у чашках Петрі при малому збільшенні мікроскопу, у препараті «відбиток», а також у фіксованих препаратах (рис. 16).

У молочній промисловості препарати плісняв як заквашувальну мікрофлору застосовують лише у виробництві м'яких сичужних сирів: «Рокфору», «Камамберу».

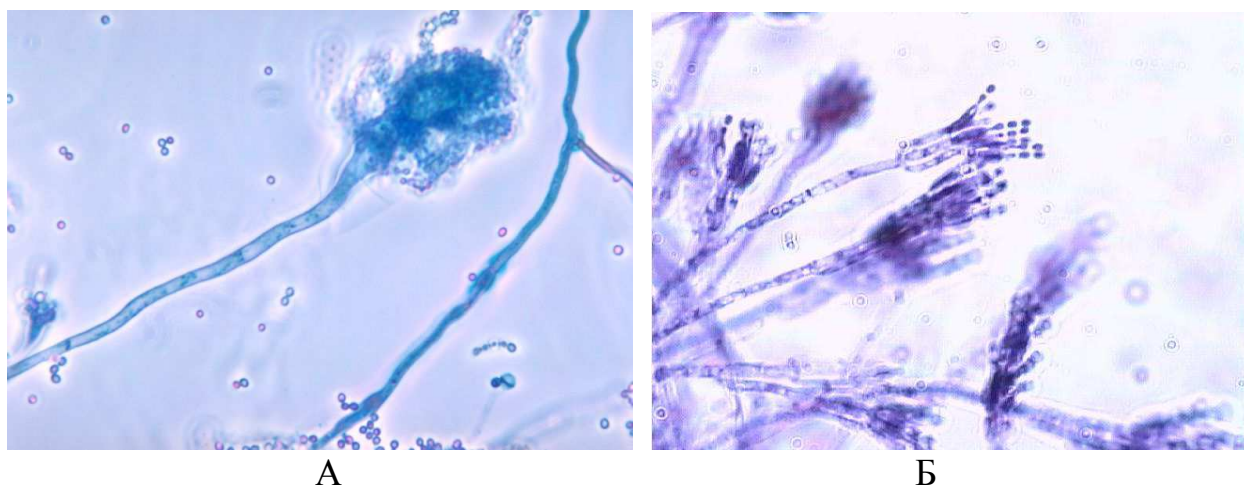


Рис. 16. Плісняви: А – *Penicillium*, Б - *Aspergillus*

Відношення до кисню: аероби, але можуть рости за мінімального доступу повітря у товщі продукту

Температура росту: оптимальна – 25-30°C, мінімальна – мінус 5- плюс 5°C, максимальна – 35-44 °C

pH росту: оптимальна – 3,5-4,5 од. pH, гранична – 1,5-9,0 од.pH

Температура загибелі вегетативних клітин – 75-76°C з витримкою 15-20с

Температура загибелі спор – 80°C з витримкою 15-20с, але стійкі до дії миюче-дезинфікуючих засобів

Джерела забруднення молочних продуктів: сировина, повітря, цукор, вода, пил, обладнання, стіни цехів та підвалів

Продукти метаболізму: кислоти, CO₂, NH₃, спирти

Вади продуктів: пліснявіння поверхні, прогорання внаслідок розщеплення жиру та білку.

Термостійкі молочнокислі палички. Ці бактерії здатні витримувати короткочасну пастеризацію молока, що є важливою ознакою, яка їх відрізняє від інших видів молочнокислих паличок. Вони виявляються у сирому молоці, пастеризованому молоці за 74-76°C з витримкою 15-20 с та 80-85 °C з витримкою до 10 хв, на обладнанні, у готових продуктах. Клітини цих бактерій – палички середнього чи великого розміру, часто з вираженими зернами у цитоплазмі (рис. 17). Грампозитивні, спор та капсул не утворюють, нерухливі.



Рис. 17. Термостійкі молочнокислі палички

Відношення до кисню: факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 45-55°C, гранична – 20-65 °C

Тривалість сквашування молока: 8-10 год.

Гранична кислотність у молоці: 150-220 °T

Температура загибелі клітин – 90-95°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: сировина, обладнання

Продукти метаболізму: кислота

Вади продуктів: надмірна кислотність під час виробництва кисломолочних продуктів, кислий смак при зберіганні, нечистий присмак.

Особливості: Стійкі до дії миюче-дезинфікуючих засобів.

Спороутворюючі палички. *Bacillus subtilis* – сінна паличка – відноситься до гнилісних протеолітичних бактерій сапрофітного походження. Клітини мають форму прямих чи злегка зігнутих паличок товщиною 0,6-0,8 мкм та довжиною 1,5-1,8 мкм, поодинокі чи розташовані попарно, у коротких ланцюжках. Бактерії утворюють термостійкі спори, не більше однієї у клітині. Спори розташовані переважно всередині клітини центрально, форма спор – еліптична (рис. 21). Клітини грампозитивні, рухливі до моменту спороутворення, жгутики розташовані перитрихіально, каталазопозитивні, капсул не утворюють.

Bacillus megatherium – спороутворююча паличка сапрофітного походження, гнилісна бактерія, протеоліз, може розвиватися за низьких температур. Достатньо крупні товсті палички порівняно з *B. subtilis*, товщина – 1,2-1,5 мкм, довжина – 2-5 мкм, поодинокі чи розташовані попарно (рис. 18). Переважне розташування спор – центральне. Клітини грампозитивні, утворюють каталазу, зустрічаються рухливі та нерухливі штами. Важливі властивості спороутворюючих бактерій наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Властивості *B. subtilis* та *B. megatherium*

Властивості	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megatherium</i>
Відношення до кисню:	аероби чи факультативні анаероби	
Температура росту:		
оптимальна	36-38°C	30-35°C
гранична	15-50 °C	3-45 °C
pH росту:		
оптимальна	6,6-7,2 од. pH	
гранична	4,5-9,5 од.pH	
Температура загибелі вегетативних клітин	85-90°C з витримкою 15-20с	
Температура загибелі спор	100°C з витримкою 3 год., 121°C – 20 хв.	
Джерела забруднення молочних продуктів	молочна сировина, обладнання, вода, пил, ґрунт	
Продукти метаболізму	кислоти, ацетоїн, індол сірководень, аміак, інколи – CO ₂	
Вади продуктів	гіркий смак, нечистий гнилісний присмак та запах, згортання пастеризованого та стерилізованого молока і вершків, молочних консервів	
Особливості:	володіють високою протеолітичною активністю, розщеплюють казеїн, спороутворення та проростання спор, а також їх стійкість до високої температури залежать від pH середовища, поживних речовин, температури	

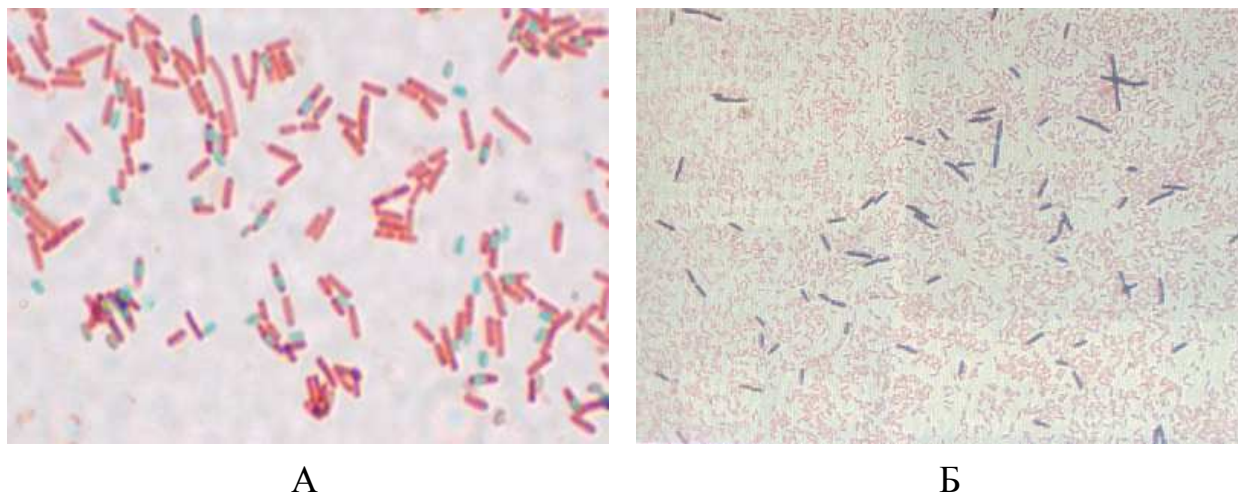


Рис. 18. Спороутворюючі палички: А - *B. subtilis*, Б - *B. megatherium*

Маслянокислі бактерії – збудники маслянокислого бродіння, особливо небезпечного у сироробства. *Clostridium tyrobutyricum* – лактатзброджуючі спороутворюючі мікроорганізми. Це грампозитивні палички товщиною 0,5-1,5 мкм та довжиною 5-12 мкм, клітини циліндричні, часто мають вигляд булави, тенісної ракетки чи ложки (рис. 19). Спори розташовані всередині клітини переважно субтермінально, капсули не формуються. Перед утворенням спор у клітині накопичується гранульоза – крахмалоподібна речовина.



Рис. 19. *Clostridium*

Відношення до кисню: облігатні анаероби

Температура росту: оптимальна – 30-37°C, гранична – 8-45 °C

pH росту: оптимальна – 6,5-7,0 од. pH, гранична – 4,0-9,0 од.pH

Температура загибелі вегетативних клітин – 72°C з витримкою 15-20с

Температура загибелі спор – 121°C з витримкою 15-20хв

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина (з кормами), особливо, у весняний період

Продукти метаболізму: масляна, оцтова, пропіонова кислоти, CO₂, H₂, спирти

Вади продуктів: спучування сичужних сирів, бомбаж молочних консервів

Особливості: згортають молоко за 8-10 год. з утворенням губчатого згустку.

Психротрофні мікроорганізми. До психротрофів відносять бактерії родів *Pseudomonas*, *Micrococcus*, дріжджі, плісняви, спороутворюючі палички та інші бактерії, здатні розмножуватися за температури нижче 7°C.

Pseudomonas мають найбільше значення у молочній промисловості, які розглядають як психротрофну, гнилісну, протеолітичну мікрофлору. Бактерії цього роду – поодинокі прямі чи зігнуті палички розміром 1-2x0,6 мкм, розташовані хаотично, рухливі, з полярними жгутиками (рис. 20). Грамнегативні, спор та капсул не утворюють, каталазопозитивні.



Рис. 20. *Pseudomonas*

Відношення до кисню: аероби

Температура росту: оптимальна – 25-30°C, гранична – 4-50 °C

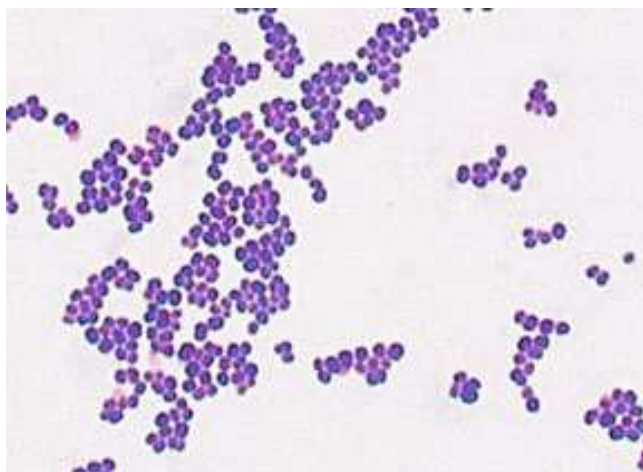
Температура загибелі клітин – 80-85°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина, повітря, вода, пил, обладнання

Вади продуктів: гіркий смак, гнилісний та нечистий присмак, фруктовий запах, згортання пастеризованого та стерилізованого молока і вершків

Особливості: Псевдомони накопичуються у сирому молоці під час його тривалого зберігання у охолодженому стані. Володіють вираженою протеолітичною та ліполітичною активністю. Під час пастеризації гинуть, але ферменти термостійкі, спричиняючи вади молочних продуктів.

Мікрококи (рід *Micrococcus*) – також представник психротрофної протеолітичної мікрофлори. Під мікроскопом мікрококи розпізнають за сферичними клітинами діаметром 0,8-1,2 мкм, розташованим у вигляді неправильних скупчень, ланцюжки не утворюють (рис. 21). У деяких видів спостерігається тенденція до сполучення клітин у тертради. Грампозитивні, нерухливі, спор не утворюють.

Рис. 21. *Micrococcus*

Відношення до кисню: анаероби

Температура росту: оптимальна – 30-35°C, гранична – 4-50 °C

Температура загибелі клітин – 70-72°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина, обладнання, повітря, вода, пил, ґрунт

Продукти метаболізму: молочна кислота

Вади продуктів: гіркий смак, згортання пастеризованого та стерилізованого молока і вершків

Особливості: здатні у молоці виділяти сичужний фермент одночасно з утворенням молочної кислоти, утворений згусток гіркий на смак, щільний з відділенням сироватки, гранична кислотність – до 60°Т. Утворені ферменти термостійкі, спричиняють вади молочних продуктів.

3.3. Санітарно-показові та патогенні мікроорганізми

Під час санітарно-мікробіологічного дослідження вирішують питання про наявність чи відсутність у продуктах та інших об'єктах зовнішнього середовища небезпечних для людини бактерій, встановлюючи факт забруднення не збудниками кишкових інфекцій, а кишковими виділеннями людини чи худоби. Кількісний підрахунок санітарно-показових мікроорганізмів виявляє рівень забруднення зовнішнього середовища, що у свою чергу визначає ступінь епідеміологічної небезпеки досліджуваних об'єктів: чим більше виявляється санітарно-показових мікроорганізмів, тим вище ймовірність наявності збудників інфекційних захворювань.

Бактерії групи кишкових паличок є основними санітарно-показовими мікроорганізмами. До них відносять грамнегативні неспороутворювальні палички, які зброджують лактозу з утворенням кислоти та газу за температури 37 °C, включають роди із родини *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klibsiella*, *Sarratia*. Термін «бактерії групи кишкових паличок» ідентичний прийнятому у міжнародній практиці терміну «коліформи».

Типовий вид - *Escherichia coli*. Це невеликі тонкі прямі палички розміром 0,5x1-2 мкм, поодинокі чи парами, у коротких ланцюжках (рис. 22). Мають жгутики, які розташовані по всій поверхні клітин (перетрих), завдяки чому рухливі. Спор не утворюють, але деякі штами формують капсулу, каталазопозитивні.

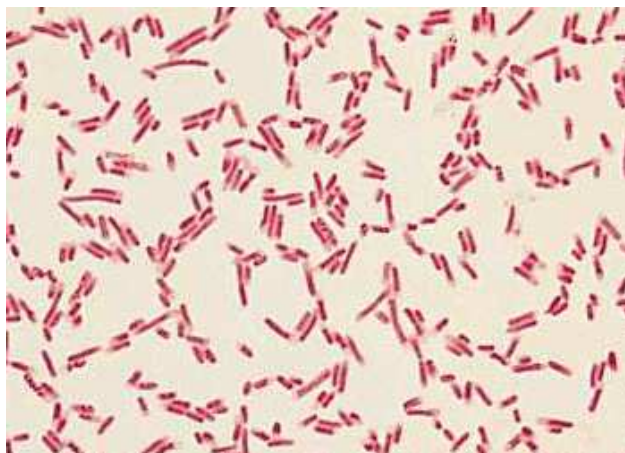


Рис. 22. *E. coli*

Відношення до кисню: факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 36-38°C, гранична – 15-55°C

pH росту: оптимальна – 7,0-7,6 од. pH, гранична – 4,5-9,0 од.pH

Температура загибелі клітин – 60°C з витримкою 15 хв

Джерела забруднення молочних продуктів: фекального походження (руки робітників, молочна сировина, обладнання), сапрофіти (грунт, вода)

Продукти метаболізму: кислоти, CO₂, NH₃, індол, скатол

Вади продуктів: нечистий смак та запах, спучування

Особливості: сквашують молоко за 12 год. з утворенням губчастого згустку з кислотністю до 80°T.

Ентерококи відносяться до постійних представників кишечника людини та худоби і виявлення їх у харчових продуктах свідчить про фекальне забруднення цих об'єктів. Типовий вид - *Enterococcus faecalis*. Морфологія цих бактерій ідентична термофільним стрептококам: шароподібні чи овальні клітин діаметром 0,7-2,0 мкм, розташовані попарно чи у ланцюжках (рис. 23). Грампозитивні, спор не утворюють, нерухомі, каталазопозитивні. Серед ентерококів визначений штам *Enterococcus faecium*, безпечність та корисні властивості якого доведені у клінічних умовах, використовується у складі заквашувальної культури «Стрептосан» для виробництва пробіотичного кисломолочного продукту.

Відношення до кисню: факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 36-38°C, гранична – 10-45°C

pH росту: оптимальна – 7,2-7,5 од. pH, гранична – 4,0-10,0 од.pH

Температура загибелі клітин – 75-80°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: фекального походження (руки робітників, молочна сировина, обладнання), сапрофіти (грунт, вода)

Продукти метаболізму: молочна кислота

Особливості: сквашують молоко за 12 год., згусток рівний з відділенням сироватки, кислотність до 100°Т.

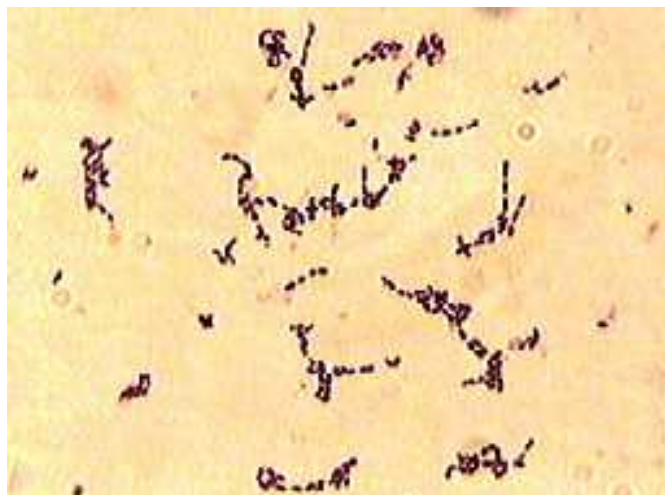


Рис. 23. *E. faecalis*

Стафілококи є нормальною мікрофлорою вимені худоби, тому присутні у сирому молоці, але їх кількість різко збільшується в разі захворювання тварини на мастит. Серед стафілококів розрізняють патогенні та нешкідливі види. Важливе місце посідає ***Staphylococcus aureus*** (золотистий стафілокок), який є потенційно патогенним збудником токсикоінфекцій. Захворювання спричиняють ендотоксини, утворені внаслідок життєдіяльності бактерій. Це коки правильної форми діаметром 0,8-1,0 мкм, розташовані у гронах неправильної форми (рис. 24). Грампозитивні, нерухливі, спор не утворюють, інколи формують капсули, каталазопозитивні, патогенним видам властива гемолітична активність (здатність руйнувати еритроцити крові) та плазмокоагуляція (здатність згортати плазму крові). Здатні до пігментоутворення.

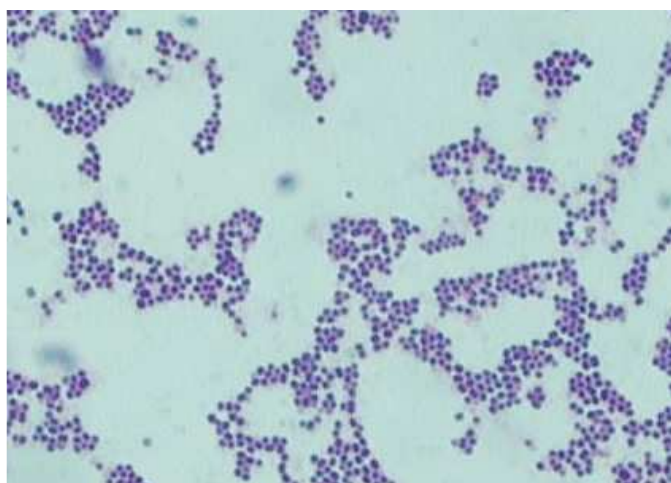


Рис. 24. *S. aureus*

Відношення до кисню: факультативні анаероби чи аероби

Температура росту: оптимальна – 36-38°C, гранична – 10-45 °C

pH росту: оптимальна – 7,0-7,4 од. pH, гранична – 4,8-8,5 од.pH

Температура загибелі клітин – 65°C з витримкою 1 хв, 72°C – 12-15 с, 75 °C – 5-7 с, 80°C – 3-4 с

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина, ранки на руках робітників; робітники, хворі на гості інфекційні захворювання горла

Продукти метаболізму: кислоти, ацетоїн

Особливості: здатні розвиватися за підвищеного вмісту сухих речовин, цукру, солі, швидко адаптуються до несприятливих умов, чутливі до дії кислот.

Бактерії роду ***Salmonella*** є збудниками небезпечного захворювання – сальмонельозу. Інфекцію спричиняють як живі клітини, так і їх токсини. Це дрібні палички з закругленими кінцями, інколи овальної форми, шириною 0,5мкм та довжиною 2-4 мкм, розташовані хаотично (рис. 25). Грамнегативні, неспороутворювальні, рухливі, мають жгутики, лактозу не зброджують.

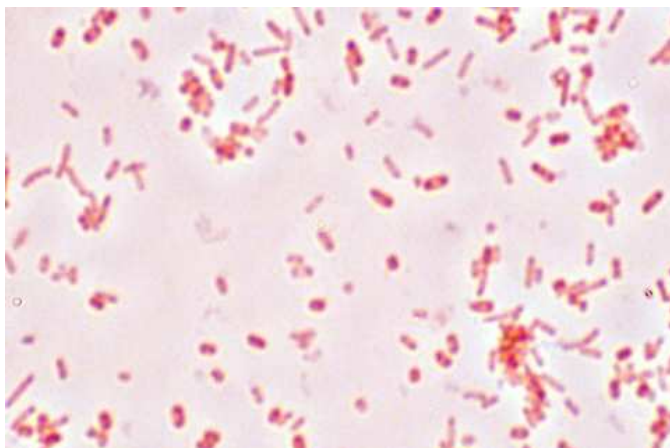


Рис. 25. *Salmonella*

Відношення до кисню: факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 36-37°C, гранична – 6-45 °C

pH росту: оптимальна – 7,2-7,6 од. pH, гранична – 4,5-8,5 од.pH

Температура загибелі клітин – 72°C з витримкою 15-20с

Джерела забруднення молочних продуктів: молочна сировина, пил, ґрунт, обладнання, руки робітників

Продукти метаболізму: кислоти, H₂S

Особливості: стійкі до дії різних факторів зовнішнього середовища, чутливі до дезінфікуючих розчинів, особливо, хлоровмісних.

Listeria monocytogenes – патогенні бактерії, що спричиняють токсикоінфекцію лістеріоз. Здатні розвиватися за низьких температур під час тривалого зберігання охолодженої сирії сировини. Збудниками захворювання є живі клітини. Це рухливі дрібні, прямі чи злегка зігнуті, закруглені на кінцях палички товщиною 0,2-0,4 мкм та довжиною 1-2 мкм, поодинокі чи розташовані попарно (рис. 26). Грампозитивні, спор та капсул не утворюють, продукують каталазу.

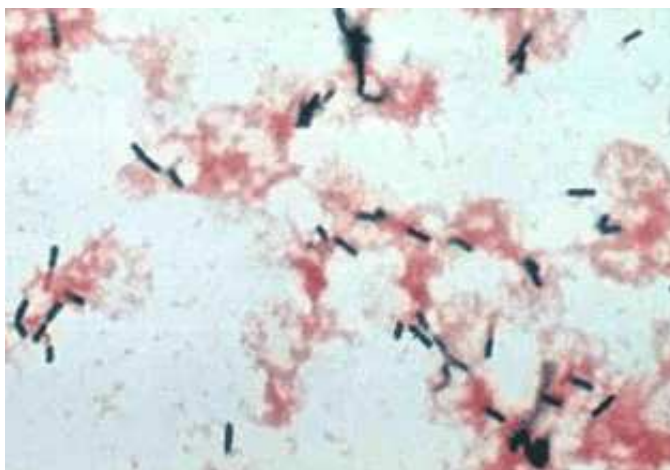


Рис. 26. *L. monocytogenes*

Відношення до кисню: факультативні анаероби

Температура росту: оптимальна – 30-37°C, гранична – 4-45 °C

pH росту: оптимальна – 6,0-7,5 од. pH, гранична – 4,2-9,5 од.pH

Температура загибелі клітин – 70-75 °C з витримкою 15-20 хв, 100°C – кілька секунд

Джерела забруднення молочних продуктів: гризуни, молочна сировина, пил, ґрунт, обладнання, руки робітників

Особливості: добре переносять низькі температури, чутливі до дії гідроксиду натрію чи формаліну

Перелік національних та міждержавних стандартів щодо санітарно-мікробіологічного контролю виробництва молочних продуктів, чинних в Україні станом на 1.09.2008 р.

ДСТУ 2636-94 Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3038-95 Гігієна. Терміни та визначення основних понять

ДСТУ IDF 73A:2003 Молоко і молочні продукти. Підрахування кількості колі форм. Метод підрахування колоній і метод визначання найімовірнішого числа (НІЧ) за температури 30°C

ДСТУ IDF 93A:2003 Молоко і молочні продукти. Визначання *Salmonella*

ДСТУ IDF 100B-2003 Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30 °C

ДСТУ IDF 117B:2003 Йогурт. Визначення кількості характерних мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 37 °C

ДСТУ IDF 122C:2003 Молоко і молочні продукти. Готування проб і розведень для мікробіологічного досліджування

ДСТУ IDF 138:2003 Сухе молоко. Визначання *Staphylococcus aureus*. Методика підрахування колоній за температури 37 °C

ДСТУ IDF 149A:2003 Культури молочнокислих заквасок. Визначання видового складу

ДСТУ ISO 707-2002 Молоко та молочні продукти. Настанови з відбирання проб

ДСТУ ISO 4831:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо підрахування кількості коліформних мікроорганізмів. Методика найвірогіднішої кількості

ДСТУ ISO 4833:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахування колоній за температури 25 °C

ДСТУ ISO 5944:2005 (IDF 60:2001) Молоко і продукти на основі молока. Визначення кількості коагулазопозитивних стафілококів методом найімовірнішого числа

ДСТУ ISO 6730:2006 (IDF 101:2005) Молоко. Метод підрахування колоній психротрофних мікроорганізмів, що формують колонії за температури 6,5 °C

ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень

ДСТУ ISO 7251:2006 Мікробіологія. Загальна настанова щодо підрахунку передбачуваної *Escherichia coli*. Метод найімовірнішого числа

ДСТУ ISO 7954:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахування колоній, культивованих за температури 25 °C

ДСТУ ISO 8553:2005 (IDF 131:2004) Молоко. Визначення кількості мікроорганізмів чашковим методом із застосуванням петлі за температури 30 °C

ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 1. Загальні настанови щодо виготовлення поживних середовищ гарантованої якості в лабораторії

ДСТУ ISO/TS 11133-2:2006 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Настанови щодо готування та вироблення поживних середовищ. Частина 2. Практичні настанови щодо випробування культуральних середовищ

ДСТУ ISO 11290-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підраховування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення

ДСТУ ISO 11290-2:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підраховування *Listeria monocytogenes*. Частина 2. Метод підраховування

ДСТУ EN 12824:2004 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*

ДСТУ ISO 13969:2005 (IDF 183:2003) Молоко та молочні продукти. Настанови щодо стандартизованого описування випробування інгібіторів мікроорганізмів

ДСТУ ISO 18593:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Мікробіологічний аналіз із використанням відбитків і змивів з поверхонь

ДСТУ ГОСТ 30726-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*

ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов, реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.2-94 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества *Staphylococcus aureus*

ГОСТ 10444.8-88 Продукты пищевые. Метод определения *Bacillus cereus*

ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 13685-84 Соль поваренная. Методы испытаний

ГОСТ 13928-84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 18963-73 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа

ГОСТ 20264.0-74 Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 20264.1-89. Препараты ферментные. Методы определения органолептических, физико-химических и микробиологических показателей

ГОСТ 23453-90 Молоко. Методы определения количества соматических клеток

ГОСТ 23454-79 Молоко. Методы определения ингибирующих веществ

ГОСТ 23455-79 Препарат "Мастоприм". Технические условия

ГОСТ 24297-87 Входной контроль продукции. Основные положения

ГОСТ 25102-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных бактерий

ГОСТ 26668-85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.

ГОСТ 26968-86 Сахар. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 28495-90 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 28566-90 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков

ГОСТ 28805-90 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества осмоотолерантных дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 29112-91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29184-91 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

ГОСТ 29185-91 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий

ГОСТ 30347-97 Молоко и молочные продукты. Метод определения *Staphylococcus aureus*

ГОСТ 30518-97 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 30519-97 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*

Перелік прийнятих національних та міждержавних стандартів щодо санітарно-мікробіологічного контролю виробництва молочних продуктів, але ще не введених у дію в Україні

ДСТУ ISO 6611/IDF 94:2007 Молоко та молочні продукти. Визначення колонієутворювальних одиниць дріжджів та/чи плісені. Метод підрахунку колоній, що виростили за температури 25 °С (надання чинності з 1.01.2009 р.)

ДСТУ ISO 7932:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод визначення кількості ймовірно *Bacillus cereus*. Техніка підрахунку за температури 30 °С (надання чинності з 1.01.2009 р.)

ДСТУ ISO 13559/IDF 153:2007 Масло вершкове, кисломолочні продукти та свіжий сир. Визначення кількості сторонніх мікроорганізмів методом підрахунку колоній, що виростили за температури 30 °С (надання чинності з 1.01.2009 р.)

ДСТУ ISO 15214:2007 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мезофільних молочнокислих бактерій за температури 30 °С (надання чинності з 1.01.2009 р.)

ГОСТ 30705-2000 Продукты молочные для детского питания. Метод определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (прийнятий МДР)

ГОСТ 30706-2000 Продукты молочные для детского питания. Метод определения количества дрожжей и плесневых грибов (прийнятий МДР)

Перелік основних нормативних та методичних документів щодо методів і порядку санітарно-мікробіологічного контролю виробництва молочних продуктів

1. Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» від 24.02.1994 р., № 4005-XII

2. Закон України «Про безпечність та якість харчових продуктів» від 06.09.2005 р., № 2809-IV

3. Закон України «Про вилучення з обігу, переробку, утилізацію, знищення або подальше використання неякісної та небезпечної продукції» від 14.01.2000 р., №1393-XIV

4. Закон України «Про питну воду та питне водопостачання» від 10.01.2002 р., № 2918-III

5. Закон України «Про молоко та молочні продукти» від 24.06.2004 р., № 1870-IV

6. Инструкция по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности. - М., Госагропром СССР, 1987. – 122с.

7. Инструкция по микробиологическому контролю производства мороженого

8. ДСанПіН 383/1940 Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько- питного водопостачання, затв. МОЗ України

23.12.1996 р., наказ № 383, зареєстр. Мінюстом України 15.04.97 р., № 136/1940

9. СанПиН 42-123-4940-88 Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов, утв. Минздравом СССР 21.12.1988 г.

10. СанПиН 2112-79 Санитарные правила для молокопроизводственных пунктов на промышленных предприятиях. Санітарні правила щодо улаштування, утримання та обладнання молокопроизводственных пунктов на промислових підприємствах, утв. Главным Государственными санитарным врачом СССР 17.12.1979 р.

11. ДНАОП 0.00-1.07-94 Правила будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском

12. Методические указания по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов, утв. Минздравом СССР 28.02.1991 г., № 15/6-5

13. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов, утв. Минздравом СССР 01.08.89 г., № 5061-89

14. ДСП 4.4.4.011-98 Державні санітарні правила для молокопереробних підприємств, затв. Головним державним лікарем України 11.09.1998 р., постанова №11

15. ДСП 9.9.5-080-02 Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю, затв. Головним державним лікарем України 28.01.2002 р., постанова №1

16. СП 2374-81 Санитарные правила для предприятий, цехов и участков, вырабатывающих детские молочные продукты, утв. Зам. Главного госсан. врача СССР 30.03.1981 р.

17. МВ 10.10.2.2-132-2006 Організація контролю і методи виявлення бактерій *Listeria monocytogenes* у харчових продуктах та продовольчій сировині, затв. МОЗ України 11.08.2006 р., наказ № 559

18. МВ 10.2.1-113-2005 Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води. Методичні вказівки, затв. МОЗ України 3.02.2005 р., наказ № 60

19. МВК 10.10.2.2-119-2005 Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. Методичні вказівки

20. МР 4.4.4.-108-2004 Періодичність контролю продовольчої сировини та харчових продуктів за показниками безпеки, затв. МОЗ України 2.07.2004р., наказ № 329

21. І 4.4.4.077-01 Інструкція про порядок санітарно-технічного контролю консервів на виробничих підприємствах, оптових базах, в роздрібній торгівлі та на підприємствах громадського харчування, затв. Головним державним сан. лікарем України 7.11.2001 р., постанова №140

22. Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін., які слід проводити в державних лабораторіях ветеринарної медицини і за результатами яких видається ветеринарне свідоцтво (ф-2), затв. Держдепартаментом ветмедицини України

03.11.1998 р., наказ №16, зареєстр. Мінюстом України 30.11.1998 р., №761/3201.

23. Правила ветеринарно-санітарної експертизи молока і молочних продуктів та вимог щодо їх реалізації, затв. МінАПК України 20.04.2004 р., наказ №49, за реєстр. Мінюст України 7.05.2004 р., № 579/9178

24. Порядок відбору зразків продукції тваринного, рослинного і біотехнологічного походження для проведення досліджень, затв. КабМіном України 14.06.2002 р., постанова № 833

25. Нормативы проведения основных санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды (Методические указания), утв. Минздравом СССР 24.02.1983г., № 2671-83

26. Методические указания по организации санитарно-эпидемиологической службой контроля за предприятиями молочной промышленности, утв. Минздравом СССР, №2642-82

27. Порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій, затв. МОЗ України 21.05.2007р., наказ №246

28. ДНАОП 0.00–4.26–96 Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту, затв. Держнаглядохоронпраці України 29.10.96 р., наказ № 170

29. Ветеринарні та санітарні вимоги до особистих підсобних господарств населення – виробників сирого товарного молока, затв. Держдепартаментом ветмедицини України 21.03.2002 р., наказ №17, зареєстр. Мінюстом України 5.04.2002 р., №336/6624

30. ГРУ 46.14.01-99 Сировина молочна, одержана від корів з господарств, неблагополучних щодо інфекційних хвороб

31. Лист від 04.04.89. №400-22/441 Державного агропромислового комітету СРСР «Об удостоверениях о качестве продукции»

32. Порядок проведення атестації виробництва молока, молочної сировини і молочних продуктів суб'єктів господарювання, затв. Мінагрополітики України і Державного комітету України з питань технічного регулювання та споживчої політики 21.01.2005 р., наказ № 23/17, зареєстр. Мінюстом України 26.01.2005 р., № 99/10379

33. Инструкция о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях, утв. Главным Государственными санитарным врачом СССР 20.12.1973 г., № 1135-73

Список використаної літератури

1. Асонов Н.Р. Микробиология, 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1997. – 352 с.
2. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. - М.: Агропромиздат. 1997. - 400 с.
3. Ветеринарно-санітрана експертиза з основами технології і стандартизації продуктів тваринництва. Підручник /Якубчак О.М., Хоменко В.І., Мельничук С.Д. та ін.. – Київ: «Біопром», 2005. – 800с.
4. ГОСТ 28489-90 Микроскопы световые. Термины и определения
5. ГОСТ 13739-78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний
6. Гудков А.В. Сыроделие: Технологические, биологические и физико-химические аспекты. - М.: ДеЛи принт, 2004. -804 с.
7. Жарикова Г.Г., Козьмина А.О. Микробиология, санитария и гигиена пищевых продуктов: Практикум. - М.: ГЕЛАН, 2001.-256 с.
8. Кігель Н.Ф., Шульга Н.М. Заквашувальні культури для ферментованих молочних продуктів – сьогодення та перспективи // Продукти харчування. – 2007. - №4.
9. Королева Н.С. Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. - 168 с.
- 10.Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 256 с.
- 11.Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978.- 325 с.
- 12.Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 160 с.
- 13.Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 368 с.
- 14.Мудрецова–Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. Микробиология, санитария и гигиена: Учебник для вузов.-7-е изд.- М.: «Деловая литература», 2001.-388 с.
15. Нецепляев С.В., Панкратов А.Я. Лабораторный практикум по микробиологии продуктов животного происхождения. - М.: Агропромиздат, 1995.-223 с.
- 16.Определитель бактерий Берджи.- 9-е изд.: В 2 т./ Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса/ Пер. с англ. под ред. Т.А. Заварзина. М.: Мир, 1997.
- 17.Перфильев Г.Д. Морина Г.В. Микробиологические лаборатории молокоперерабатывающих предприятий. Организация и устройство.- Углич: ВНИИМС, 1999.
- 18.Перфильев Г.Д., Свириденко Ю.Я. Производство и применение бактериальных концентратов // Сыроделие и маслоделие. - 2004.– №3. – С.24-29.

19.Перфильев Г.Д. Смыков И.Т. Руководство по технике микроскопических исследований и атлас микроорганизмов молока, молочных продуктов и бактериальных заквасок.- Углич: ВНИИМС, 1995.

20.Полянский К.К., Алтухов Н.М., Семенов С.Н., Пономарев А.Н. Состав микрофлоры молока на ранних этапах получения // Молочная промышленность. - №5. – 2005. – С.69-70.

21.Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Колос, 1993. - 175 с.

22.Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для ВУЗов.- Сергиев Посад: ООО «Все для Вас – Подмоскowie», 1999.-415 с.

23.Степаненко П.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии молока и молочных продуктов. – М.: ОИЦ «Тех Промконсалтинг», 2005.- 653 с.

24.Степаненко П.П., Корнелаева Р.П. Микрофлора сыра «Голландский» // Переработка молока. - 2001. – №12. – 15-16.

25.Фильчакова С.А. Санитария и гигиена на предприятиях молочной промышленности. - М.: ДеЛи принт, 2008.- 276 с.

26.Шаманова Г.П. Рекомендации по устройству микробиологических лабораторий на молочных предприятиях (в цехах).- М.: Молочная промышленность, 1997.-21 с.