

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА**

**Кафедра біології**

**МІКРОБІОЛОГІЯ СИРОВИНИ ТА ПРОДУКТІВ ЇЇ ПЕРЕРОБКИ**

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами другого рівня вищої освіти (магістр) спеціальностей 091 «Біологія», 203 «Садівництво та виноградарство», 181 «Харчові технології»

**УМАНЬ – 2022**

**Методичні вказівки підготував**

Р. М. Притуляк – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри біології Уманського національного університету садівництва

Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри біології (протокол від 29 серпня 2022 року № 2).

Схвалено науково-методичною комісією факультету плодовоовочівництва, екології та захисту рослин

Протокол від 31 серпня 2022 року № 1

**Рецензент** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри захисту і карантину рослин УНУС С. В. Суханов

**Притуляк Р. М.**

Мікробіологія сировини та продуктів її переробки. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами другого рівня вищої освіти (магістр) спеціальностей 091 «Біологія», 203 «Садівництво та виноградарство» 181 «Харчові технології». Умань, 2022. 18 с.

## ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
<b>Лабораторна робота №1.</b>	
Вивчення морфологічної будови мікроорганізмів – збудників псування різних за призначенням видів сировини та готових продуктів (клостридії, мезофільні і термофільні бацили, плісняві гриби і дріжджі).	5
<b>Лабораторна робота №2.</b>	
Методи відбору і підготовки проб з різних об'єктів для мікробіологічних аналізів. Посів мікроорганізмів із різних видів сировини (плоди, овочі, зерно та ін.) для визначення їх чисельності методом розведень.	6
<b>Лабораторна робота №3.</b>	
Кількісний облік мікроорганізмів, висіяних із різних видів сировини (плоди, овочі, зерно та ін.) для визначення їх чисельності, аналіз одержаних даних згідно вимог.	6
<b>Лабораторна робота №4.</b>	
Закладання дослідів на вивчення санітарно-бактеріологічного стану обладнання, інвентаря, тари, рук обслуговуючого персоналу (МАФАНМ, БГКП).	10
<b>Лабораторна робота №5.</b>	
Підрахунки і дослідження мікроорганізмів, висіяних з обладнання, тари, інвентаря та рук обслуговуючого персоналу. Санітарно-бактеріологічна оцінка одержаних даних.	10
<b>Лабораторна робота №6.</b>	
Бактеріологічний контроль води і повітря (постановка дослідів на визначення загальної чисельності мікроорганізмів і БГКП).	13
<b>Лабораторна робота №7.</b>	
Кількісний облік мікроорганізмів води і повітря. Санітарна оцінка одержаних даних.	13
<b>Лабораторна робота №8.</b>	
Дослідження забрудненості зерна і борошна картопляною паличкою.	16
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</b>	18

## ПЕРЕДМОВА

Мікробіологія сировини та продуктів її переробки включає всебічне вивчення основних груп мікроорганізмів, що складають епіфітну, патогенну та фітопатогенну мікробіоту плодоовочевої сировини, зерна та продуктів їх переробки, залишкову мікробіоту різних груп консервів; хлібопекарських та макаронних виробів, а також вивчення умов та методів контролювання життєдіяльності мікроорганізмів, направленості їх діяльності з метою одержання високоякісних продуктів безпечних для споживання.

Завдання даної дисципліни полягає у засвоєнні студентами основ спеціальної мікробіології з метою подальшого використання цих знань в практиці зберігання та переробки плодоовочевої сировини та зернової продукції. Оволодіння знаннями з дисципліни «Мікробіологія сировини та продуктів її переробки» дозволить фахівцям використовувати закономірності розвитку мікроорганізмів для одержання високоякісного кінцевого продукту споживання, забезпечуючи оптимізацію технологічних процесів, підвищуючи їх ефективність, знижуючи їх собівартість, і покращуючи якість готової продукції; забезпечувати виробництво продукції високопродуктивними расами (штамами) мікроорганізмів із гарантованою активністю і чистотою; здійснювати кваліфікований мікробіологічний контроль за технологічними операціями, сировиною, напівфабрикатами, готовою продукцією; виявляти і своєчасно ліквідувати джерела сторонніх мікроорганізмів; попереджувати забруднення води і повітря в зоні технологічного процесу; поліпшувати умови праці обслуговуючого персоналу і самостійно, кваліфіковано приймати технічні рішення.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

**Вивчення морфологічної будови мікроорганізмів – збудників псування різних за призначенням видів сировини та готових продуктів (клостридії, мезофільні і термофільні бацили, плісняві гриби і дріжджі)**

**Матеріали і обладнання:** мікроскопи; чашки Петрі; зразки рослинних матеріалів, уражених захворюваннями; бактеріологічні петлі; скальпелі; препарувальні голки; спиртівки; серветки; предметні і накривні скельця; флакони зі спиртом і водою; розчин метиленового синього і фуксину; атласи-визначники захворювань плодових, овочевих, ягідних і зернових культур.

### Методичні рекомендації

При виробництві продукції велику роль відіграє правильний вибір сировини з урахуванням її цільового призначення. При цьому важливо знати імунітет зібраних плодів. Овочів і зерна до захворювань, які викликають мікроорганізми. Серед мікробіоти сировини виділяють особливу групу фітопатогенних мікроорганізмів, що здатні викликати захворювання ще під час їх вирощування.

В процесі зберігання рослинної сировини розрізняють два етапи її псування. На першому етапі на поверхні плодів, чи інших видів сировини, розвиваються гриби-сапрофіти. Вони виділяють ферменти, що руйнують шкірочку плодів, заглиблюються в тканини і викликають їх загнивання. Гідролітичні ферменти грибів (пектиназа, целюлаза) руйнують клітинні оболонки, зумовлюють гідроліз пектинових речовин і целюлози. Псування сировини здатні викликати різні види дріжджів, які зброджують цукор в етиловий спирт і CO<sub>2</sub>.

Під впливом грибів вміст вуглеводів і органічних кислот у сировині різко знижується, реакція клітинного соку стає лужною, що створює сприятливі умови для розвитку різних видів бактерій, які продовжують процес псування до повного їх знищення (другий етап псування).

Для деяких бактерій перший етап псування (участь грибів) не потрібний, тому захворювання, що ними викликаються, називають бактеріозами.

### Вказівки до виконання роботи:

1. Користуючись атласами та іншою допоміжною літературою, визначити вид захворювання у поданих зразках сировини.
2. Методом зіскобу виготовити препарати збудників захворювань і розглянути під мікроскопом.
3. Замалювати прояви захворювання на досліджуваному об'єкті та вигляд збудника (форма клітини – для бактеріозів; міцелій, органи спороношення і вигляд спор – для грибних захворювань). Підписати збудників латиницею.

### **Контрольні запитання:**

1. Вплив погодних умов, строків збирання, механічних пошкоджень та ін. на псування сировини.
2. Характеристика мікроорганізмів, що розпочинають процес псування.
3. Специфічні фітопатогенні мікроорганізми, що викликають псування сировини.
4. Способи і типи поширення фітопатогенних мікроорганізмів.
5. Значення збереження природної оболонки плодів, овочів, ягід, зерна у попередженні ураження їх хворобами.
6. Характеристика найбільш поширених хвороб плодів, овочів, ягід, зерна.
7. Основні заходи з попередження мікробіологічних захворювань плодів, овочів, ягід, зерна.

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2–3**

**Методи відбору і підготовки проб з різних об'єктів для мікробіологічних аналізів. Посів мікроорганізмів із основних видів сировини (плоди, овочі, зерно та ін.) для визначення їх чисельності методом розведень.**

**Кількісний облік мікроорганізмів, висіяних із основних видів сировини (плоди, овочі, зерно та ін.) для визначення їх чисельності, аналіз одержаних даних згідно вимог.**

**Матеріали і обладнання:** зразки рослинної сировини; спиртівки; чашки Петрі; стерильні скальпелі; стерильні годинникові скельця; стерильні колби з 100 см<sup>3</sup> води; стерильні пробірки; стерильні піпетки на 1 см<sup>3</sup>; розплавлене живильне середовище МПА.

### **Методичні рекомендації**

На поверхні плодів, овочів та зерна постійно знаходиться значна кількість мікроорганізмів, які дістали назву – епіфітних. Епіфітні мікроорганізми живуть і розмножуються на поверхні тканин рослин, не завдаючи їм шкоди. Серед епіфітних мікроорганізмів зустрічаються різні види дріжджів, молочнокислі й оцтовокислі бактерії, плісняві гриби та ін.

При порушенні цілісності покривних тканин плодів, овочів, зерна у мікроорганізмів з'являється доступ до тканин, які багаті на поживні речовини і воду. Потрапляючи в сприятливе поживне середовище, гриби і бактерії викликають поступове псування сировини.

Видовий склад і чисельність епіфітної мікробіоти може змінюватись залежно від виду рослин, географічних, кліматичних умов, а також – від кількісного і якісного складу мікроорганізмів ґрунту, води і повітря. Серед

епіфітної мікробіоти на поверхні рослин можуть знаходитись фітопатогенні і патогенні мікроорганізми (збудники дизентерії, сальмонельозу та ін.). Патогенні мікроорганізми зберігають свою життєздатність тривалий час.

Рослинна сировина, як правило, може містити від 100 до 500 тисяч мікроорганізмів.

Більша частина мікроорганізмів видалається з поверхні плодоовочевої сировини у процесі миття. Наступне ополіскування сировини під душем зменшує кількість мікроорганізмів у 10–20 разів.

Сировина, що надходить на переробку, повинна мати посвідчення якості (у випадках передбачених законодавством – сертифікати відповідності, висновки державної санітарно-гігієнічної експертизи тощо). Кожна партія сировини повинна супроводжуватись сертифікатом.

Не допускається на переробку сировина, яка ушкоджена гниллю, пліснявою, сажковими хворобами, пошкоджена шкідниками, містить забруднення хімічного та біологічного характеру в кількостях, які перевищують встановлені рівні згідно нормативної документації.

Відбір проб для мікробіологічних досліджень виконують з різних місць партії сировини в кількості 20–50 екземплярів.

Для оцінки якості сировини та готової продукції, а також умов її виробництва та зберігання, використовують кількісні та якісні мікробіологічні показники. Як правило, основним кількісним мікробіологічним показником є МАФАНМ продукту – кількість колоній мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, що вирости на щільному живильному середовищі при посіві 1 г чи 1 см<sup>3</sup> субстрату і культивуванні посівів при 37°C впродовж 24–48 годин. Одиницею виміру при використанні тесту МАФАНМ є КУО – кількість колонієутворюючих одиниць.

### **Вказівки до виконання роботи:**

1. Користуючись стерильним скальпелем, вирізають пробу з овочів чи плодів (захоплюють зовнішні і внутрішні тканини об'єкту), вміщують її на попередньо зважене стерильне годинникове скло. Маса наважки повинна становити 5 г. Наважку переносять у стерильну колбу з 100 см<sup>3</sup> води. Пробу протягом десяти хвилин енергійно збовтують. Отриманий змив розводять (10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup>), беруть 1 см<sup>3</sup> і переносять в стерильну чашку Петрі, після чого змішують з розплавленим і охолодженим до 45°C агаризованим живильним середовищем (МПА).
2. Для мікробіологічних досліджень зерна, крупів відібрані проби з одиниць упаковки чи ємкостей змішують і з середньої проби беруть 1–2 г. Переносять у колбу на 100 см<sup>3</sup>, доводять стерильною водою до позначки. Суміш енергійно струшують протягом 5 хв., дають осісти великим часткам і після відповідного розведення (1:10; 1:100, 1:1000 чи 1:10000) роблять висів на відповідні живильні середовища: для визначення загального обсіменіння – 1 см<sup>3</sup> проби вносять в чашку Петрі і заливають її розплавленим та охолодженим до 45°C МПА.

3. Для аналізу солі беруть середню пробу в кількості 100 г із кожної партії. Із цієї проби відбирають 5 г і розчиняють в стерильній воді в колбі на 100 см<sup>3</sup>, після повного розчинення солі стерильною водою доводять розчин до мітки. Із виготовленого розчину солі по 1 см<sup>3</sup> висівають в чашки Петрі. При визначенні загального бактеріального обсіменіння чашки заливають МПА і терmostатують. Вийняті з терmostату чашки оглядають, підраховують колонії, які вирости і знаходяться на поверхні щільного середовища.

При визначенні галофітів і галобів використовують м'ясо-пептонний агар з додаванням 10 чи 20% солі.

При визначенні споруутворюючих мікроорганізмів висів у чашки Петрі проводять після попереднього прогрівання розчину солі при 80°C на водяній бані протягом 20 хвилин. Після посіву чашки Петрі заливають МПА.

4. Після охолодження і застигання середовища, посіви протягом 24–48 годин терmostатують при температурі 37°C. Облік колоній для визначення мікробного обсіменіння сировини проводять шляхом підрахунку їх кількості на всій поверхні живильного середовища. Розрахунок кількості МАФАНМ в 1 г виконують за формулою:

$$X=(A \times V \times K) / M,$$

де:  $X$  – число мікроорганізмів (КУО) в 1 г;

$A$  – середнє число колоній, що вирости в чашках;

$V$  – ступінь розведення;

$K$  – кількість см<sup>3</sup> змиву (100);

$M$  – маса наважки.

Отримані результати порівнюють з встановленими нормами (табл. 1) і роблять висновок про ступінь забруднення сировини.

Таблиця 1

### Мікробіологічні показники сировини

Найменування сировини та матеріалів	Допустима кількість МАФАНМ в 1 г/(см <sup>3</sup> ), КУО, не більше
Овочі та гриби після миття	5,0 x 10 <sup>4</sup>
Овочі та гриби бланшовані	1,0 x 10 <sup>4</sup>
Борошно, крохмаль	5,0 x 10 <sup>4</sup>
Крупа	5,0 x 10 <sup>4</sup>
Сіль	1,0 x 10 <sup>3</sup>



Зелень свіжа (суміш)	$7,5 \times 10^4$
Овочі сушені	$5,0 \times 10^5$
М'ясо у напівтушках (тушках) після закінчення розбирання в цеху переробки тварин	$5,0 \times 10^4$ на $1 \text{ см}^2$
М'ясо охолоджене перед розбиранням	$5,0 \times 10^5$ на $1 \text{ см}^2$
М'ясо після жиловки	$1,0 \times 10^5$ на $1 \text{ г}$
М'ясо заморожене у блоках	$1,0 \times 10^4$ на $1 \text{ г}$
Субпродукти	$2,0 \times 10^5$ в $1 \text{ г}$
М'ясо птиці	$2,0 \times 10^5$ на $1 \text{ см}^2$

### Контрольні запитання:

1. Склад і чисельність епіфітної мікробіоти сировини.
2. Джерела епіфітної мікробіоти сировини.
3. Стійкість епіфітної мікробіоти до факторів зовнішнього середовища.
4. Залежність епіфітної мікробіоти від виду, сорту, стадії розвитку рослини, ступеня зрілості.
5. Роль епіфітної мікробіоти в природному імунитеті рослин.
6. Порогові значення вмісту води для життєдіяльності бактерій і грибів та їх роль в сушінні сировини.
7. Залежність якісного і кількісного складу мікробіоти від якості сировини, виду й сорту та способів переробки.
8. Вплив підготовчих операцій на обсіменіння сировини мікробіотою.
9. Кількість залишкової мікробіоти на висушених плодах, ягодах, винограді й овочах.
10. Види мікроорганізмів, що переважають на висушених продуктах та їх характеристика.
11. Характеристика мікроорганізмів-збудників псування висушених продуктів.
12. Мікрофлора сировини під час зберігання.
13. Характеристика мікроорганізмів – збудників псування сировини, що зберігається.
14. Кількісний і якісний склад патогенної мікробіоти сировини при її зберіганні.
15. Хімічні консерванти плодів, овочів, ягід, зерна.
16. Вплив сухої і мокрої сульфатації на мікрофлору сировини.
17. Мікробіота різних крупів, її кількісний і якісний склад.
18. Мікробіота солі, її кількісний і якісний склад. Мікрофлора цукру, її кількісний і якісний склад.
19. Мікробіота зелені, її кількісний і якісний склад.
20. Мікробіота борошна, її кількісний і якісний склад.
21. Порядок відбору проб допоміжних матеріалів для мікробіологічних досліджень.
22. Особливості мікробіологічного дослідження солі.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4–5

**Закладання дослідів на вивчення санітарно-бактеріологічного стану обладнання, інвентаря, тари, рук обслуговуючого персоналу (МАФАНМ, БГКП).**

**Підрахунки і дослідження мікроорганізмів, висіяних з обладнання, тари, інвентаря та рук обслуговуючого персоналу. Санітарно-бактеріологічна оцінка одержаних даних.**

**Матеріали і обладнання:** стерильні ватні тампони; стерильний пептонно-сольовий розчин; колби на 100 см<sup>3</sup>; стерильні пробірки; чашки Петрі; стерильні пінцети; стерильні металеві трафарети з обмежувальними отворами; МПА; середовище Кеслера; банки об'ємом 0,5; 1,0; 3,0 дм<sup>3</sup>.

### Методичні рекомендації

Контролю підлягають: санітарний стан первинних пунктів прийому та обробки сировини, сировинних майданчиків, виробничих та складських приміщень, автоклавних приміщень, транспортної та споживчої тари, технологічне обладнання, інвентар, особиста гігієна працівників.

Санітарний стан первинних пунктів переробки сировини, сировинних майданчиків, виробничих, складських і автоклавних приміщень, транспортної тари, технологічного обладнання, інвентарю та засобів їх санітарної обробки повинні відповідати вимогам санітарних правил та відомчих інструкцій.

Контроль за дотриманням особистої гігієни працюючими, проводять шляхом взяття змивів з рук при виробництві продукції. Змиви з рук беруть перед початком зміни або після перерви в роботі не рідше двох разів на тиждень. БГКП (бактерії групи кишкової палички) повинні бути відсутні у всій змивній рідині.

Контроль хлорування рук проводять, протираючи окремі ділянки рук йодо-крохмальним розчином. Поява на тампоні і поверхні рук синьо-бурого забарвлення вказує на те, що руки були оброблені розчином хлорного вапна. Забарвлення видаляють тампоном, змоченим у розчині гіпосульфїта натрію. Бактерії групи кишкової палички не повинні виявлятися.

Змиви з санітарного одягу беруть два рази на місяць перед початком роботи. У змивах із 100 см<sup>2</sup> поверхні БГКП не повинні виявлятися.

Взяття змивів з консервної банки проводять після миття. Трубопроводи контролюють не рідше двох разів на місяць після санітарної обробки. Для дослідження відбирають останні порції промивних вод. В 1 см<sup>3</sup> промивних вод – БГКП повинні бути відсутні.

Кількість МАФАНМ визначають у змивах при виробництві консервів дитячого харчування, газованих напоїв та соків, пастеризованих м'ясних та м'ясорослинних напівконсервів. Бактерії роду *Proteus* визначають тільки при виробництві пастеризованих м'ясних та м'ясорослинних консервів

(напівконсервів).

Робітники підприємства, які контактують з харчовими продуктами та чистою тарою, повинні суворо дотримуватись правил особистої гігієни, періодично проходити медичний огляд, носити чистий санітарний та спеціальний одяг, а також виконувати інші вимоги діючих санітарних правил.

Після проведення санітарної обробки кількість МАФАНМ на  $1 \text{ см}^2$  поверхні устаткування, інвентарю, який контактує з харчовим продуктом, не повинна перевищувати 300 клітин. БГКП та бактерії роду *Proteus* у змивах з  $100 \text{ см}^2$  поверхні устаткування, інвентарю не допускаються.

Періодичність визначення мікробіологічних показників тари та кришок узгоджується з територіальними установами санепідемслужби.

Кількість МАФАНМ на внутрішній поверхні кожної одиниці тари для консервів, яка стерилізується (пастеризується) в автоклавах або апаратах безперервної дії, не повинна перевищувати 500 клітин – для тари місткістю більше  $1 \text{ дм}^3$  та 100 клітин – для тари місткістю до  $1 \text{ дм}^3$  включно.

При незадовільній санітарній підготовці тари та кришок необхідно виявити та усунути такі причини: при митті тари – не допускати надходження у мийну машину тари з підвищеним забрудненням, налагодити роботу машини у відповідності з заданими параметрами, замінити миючий розчин.

Після проведення генеральної санітарної обробки кількість МАФАНМ на  $1 \text{ см}^2$  поверхні стінок автоклаву та сіток не повинна перевищувати 30 клітин.

### **Вказівки до виконання роботи:**

*Мікробіологічний контроль санітарного стану устаткування та інвентарю*

1. Пробу для визначення санітарного стану устаткування, інвентарю беруть зволеним стерильним ватним або марлевым тампоном, яким протирають  $100 \text{ см}^2$  поверхні. Тампони зволожують у стерильному пептонно-сольовому розчині. Для обмеження площі на поверхню накладають стерильний металевий трафарет з отворами певного розміру. Після взяття змивів з поверхні тампон уміщують у посуд з  $100 \text{ см}^3$  стерильного пептонно-сольового розчину і енергійно струшують. Виконують розведення (1/1000; 1/10000 і т.д.). Вибір ступеня розведення залежить від передбачуваної кількості МАФАНМ у продукті. Розведення підбирають з таким розрахунком, щоб у засівах на чашках Петрі виросло від 15 до 300 колоній.
2.  $1 \text{ см}^3$  відповідного розведення висівають на МПА для визначення кількості МАФАНМ. Засіви терmostатують при температурі  $(30 \pm 1) \text{ C}^\circ$  протягом 72 годин. Дозволяється проводити завчасний облік результатів

- після 48 годин. В чашках підраховують колонії і виконують перерахунок на площу  $1 \text{ см}^2$  з урахуванням розведення.
3. Для визначення БГКП тампони зі змивами безпосередньо занурюють в 5–7  $\text{см}^3$  одного із середовищ збагачення (Кеслер, Кода). Засіви термостатують при температурі  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Із пробірок з ознаками росту (зміна кольору, газоутворення, помутніння) роблять висів на середовище Ендо. З колоній, характерних для БГКП (червоних з металевим блиском або без нього, рожевих і блідо-рожевих), готують препарати, фарбують за Грамом і мікроскопують. При виявленні в препаратах грамнегативних безспорових паличок проводять тест на газоутворення в напіврідкому середовищі з глюкозою. Враховують результат після інкубації при температурі  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  через 6–8 годин. При виявленні газоутворення на середовищі з глюкозою роблять висновок про те, що в змивах виявлені БГКП.
  4. В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про санітарний стан обладнання та інвентаря.

#### *Мікробіологічний контроль гігієнічного стану обслуговуючого персоналу*

1. При взятті змивів з рук протирають поверхні долоней рук, проводячи вологим тампоном не менш 5 разів по кожній долоні і пальцях, під нігтями. Стерильні тампони звожують у стерильному пептонно-сольовому розчині і після відбору змивів занурюють в пробірку з селективним середовищем для виявлення БГКП (як описано вище).
2. Змиви з санітарного одягу беруть, протираючи стерильними тампонами 4 площини по  $25 \text{ см}^2$  (нижня частина кожного рукава і 2 площини з верхньої передньої частини санодягу). Після відбору змивів тампони занурюють в пробірку з селективним середовищем для виявлення БГКП (як описано вище).
3. В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про гігієнічний стан рук і одягу обслуговуючого персоналу.

#### *Мікробіологічний контроль санітарного стану тари*

1. Взяття змивів з тари проводять після миття. У відібрану тару заливають пептонно-сольовий розчин. Для тари місткістю до  $1 \text{ дм}^3$  об'єм розчину –  $10 \text{ см}^3$ , від  $1 \text{ дм}^3$  до  $3 \text{ дм}^3$  –  $20 \text{ см}^3$ , більше  $3 \text{ дм}^3$  –  $50 \text{ см}^3$ . Тару прикривають кришкою і, струшуючи, змивають внутрішню поверхню.
2.  $1 \text{ см}^3$  змиву висівають на МПА для визначення МАФАНМ. Засіви термостатують при температурі  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 72 годин. В чашках підраховують колонії і виконують перерахунок на відповідний об'єм тари.
3. В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про санітарний стан тари.

### Контрольні запитання:

1. Мікробіологічний контроль устаткування: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
2. Мікробіологічний контроль інвентаря: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
3. Мікробіологічний контроль тари: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
4. Мікробіологічний контроль гігієнічного стану обслуговуючого персоналу: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
5. Поняття про дезінфекцію, показання до застосування. Класифікація дезінфікуючих речовин та особливості їх використання в харчовій промисловості.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6–7

**Бактеріологічний контроль води і повітря (постановка дослідів на визначення загальної чисельності мікроорганізмів і БГКП).**

**Кількісний облік мікроорганізмів води і повітря. Санітарна оцінка одержаних даних.**

**Матеріали і обладнання:** стерильні флакони; колби на 100 см<sup>3</sup>; стерильні пробірки; чашки Петрі; стерильні пробірки та пінцети; бактеріологічні петлі; нітроцелюлозні фільтри № 3; середовища Ендо; МПА.

### Методичні рекомендації

Вода є природним середовищем для багатьох мікроорганізмів, тому її якість підлягає постійному контролю.

Відбір проб і мікробіологічний аналіз води виконують згідно з ДСТУ 4808:2007. Пробу води об'ємом 500 см<sup>3</sup> відбирають у стерильні флакони. Наповнений флакон закривають стерильною пробкою. Пробу хлорованої води відбирають у флакон з дехлоратором (10 см<sup>3</sup> стерильного натрію сірнуватоокислого). Проба повинна бути досліджена не пізніше як через 2 години після її відбору. При неможливості виконання цих умов дослідження можна виконувати не пізніше 6 годин після відбору проби, за умови зберігання її при температурі від 1 до 50°C.

При мікробіологічному дослідженні води у 1 см<sup>3</sup> визначають МАФАНМ, у питній воді повинно бути не більше 100 клітин мікроорганізмів в 1 см<sup>3</sup>. Також, обов'язково визначають бактерії групи кишкової палички. Колі-титр – найменший об'єм води у мілілітрах, який містить одну клітину кишкової палички. За ДСТУ він не має бути меншим 300. Колі-індекс – кількість клітин кишкової палички, що міститься в одному літрі води. За ДСТУ колі-індекс для водопровідної води не повинен перевищувати 3, а для

води з криниць – 10.

Мікробіологічний аналіз повітря. Повітря є менш сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів, але відіграє суттєву роль у їх розповсюдженні, в тому числі патогенних. Мікроорганізми потрапляють у повітря з поверхні ґрунту та рослин, із викидами деяких виробництв тощо. Мікробіота атмосферного повітря бідна та варіабельна і залежить від інтенсивності сонячної радіації, вітру, опадів, типу ґрунту, пори року.

Санітарно-мікробіологічне дослідження повітря має за мету контроль, перш за все, стану закритих приміщень.

Для контролю загального санітарного стану повітряного середовища, а також у зв'язку з тим, що повітряно-крапельним шляхом передаються збудники багатьох інфекційних захворювань та збудниками псування сировини і готових продуктів, періодично проводять бактеріологічне дослідження повітря. Критеріями санітарно-гігієнічної оцінки повітря приміщень є його загальна бактеріальна забрудненість, а також наявність у ньому *a*- і *b*-гемолітичних стрептококів та гемолітичних стафілококів.

### Вказівки до виконання роботи:

1. Визначення МАФАНМ води. Суть методу полягає у здатності мезофільних аеробів і факультативних анаеробів рости на живильному агарі при 37°C упродовж 24 годин з утворенням колоній.

Для визначення МАФАНМ загальної проби води (500 см<sup>3</sup>) у стерильних умовах відбирають 1 см<sup>3</sup> і виконують розведення у пробірках з 9 см<sup>3</sup> фізрозчину від 1:10 до 1:100. З цих розведень відбирають по 1 см<sup>3</sup> і вносять у чашки Петрі. Далі, засіяні чашки заливають 10–12 см<sup>3</sup> розплавленого і охолодженого до 45°C МПА. Після чого чашку закривають і агар з посівним матеріалом обережно перемішують. Після затвердіння агару чашки перевертають догори дном і ставлять у термостат.

Через 24 години оцінюють результати. Для підрахунків використовують лише ті розведення, при засіві яких в чашці виросло від 30 до 300 колоній. Результат підрахунку колоній у кожній чашці виражають у кількості бактерій в 1 см<sup>3</sup> води з урахуванням висіяного об'єму. За кінцеву кількість бактерій беруть середнє арифметичне результатів підрахунків у чашках різних розведень.

Визначення кількості кишкової палички. *E. coli* є санітарним індикатором, бо наявність її у воді свідчить про фекальне забруднення. При визначенні колі-титру значного поширення набув *метод мембранних фільтрів*. Пробу води об'ємом 300–500 мл, взятої з джерела централізованого водопостачання, пропускають через нітроцелюлозні фільтри № 3, які стерилізують кип'ятінням у дистильованій воді двічі-тричі по – 15 хв. з обов'язковою зміною води. З відкритих водоймищ воду фільтрують в об'ємах 100, 10, 1 і 0,1 мл. Після закінчення фільтрації

фільтри знімають стерильним пінцетом і накладають на поверхню середовища Ендо, залитого попередньо в чашки Петрі. Чашки ставлять у термостат за температури 37°C на 24 год. Після термостатування у чашках підраховують кількість колоній, характерних для кишкової палички. Для остаточної ідентифікації кишкової палички із типових колоній здійснюють засів на глюкозо-пептонне середовище Ейкмана. Результат вважають позитивним при утворенні кислоти й газу. Якщо при фільтрації 300 мл води на фільтрі вирости дві колонії, характерні для кишкової палички, то колі-титр для цієї проби становитиме 150 мл.

При дослідженні води невідомої якості спочатку готують її 10-ти разові розведення, орієнтуючись на попередній дослід таким чином, щоб на фільтрах після пропускання проби вирости не більше 50–70 колоній, в т. ч. не більше 30 колоній кишкової палички.

Для виведення показника колі-індексу кількість колоній, що вирости на фільтрі, перемножують на 1000 і ділять на об'єм води, який було пропущено через фільтр.

При визначенні колі-титру методом бродильної проби певні об'єми води висівають в одне із середовищ нагромадження (глюкозо-пептонне або лактозо-пептонне з індикатором та бродильною трубкою) з наступним пересівом на щільне середовище Ендо або Левіна. Характерні для кишкової палички колонії досліджують шляхом мікроскопії та за оксидазним тестом. Для цього смужки фільтрувального паперу змочують розчином а-нафтолдіетил-п-фенілдіаміну і бактеріологічною петлею штрихами наносять на них мікробну масу з характерних колоній. Якщо в мазках знаходять типові для кишкової палички форми, а смужка паперу після нанесення культури не змінює кольору, то це остаточно підтверджує наявність у пробі *E. Coli*.

- Седиментаційний метод дослідження мікробіоти повітря полягає у тому, що бактеріологічні чашки з щільним живильним середовищем залишають відкритими в місцях проведення досліджень на 5–10 хв. – за визначення загального мікробного забруднення і до 40 хв. – за індикації кокової мікробіоти. Потім чашки закривають й переносять у термостат на 24 год., витримують стільки ж при кімнатній температурі і підраховують кількість колоній, що вирости. Орієнтовно вважають, що на поверхню живильного середовища бактеріологічної чашки площею 100 см<sup>2</sup> упродовж 5 хв. осідає стільки бактерій, скільки їх міститься в 10 л повітря (1 м<sup>3</sup>). На основі цього правила виведено формулу для розрахунку кількості мікроорганізмів у 1 м<sup>3</sup> повітря:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{t \cdot V},$$

де: X – кількість мікроорганізмів у 1 м<sup>3</sup> повітря;

A – кількість колоній, що вирости в чашці Петрі при дослідженні;

100 – коефіцієнт для перерахунку на 1 м<sup>3</sup> з 10 л;

5 – коефіцієнт часу;

100 – площа контрольної чашки;

$V$  – площа чашки Петрі, взятої для аналізу (стандартна чашка Петрі вітчизняного виробництва має площу 78,5 см<sup>2</sup>);

$t$  – час, упродовж якого чашка Петрі була відкрита.

Уважно розглядають вирощені колонії і за зовнішнім виглядом визначають, до якої групи мікроорганізмів відноситься та чи інша колонія (до мікроміцетів, бактерій чи дріжджів).

*Колонії мікроміцетів* – мають різне забарвлення, великі, пухкі, інколи займають усю поверхню середовища в чашці.

*Колонії бактерій* – різноманітні за формою і розмірами, білого, сірувато-білого або жовтого кольору, випуклі або плоскі, слизькі або сухі, зморщені або гладенькі.

*Колонії дріжджів* – білого, сірого і рожевого кольору, різних розмірів, але невеликі. Поверхня блискуча, випукла або плоска, форма кругла з рівним або ворсинчастим краєм.

Визначення відсоткового співвідношення основних груп мікроорганізмів проводять шляхом підрахунку колоній грибів, бактерій і дріжджів (загальна кількість усіх колоній становить 100 %, а кожна із груп складає відповідний їхній кількості відсоток).

Офіційних стандартів чистоти повітря не розроблено, але прийнято такі показники оцінки ступеня мікробного забруднення повітря в приміщеннях: на промислових підприємствах, переробних заводах повітря вважається чистим, якщо в 1 м<sup>3</sup> знаходиться не більше 500 клітин мікроорганізмів; у громадських місцях, навчальних закладах ця норма не повинна перевищувати 7000.

### Контрольні запитання:

1. Опишіть методику визначення БГКП (Бактерій групи кишкової палички – *Escherichia coli*).
2. Назвіть основні етапи мікробіологічного дослідження води і повітря.
3. Що таке колі-індекс та колі-титр води, методи визначення?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

### Дослідження забрудненості зерна і борошна картопляною паличкою.

**Матеріали і обладнання:** колби на 100 см<sup>3</sup>; стерильні пробірки; чашки Петрі; стерильні пробірки та пінцети; бактеріологічні петлі; пшеничний хліб з борошна вищого гатунку; МПБ.

### Методичні рекомендації

Спори *B. mesentericus* потрапляють у борошно під час розмелювання



зерна. Вони витримують нагрівання до 120°C, а тому дуже часто залишаються життєздатними у м'якуші хліба, де температура випікання не перевищує 100°C. За підвищеної температури та вологості зберігання борошна, хлібобулочних виробів *Bacillus mesentericus* значно активізує свою діяльність.

### **Вказівки до виконання роботи:**

Для визначення *Bacillus mesentericus* у стерильній воді готують 10% розчин із зерна, борошна чи хліба і засівають по 1 см<sup>3</sup> розведення 1:100, 1:1000 у пробірки з 10 см<sup>3</sup> мясопептонного бульйону. Через дві доби термостатування за температури 37°C виконують пересів суспензії на шматочки пшеничного хліба з борошна вищого ґатунку, які попередньо стерилізують.

Для цього в стерильні чашки Петрі вміщують шматочки хліба, на які наносять по 10 см<sup>3</sup> мясопептонного бульйону з досліджуваних пробірок. Чашки вміщують в ексікатор, на дно якого наливають небагато стерильної води. Чашки інкубують дві-три доби за температури 37°C. Далі їх оглядають, відзначаючи характерні ознаки для картопляної хвороби. Враховуючи розведення, розраховують кількість картопляної палички в зразках.

Ознаки, характерні для росту картопляної палички:

- утворення спор;
- позитивне забарвлення за Грамом;
- ріст на зрізі картоплі у вигляді складчастого нальоту;
- ріст на поверхні мясопептонного бульйону у вигляді зморщеної плівки;
- розрідження желатину;
- ферментація глюкози і сахарози до кислот без утворення газів;
- відсутність ферментації лактози.

### **Контрольні запитання:**

1. Які ознаки, характерні для росту картопляної палички?
2. Назвіть основні способи потрапляння картопляної палички у борошно
3. Які фактори зумовлюють активність розвитку картопляної палички?

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

---

1. Карпенко В. П., Грицаєнко З. М., Притуляк Р. М. та ін. Мікробіологія галузі: зерно і продукти його переробки: навч. посіб. за ред. В. П. Карпенка. Умань : Видавничо-поліграфічний центр «Візаві», 2014. 132 с.
2. Карпенко В. П., Притуляк Р. М. Лабораторний практикум з мікробіології консервного виробництва. Навчально-методичний посібник до виконання лабораторно-практичних занять. Умань: Редакційно-видавничий відділ Уманського НУС, 2010. 55 с.
3. Грицаєнко З. М., Карпенко В. П., Притуляк Р. М. Мікробіологія консервної галузі. Умань: Редакційно-видавничий відділ Уманського НУС, 2010. – 96 с.
4. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології. К. : Либідь, 2001. – 143 с.
5. Груздь С. П. Практикум з мікробіології. Львів: Львів нац. ун-т. І. Франка, 2003. 78 с.