

МІКРОБІОЛОГІЯ ЖИРІВ ТА ЖИРОЗАМІННИКІВ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

СХВАЛЕНО
на засіданні кафедри
біотехнології мікробного
синтезу
Протокол № від р.

“ ” 200 p.

Лекція № 1.

План.

1. Загальні положення.
2. Мікробна забрудненість сировини для олійно – жирових виробництв.
3. Методи визначення мікроорганізмів

"Мікробіологія продуктів переробки жирів" (надалі мікробіологія) входить до навчальних планів бакалаврів та є обов'язковою для технічних вузів, які готують інженерів-технологів за спеціальністю – 6.091700 "Технологія жирів та жирозамінників". Це одна з дисциплін фахової підготовки, оскільки технологічні режими виробництва жирів та жирозамінників певним чином залежить від кількості та якості мікроорганізмів, які знаходяться в сировині. Мікробіологія продуктів переробки жирів ґрунтується на знаннях, здобутих студентами при вивченні технічної мікробіології та базових і спеціальних дисциплін.

Предметом дисципліни є вивчення впливу мікроорганізмів на якість жирів та жирозамінників, термін їх зберігання.

Мета дисципліни – засвоєння студентами основ спеціальної мікробіології з метою подальшого застосування отриманих знань при вивченні загальної та спеціальної технології, обладнання, наукових основ і стандартизації галузі, проходженні виробничої практики, виконанні НДРС, курсових та дипломного проектів.

Мікробіологічний аналіз сировини для олійно-жирових виробництв.

Сировиною є тваринні, рафінована та дезодорована олія, саломаси, яєчні продукти, молоко коров'яче питне, молоко сухе, вершки коров'ячі та домішки, що забезпечують органолептичні характеристики готового продукту. До них відносять барвники, цукор, гірчичний порошок, кисломолочні закваски, ізоляти, концентрати та гідролізати рослинних білків та інші компоненти згідно рецептури.

Відбір проб на мікробіологічний аналіз проводять один раз на 30 днів від кожного виду продукту, а спецій – середню пробу від кожної партії.

Жири та олії, які мають вміст вологи 0,1 – 0,3%, мікробіологічному аналізу не піддаються.

Відбір зразків (маса 50-100 г) проводять в асептичних умовах. Кожен зразок окремо запаковують в стерильний пергаментний папір (вміщують в стерильний посуд), підписують і направляють в бактеріологічну лабораторію.

В ході мікробіологічних досліджень визначають загальне мікробне число в 1 г проби, характер мікрофлори (БГКП, дріжджі, мікроміцети).

Визначення загального мікробного числа. Відбирають наважку сировини (1 г) і з неї готують проби для аналізу ваговим методом. В стерильну чашку Петрі піпеткою вносять 0,1 мл отриманої суспензії (її розведення), відбираючи пробу з верхнього шару. Чашку заливають поживним середовищем (МПА). Інкубацію чашок проводять в термостаті протягом 18-24 годин при 30°C. Рахують колонії і визначають кількості мікроорганізмів в 1 г продукту.

Класифікація поживних середовищ

В лабораторній практиці для вивчення фізіологічних та біохімічних властивостей мікроорганізмів використовують різноманітні поживні середовища. Кожне з них повинно містити достатню кількість необхідних для росту мікроорганізмів сполук, мати оптимальне для даного виду мікроорганізмів рН та бути стерильним.

Будь-яке поживне середовище повинно містити: органогенні елементи - вуглець, водень, кисень, азот; зольні елементи – фосфор, сірка, калій, кальцій, магній, залізо та мікроелементи – молібден, цинк, мідь та ін.

Для розвитку деяких мікроорганізмів (ауксотрофів) необхідною умовою є наявність вітамінів або їх складових частин (Ко-ферментів) в складі поживного середовища.

За складом поживні середовища поділяють на **природні (натуральні), штучні (синтетичні) та напівсинтетичні**.

Натуральні середовища складаються з продуктів тваринного та рослинного походження (молоко, жовч, відвари та витяжки з м'яса, печінки; капустяне середовище, пивне сушло та ін). Напівсинтетичні середовища виготовляються на основі природних і містять штучні домішки, що поліпшують їх характеристики. Штучні або синтетичні середовища містять в своєму складі визначені органічні сполуки та неорганічні солі в точно зазначених концентраціях. За набором компонентів синтетичні середовища можуть бути складними та простими.

За консистенцією поживні середовища поділяються на **щільні, рідкі та сипучі**.

Для одержання щільних середовищ до субстратів додають ущільнювачі. До таких сполук відносять агар-агар (додають в кількості 1,5 - 4%) чи желатину (додають в кількості 5-25%). Подрібнені ущільнювачі вносять в рідке поживне середовище та піддають термічній обробці.

Щільні середовища використовують для аналізу мікрофлори різних об'єктів (зокрема повітря та води), виділення чистих культур мікроорганізмів, зберігання та транспортування чистих культур та ін. Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси чи продуктів обміну, дослідження фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів. Сипучі – для зберігання деяких видів мікроорганізмів та їх спор, приготування маточного та посівного матеріалу.

За призначенням поживні середовища поділяються на **універсальні, елективні (вибіркові) та диференціально-діagnostичні**.

До універсальних середовищ відносять: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонну желатину (МПЖ), м'ясну воду, м'ясопечінково-пептонний бульйон (МППБ). На таких середовищах росте більшість мікроорганізмів.

Для вирощування певних видів мікроорганізмів, які на універсальних середовищах ростуть погано або зовсім не ростуть, застосовують елективні середовища. До них відносять МПБ з кров'яною сироваткою, середовище Ендо, середовище Кітта-Тароцці та ін.

Диференціально-діagnostичні середовища дозволяють розрізнити окремі види мікроорганізмів за фізіологічними ознаками. До таких середовищ відносять: середовища Андрере, Дригальського, "строкатий" ряд Гіса та ін. Зазначені середовища використовують переважно при вивченні біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Диференціально-діagnostичні середовища, залежно від складу, можна розділити на 4 групи:

1. Середовища, які містять білкові речовини (желатину, молоко, сироватку крові у згорнутому вигляді, курячі білки) і використовуються для визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.

2. Середовища з цукрами, для визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів.

3. Середовища з хімічними речовинами, які змінюють свої властивості під дією окисно-відновних ферментів.

4. Середовища, які містять індиферентні хімічні складові, що є джерелом живлення одних видів мікроорганізмів і не асимілюються іншими видами.

Методи стерилізації поживних середовищ, посуду та інструментів.

Необхідно зазначити, що процеси культивування та зберігання мікроорганізмів проводять на стерильних середовищах з дотриманням правил асептики.

Повне знищення вегетативних клітин мікроорганізмів та їх спор в будь-якому матеріалі називають **стерилізацією**.

Існує декілька методів стерилізації: прожарювання в полум'ї (фламбування); стерилізація сухим жаром, насиченою парою під тиском (автоклавування), текучою парою; фільтрування та ін. Вибір способу стерилізації залежить від виду та властивостей стерилізуємого об'єкту.

Прожарювання в полум'ї. Цей метод використовують для стерилізації металевих інструментів (мікробіологічні петлі, голки, ланцети, пінцети) безпосередньо перед використанням. При прожарюванні мікроорганізми згорають в полум'ї пальника або спиртівки.

Стерилізація сухим жаром. Цей метод використовують для стерилізації скляного посуду в сушильних шафах. Тривалість стерилізації: при 150°C – 2 год., при 160°C – 1 год., при 180°C – 30 хв. Посуд перед стерилізацією ретельно миють та висушують. Пробірки та колби закривають ватними пробками та паперовими ковпачками. Чашки Петрі та піпетки загортають в папір.

Стерилізація насиченою парою. Стерилізацію скляного посуду, інструментів, поживних середовищ здійснюють головним чином в автоклавах насиченою парою під тиском 0,05 – 0,2 МПа. Автоклав представляє собою металевий котел, який герметично закривається кришкою. Посуд або поживні середовища, які піддають стерилізації, завантажують у автоклав. Паралельно заповнюють водопарову камеру приладу дистильованою водою до необхідного рівня, який контролюється за водомірним склом. Автоклав закривають кришкою та відкривають кран для виходу пари і повітря (тримають відкритим доти, доки з нього не піде суха пара), включають автоклав в електричну мережу та починають прогрів. Пара підвищує в автоклаві тиск, а тим самим й температуру. Час стерилізації відраховують з моменту встановлення необхідного тиску. При вичерпанні часу стерилізації автоклав вимикають з електричної мережі та чекають моменту, коли тиск по манометру впаде до нуля. Після цього відкривають спускний кран, обережно випускають з автоклаву залишок пари та відкривають кришку.

Температура та тривалість автоклавування визначаються складом поживних середовищ та їх рН.

Стерилізація текучою парою (дробна стерилізація). Дробну стерилізацію поживних середовищ проводять в апараті Коха або в автоклаві з закритою, але незагвинченою кришкою. Апарат Коха – це металевий циліндр (стінки якого вкриті теплоізоляцією) в середину якого встановлено сітчасту підставку на ніжках. В апарат заливають воду з таким розрахунком, щоб рівень води був нижчим за рівень підставки.

Середовища встановлюють на підставку і починають нагрів води в апараті. Температура пари в процесі стерилізації складає біля 90-100°C. Нагрів середовища здійснюють три рази по 30-40 хв. три доби поспіль. В перервах між нагріваннями середовище витримують при кімнатній температурі (або в термостаті при 30°C) для проростання споривих форм мікроорганізмів.

Даний метод застосовують для стерилізації поживних середовищ, властивості та склад яких змінюються під дією температур вищих за 100°C.

Стерилізацію фільтруванням (холодну стерилізацію) застосовують, якщо властивості середовищ змінюються навіть при незначному нагріванні. Фільтруванню піддають середовища з білками, антибіотиками, вітамінами, леткими речовинами та ін. Для стерилізації фільтруванням використовують спеціальні фільтри з діаметрами пор меншими за 1 мкм (азбестові фільтри Зейтца), свічки Шамберлана та Беркефельда, мембранні ультрафільтри.

Дезинфекція – знешкодження мікроорганізмів за допомогою сильнодіючих хімічних речовин, які називаються антисептиками. До них відносять неорганічні (кислоти, луги, солі), органічні (органічні кислоти, спирти, альдегіди) та інші речовини.

В лабораторіях антисептиками обробляють робочі столи (70-80% етиловий спирт, 2% розчин перекису водню). На виробництві в якості антисептиків використовують розчини сполук хлору, формалін, луги.

Методи кількісного обліку мікроорганізмів

Прямий підрахунок клітин мікроорганізмів проводять в камерах Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера та ін. В них проводять підрахунок клітин дріжджів, спор, клітин деяких бактерій. Камера Горяєва представляє собою товсте предметне скло, розділене чотирма прорізами на три поперечно розташовані площадки. Центральна площадка поздовжнім прорізом ділиться на дві рівні частини. На кожній половині вигравірувана сітка. Бокові площадки розташовані на 0,1 мм вище центральної та використовуються для притирання покривного скла.

Сітка камери Горяєва розділена на 225 великих квадратів (15 рядів по 15 квадратів в кожному). Площа великого квадрата розділена на 16 малих квадратів.

В процесі підрахунку на поверхню сіток наносять невеликі крапельки проби (чи її розведення). Для того щоб об'єм проби точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притирають до її бокових площадок до появи так званих Ньютонових кілець. Рідина під покривним склом повинна розподілитися по всій сітці рівномірно, без пухирців повітря. Підрахунок клітин проводять через 3-5 хв. після заповнення камери, щоб клітини осіли та знаходилися в одній площині. Рухомі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку необхідно вбити нагріванням або внесенням 0,5% формаліну.

Камеру розміщують на предметному столику мікроскопа та роздивляються спочатку з об'єктивом 8х, потім 40х. Клітини підраховують в 5 (10) великих квадратах по діагоналі або по кутах сітки і в центрі. Враховують всі клітини, що знаходяться всередині квадрата або на межі обмежувальних ліній квадрата (якщо клітини більш ніж наполовину знаходяться всередині квадрата). Клітини, що пересікаються обмежувальними лініями квадрата навпіл, рахують тільки на двох з чотирьох сторін квадрата, а клітини, що розташовуються за межами квадрата не враховують.

Кількість клітин в 1 мл:

$$x = \left(\frac{a \cdot 4000 \cdot b}{c} \right) \cdot 1000 ,$$

де а – сума клітин, підрахована в 5 (чи 10) великих квадратах сітки; b – розведення вихідного субстрату; c – кількість малих квадратів, в яких проводили підрахунок.

Визначення кількості клітин методом посіву на щільні середовища. Метод знайшов широке застосування для встановлення кількості мікроорганізмів в природних та промислових субстратах. Метод ґрунтується на тому, що кожна жива клітина при висіві на щільне середовище утворює колонію. Виконання аналізу складається з 3 етапів.

Приготування десятикратних розведень в стерильній водопровідній воді чи фізіологічному розчині (0,5% розчин NaCl).

Посів на щільні середовища. Кожне розведення висівають на 2-4 паралельні чашки Петрі поверхневим чи глибинним способом. При поверхневому посіві в стерильні чашки спочатку вносять по 15-20 мл розплавленого агаризованого середовища. Залиті чашки рекомендується витримати 1-2 доби в термостаті при 30 °С для підсихання середовища та перевірки на стерильність. Для посіву використовують стерильні мірні піпетки, якими переносять в чашки визначений об'єм суспензії (0,05; 0,1; 0,2 мл але не більше 0,5 мл) відповідного розведення. Внесений об'єм стерильним шпателем рівномірно розподіляють по всій поверхні щільного середовища. Висів проводять не менш ніж з трьох послідовних розведень.

При глибинному посіві, по 1 мл відповідного розведення стерильною піпеткою вносять в 2-4 паралельні стерильні чашки Петрі, заливають їх розплавленим (попередньо охолодженим до 40-45 °С) агаризованим середовищем. Кришку чашки закривають і легкими обертальними рухами ретельно перемішують середовище з суспензією мікроорганізмів. Засіяні чашки залишають в горизонтальному положенні для застигання середовища. Чашки перевертають та переносять в термостат де підтримується температура сприятлива для вирощування даного виду мікроорганізмів.

Підрахунок колоній. Різні групи мікроорганізмів володіють різною швидкістю росту. Тому колонії бактерій підраховують через 2-3 доби, грибів та дріжджів – через 5-7 діб, актиноміцетів – через 7-15 діб. Для підрахунку вибирають чашки, в яких колонії є ізольованими, а їх кількість знаходиться в межах 50-300. При великій кількості колоній дно чашки ділять на 4, 8 або 16 однакових за площею секторів, підраховують кількість колоній в кожному секторі, після чого результати підсумовують. Можна підраховувати число колоній в декількох секторах, але не менш ніж на $\frac{1}{3}$ площі середовища, визначити середнє арифметичне число колонію на них та помножити на загальну кількість секторів чашки. Підрахунок колоній також проводять на спеціальних напівавтоматичних лічильниках.

Результати паралельних висівів підсумовують та визначають середнє число колоній, які вирости при висіві розведення. Якщо середнє число колоній є меншим за 10, ці результати для визначення кількості клітин в вихідному матеріалі не враховують. Кількість клітин мікроорганізмів в 1 г (мл) досліджуваної проби розраховують за формулою:

$$x = \frac{a \cdot n}{c \cdot v},$$

де а – середнє число колоній при висіві розведення; n – розведення вихідного матеріалу; с – наважка препарату, г (мл); v – об'єм суспензії, взятої для посіву, мл.

Лекція 2.

План.

Визначення видової належності мікроорганізмів

При визначенні мікрофлори олійно - жирових виробів іноді виникає необхідність в ідентифікації виділених культур. Ідентифікацію мікроорганізмів (розглянемо на прикладі бактерій) проводять за їх культуральними, фізіологічними та морфологічними ознаками.

Морфологічні ознаки.

1. Форма клітин. В основному бактерії мають кулеподібну, паличковидну або звивисту форми. Інколи палички вигнуті. В старих культурах частіше, ніж в молодих, знаходяться палички з заокругленими або загостреними кінцями.

2. Характер розташування клітин. Кулеподібні бактерії можуть бути розташовані окремо (монококи), з'єднані по дві (диплококи), по чотири (тетракоки), в ланцюжки (стрептококи), в пакети (сарцини), гроноподібні накопичення (стафілококи). Паличковидні бактерії розташовуються поодинокі, з'єднані попарно або утворюють ланцюжки.

3. Розмір клітин.

4. Спороутворення. Спори можуть утворюватись в центрі клітини, не змінюючи її форми – бацили. У деяких бактерій діаметр клітини менший за діаметр спори – клостридії. Коли спора локалізується термінально, паличка приймає форму тенісної ракетки або барабанної палички – плектридії.

5. Рухливість бактерій визначають в препаратах “розчавлена крапля” і “вісяча крапля”.

6. Здатність до утворення капсул. Наявність капсул встановлюють в незабарвлених та забарвлених препаратах. На відміну від безкапсульних бактерій,

капсульні мікроорганізми розташовуються на певній відстані один від одного, так як капсули заважають їх більш щільному розташуванню. Для фарбування капсул використовують спиртовий розчин туші.

7. Відношення до фарбування за Грамом: грампозитивні чи грамнегативні мікроорганізми.

Культуральні ознаки.

Для визначення культуральних ознак досліджувану культуру висівають на рідкі і щільні поживні середовища.

При вивченні росту мікроорганізмів на щільних поживних середовищах відмічають:

характер росту – скудный, пухкий, однорідний або неоднорідний;

форма – кругла, амебовидна, кореневидна, складчаста та ін.;

розмір – крапкові (діаметр до 1 мм), дрібні (1-2 мм), середні (2-4 мм), великі (більші за 4 мм);

колір – білі, жовті, рожеві, прозорі та ін.;

поверхня – матова, блискуча, гладенька, шорстка, складчаста, бугриста, плоска, куполоподібна;

краї – рівні, хвилясті, зубчасті, розпливчасті та ін.;

консистенція – щільна, маслоподібна, слизиста, глейка, мокра, суха;

структура – однорідна, дрібнозерниста, крупнозерниста, волокниста.

При вивченні росту мікроорганізмів на рідких середовищах відмічають:

інтенсивність росту – слабка, помірна, значна;

наявність муті – слабка, помірна, значна, рівномірна, нерівномірна, зерниста, у вигляді пластівців;

характер осаду – невеликий, значний, у вигляді пластівців, глейкий;

утворення на поверхні середовища пристінного кільця, плівки, шершехатої поверхні.

В посівах уколом відмічають:

на МПА – характер росту по лінії уколу (ниткою, з боковими відгалудженнями або без них).

на МПЖ – розрідження середовища і його характер (кратероподібний, воронкоподібний, кулеподібний та ін.)

Фізіологічні ознаки.

Фізіологічні ознаки мікроорганізмів обумовлені їх біохімічними особливостями. До фізіологічних ознак відносять:

1. Тип живлення мікроорганізмів.

2. Відношення до кисню – аероби, анаероби, облігатні анаероби.

3. Відношення до температури – мезофіли, психрофіли, термофіли.

4. Відношення до pH .

5. Можливість розвитку в молоці.

6. Цукролітичні властивості – здатність розщеплювати цукри.

7. Протеолітичні властивості – здатність розщеплювати білки.

8. Окисно-відновні властивості.

Кожний вид мікроорганізмів виробляє постійний набір ферментів, одні з яких розщеплюють білки і вуглеводи, а інші викликають окислення чи відновлення різноманітних субстратів.

Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів

Деякі мікроорганізми в процесі життєдіяльності синтезують протеази, ферменти, які здатні розщеплювати білки. Наявність протеолітичних властивостей у мікроорганізмів визначають шляхом їх висіву уколом в стовпчик МПЖ. Пробірки витримують при температурі 22-23 °С протягом 24-48 год. Мікроорганізми, які синтезують протеолітичні ферменти, розріджують желатину. Відмічають швидкість розрідження та його характер.

При висіві на молочний агар Ейсмана (10 частин розплавленого МПА і 3 частини стерильного знятого молока), культури, що синтезують протеолітичні ферменти, викликають пептонізацію казеїну. Спостерігається утворення прозорих зон навколо колоній на мутному фоні середовища. Засіяні чашки витримують в термостаті при 37°С протягом 24-48 годин.

Для визначення протеолітичних властивостей, досліджувані культури аеробних мікроорганізмів висівають на середовища з сироваткою крові. Анаеробні мікроорганізми висівають уколом в стовпчик аналогічного середовища. Чашки і пробірки витримують при 37°С протягом 24-48 годин. Штами, які синтезують протеолітичні ферменти, розріджують зазначене поживне середовище, навколо колоній утворюються поглиблення.

Деяким видам патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів властива протеолітична активність. Вони здатні розщеплювати білок до продуктів глибокого розпаду: індолу, сірководню, сечовини, аміаку. При визначенні протеолітичних властивостей патогенів найбільше значення має виявлення індолу та сірководню.

Для встановлення наявності індолу, в пробірку з МПБ (або пептонною водою) засіяною досліджуваною культурою, вносять смужку фільтрувального паперу насиченого розчином шавлевої кислоти. Засіяні пробірки витримують при 37°С в термостаті протягом 24-48 годин. Забарвлення паперу в рожевий або червоний колір, свідчить про наявність індолу.

Сірководень - кінцевий продукт розщеплення цистину, цистеїну та метіоніну. Для його виявлення в пробірку з МПБ засіяну досліджуваною культурою, вносять смужку фільтрувального паперу змочену 10% розчином оцтовокислого свинцю. При виділенні сірководню, папір буріє або чорніє (утворюється сірчистий свинець).

Визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів

Здатність розщеплювати вуглеводи і багатоатомні спирти, які об'єднують в одну групу "цукри", притаманна багатьом умовно-патогенним і патогенним мікроорганізмам.

Під дією цукролітичних ферментів, які синтезуються бактеріями, цукри розщеплюються до альдегідів і кислот. Кінцевими продуктами їх розщеплення є вуглекислий газ і водень.

Різні види і штами мікроорганізмів по-різному відносяться до цукрів. Одні ферментують лактозу, інші - глюкозу, треті – обидва цукри. Цю властивість мікроорганізмів в мікробіології використовують для ідентифікації бактерій та дріжджів.

Суспензію досліджуваних клітин (0,1-0,2 мл) висівають на короткий чи довгий „строкатий” ряд Гісса (набір пробірок з поживними середовищами). До складу кожного поживного середовища входить пептонна вода (1% пептону), відповідний цукор (0,5-1%) та індикатор Андрере (1мл індикатора на 100 мл середовища) або бромтимолблау (0,1 мл 1,6%-ного розчину бромтимолблау на 100 мл середовища). В ході звичайного аналізу, досліджувану культуру висівають на так званий “короткий” ряд Гісса, який містить

середовища з глюкозою, лактозою, манітом, мальтозою і цукрозою. Для поглибленого аналізу в “строкатий” ряд Гісса додатково вводять інші цукри та спирти: дульцит, сорбіт, ксилозу, арабінозу та ін.

Індикатор Андрере: 0,3 г кислого фуксину розчиняють в 100 мл стерильної дистильованої води і додають 16,4 мл 1 н розчину їдкого натру. Розчин стерилізують при 100°C протягом 5 хв. і зберігають в темному місці у флаконі з притертим корком. Індикатор Андрере має солом'яно-жовте забарвлення. При зміщенні рН середовища в кислий бік він набуває яскраво-малинового забарвлення.

Індикатор бромтимолблау: 0,4 г бромтимолблау розчиняють в 40 мл дистильованої води, нагріваючи її до кипіння. Після цього до розчину додають 6,4 мл 0,1 н. розчину їдкого натру, в результаті чого рідина набуває зеленуватого кольору і доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Індикатор зберігають в темному місці в склянці з притертим корком. Індикатор бромтимолблау дозволяє визначити зміну рН в межах 6,0-7,6. В лужній зоні (рН=7,6) індикатор має синій колір, в кислій зоні (рН=6,0) – жовтий. При зміні рН у вказаному діапазоні забарвлення приймає різні відтінки зеленого кольору.

Для визначення газоутворення (кінцеві продукти розпаду цукрів) в пробірки додатково занурюють “поплавки” (трубка діаметром 0,5-0,7 см, запаяна з одного кінця). При стерилізації, поплавок повністю заповнюється поживним середовищем, а при виділенні газу в ньому утворюється повітряна бульбашка і поплавок спливає.

Штатив з набором проб витримують в термостаті при 37-43°C протягом 48-72 годин. Візуально за помутнінням середовища, утворенням плівки, осаду відмічають ріст мікроорганізмів або його відсутність на всіх субстратах. В ході експерименту проводять контроль рН, за зміною забарвлення середовища. Проби з кислою реакцією середовища (відбувається утворення кислот) позначають буквою “К”, а проби в яких утворюються бульбашки газу (спливає поплавок) та підтримується кисла реакція – буквами “КГ”, де “Г” вказує на утворення газу.

На основі отриманих результатів роблять висновок, які цукри (спирти) асимілюються даними мікроорганізмами.

Визначення окисно-відновних властивостей мікроорганізмів

Мікроорганізми також синтезують окисно-відновні ферменти. Окислення субстрату може відбуватися за рахунок приєднання до нього кисню (ферменти оксидази) або відщеплення водню.

Речовини, від яких відщеплюється водень, називають донорами, а речовини до яких приєднується водень – акцептором. Акцептором водню часто виступає кисень повітря, а також органічні сполуки.

Для виявлення дегідраз і визначення їх активності в поживне середовище додають органічний барвник, який виконує роль акцептора водню. В результаті приєднання водню барвник відновлюється, перетворюючись в безбарвну сполуку. Останній при контакті з киснем повітря може знову окислитись і набути кольору. В якості акцепторів водню використовують метиленову синь, лакмусову настоянку, малахітову зелень та ін.

Окисно-відновні властивості мікроорганізмів можна встановити шляхом висіву культур в поживні середовища (МПБ, МПА, молоко), що містять барвник (на 5 мл середовища вносять 1 краплю 5% розчину метиленової сині, або 1-2 краплі 5% розчину індигокарміну, або 1 краплю лакмусової настоянки). При позитивній реакції середовище повністю знебарвлюється.

Відношення мікроорганізмів до кисню повітря

Відношення мікроорганізмів до кисню визначають шляхом їх посіву уколом в стовпчик МПА. Пробірки витримують в термостаті при температурі 30-37°C протягом 48 год.

Якщо спостерігається ріст мікроорганізмів на поверхні середовища (у вигляді цвяха, шляпкою догори) – це аеробні мікроорганізми. Незначний ріст на поверхні середовища та більш інтенсивний по всій довжині уколу є характерним для факультативних анаеробів. Активне розрідження середовища на дні пробірки характеризує розвиток облигатних анаеробів.

Визначення морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак мікроорганізмів (отримані результати заносяться в таблицю) дозволяє провести їх ідентифікацію за спеціальними визначниками.

Лекція № 3.

План

Мікробіологічний аналіз продуктів олійно-жирових виробництв.

Санітарно – мікробіологічний контроль в олійно – жировій промисловості

Для проведення мікробіологічного аналізу від кожної партії виробів відбирають не менше 2 - 3 зразків. У разі великого пакування асептично відбирають зразки масою ~100 - 150 г (см³) від 2 -3 одиниць від кожної партії. Кожний із зразків окремо пакують у стерильний пергаментний папір (вміщують у стерильний посуд), підписують і направляють в мікробіологічну лабораторію. Аналіз проводять не пізніше 4 годин з моменту відбору проб.

Контроль проводять періодично, але не рідше одного разу у 10 днів з чергуванням асортименту на лінії виробництва продукції. У такий самий термін перевіряють мікробіологічний стан обладнання, інвентарю, пакувальної тари, рук працюючих та спецодягу.

Проби відібрані від зразків однієї партії змішують і формують з них середню пробу.

При проведенні мікробіологічних досліджень визначають: загальне мікробне число в 1 г виробу, характер мікрофлори, БГКП, кількість дріжджів та грибів.

Для майонезу МАФAM не досліджується. Вміст дріжджів не повинен перевищувати 1 000 в 1 г (см³), грибів – 10 в 1 г (см³), БГКП – 0,01.

Для маргаринів МАФAM не досліджується. Вміст дріжджів не повинен перевищувати 1 000 в 1 г (см³), грибів – 100 в 1 г (см³), БГКП – 0,01.

Визначення мікробного числа та характеру мікрофлори досліджуваних зразків проводять аналогічно викладеним в лабораторній роботі №1 методикам дослідження сировини для олійно-жирових виробництв.

Для виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів в зразках розроблені окремі експрес-методи. Використання методів, що були наведені в попередній роботі, унеможлиблюється за рахунок великої тривалості їх проведення, яка в деяких випадках може перевищувати термін реалізації готового продукту.

Перший метод. Досліджуваний зразок вносять в пробірку з середовищем Хейфеца (до 1л розчину, який містить 1% пептону, 0,5% кухонної солі і 0,5% маніту, додають 1 мл 5% спиртового розчину різолової кислоти і 2,5 мл 0,1% водного розчину метилової сині). Потім профламованим пінцетом вкладають в пробірку трохи стерильного фільтрувального паперу і стерильною скляною паличкою проштовхують його разом з наважкою проби на дно пробірки, щоб проба не сплила. Пробірки 12-13 годин витримують у термостаті при температурі 37°C. У випадку наявності бактерій групи кишкових паличок, середовище

змінює колір з червоно-фіолетового на жовтий, а при збівтуванні зеленіє з утворенням осаду. За відсутності умовно-патогенних мікроорганізмів колір середовища не змінюється. Знебарвлення середовища, його інтенсивне помутніння та виділення газу вказує на розвиток анаеробних мікроорганізмів.

Другий метод. Чашки з середовищем Ендо витримують в термостаті при 37°C протягом 2-3 годин та висівають на них досліджувану пробу. При наявності в зразках бактерій групи кишкових паличок, вже через 12-18 год. на середовищі будуть утворюватися характерні для цього виду мікроорганізмів колонії.

І ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Інструкція призначена для здійснення відомчого санітарного — мікробіологічного контролю на підприємствах за такими показниками безпеки, як мікробіологічні показники.

Мета документу - забезпечення належного відомчого санітарно-мікробіологічного контролю, який є невід'ємною складовою частиною комплексу послідовних дій, що забезпечують випуск продукції стабільної якості та безпечної в епідемічному відношенні.

Санітарно - мікробіологічний контроль складається з контролю сировини, окремих складових технологічного процесу, готової продукції, санітарного стану підприємства та особистої гігієни працюючих.

При організації санітарію - мікробіологічного контролю виробництва маргарину та майонезу слід керуватися цією інструкцією, відповідною нормативною та методичною документацією на сировину та готову продукцію (ДСТУ, ТУ, ГОСТ та ін.) технологічними регламентами, інструкціями, санітарними правилами, інструкціями з миття, дезінфекції технологічного обладнання, підтримки належного стану приміщень та повітря.

3 ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Підприємства, що виробляють маргарин та майонез, повинні забезпечити випуск продукції відповідно до вимог нормативної документації, яка гарантує їх споживчі властивості та епідемічну безпеку. Фахівці, що здійснюють санітарно – мікробіологічний контроль, повинні мати базову підготовку з мікробіології і систематично підвищувати свою кваліфікацію.

3.1 Мікробіологічні критерії оцінки якості та безпеки маргарину, та майонезу.

3.1.1 Маргарин та майонез, які вироблені на підприємстві при суворому дотриманні санітарно-гігієнічних правил, технологічних режимів виробництва, повинні відповідати вимогам ГОСТ 240 "Маргарин. Общие технические условия", ТУУ 18.433-97 "Маргарини м'які. Технічні умови", ТУУ 18.560-2001 "Маргарин. Технічні умови", ГОСТ 3004.1 "Майонез. Технические условия", "медико – биологические и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов" № 5061 – 89, 01.18.89 та іншої нормативної документації, що чинна в Україні.

3.1.2 За мікробіологічними критеріями оцінки якості та безпеки маргарину та майонезу передбачено визначення таких груп мікроорганізмів:

3.1.2.1 Санітарно – показові мікроорганізми.

В бутербродних маргаринах, які використовують для виготовлення кремів, проводять визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно – анаеробних мікроорганізмів (МАФАМ) шляхом кількісного підрахунку колоній, що виростають в глибині на поверхні поживного агару за температури $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 72 годин. Результати дослідження виражають кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г або 1cm^3 продукту.

У маргарині та майонезі визначається відсутність бактерій групи кишкових паличок (коліформи) в обумовленій кількості продукту.

До коліформних бактерій групи кишкових паличок (БГКП) віднесені аеробні та факультативно – анаеробні, грамнегативні, не утворюючі спор палички, що зброджують лактозу з утворенням кислоти та газу за температури 37°C на протязі (24 - 48) годин.

3.1.2.2 Патогенні мікроорганізми.

Дослідження по виявленню патогенних мікроорганізмів за угодою здійснюють лабораторії, які мають право на роботу з патогенними мікроорганізмами відповідних груп небезпеки і акредитовані на цей вид діяльності.

3.1.2.3 Показники мікробіологічної стабільності продукту.

Як і для більшості продуктів харчування, в маргарині та майонезі контролюють вміст дріжджів та пліснявих грибів згідно ГОСТ 10444.12.

3.2 Об'єкти дослідження.

3.2.1 Якість маргарину та майонезу за мікробіологічними показниками залежать від ряду факторів:

- якості сировини та компонентів;
- додержання рецептури та технологічних режимів;
- якості та стану пакувальної тари та матеріалів;
- якості миття та дезінфекції інвентарю та обладнання;
- санітарного стану виробничих приміщень;
- дотримання правил особистої гігієни персоналом.

3.2.2 Відповідно до цих факторів при здійсненні санітарно – мікробіологічного контролю маргарину та майонезу визначаються такі об'єкти контролю:

- сировина та компоненти;
- готова продукція;
- санітарний стан обладнання, інвентарю, пакувальної тари, рук робітників спецодягу;
- питна вода, яка використовується у виробництві;
- повітря виробничих приміщень.

3.2.3 Сировиною при виробництві маргарину та майонезу є: рафінована дезодорована олія, саломаси, яєчні продукти, молоко коров'яче питне, різні види молока сухого, вершкове коров'яче, какао - порошок, кисломолочна закваска, цукор, спеції та прянощі, гірчичний порошок, ізоляти, концентрат та гідролізати рослинних білків, концентрат казеїнати молочні тощо.

Сировина, що використовується, при надходженні повинна мати супроводжуючу, документацію про якість, що містить відомості про мікробіологічні показники, які повинні відповідати вимогам чинних нормативних документів на цей вид продукту.

Плановий контроль за мікробіологічними показниками сировини здійснюється бактеріологом підприємства вибірково, але не рідше одного разу на місяць (крім заквасок для молока, додаток В).

Обов'язково (позапланове) проводиться мікробіологічний контроль у таких випадках:

- відсутність у супровідній документації постачальника відомостей мікробіологічних показників;
- вперше надходить нова сировина ;
- вперше надходить сировина від нового постачальника;
- готовий продукт за мікробіологічними показниками не відповідає встановленим нормам і слід встановити причину забруднення;
- за різними обставинами порушено режими зберігання, у зв'язку з чим виникає сумнів з якості.

Примітка 1. Основною сировиною для виробництва маргарину та майонезу є натуральні жири та олії. В порівнянні з іншою сировиною вони не схильні до мікробіологічного псування, в зв'язку з тим, що вміст води в них незначний і не перевищує (0,1 – 0,3) %.

Виходячи з цих обставин, вищезазначені види сировини не входять до норм санітарно - мікробіологічного контролю".

Примітка 2. Згідно з чинною нормативною документацією (ГСТУ 18.29-98) гірчичному порошку не нормуються мікробіологічні показники. Як показали дослідження, гірчичний порошок може мати значне обсіменіння мікроорганізмами, що може впливати на якість готового майонезу. Виходячи з цих обставин, гірчичний порошок введено у "Схему контролю". Методика дослідження наведена у Додатку Б.

3.2.4 Компоненти для маргарину та майонезу: молоко пастеризоване, молоко зквашене, цукровий сироп тощо.

Компоненти контролюються згідно зі схемою санітарно-гігієнічного контролю (Додаток В). При необхідності (забруднення готової продукції, порушення технологічного процесу тощо) вони підлягають контролю згідно з виробничою необхідністю.

Показники якості компонентів не повинні перевищувати встановлені нормативи для готового продукту.

3.2.5 Готова продукція: маргарин та майонез.

Кількість бактерій групи кишкових паличок, дріжджів та пліснявих грибів гарантується виробником і визначається підприємством періодично, але не рідше одного разу у десять днів з чергуванням асортименту та ліній виробництва продукції.

3.2.6 Санітарний стан обладнання, інвентарю, пакувальної тари, рук робітників та спецодягу.

Мікробіологічний контроль обладнання, інвентарю, пакувальної тари, рук та спецодягу проводиться лабораторією підприємства без попередження, з обов'язковим записом у журналах (форма 1). Мікробіологічний контроль чистоти оцінюють по кожному контрольному об'єкту згідно зі "Схемою організації санітарно – мікробіологічного контролю" (додаток В) і додатково (позапланової при необхідності, а саме: забрудненість продукції, ремонт обладнання та приміщення, літній період року, підвищення захворюваності робітників тощо.

Контроль санітарно - гігієнічного стану обладнання проводять після його миття, дезинфекції, щоб оцінити якість проведеної санітарної обробки.

Фактично в 100 % змивів з контрольних об'єктів не повинно бути бактерій групи кишкових паличок (допускається лише 1% незадовільних змивів від кількості проб, які досліджуються).

Визначення загальної кількості бактерій (МАФАМ) проводиться, якщо дозволяє обсяг роботи бактеріолога.

У разі виявлення бактерій групи кишкових паличок або перевищення нормативів по загальній кількості бактерій у змивах з обладнання та інших контрольних об'єктів лабораторія повинна повідомити про результати досліджень начальника цеху, який надає наказ про термінове вживання відповідних заходів: повторне миття і дезинфекцію обладнання, пакувальної тари та інше. Після повторної санітарної обробки необхідно знову провести аналіз змивів. В разі виявлення бактерій групи кишкових паличок або встановлення загальної кількості бактерій, що перевищує встановлені норми у змивах з одного і того ж обладнання, адміністрація підприємства повинна зупинити роботу цеху для проведення генерального прибирання, ретельного миття із розбиранням трубопроводів та дезинфекцією всього обладнання.

Після цього лабораторія повинна провести мікробіологічний контроль.

3.2.7 Питна вода.

Питна вода підлягає лабораторним дослідженням у виробничій лабораторії, яка акредитована на проведення цих аналізів, або в санітарно - епідеміологічній станції. Аналіз води проводиться не рідше одного разу на місяць.

3.2.8 Повітря виробничих приміщень.

Повітря виробничих приміщень підлягає бактеріологічному контролю не рідше одного разу на квартал у зимовий період року, у літній — не рідше одного разу на місяць.

3.3 Державний санітарно - епідеміологічний нагляд здійснюється відповідно до плану роботи установи держсанепідслужби.

3.4 В разі відсутності на підприємстві мікробіолога лабораторний контроль проводиться за угодою з установами держсанепідслужби.

4 ВІДБІР ПРОБ ДЛЯ САНІТАРНО-БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Загальні положення

4.1.1 При відборі проб для проведення контролю керуються відповідною нормативною документацією на окремі види продуктів (розділи "Методи випробувань та відбір проб"), а також основними положеннями ГОСТ 26668.

4.1.2 Проби для мікробіологічного аналізу відбирають перед тим, як брати проби для інших цілей, асептичним способом, що виключає мікробне забруднення продукту із зовнішнього середовища.

4.1.3 Посуд, інструменти та матеріали, які використовують для відбору проб, повинні бути стерильні.

Їх стерилізують одним із таких способів:

- насиченою парою в автоклаві за температури $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 30 хвилин;
- гарячим повітрям в стерилізаторі;
- з примусовою циркуляцією повітря за температури $(170 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 60 хвилин;
- без примусової циркуляції повітря за температури $(180 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 15 хвилин, за температури $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 120 хвилин.

Допускається обробка інструментів шляхом занурення їх в етиловий спирт з масовою часткою 95 % з наступним фламбуванням в полум'ї пальника.

4.1.4 Маса (об'єм) проби встановлюється у відповідності з НД на конкретний вид продукту. Вона повинна бути достатньою для проведення мікробіологічних аналізів, а саме: не менше $(100-150) \text{ г (см}^3\text{)}$. Від продукту, маса якого перевищує масу проби, відбирають середню пробу в один посуд шляхом взяття ізольованих проб з різних місць і з різної глибини, а також з поверхневих шарів, які контактують з тарою.

4.1.5 Якщо маса (об'єм) проби продукту не встановлена в нормативній документації на конкретний вид продукції, то від кожної пакувальної одиниці, яка потрапила у вибірку, відбирають:

- не менше двох одиниць – від продукту у споживчій тарі;
- до $1000 \text{ г (см}^3\text{)}$ - від продукції у транспортній тарі (рідинної, пастоподібної, сипкої консистенції).

4.1.6 Мікробіологічні дослідження проводять не пізніше чотирьох годин з моменту відбору проб.

Зразки до початку дослідження зберігають при температурі $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в окремому промаркованому холодильнику.

4.1.7 Відібрані і доставлені в лабораторію проби реєструються у відповідному лабораторному журналі.

4.1.8 При відборі проб для: мікробіологічних досліджень фахівцями санітарно – епідеміологічної служби необхідно, щоб мікробіолог підприємства водночас з ним відбирав проби і досліджував їх (паралельне визначення).

4.2 Відбір проб продукту

4.2.1 Відбір проб від рідинного або пастоподібного продукту (молоко, молоко зквашене, закваска рідка, цукровий сироп, вода тощо).

4.2.1.1 З ємкості місткістю до 1000 см^3 пробу відбирають піпеткою або металевим черпаком. Перед відбором проби вміст ємкості ретельно перемішують.

4.2.1.2 З ємкості місткістю більше 1000 см^3 ізольовані проби відбирають в один посуд з різної глибини не менше, ніж з трьох шарів продукту або після ретельного перемішування усього вмісту ємкості.

4.2.1.3 При відборі проб із резервуару з краном, кран спочатку промивають водою, протирають тампоном, змоченим етиловим спиртом з масовою часткою 70 %, та обпалюють в полум'ї пальника, потім випускають від 10 см^3 до 100 см^3 рідини (в залежності від місткості резервуару та діаметру крану) і тільки після цього відбирають пробу в посуд таким чином, щоб кількість рідини, яка необхідна, потрапляла безпосередньо в посуд. Об'єм проби продукту приблизно 200 см^3 води – 1500 см^3

Відбір проб від сипучих продуктів (молоко сухе, яєчні продукти, цукор тощо).

Пробу відбирають після ретельного перемішування продукту мішалкою або черпаком. Якщо продукт не може бути перемішаний (наприклад, мішок цукру), то проби відбирають шляхом взяття ізольованих проб з різних місць, різної глибини, а також, з поверхневих шарів, які контактують з тарою, в один посуд.

4.2.3 Відбір проб від готової продукції (маргарин та майонез)

4.2.3.1 Відбір проб готової фасованої продукції проводять від декількох одиниць фасування (не менше двох - трьох) від кожної однорідної партії. Потім від кожного зразка відбирають приблизно по 50 г продукту в один посуд для одержання середньої проби.

4.2.3.2 Проби від фасованої продукції масою до 1000г (маргарин, майонез) відбирають шляхом взяття ізольованих проб з різних місць пакувальної тари, а також з поверхневих шарів, які контактують з пакувальним матеріалом, в один посуд. Відбір проби проводять шпателем, ложкою тощо.

4.2.3.3 Пробу від нефасованого маргарину (моноліт) масою більше 1000 г відбирають від декількох (не менше двох) одиниць пакування стерильним щупом на відстані (3-5) см від краю шматка, спрямовуючи щуп до протилежної сторони на $\frac{3}{4}$ його довжини. З стовпчика продукту в щупі відбирають стерильним шпателем приблизно 20г та переносять в стерильний посуд (при дослідженні на патогенну) мікрофлору об'єм проби складає приблизно 50 г). Стовпчик продукту що залишається на щупі після відбору проби, повертають на колишнє місце, поверхню моноліту акуратно зрівнюють.

4.2.3.4 Пробу від нефасованого майонезу відбирають піпеткою в один посуд ізольованими пробами з різної глибини не менше, ніж з трьох шарів продукту або черпаком після ретельного перемішування.

5 ЗАСОБИ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ ТЕХНІКИ, ОБЛАДНАННЯ, МАТЕРІАЛИ, РЕАКТИВИ І ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ПРИ ПРОВЕДЕННІ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

5.1 Засоби вимірювальної техніки та обладнання:

- стерилізатор паровий (автоклав);
- апарат для бактеріологічного аналізу повітря;
- бактерицидні опромінювачі для боксу БУВ 10 або БУВ 30;
- баня водяна з терморегулятором;
- ваги лабораторні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г (для зважування реактивів) з набором різноваг;
- ваги лабораторні 4-го класу точності з найбільшою межею зважування 1000 г (для зважування продукту) з набором різноваг;
- годинник або таймер;
- лупа з (5-10) кратним збільшенням;
- мікроскоп світловий біологічний із збільшенням 900-1000 разів ;
- прилад для підрахунку колоній;
- рН-метр, який забезпечує вимірювання рН в інтервалі 0÷14 ;
- система очищення води (дистилятор електричний);
- стерилізатор сухоповітряний;
- термометри лабораторні скляні з діапазоном вимірювання від 0°C до 50 °C; від 0°C до 100 °C; від 0°C до 150 °C; від 0°C до 200 °C;
- термометр максимальний;
- термостати, які дозволяють підтримувати задану температуру з похибкою ± 1 °C;
- холодильники побутові;
- електроплитка;
- шафа сушильна

5.2 Матеріали та обладнання

- вата медична гігроскопічна;
- каstrулі емальовані ємкістю 1000 см³ та 3000см³;
- кювети типу КП для фарбування препаратів;
- марля медична;
- маркери по склу;
- ніж консервний для відкриття банок;
- ножиці;
- обладнання для відбору проб (паровідбірник, щуп, черпак, шпатель)
- папір індикаторний універсальний (або інший, який забезпечує вимірювання рН в інтервалі 0÷2;

- папір фільтрувальний та пергаментний;
- пальник;
- пенали лабораторні скляні або металеві для стерилізації посуду;
- пінцети медичні;
- петлі бактеріологічні;
- скальпель хірургічний;
- системи індикаторні для визначення оксидазного тесту;
- трафарет для взяття змивів (10см x 10см);
- термоіндикатори для контролю режиму стерилізації автоклаву на 120° та 132°C;
- шпателі металеві або дерев'яні;
- шпагат.

5.3 Лабораторний посуд:

- колби мірні місткістю 100 см³, 2 клас точності;
- колби круглодонні або плоскодонні місткістю 100, 250, 500, 1000 см³;
- палички скляні;
- пляшки з темного скла місткістю 250 см³ і 500 см³;
- пробірки діаметром (18-20) мм;
- пробірки Уленгупта (поплавки);
- піпетки мірні місткістю (0,1; 1,0; 10,0; 50,0) см³ 2 клас точності;
- стакани хімічні;
- скельця предметні для мікроскопії;
- скельця покривні для мікроскопії;
- ступка фарфорова з товкачиком;
- скляні бюкси з пришліфованими пробкам;
- циліндри мірні місткістю від 50 см³ до 1000см³, 2 клас точності;
- чашки Петрі.

5.4 Реактиви і поживні середовища:

- агар мікробіологічний;
- вода очищена (дистильована);
- глюкоза;
- дезинфікуючі засоби;
- диметил - п - фенилендіамін гідро хлорид;
- жовч суха або жовч наливна сільськогосподарських тварин;
- йод;
- калій гідроокис;
- калій йодистий;
- кислота соляна;
- кислота цитринова;
- кристалічний фіолетовий;
- лактоза;
- левоміцетин (медпрепарат);
- мальтоза;
- масло імерсійне для мікроскопії;
- медичний ефір;
- метиленовий голубий, індикатор;
- натрій гідроокис;
- натрій двовуглекислий;
- натрій хлористий;
- α-нафтол;
- неоміцин (медпрепарат);
- пеніцилін (медпрепарат);
- пептон сухий ферментативний;
- перекис водню з масовою часткою 6%

- спирт етиловий ректифікований;
- Середовище поживний агар сухий;
- середовище Кесслер сухе;
- середовище КОДА сухе;
- середовище ЕНДО сухе;
- середовище з лактозою сухе;
- середовище Сабура;
- стрептоміцин (медпрепарат);
- фуксин - основний.

6 ПІДГОТОВКА ДО ПРОВЕДЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ АНАЛІЗІВ

6.1 Підготовка приміщення

6.1.1 Приготування заквасок проводять у приміщенні, спеціально обладнаному для проведення цих робіт – боксах.

Щоденно бокс піддають ретельному прибиранню і знезаражуванню розчином перекису водню з масовою часткою 6% чи іншим придатними дезінфікуючими засобами (наприклад, розчин монохлораміну з масовою часткою 1 – 2 %). Готують і обробляють бокс з дотриманням вимог техніки безпеки. Норма витрати дезінфікуючого розчину (70 - 100) см³/м² під час вологого прибирання.

Розчин готують безпосередньо перед застосуванням.

У кожному боксі повинні бути встановлені бактерицидні випромінювачі з розрахунку 2,5 Вт на 1м³. випромінювачі розміщують на стелі і стінах в залежності від площі приміщення. Бокс опромінюють до початку роботи протягом (1 - 2) годин. Під час проведення випробування лампи повинні бути вимкнуті. Ведеться облік роботи бактерицидного випромінювача.

6.1.2 Мікробіологічні аналізи проводять у спеціальному (окремому) відділенні — боксі, який попередньо підготовляють за п.6.1.1, або в одному з відділень мікробіологічної лабораторії, в якому під час проведення аналізу повинні бути зачинені кватирки та двері, щоб запобігти протягів та руху повітря.

Категорично забороняється проведення мікробіологічних досліджень в боксі, де готуються закваски.

6.2 Підготовка посуду і матеріалів

6.2.1 Новий лабораторний посуд, призначений для мікробіологічних робіт, кип'ятять протягом 15 хвилин в підкисленій воді (з масовою часткою соляної кислоти (1-2) %), промивають водопровідною водою, потім ополіскують очищеною (дистильованою) водою і висушують.

6.2.2 Вимитий посуд стерилізують у сухоповітряному стерилізаторі за температури (160±5) °С протягом двох годин чи в автоклаві за температури (121±1) °С протягом (30 ±1) хвилин з наступним висушуванням.

Перед стерилізацією колби і пробірки закривають ватно-марлевими пробками. Піпетки стерилізують загорнутими в папір чи в металевих пеналах. У кінець піпетки попередньо вкладають шматочок вати на глибину (20-30) мм.

Чашки Петрі загортають у папір чи складають у металеві пенали.

Стерильний посуд зберігають у шафах та ящиках, які щільно закриті, не більше 7 діб. На пакуванні посуду обов'язково вказують дату стерилізації.

6.2.3 Тампони ватні або марлеві для змивів стерилізують загорнутими у папір. Тампон може бути закріплений на дроті, який проходить через ватну пробку. В цьому разі його разом з пробкою вставляють в пробірку з 5 см³ фізіологічного розчину або пептонно – сольового розчину (тампон не повинен торкатися розчину) і все разом стерилізують за температури (121±1)°С протягом (20±1) хвилин.

6.3 Приготування середовищ, розчинів і реактивів.

Приготування середовищ, розчинів і реактивів проводять згідно з ГОСТ 10444.1, ГОСТ 9225.

Для приготування реактивів, барвників та поживних середовищ використовують реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

6.3.1 Розчини і реактиви загального призначення.

6.3.1.1 Фізіологічний розчин хлористого натрію з масовою часткою 0,85 %.

Для приготування фізіологічного розчину з рН (6,9-7,0) використовують очищену (дистильовану) воду, рН підготовленої води перевіряють за допомогою рН-метру.

В 1000 см³ води розчиняють 8,5 г хлористого натрію, розливають розчин у чисті пробірки діаметром (18-20) мм по 10 см³, в колби - по 93 см³, і стерилізують за температури (121 ± 1) °С протягом (15-20) хвилин. Після стерилізації в пробірках повинно залишитися 9 см³ розчину хлористого натрію, у колбах - 90 см³, (кількість, яка необхідна для приготування розведень з продукту)

6.3.1.2 Стерильна очищена (дистильована) вода Очищену (дистильовану) воду розливають у колби або пробірки в необхідних кількостях і стерилізують за температури (121 ± 1) °С протягом 20 хвилин.

6.3.1.3 Пептонно – сольовий розчин (ПСР)

8,5г хлористого натрію та 1,0г пептону розчиняють в 1000 см³ очищеної (дистильованої) води при повільному нагріванні. Одержаний розчин розливають у колби і пробірки і стерилізують за температури (121 ± 1) °С протягом (20 - 30) хвилин.

6.3.1.4 Розчин двовуглекислого натрію з масовою часткою 10 % для нейтралізації проб закваски, зквашеного молока та майонезу.

В 100 см³ очищеної (дистильованої) води розчиняють 10 г двовуглекислого натрію, розливають розчин в чисті пробірки по (10-20) см³ і стерилізують за температури (121±1)°С Протягом 15хвилин.

6.3.1.5 Розчин цитринової кислоти для підкислення поживних середовищ з масовою часткою 20%.

В 100 см³ очищеної (дистильованої) води розчиняють 20 г цитринової кислоти, розливають у пробірки чи колби і стерилізують за температури (121±1)°С протягом 20 хвилин.

6.3.1.6 Розчин гідроокису натрію для луження поживних середовищ.

В 100 см³ дистильованої води розчиняють 10 г гідроокису натрію, розливають у чисті пробірки чи колби і стерилізують за температури (121±1)°С протягом (15 – 20) хвилин.

6.3.1.7 Приготування реактивів для забарвлення за Грамом.

Реактив 1. До 100 см³ етилового спирту з масовою часткою 95% додати 0,5 г кристалічного фіолетового.

Примітка: Розчинення йодистого калію в спирті проводити на водяній бані за температури (45 - 50) °С при постійному перемішуванні.

6.3.1.8 Приготування розчину метиленового голубого

Для приготування основного спиртового розчину необхідно 10 г метиленового голубого розчинити у 100 см³ етилового спирту з масовою часткою 95 %. Суміш ставлять у термостат на 24 години за температури (37±1)°С, потім фільтрують. Одержаний основний розчин метиленового голубого зберігають не більше 3 місяців у термостаті за температури (37 ± 1)°С у темній, щільно закритій склянці.

Розчин метилового голубого для забарвлення препарату готують таким чином: до 30см³ основного спиртового розчину додають 100 см³ дистильованої води і 1 см³ розчину гідроокису калію з масовою часткою 1 %.

6.3.1.9 Приготування розчину кристалічного фіолетового

1,0 г кристалічного фіолетового переносять у мірну колбу ємкістю 100 см³ і доводять до мітки очищеною (дистильованою) водою.

Розчин зберігають в темній пляшці з притертою пробкою за температури 4 °С не більше 7 діб.

6.3.1.10 Приготування суміші Никифорова для знежирення скла.

Змішують рівні об'єми етилового спирту і медичного ефіру в широкогорлій склянці з притертою пробкою. Предметні скельця зберігають у цій суміші до використання.

6.3.1.11 Реактиви для визначення цитохромоксидази (оксидазний тест). Представники родини Enterobacteriaceae не мають цитохромоксидази, що використовується для диференціації їх від псевдомонад та деяких інших грамегативних бактерій.

Склад: Розчин А:

Спирт етиловий з масовою часткою 95% - 100 см³

α-нафтол - 1 г

Розчин Б:

Дим етил – п - фенілендіамін гідрохлорид – 1 г

Вода очищена (дистильована)- 100 см³

Розчин А зберігається в холодильнику до 10 діб. розчин Б - використовується свіжого приготування.

Доцільно використовувати для визначення цитохромоксидази комерційні препарати згідно з інструкцією, що додається до препарату.

6.3.2 Поживні середовища

6.3.2.1 Середовище для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно - анаеробних мікроорганізмів (МАФМ).

Доцільно використовувати готові поживні середовища, що випускаються спеціалізованими підприємствами. Спосіб застосування зазначено на етикетці.

В разі необхідності приготування поживного середовища з окремих інгредієнтів необхідно керуватися ГОСТ 10444.1, ГОСТ 9525.

6.3.2.2 Середовища для виявлення бактерій групи кишкових паличок. Середовище Кесслер (з лактозою) — До 1000 см³ питної води додати 50 см³ жовчі нативної (без консервантів) сільськогосподарських тварин і 10 г пептону. Суміш кип'ятити (20 -30) хвилин на водяній бані при перемішуванні, фільтрувати через ватно-марлевий фільтр, потім додати 2,5 г лактози.

Довести об'єм суміші водою до 1000 см³, встановити реакцію середовища рН (7,4-7,6), додати 2 см³ розчину кристалічного фіолетового з масовою часткою 1 %, розлити у пробірки по 5 см³, закласти поплавки. Стерилізувати (10-15) хвилин за температури (121 ±1)°С.

Сухе середовище Кесслер. Підготовку середовища для посіву проводити згідно з прописом на етикетці, використовувати з поплавками.

Середовища ЕНДО, КОДА. Доцільно використовувати сухі середовища. Готувати їх згідно з прописом на етикетці. Допускається зберігання приготуваних і розлитих в стерильні чашки Петрі або пробірки середовища за температури (4±2) °С протягом (2-3) діб.

Середовище КОДА розливають по 5 см³ у пробірки без поплавків. Використовують для дослідження змивів.

Сухе середовище з лактозою. Підготовку середовища для посіву проводити згідно з прописом на етикетці.

6.3.2.3 Середовища і розчини для виявлення пліснявих грибів та дріжджів.

Середовище Сабуро. До 1000 см³ очищеної (дистильованої) води додають 18,0 г агару і залишають на 30 хвилин для його набухання, потім додають 40,0 г, мальтози або глюкози і 10,0 г пептону, нагрівають до повного розчинення (при наявності осаду фільтрують через гігроскопічну вату). Встановлюють рН за допомогою цитринової кислоти таким чином, щоб після стерилізації рН була (6,5 ±1). Фільтрат розливають у стерильні колби або пробірки і стерилізують за температури (112 ±1) °С протягом 20 хвилин.

Для підвищення селективності середовища Сабуро до нього додають антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин, неоміцин, левоміцетин). Приготування розчинів антибіотиків наведено у ГОСТ 10444.12.

Водні розчини антибіотиків вводять безпосередньо перед використанням в розтоплене та охолоджене до (45-- 46)°С поживне середовище.

Середовище з антибіотиками готується безпосередньо перед застосуванням!

Допускається використання інших середовищ, зазначених у ГОСТ 10444.12, а також готових середовищ, що випускаються спеціалізованими підприємствами.

6.3.3 Контроль поживних середовищ

6.3.3.1 Визначення активної кислотності (pH)

Визначення pH проводять за допомогою pH – метру згідно з інструкцією. Загальні вимоги за ГОСТ 10444.1.

6.3.3.2 Контроль ростових, диференціюючих властивостей поживних середовищ за допомогою тест-штамів мікроорганізмів проводять за угодою установи держсанепідслужби.

6.3.4 Строки і умови зберігання середовищ.

При відсутності спеціально встановлених умов і строків зберігання поживні середовища зберігають згідно ГОСТ 10444.1.

6.4 Підготовка проб до аналізу .

Підготовку проб до аналізу проводять згідно з ГОСТ 26669.

6.4.1 Розкриття упаковки з пробою продукту проводять в асептичних умовах таким чином, щоб запобігти можливості забруднення продукту, навколишніх предметів та середовища.

6.4.2 Відібрані проби перед дослідженням ретельно перемішують.

6.4.3 Перед відкриттям пакувальної тари (банок, пакетів) з продуктом кришку банки або поверхню пакетів протирають тампоном, змоченим етиловим спиртом з масовою часткою 95%. Банку розкривають стерильним консервним ножом, її шийку обпалюють. Край пакету розрізають стерильним скальпелем або ножицями у тому місці, де попередньо обробили тампоном.

6.4.4 Проби жирових продуктів (маргарину, масла) перед відбором з них наважок розтоплюють на водяній бані за температури не вище 45 °С

6.5 Відбір наважок

6.5.1 З кожної проби продукту залежно від показників, які визначають, відбирають одну або декілька наважок для приготування розведень та висіву на поживні середовища.

6.5.2 Наважку для посіву відбирають ваговим або об'ємним методом безпосередньо після розкриття проби продукту біля полум'я пальника.

6.5.3 Наважки від проби рідких та в'язких продуктів відбирають після їх ретельного перемішування об'ємним методом стерильною піпеткою. Частину рідкого продукту, яка залишилась на поверхні піпетки, залишають стекти до кінця піпетки. Краплинку, що утворилась, видаляють доторканням до внутрішньої стінки посуду.

В'язкі продукти усувають з поверхні піпетки стерильним ватним тампоном.

6.5.4 Наважку від проб рідких жирів відбирають теплою піпеткою, яка нагріта фламбуванням.

6.5.5 Наважку від проб твердих та сипких продуктів (яєчні продукти, сухе молоко, спеції та прянощі тощо) проводять стерильною ложкою або шпателем з різних місць продукту. Потім наважку переносять в попередньо зважений стерильний посуд, зважують.

6.6 Приготування розведень

6.6.1 Для приготування розведень використовують різні розчинники в залежності від продукту — фізіологічний розчин, пептонно - сольовий розчин і стерильну очищену (дистильовану) воду.

6.6.2 Для обліку кількості мезофільних аеробних та факультативно - аеробних організмів продукт, який досліджують, розводять у 10, 100, 1000 разів і більше в залежності від обсіменіння, що передбачається (1×10^{-1} ; 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4}).

6.6.3 Для встановлення відсутності бактерій групи кишкових паличок у певній кількості продукту готують те розведення, в якому і визначається ця група бактерій.

6.6.4 Для виявлення пліснявих грибів продукт не розводять або розводять у 10 та 100 разів (1×10^{-1} ; 1×10^{-2})

6.6.5 Жири після розтоплення проби в об'ємі 10 см³ відбирають підігрітою піпеткою і переносять у посуд з пептонно - сольовим розчином, попередньо підігрітим до температури (40-45)°С.

6.6.6 Вихідне або основне розведення містить в 1 см^3 0,1 г продукту (1×10^{-1}). Його отримали перенесенням наважки 10 г (см^3) продукту в приготовлений розчин для розведення (колба з 90 см^3 відповідного розчину).

6.6.7 Стерильною піпеткою ретельно перемішують вміст основного розведення і переносять 1 см^3 його у пробірку з 9 см^3 розчинника так, щоб піпетка не торкалася розчину. Одержують таким чином друге розведення, 1 см^3 якого вміщує 0,01 г (см^3) продукту – розведення (1×10^{-2}).

Вміст пробірки другого розведення перемішують новою стерильною піпеткою, відбирають 1 см^3 і вносять у пробірку з 9 см^3 розчинника так, щоб піпетка не торкалася поверхні розчину. Перемішують новою стерильною піпеткою. Третє розведення містить 0,001 г (см^3) продукту в 1 см^3 (1×10^{-3}). Наступні розведення готують аналогічним способом.

7 ПРОВЕДЕННЯ ВИПРОБУВАНЬ

При проведенні санітарно – мікробіологічного контролю виробництва маргарину та майонезу у випробувальних лабораторіях визначаються такі групи мікроорганізмів: загальна кількість мезофільних аеробних і факультативно – анаеробних мікроорганізмів, бактерії, групи кишкових паличок (полі формні бактерії) в певному об'ємі (або масі) продукту, дріжджів, пліснявів, грибів.

7.1 Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно – анаеробних мікроорганізмів (МАФAM).

7.1.1 Суть методу

Метод заснований на кількісному підрахунку числа колоній мікроорганізмів, які вирости на щільному поживному середовищі за температури (30 ± 1) °C протягом 72 годин.

7.1.2 Апаратура, матеріали, середовище згідно з розділом 5 та п.6.3.2.1.

7.1.3 Посуд, матеріали, середовище готують та стерилізують згідно з п. 6.2.

7.1.4 Підготовку проб і приготування розведень виконують згідно пп. 6.4-6.6.

7.1.5 Проведення аналізу.

Для посіву використовують такі розведення продукту, щоб на чашках виросло від 30 до 300 колоній.

Залежно від припустимого ступеня мікробного обсіменіння використовують не менше двох розведень з тих, що приготовлені (1×10^{-1} ; 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4}).

По 1 см^3 з кожного розведення, переносять на дно двох стерильних чашок Петрі (два паралельних визначення). У чашки Петрі з посівним матеріалом доливають по (10 -15) см^3 попередньо розтопленого і охолодженого до температури (40 -45) °C поживного середовища і обережними обертами перемішують при закритій кришці, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всьому поживному середовищу. Потім чашки з посівами залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання поживного середовища.

7.1.6 Інкубація.

Після застигання середовища чашки Петрі інкубують у термостаті догори дном за температури 30°C 72 години (допускається попередній підрахунок через 48 годин з наступним остаточним підрахунком ще через 24 години).

7.1.7 Підрахунок і обробка результатів

Після зазначеного для інкубації часу проводять облік колоній мікроорганізмів, які вирости на чашках. Підраховують ті чашки розведення, де кількість колоній знаходиться в межах від 30 до 300.

Неозброєним оком або за допомогою лупи зі збільшенням у 4-10 разів або приладу для підрахунку колоній підраховують кількість колоній, які вирости на кожній чашці.

В окремих випадках при значному числі колоній дно чашки Петрі ділять на (4-6) однакових секторів, підраховують число колоній на (2-3) секторах (але не менше ніж на 1/3 поверхні чашки), знаходять середнє арифметичне число колоній, яке множать на загальну

кількість секторів усієї чашки. Таким чином, знаходять загальну кількість колоній, які вирости на одній чашці.

Число колоній, які вирости на кожній чашці, перераховують на 1г або см³ продукту з врахуванням розведення.

Остаточним результатом є середнє арифметичне від результатів підрахунків колоній на окремих чашках одного розведення.

Результат аналізу виражають у вигляді числа КУО/г (або см³) з вказівкою відповідності або невідповідності продукту мікробіологічному нормативу на цей показник.

7.2Визначення коліформних бактерій (БГКП).

7.2.1 Суть методу.

Коліформні бактерії - грамнегативні палички, що не утворюють спор, розкладають лактозу до кислоти та газу за температури 37 °С протягом (24-48) годин.

7.2.2 Підготовка до аналізу.

Апаратуру, посуд, матеріали, реактиви та поживні середовища готують згідно з розлом 5 п.6.2 та п.6.3.2.2.

7.2.3 Приготування розведень.

Підготовку проб та приготування розведення виконують згідно з пп.6.4-6.6

7.2.4Посів.

Для посіву використовують ту кількість продукту, в якій передбачається відсутність коліформних бактерій.

Посів проводиться у середовище Кесслер з лактозою та поплавками.

Застосування середовища КОДА для продуктів не допускається.

7.2.5Інкубація.

Посіви інкубують за температури (37±1) °С протягом (24-48) год (з обов'язковим переглядом посівів через 24 години інкубації).

7.2.6 Перегляд посівів.

При відсутності газоутворення та помутніння в пробірках з середовищем роблять висновок про відсутність колі формних бактерій (БГКП) в засіяному об'ємі та відповідність продукту нормативу.

При наявності помутніння та газу в пробірках роблять висів не середовище ЕНДО так, щоб отримати ріст ізольованих колоній. Чашки з ЕНДО інкубують за температури 37°С протягом (18-24) години. Висів на ЕНДО потрібний для остаточного обліку коліформних бактерій та визначення мікроорганізмів, підозрілих на шигели чи сальмонели.

Облік посівів на середовище ЕНДО:

1. Ріст колоній мікроорганізмів відсутній – видається негативна відповідь: Коліформні бактерії (БГКП) в засіяному об'ємі відсутні.

2. При наявності росту темно – червоних з металевим блиском чи без нього червоних або рожево – червоних колоній за характером росту типових для коліформних бактерій (округлі, плоскі чи злегка випуклі або з піднятим центром, блискучі, легко знімаються з агару) з ознаками редукції (червоний відбиток під колонією та червоною зоною навколо колонії) на всі види колоній ставлять оксидазний тест та роблять мікроскопію. При виявленні грамнегативних оксидазанегативних паличок видається позитивний результат – в засіяному об'ємі продукції виявлені Коліформні бактерії.

При виявленні безбарвних прозорих колоній на чашках з середовищем ЕНДО підозрілих на патогенні бактерії ці чашки повинні передаватися в лабораторії санітарно – епідеміологічних станцій для подальшої ідентифікації.

7.2.7 Забарвлення за Грамом .

На знежирене предметне скельце наносять 1 краплю стерильної дистильованої (водопровідної) води. В ній розтирають матеріал, який здобутий петлею з характерної колонії на щільному середовищі. Потім вносять краплю реактиву 1 за п.6.3.1.7.

Суміш розподіляють по ділянці 1 см², підсушують за кімнатної температури і фіксують одноразовим проведенням предметного скельця через полум'я пальника. На одному скельці можна готувати 6 – 8 мазків, відокремлюючи їх один від одного лініями, що проведені з

лицьової сторони скельця. Препарат споліскують водою та ретельно просушують фільтрувальним папером.

Після просушування на препарат наносять з надлишком реактив 2 за п.6.3.1.7 так, щоб рідина покрила всю поверхню скельця. Тривалість забарвлення (0,5-1) хвилина. Після забарвлення препарат швидко споліскують проточною водопровідною водою, спрямовуючи струмінь під кутом на скельце, яке розташоване вертикально. Препарат просушують на повітрі або фільтрувальним папером і дивляться під мікроскопом з імерсійною системою. Мікроби, які забарвлюються за Грамом (грам позитивні) мають темно – фіолетовий колір. Мікроби, які не забарвлюються за Грамом (грамнегативні), мають червоний колір.

7.2.8 Постановка оксидазного тесту.

По 2 - 3 ізольованих колоній кожного типу, які вирости на середовищі ЕНДО, знімають петлею або скляною паличкою і наносять штрихом на фільтрувальний папір, який змочений реактивом (2-3 каплі кожного реактиву). В місці нанесення бактеріальної маси папір не змінює кольору, якщо оксидазний тест негативний, і синіє протягом однієї хвилини, якщо бактерії мають активну оксидазу.

7.3 Визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів.

7.3.1 Суть методу.

Метод заснований на кількісному підрахунку числа колоній дріжджів та пліснявих грибів, які вирости на щільному поживному середовищі за температури $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 5 діб.

7.3.2 Обладнання, посуд, матеріали, середовища згідно з розділом 5, п. 6.2; 6.3.2.3.

7.3.3 Підготовку проб і приготування розведень виконують згідно з пп.6.4—6.6.

7.3.4 Проведення аналізу.

Для визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів з кожної проби роблять посів по 1 см^3 нативного продукту і розведення 1×10^{-1} або по 1 см^3 з розведень 1×10^{-1} та 1×10^{-2} на дві чашки Петрі (паралельний висів). В кожну чашку Петрі з попередньо промаркованою кришкою додають не пізніше як через (15 -- 20) хвилин приблизно 15 см^3 агаризованого поживного середовища, попередньо розтопленого і охолодженого до температури $(40 -- 45)^{\circ}\text{C}$, обережними обертами ретельно перемішують; залишають до застигання.

7.3.5 Інкубація.

Чашки з посівами витримують у термостаті за температурою $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 5 діб з попереднім підрахунком через 3 доби. Посіви можна витримувати за кімнатної температури (не менше ніж 20°C).

7.3.6 Опрацювання результатів.

Для кількісного підрахунку відбирають чашки, на яких вирости від 15 до 150 колоній дріжджів та (або) від 5 до 50 колоній пліснявих грибів.

Колонії дріжджів на середовищі мають білувато – жовтий колір, слизьку консистенцію. В процесі зростання та збільшення розмірів колонії набувають перламутрового відтінку та куполоподібного підвищення.

Розвиток плісняви супроводжується появою пухнастого павутиноподібного чи валоподібного утворення на поверхні середовища. Колір різноманітний.

Кількість колоній дріжджів та пліснявих грибів підраховують окремо на кожній чашці. Обчислюють середнє арифметичне число колоній, які вирости на чашках.

Результати обробляють і перераховують окремо для дріжджів та пліснявих грибів.

Кількість колоній дріжджів та пліснявих грибів в 1 см^3 або в 1 г продукту (X) в КУО обчислюють за формулою:

$$X = n \times 10^m, \text{ де}$$

n - середнє арифметичне число колоній;

m - Число десятикратних розведень.

Остаточним підрахунком є середнє арифметичне результатів, які обчислили за паралельними чашками.

7.4 Дослідження заквасок.

При контролі складу мікрофлори заквасок проводять мікроскопію препаратів, які забарвлені метиленовим голубим за п. 6.3.1.8.

7.4.1 Суть методу

Метод заснований на перегляді забарвлених препаратів під мікроскопом для орієнтованої характеристики мікрофлори кисломолочних продуктів.

7.4.2 Проведення аналізу.

Для приготування препаратів на чисте знежирене предметне скельце наносять петлею одну невелику каплю досліджуваного матеріалу або розведення (1×10^{-1}) і розподіляють його по площі близько 1 см^2 . Препарат висушують на повітрі за температури $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, фіксують над полум'ям пальника і забарвлюють метиленовим голубим.

Оцінку чистоти закваски проводять за даними мікроскопії препарату: в заквасці для маргарину повинні знаходитись тільки молочнокислі стрептококи, які розміщені рівномірно у полі зору мікроскопа.

8 ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМИВІВ

8.1 Методика взяття змивів з обладнання та інвентарю

Змиви беруть стерильними ватними або марлевими тампонами за п.6.2.3. Безпосередньо перед взяттям змиву тампон зволожують пептонно-сольовим розчином за п.6.3.1.3 або фізіологічним розчином за п.6.3.1.1. які розлиті по 5 см^3 у стерильні пробірки. Після взяття змивів тампон поміщають у ту ж пробірку, з якої проводили зволоження. Пробірки з тампоном ретельно струшують.

При контролі жирної поверхні використовують сухі тампони.

Змиви з великого обладнання і інвентарю беруть з поверхні 100 см^2 в різних місцях або за допомогою трафарету (розмір трафарету $10 \text{ см} \times 10 \text{ см}$).

Змиви з невеликих предметів беруть шляхом обробки тампоном всієї робочої поверхні, при цьому одним тампоном протирають не менше трьох однойменних предметів.

При дослідженні трубопроводів, насосів допускається використання для аналізу останніх порцій промивної води.

8.2 Методика взяття змивів з пакувальної тари (банок, кришок, пергаменту, коробок тощо)

8.2.1 Взяття змивів з банок та іншої пакувальної тари (коробочок, стаканчиків)

Спосіб 1

Для аналізу відбирають вибірково з конвеєру 10 скляних банок або іншої пакувальної тари (коробочок, стаканчиків), тампон зволожують пептонно - сольовим або фізіологічним розчином і послідовно протирають відібрану пакувальну тару. Після взяття змивів тампон поміщають у ту ж саму пробірку, з якої проводили зволоження.

Спосіб 2

Для аналізу відбирають з конвеєру вибірково 10 банок з партії. В першу заливають - 15 см^3 фізіологічного або пептонно - сольового розчину, держать над полум'ям пальника під кутом 135° , щоб не потрапила мікрофлора із повітря. Обертанням банки змочується розчином вся її внутрішня поверхня, змивний розчин зливається в наступну банку. Таким чином однією порцією розчину обмивають усі 10 банок. З останньої банки змивний розчин засівають у середовище Кесслер.

8.2.2 Взяття змивів з кришок майонезних банок та полімерних стаканів.

Змив проводять стерильним тампоном з внутрішньої поверхні 10 кришок.

8.2.3 Взяття змивів з пергаменту, підпергаменту, полімерної плівки, кашированої фольги, картонних заготівок.

Для визначення чистоти матеріалів розгортають досліджуваний рулон або заготівку і з середини беруть змив стерильним тампоном. Із площі 100 см^2 . Потім тампон поміщають у пробірку з 5 см^3 фізіологічного або пептонно - сольового розчину таким чином, щоб він погрузився повністю в розчин.

Для дослідження змивів допускається використання середовища КОДА.

8.3 Методика взяття змивів з рук робітників.

Змиви беруть у робітників, які контактують безпосередньо з продуктом. Змиви відбирають без попередження перед початком роботи, а також після відвідування туалету.

Змиви з рук беруть зволоженим тампоном за п.8.1, яким проводять не менше 5 разів по долонях та пальцях. Потім протирають дільниці між пальцями, нігтями та під нігтьовим простором.

8.4 Методика взяття змивів з спецодягу.

Для взяття змивів з спецодягу протирають тампоном чотири площі по 25см³ з нижньої частини кожного рукава і передньої частини поверхні спецодягу.

8.5 Методика дослідження змивів та промивних вод.

В разі необхідності визначають загальну кількість бактерій посівом 1см³ в чашку Петрі згідно з п.7.1.

Для виявлення бактерій групи кишкових паличок в розлите у пробірки по 5см³ поживне середовище (Кесслер або КОДА) асептично переносять залишки змивної рідини разом з тампоном.

Промивні води з трубопроводів в кількості приблизно 10см³ вносять у колбу (40-50) см³ з середовищем Кесслер або КОДА. Вміст пробірки або колби добре струшують, щоб перемішати середовище з посівним матеріалом, після чого посіви інкубують у термостаті (24-48) годин за температури (37±1) °С. Подальше дослідження проводять згідно п.7.2.

Примітка. Треба контролювати., щоб рН змивів не було менше (7,0±0,1), бо кисла, реакція може змінити колір середовища КОДА.

У разі необхідності дослідження змивів на визначення загальної кількості аеробних, факультативно - анаеробних мікроорганізмів беруть стерильною піпеткою 1 см³ змивної рідини і переносять на чашки Петрі.

Подальше дослідження проводять згідно з п.7.1.

9 ДОСЛІДЖЕННЯ ПИТНОЇ ВОДИ

Відбір проб води, зберігання і проведення досліджень виконують згідно з ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно - бактериологического контроля".

Оцінка результатів досліджень питної води централізованого водопостачання згідно з ГОСТ 2874-82 "Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством".

10 ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВІТРЯ ВИРОБНИЧИХ ПРИМІЩЕНЬ

Проби повітря відбирають у виробничих приміщеннях перед початком роботи. Вікна, квартирки та двері повинні бути зачинені. Рівень висоти відбору проб повинен відповідати висоті робочого столу або висоті обладнання.

Проби повітря відбирають аспіраційним методом за допомогою апарату для бактеріологічного аналізу повітря. Для визначення загальної кількості бактерій відбирають 100 дм³ повітря на поживний агар, розлитий у чашки Петрі по 15см³.

11 ЗНЕЗАРАЖЕННЯ ВІДПРАЦЬОВАНОВОГО МАТЕРІАЛУ

Відпрацьований матеріал знезаражують в автоклаві за температури (132±2) °С протягом 20 хвилин.

Процес знезараження відпрацьованого матеріалу фіксується у журналі (форма 9).

12 ОРГАНІЗАЦІЯ САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ НА ПІДПРИЄМСТВАХ, ЩО ВИРОБЛЯЮТЬ МАРГАРИНОВУ ТА МАЙОНЕЗНУ ПРОДУКЦІЮ

12.1 Санітарно-мікробіологічний контроль на підприємствах маргаринової промисловості проводять згідно з схемою (Додаток В).

12.2 Лабораторна документація.

Результати санітарно-мікробіологічного контролю заносяться у відповідні журнали. Форми журналів наведені у додатку А.

Лабораторні журнали повинні бути прошнуровані, сторінки пронумеровані, підписані директором або головним інженером та скріплені печаткою.

Записи у журналах повинні вестись чітко ручкою. Журнали знаходяться на відповідальному зберіганні у мікробіолога.

12.3 Обладнання мікробіологічної лабораторії.

Відомча мікробіологічна лабораторія повинна бути повністю забезпечена лабораторним обладнанням, посудом, реактивами, поживними середовищами, які необхідні для проведення санітарно-мікробіологічного контролю згідно з розділом 5.

Примітка:

1 При повному навантаженні мікробіолога лабораторним контролем протягом дня він може зробити 25 - 27 аналізів. Якщо він, крім цього, зайнятий приготуванням поживних середовищ, стерилізацією посуду та середовищ, перевіркою правильності ведення технологічних процесів, візуальним контролем санітарно-гігієнічного стану виробництва, кількість аналізів, що він може виконати протягом дня, відповідно зменшується до 7 – 10.

2 Зазначений обсяг досліджень здійснюється мікробіологом виробництва. У випадку відсутності бактеріолога на підприємстві, укладається угода із санітарно-епідеміологічною станцією про проведення санітарно-бактеріологічного контролю на підприємстві з визначенням періодичності контролю.

ДОДАТОК А
(ОБОВ'ЯЗКОВИЙ)
РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЗМИВІВ З ОБЛАДНАННЯ,
ПАКУВАЛЬНИХ МАТЕРІАЛІВ ТА ТАРИ
(ФОРМА 1)

Почато «___» _____ 200_ р.

Закінчено «___» _____ 200_ р.

	Методи відбору зразків, збір матеріалів та лабораторні дослідження проводять згідно з такою нормативною документацією: 1 2 3
--	---

Реєстраційний №	Дата	Об'єкт дослідження	Час відбору проб	Особа, яка відповідає за якість миття	Загальна кількість бактерій на 100 см ²	Визначення колі формних бактерій(наявність/відсутність у змиві БГКП)	Оцінка (результат аналізу)	Дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Примітка: При дослідженні змивів з різних об'єктів вести самостійні журнали.

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ СИРОВИНИ ТА КОМПОНЕНТІВ (ФОРМА 2)

Почато «__» _____ 200_ р.

Закінчено «__» _____ 200_ р.

	Методи відбору зразків, збір матеріалів та лабораторні дослідження проводять згідно з такою нормативною документацією: 1 2 3
--	---

Реєстраційний №	Дата початку дослідження	Назва продукту, який досліджується. № партії	Загальне обсіменіння МАФАМ			Визначення коліформних бактерій						Визначення пліснявих грибів та дріжджів					Результат та дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
			Засіяний об'єм (см³)	Кількість колоній, що виросли	Кількість КУО в 1 г/см³	об'єм, засіяний на середовище Кесслер	Характер росту на середовищі Кесслер	Середовище Ендо. Характер росту	Мікроскопія	оксидазний тест	Результат аналізу	Засіяний об'єм (см³)	Кількість колоній, що виросли		Кількість КУО в 1 г/см³		
													Дріжджів	Пліснявих грибів	Дріжджів	Пліснявих грибів	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Примітка:
При дослідженні різних видів продуктів, можна вести самостійні журнали

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ГОТОВОЇ ПРОДУКЦІЇ (ФОРМА 3)

Почато «__» _____ 200_р.

Закінчено «__» _____ 200_р.

	Методи відбору зразків, збір матеріалів та лабораторні дослідження проводять згідно з такою нормативною документацією: 1 2 3
--	--

Реєстраційний №	Дата початку дослідження	Назва продукту, який досліджується. № партії	Загальне обсіменіння МАФАМ			Визначення колиформних бактерій						Визначення пліснявих грибів та дріжджів					Результат та дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
			Засіяний об'єм (см³)	Кількість колоній, що виросли	Кількість КУО в 1 г/см³	об'єм, засіяний на середовище Кесслер	Характер росту на середовищі Кесслер	Середовище Ендо. Характер росту	Мікроскопія	оксидазний тест	Результат аналізу	Засіяний об'єм (см³)	Кількість колоній, що виросли		Кількість КУО в 1 г/см³		
													Дріжджів	Пліснявих грибів	Дріжджів	Пліснявих грибів	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Примітка: При дослідженні різних видів продуктів можна вести самостійні журнали.

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ КОНТРОЛЮ ЧИСТОТИ РУК РОБІТНИКІВ ТА СПЕЦОДЯГУ (ФОРМА 4)

Почато «__» _____ 200_р.

Закінчено «__» _____ 200_р

Реєстраційний №	Дата	Цех	Прізвище робітника, якого перевіряють	Робота, яка виконується	Присутність або відсутність колиформних бактерій	Оцінка	Дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
1	2	3	4	5	6	7	8

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ КОНТРОЛЮ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ПАСТЕРИЗАЦІЇ МОЛОКА(ФОРМА 5)

Почато «__» _____ 200_р.

Закінчено «__» _____ 200_р.

	Методи відбору зразків, збір матеріалів та лабораторні дослідження проводять згідно з такою нормативною документацією: 1 2 3
--	---

Реєстраційний №	Дата аналізу	Назва продукту. Місце його знаходження	Температура		Загальне обсіменіння(МАФАМ) в 1 см³			Визначення БГКП						Результат та дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
			Пастеризації	охладження	Засіяний об'єм	Кількість колоній, що виросли	Кількість КУО в 1 см³	Об'єм, засіяний на середовище Кесслер	Характер росту на середовищі Кесслер	Середовище Ендо. Характер росту	мікроскопія	Оксидазний тест	Результат аналізу	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЗКВАШЕНОГО МОЛОКА(6)

Почато «__» _____ 200_р.

Закінчено «__» _____ 200_р

Реєстраційний №	Дата	Найменування ємкості, в якій проводять зквашування	Термін зквашування, год.	Кислотність, °T	Характер згустку	Смак та аромат	Мікроскопія	Коліформні бактерії, відсутні в см³	Висновок про якість зквашеного молока	Дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЗАКВАСОК (ФОРМА 7)

Почато «__» _____ 200_ р.

Закінчено «__» _____ 200_ р.

	Методи відбору зразків, збір матеріалів та лабораторні дослідження проводять згідно з такою нормативною документацією: 1 2 3
--	---

Реєстраційний №	Дата, № заквашування, набору	Лабораторна закваска					Виробнича закваска								Результат та дата закінчення дослідження. Підпис особи, що його проводила
		Тривалість заквашування, год	Характер згустку	Кислотність, °T	Смак та аромат	Мікроскопія	Тривалість зквашування, год.	Характер згустку	Кислотність, °T	Смак та аромат	Мікроскопія	БГКП в 10 см³			
												Середовище Кесслер, характер росту	Середовище Ендо, характер росту	Мікроскопія	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Таблиця 3 Схема посіву готової продукції

Найменування продукту	НД на продукт	Показники згідно НД				НД на методи випробувань	Підготовка проб	Визначення мікробіологічних показників		
		МАФАМ, КУО в 1 г/см³, не більше	Кількість продукту (г/см³), в якому не допускається		Плісняві гриби та дріжджі КУО в 1 г/см³, не більше			МАФАМ	БГКП (коліформи)	Плісняві гриби та дріжджі
			БГКП (коліформи)	Патогенні мікроорганізми, у т.ч сальмонели						
Майонез	ГОСТ 3004.1-93		0,01	25	Дріжджі 1 x 10³. Плісняві гриби 10	ГОСТ 9225-84, ГОСТ 10444.12-88	Нейтралізувати розчином двовуглекислого натрію з масовою часткою 10% рН (7±0.1), 10 см³ + 90 см³ фіз. розчину або ПСР розвед. (1 x 10⁻¹). Готувати розведення (1 x 10⁻²)		1 см³ з(1 x 10⁻²) в пробірку з 5.0 см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	1см³продукту і 1см³ з розведення (1x10⁻¹) глибинним методом у 2 чашки з середовищем Сабура 25°C-120 год, попередні підрахування-72 год
Групи маргаринів: бутербродні	ТУУ 18.560-2001		0.01	25	Дріжджі 1x10³ Плісняві гриби 1x10²	ГОСТ 9225-84 ГОСТ 10444.12-88	10г+90см³ фіз. роз-ну або ПСР(розведення 1x10⁻¹). Готувати розведення 1x10⁻²		1см³ з (1x10⁻²) в пробірку з 5.0 см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48) год	1см³ продукту і 1 см³ розведення(1x10⁻¹) глибинним методом у 2 чашки з середовищем Сабура 25°C-120 год, попередні підрахування-72 год
у тому числі для приготування крему		5x10⁻⁴	0.01	25	Дріжджі 1x10². Плісняві гриби 5x10	ГОСТ 9225-84 ГОСТ 10444.12-88	10г+90см³ фіз. роз-ну або ПСР розвед(1x10⁻¹)ю готувати розведення (1x10⁻²-1x10⁻⁴)	По 1 см³ з розведень(1x10⁻¹-1x10⁻⁴) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C-72 год	1см³ з (1x10⁻²) в пробірку з 5,0 см³ середовище Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48год)	1 см³ продукту і 1см³ розведення (1x10⁻¹) глибинним методом у 2 чашки з середовищем Сабура

										25°C(120 год),попередні підрахування 72 год
Столові			0,01	25	Дріжджі 1×10^3 Плісняві гриби 1×10^2	ГОСТ 9225-84 ГОСТ 104444.12-88	10г+90см ³ фіз. роз-ну або ПСР розвед(1×10^{-1})ю готувати розведення (1×10^{-2})		1см ³ з (1×10^{-2}) в пробірку з 5,0 см ³ середовище Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48год)	1 см ³ продукту і 1см ³ розведення (1×10^{-1}) глибинним методом у 2 чашки з середовищем Сабуро 25°C(120 год),попередні підрахування 72 год
Для промислової переробки			0,01	25	Дріжджі 5×10^3 Плісняві гриби 1×10^2	ГОСТ 9225-84 ГОСТ 104444.12-88	10г+90см ³ фіз. роз-ну або ПСР розвед(1×10^{-1})ю готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-3})		1см ³ з (1×10^{-3}) в пробірку з 5,0 см ³ середовище Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48год)	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Почато «__» _____ 200_ р.

Закінчено «__» _____ 200_ р.

№ п/п	Дата		Найменування поживного середовища	Кількість	Серія, контроль препаратів, з яких виготовлено середовище	рН	Результат контролю	Дата. Підпис
	приготування	контролю						
1	2	3	4	5	6	7	8	9

РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ КОНТРОЛЮ РОБОТИ ПАРОВОГО СТЕРИЛІЗАТОРА(АВТОКЛАВА)(ФОРМА 9)

Почато «__» _____ 200_ р.

Закінчено «__» _____ 200_ р.

Реєстраційний №	Дата	Найменування матеріалу, стерилізація/зnezараження	Ємкість	Термін стерилізації		Режим роботи		Контрольний тест		Підпис
				Початок (год)	Кінець (год)	Тиск кгс/см ²	температура	термотест	Хімічний тест	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

ДОДАТОК Б (обов'язковий)
СХЕМА ПОСІВУ ОСНОВНИХ ВИДІВ СИРОВИНИ

Таблиця 1-схема посіву основних видів сировини

Найменування продукту	НД на продукт	Показники згідно НД				НД на методи випробувань	Підготовка проб	Визначення мікробіологічних показників		
		МАФАМ, КУО в 1г/см³, не більше	Кількість продукту (г/см³), в якому не допускається		Плісняві гриби та дріжджі КУО в 1 г/см³, не більше			МАФАМ	БГКП (коліформи)	Плісняві гриби та дріжджі
			БГК П (колі форми)	Патогенні мікроорганізми, у т.ч сальмонели						
Молоко коров'яче	ГОСТ 13264-88	5x10 ⁵				ГОСТ 9225-84	10см³+90см³фіз. розчну (розведення 1x10 ⁻¹). Готувати розведення(1x10 ⁻² -1x10 ⁻⁴)	По 1см³ з розведень (1x10 ⁻³ 1x10 ⁻⁵) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище 30°C(72 год)	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48 год)	
Молоко коров'яче пастеризоване(у флягах та цистернах)	ДСТУ 2661-94 МБТ 5061-89	2x10 ⁵	0.1	25		ГОСТ 9225-84	10см³+90см³фіз. розчну (розведення 1x10 ⁻¹). Готувати розведення(1x10 ⁻² -1x10 ⁻⁴)	По 1см³ з розведень (1x10 ⁻³ 1x10 ⁻⁵) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище 30°C(72 год)	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48 год)	
Молоко коров'яче сухе(знежирене)	ГОСТ 10970-87	1x10 ⁵	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см³ фіз.. розчину або ПСР підігріти до 45°C(розведення 1x10 ⁻¹). Готувати розведення (1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻⁴)	По 1см³ з розведень (1x10 ⁻³ 1x10 ⁻⁵) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище 30°C(72 год)	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48 год	
Молоко коров'яче сухе(незбиране): вищий гат 1 гатунок	ГОСТ 4495-87					ГОСТ 9225-84	10г+90см³ фіз.. розчину або ПСР підігріти до 45°C(розведення 1x10 ⁻¹). Готувати розведення (1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻⁴)	По 1см³ з розведень (1x10 ⁻³ 1x10 ⁻⁵) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище 30°C(72 год)	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C(24-48 год	
	МБТ 5061-89	5x10 ⁴ 7x10 ⁴	0,1 0,1	25 25						
Вершкі сухі Вищого гатунку 1гатунку	ГОСТ 1349-85	5x10 ⁴	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см³ фіз.. розчину або ПСР підігріти до 45°C(розведення	По 1см³ з розведень (1x10 ⁻³ 1x10 ⁻⁵) у 2 чашки Петрі глибинним методом	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та	

		7×10^4	0,1	25			1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-1} - 1×10^{-4})	на середовище 30°C (72 год)	поплавком 37°C (24-48 год)	
Масло коров'яче вершкове	ГОСТ 37-91 МБТ 5061-89	1×10^5 (для солодко-вершкового)	0,01	25		ГОСТ 9225-84	10г розтопленого на водяній бані продукту за температури не більше $45^\circ\text{C} + 90\text{см}^3$ фіз. розчину або ПСР, підігрітих до 45°C -розведення(1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 10^{-4})	Тільки для солодко-вершкового масла по 1см^3 з розведень(1×10^{-2} - 10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище 30°C (72 год)	1см^3 з (1×10^{-1}) в пробірку з $5,0\text{см}^3$ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Продукти ячні *	ГОСТ 30363-96		0,1	25		ГОСТ 2858-82	$10\text{г} + 90\text{см}^3$ ПСР розведення(1×10^{-1})		1см^3 з $19(1 \times 10^{-1})$ в пробірку з $5,0\text{см}^3$ серед-ща Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Закваска рідка на чистих культурах	МБТ 5061-89	Відсутність сторонніх мікроорганізмів	10,0	100,0		ГОСТ 9225-84	Нейтралізація двовуглекислим натрієм з масовою часткою 10% до рН ($7 \pm 0,1$) 10г продукту	Мікроскопія мазку	10см^3 продукту в колбу з $40\text{-}50\text{ см}^3$ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-46 год)	
Закваска суха(сублімаційне сушіння)	МБТ 5061-89	50,0	50,0	50,0		ГОСТ 9225-84	Нейтралізація двовуглекислим натрієм з масовою часткою 10% до рН ($7 \pm 0,1$) $10\text{г} + 90\text{см}^3$ ПСР підігрітого до 45°C збовтувати 5 хв розведення (1×10^{-1})	Мікроскопія мазку з розведення (1×10^{-1})	10см^3 продукту в колбу з $40\text{-}50\text{ см}^3$ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-46 год)	
Цукор - пісок	ДСТУ 2316-93	1×10^3				ГОСТ 26968-86	$10\text{г} + 90\text{см}^3$ стерильної води, збовтувати не менше 3-5 хв розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-1} - 1×10^{-4})	По 1см^3 з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-2}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C (72 год)		

Какао - порошок	ГОСТ 108-76	5×10^4	0,01	25	Плісняві гриби 1×10^2	ГОСТ 26972-86	10г+90см ³ ПСР збовтувати 3-5 хвилин – розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-4})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-2}) в пробірку з 5,0 см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	1см ³ з розведення 1×10^{-1} - 1×10^{-2} , глибинним методом у 2 чашки з середовищем Сабуро 25°C(120 год) попер. Перерахунок 7 2 год
Гірчичний порошок	ДСТУ 1829-98	3×10^5	0,01			ГОСТ 26972-86	10г+90см ³ фіз.. розчину збовтувати не менше 5 хв розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-3})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-3}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-2}) в пробірку з 5,0 см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Ізоляти, концентрати та гідролізати рослинних білків(боби сої, насіння соняшника) -концентрат соєвого білка текстурований	МБТ 5061-89	1×10^5	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см ³ ПСР збовтувати 3-5 хвилин розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-4})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-1}) в пробірку з 5,0 см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
-гідролізат білковий ферментативний із соєвої сировини		1×10^3	1,0	25			10г+90см ³ ПСР збовтувати 3-5 хвилин розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-2}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	10 см ³ з розвед (1×10^{-1}) в колбу з 40-50 см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Концентрати молочні стабілізовані	МБТ 5061-89	5×10^4	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см ³ ПСР збовтувати 3-5 хвилин розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-4})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-1}) в пробірку з 5,0см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	

Концентрат сироватний білковий, одержаний методом ультрафільтрації та електродіалізу	МБТ 5061-89	5×10^4	1,0	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см ³ ПСР збовтувати 3-5 хвилин розведення (1×10^{-1}). Готувати розведення (1×10^{-2} - 1×10^{-4})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	10 см ³ з розвед (1×10^{-1}) в колбу з 40-50 см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Казеїн кислотний харчовий сухий	МБТ 5061-89		0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см ³ ПСР розвед (1×10^{-1}). Нейтралізація розчином двовуглекислого натрію з мас часткою 10% до рН (7 ± 1)		1см ³ з (1×10^{-1}) в пробірку з 5,0см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Казеїн харчовий комбінований **	МБТ 5061-89	$7,5 \times 10^4$	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10г+90см ³ ПСР розвед (1×10^{-1}). Готувати розвед (1×10^{-2} - 1×10^{-4})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-1} , 1×10^{-4}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-1}) в пробірку з 5,0см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Прянощі та спеції ***	МБТ 5061-89	5×10^5 - 1×10^6	0,01	25	Плісняві гриби 1×10^3		10г+90см ³ ПСР розвед (1×10^{-1}). Готувати розвед (1×10^{-2} - 1×10^{-5})	По 1см ³ з розведенням (1×10^{-3} , 1×10^{-5}) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см ³ з (1×10^{-2}) в пробірку з 5,0см ³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	1см ³ з розведення 1×10^{-1} - 1×10^{-2} , залити у 2 чашки з середовищем Сабуро 25°C(120 год) попер. Перерахунок 7 2 год

Таблиця 2 – Схема посіву компонентів

Найменування продукту	НД на продукт	Показники згідно НД				НД на методи випробувань	Підготовка проб	Визначення мікробіологічних показників		
		МАФАМ, КУО в 1г/см³ не більше	Кількість продукту, (г/см³), в якому не допускається		Плісняві гриби та дріжджі КУО в 1г/см³, не більше			МАФАМ	БГКП (коліформи)	Плісняві гриби та дріжджі
			БГКП (коліформи)	Патогенні мікроорганізми, у т.ч Сальмонели						
Цукровий сироп		5x10²				ГОСТ 26968-86	10см³+90см³ стерильної води – розведення (1x10 ⁻¹)	1см³ продукту і 1см³ розведення (1x10 ⁻¹) у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)		
Молоко коров'яче після пастеризатора			10,0			ГОСТ 9225-84			10 см³ з розвед (1x10 ⁻¹) в колбу з 40-50 см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Молоко коров'яче пастеризоване	ДСТУ 2661-94 МБТ 5061-89	2x10 ⁵	0,1	25		ГОСТ 9225-84	10см³+90см³ фіз. розчину хлористого натра (1x10 ⁻¹). Готувати розвед (1x10 ⁻² -1x10 ⁻⁴)	По 1 см³з розвед (1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻⁴)у 2 чашки Петрі глибинним методом на середовище, 30°C(72 год)	1см³ з (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	
Зквашене молоко			0,01	25		ГОСТ 9225-84	Нейтралізувати розчином двовуглекислого натрію з мас часткою 10% 10см³+90см³ фіз. розчину – розвед (1x10 ⁻¹). Готувати розвед (1x10 ⁻²)		1см³ (1x10 ⁻¹) в пробірку з 5,0см³ середовища Кесслер з лактозою та поплавком 37°C (24-48 год)	

Примітка: * Бактерії р. Proteus згідно з МБТ № 5061-89 не допускаються в 0,1 г яєчних продуктів. Визначення р. Proteus проводити згідно з ГОСТ 28560-90

** Згідно МБТ № 5061-89 сульфїтредукуючі клостридії (КУО/г) не більше 200. Їх визначення проводити згідно з ГОСТ 9958-81

*** Згідно з МБТ № 5061-89 сульфїтредукуючі клостридії в 0,01 г не допускаються.

ДОДАТОК В

Таблиця – Схема організації санітарно – мікробіологічного контролю

Найменування об'єкту контролю	Місце знаходження об'єкту	Періодичність контролю	Показники, які досліджуються		Приблизний показник або норматив згідно з НД
			Найменування	Маса, об'єм або площа поверхні, яка аналізується (г,см³,см²)	
Сировина					
Молоко коров'яче (ГОСТ 13264-88)	Приймальні ємкості	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ	0,001; 0,0001; 0,00001	Не більше 5х10 ⁵ КУО/г
Молоко коров'яче питне (ДСТУ 2661-94)	Приймальні ємкості	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01;0,001; 0,0001 0,1	Не більше 2х10 ⁵ КУО/г. Відсутні в 0,1 г
Молоко коров'яче сухе (знежирене)	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01;0,001; 0,0001 0,1	Не більше 1х10 ⁵ КУО/г. Відсутні в 0,1 г
Молоко коров'яче сухе (незбиране)	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01;0,001; 0,0001 0,1	Не більше 1х10 ⁵ КУО/г – вищий гат., 7х10 ⁴ – 1 гатунок Відсутні в 0,1г
Вершки сухі	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01;0,001; 0,0001 0,1	Не більше 5х10 ⁴ КУО/г – вищий гат.; 7х10 ⁴ – 1 гатунок Відсутні в 0,1 г
Масло коров'яче вершкове	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01;0,001; 0,0001 0,1	Не більше 1х10 ⁵ КУО/г (для солодко - вершкового). Відсутні в 0,1 г
Продукти яєчні	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	БГКП (коліформи) P. Proteus	0,1 0,1	Відсутні в 0,1 г Відсутні в 0,1 г
Цукор - пісок	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ	0,1; 0,01	Не більше 1х10 ³ КУО/г

Какао – порошок	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи) Плісняві гриби	0,01; 0,001; 0,0001 0,01 0,1; 0,01	Не більше 5×10^4 КУО/г Відсутні в 0,01 г Не більше 1×10^2 КУО/г
Концентрат соєвого білка текстурований	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01; 0,001; 0,0001 0,1	Не більше 1×10^5 КУО/г Відсутні в 0,1 г
Гідролізат білковий ферментативний із соєвої сировини	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,1; 0,01 1,0	Не більше 1×10^3 КУО/г Відсутні в 1,0 г
Концентрат сироватний білковий, одержаний методом ультрафільтрації та електродіалізу	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01; 0,001; 0,0001 1,0	Не більше 5×10^4 КУО/г Відсутні в 1,0 г
Казеїн кислотний харчовий сухий	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	БГКП (коліформи)	0,1	Відсутні в 0,1 г
Казеїн харчовий комбінований	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи) Сульфитредукуючі кlostридії	0,01; 0,001; 0,0001 0,1	Не більше $7,5 \times 10^4$ КУО/г Відсутні в 0,1 г Не більше 200 КУО/г
Прянощі та спеції	Пакувальна тара	Планово не менше 1 разу на місяць: позапланово – згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи) Плісняві гриби Сульфредукуючі кlostридії	0,01; 0,001; ,0,0001; 0,00001 0,01 0,1 0,01	Не більше 5×10^5 - 1×10^6 КУО/г Відсутні в 0,01 г Не більше 1×10^3 КУО1/г Відсутні в 0,01 г
Гірчичний порошок	Пакувальна тара	Згідно з п.3.2.3	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01; 0,001 0,01	Не більше 3×10^3 КУО/г Відсутні в 0,01 г
Закваска рідка на чистих культурах	Ємність, де вона знаходиться	1 раз у день	Мікроскопія препарату БГКП (коліформи)	 10,0	Відсутність сторонньої мікрофлори Відсутні в 10,0 г
Закваска суха (сублімаційне сушіння)	Пакувальна тара	По мірі необхідності	Мікроскопія препарату БГКП	0,1 1,0	Відсутність сторонньої мікрофлори Відсутні в 1,0 г
Компоненти					
Цукровий сироп	Ємність, де він знаходиться	Не рідше 1 разу на тиждень	МАФАМ	1,0; 0,1	Не більше 5×10^2 КУО/см ³
Молоко коров'яче	На виході з пастеризатора	Не рідше 1 разу на тиждень	БГКП (коліформи)	10,0	Відсутні в 10,0 см ³

пастеризоване					
Молоко пастеризоване	Ванни, танки	Кожного дня по черзі	МАФАМ БГКП (коліформи)	0,01; 0,001; 0,0001 0,1	Не більше 2×10^5 КУО/см ³ Відсутні в 0,1 см ³
Зквашене молоко	Ванни, танки та ємкості, де воно знаходиться	Кожного дня по черзі	БГКП (коліформи)	0,01	Відсутні в 0,01 см ³
Готова продукція					
Маргарин (різні групи) згідно з ТУ 18.560-2001	Пакувальна тара на виході з виробництва	Згідно з п.3.2.5	МАФАМ БГКП (коліформи) Дріжджі Плісняві гриби	0,01; 0,001; 0,0001 0,01 0,001 1,0; 0,1 1,0; 0,1; 0,001	Не більше 5×10^4 КУО/г – для приготування крему Відсутні в 0,01 Відсутні в 0,001 – для промпереробки Не більше 1×10^2 КУО/г – для приготування кремів Не більше 5×10^3 КУО/г – для промпереробки Не більше 1×10^3 КУО/г – для столових Не більше 1×10^2 КУО/г Не більше 5×10 КУО/г – для приготування кремів
Майонез	Пакувальна тара на виході з виробництва згідно з п.3.2.5	Згідно з п.3.2.5	БГКП (коліформи) Дріжджі Плісняві гриби	0,01 0,1 1,0; 0,1	Відсутні в 0,01 г Не більше 1×10^3 Не більше 1×10 КУО/г
Санітарно – гігієнічний стан виробництва майонезу. Приймальне відділення молока					
Приймальні ємкості, трубопроводи, молочні насоси	Внутрішня поверхня	Не рідше 1 разу на добу після миття	МАФАМ	1 см ³ 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (коліформи)
Заквасочне відділення					
Ємкості для зквашування, культиватори та інше обладнання	Внутрішня поверхня	Після кожного миття, але не рідше 1 разу на добу Внутрішня поверхня	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Відділення пастеризації молока					
Пастеризатори, ємкості, ванни, танки для пастеризованого молока, охолоджувачі,	Внутрішня поверхня	Після кожного миття, але не рідше 1 разу на добу Внутрішня поверхня	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)

трубопроводи, насоси					
Виробництво маргарину методом переохолодження					
Ємкість на вагах для жирової та водно – молочної фази, зрівняльні бачки, ємкості зворотної емульсії, охолоджувачі, кристалізатори, насоси, фасувальні апарати та інше обладнання	Внутрішня поверхня	Після кожного миття та дезінфекції(не рідше 1 разу на тиждень) з чергуванням обладнання	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Безперервна лінія					
Ємкість на вагах для жирової та водно – молочної фази, зрівняльні бачки, ємкості зворотної емульсії, охолоджувачі, кристалізатори, насоси, фасувальні апарати та інше обладнання	Внутрішня поверхня	Після кожного миття та дезінфекції(не рідше 1 разу на тиждень) з чергуванням обладнання	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Пакувальна тара					
Папір (пергамент), полімерна плівка, фольга	Лінія фасування. Поверхня паперу	1 раз на декаду	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Стаканчики та інше	Внутрішня поверхня. Лінія фасування	1 раз на декаду	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Санітарно – гігієнічний стан виробництва майонезу. Періодична лінія					
Ємкості, змішувачі, емульгатори, гомогенізатори, баки готового продукту, дозатори фасувальних автоматів та інше обладнання	Внутрішня поверхня.	Після кожного миття та дезінфекції(не рідше 1 разу на тиждень) з чергуванням обладнання	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Безперервна лінія					
Ємкості, змішувачі, емульгатори, гомогенізатори, баки готового продукту, дозатори фасувальних автоматів та інше обладнання	Внутрішня поверхня	Після кожного миття та дезінфекції(не рідше 1 разу на тиждень) з чергуванням обладнання	МАФАМ БГКП (коліформи)	1 см ³ змиву 100 см ²	Не більше 500 КУО Відсутні БГКП (колі форми)
Пакувальна тара					
Банки, коробочки, кришки	Лінія фасовки	1 раз на декаду	МАФАМ	1 см ³ змиву	Не більше 500 КУО

тощо	Внутрішня поверхня.		БГКП (коліформи)	100 см ²	Відсутні БГКП (колі форми)
Руки робітників	З рук робітників, які контактують з продукцією на усіх етапах виробництва маргарину і майонезу	1 раз на декаду	БГКП (коліформи)	100 см ²	Відсутні БГКП (колі форми) 100 см ²
Спецодяг робітників	Зовнішня поверхня спецодягу (рукава, передня частина халату)	1 раз на декаду	БГКП (коліформи)	100 см ²	Відсутні БГКП (колі форми) 100 см ²
Повітря виробничих приміщень	Маргариновий, майонезний, фасувальний цехи, склад готової продукції	Згідно з п.3.2.8	МАФАМ	100 дм ³	Не більше 100 м ²

