

Практическая микробиология

Материалы курса Тетра Пак





Содержание курса

1. Работа в микробиологической лаборатории 5
2. Контроль сырья и компонентов 9
3. Оценка качества готового продукта 17
4. Подготовка образцов для микробиологического исследования 21
5. Проверка герметичности пакетов методом растворения 25
6. Техника проведения идентификации микроорганизмов 42
7. Контроль санитарного состояния оборудования 71
8. Основы общей микробиологии 85
9. Влияние тепловой обработки на микроорганизмы 115



Основные задачи лаборатории при производстве продуктов длительного срока годности

- ▶ Определение пригодности сырья, компонентов и промежуточного продукта к УВТ- обработке.
- ▶ Проверка готовой продукции на соответствии спецификации качества и условиям промышленной стерильности.
- ▶ Контроль санитарно-гигиенических условий производства и качества мойки оборудования.
- ▶ Анализ причин нестерильности: первичная идентификация микрофлоры, вызвавшей порчу продукта, и определение вероятных причин нестерильности.



Особенности производства продуктов длительного срока годности

- ▶ Возможность хранить готовую продукцию в неохлажденных условиях в течении нескольких месяцев.
- ▶ Высокая производительность оборудования делает критичным период времени обнаружения проблем со стерильностью и своевременную остановку линии, а также скорость выявления и устранения причин нестерильности для скорейшего возобновления производства.



Работа в микробиологической лаборатории





Требования к лаборатории

Важнейшими факторами, определяющими правильность и надёжность проводимых лабораторией испытаний, являются следующие показатели:

- наличие квалифицированного персонала,
- соответствие помещений и условий окружающей среды,
- наличие необходимого оборудования,
- организация процесса проведения испытаний, обеспечивающая качество и достоверность их результатов (регистрация измерений, обращение с образцами и др.)



Список основного оборудования

- ▶ Автоклав - стерилизация лабораторной посуды и питательных сред
- ▶ Микроскоп - бинокулярный
- ▶ Инкубаторы на температуры +25, +30, +55 (желательно как минимум 2 шт.)
- ▶ Мешалка
- ▶ рН-метр
- ▶ Холодильник
- ▶ Бунзеновская горелка
- ▶ Весы
- ▶ Тележки для транспортировки образцов
- ▶ Водяная баня





Расходные материалы

- ▶ Посуда
Колбы, химические стаканы, пипетки, градуированные цилиндры, пробирки, чашки Петри и др.
- ▶ Питательные среды:
МПА
Агар с апельсиновым соком (OSA)
Декстрозный агар Сабуро
- ▶ Красители и реагенты, применяемые для идентификации бактерий
- ▶ Инокуляционные петли

Контроль сырья и компонентов





Производственный контроль

Показатели сырого молока:

- ▶ Значение pH
- ▶ Содержание белка, жира, СОМО
- ▶ Алкогольная проба
- ▶ Точка замерзания
- ▶ Подсчёт КМАФАнМ
- ▶ Подсчёт спор
- ▶ Определение соматических клеток
- ▶ Наличие посторонних веществ (антибиотики, сода, крахмал, мука и др.)
- ▶ Кипятильная проба





Методы выявления фальсификации молока

- ▶ **ГОСТ 23454-79.** Молоко. Метод определения ингибирующих веществ.
- ▶ **ГОСТ 24067-80.** Молоко. Метод определения перекиси водорода.
- ▶ **ГОСТ 30562-97.** Молоко. Определение точки замерзания.
- ▶ **ГОСТ Р 51600-2010.** Молоко. Методы определения антибиотиков.



Требования к сырому молоку * для производства УВТ-молока



"Технический регламент на молоко и молочную продукцию" N 88-ФЗ

Запах и вкус	Свойственные для молока, без посторонних запахов и привкусов
Кислотность	16-18°Т
Степень чистоты	не ниже I группы
Бактериальная обсемененность (тысяч КОЕ/см ³)	до 100
Содержание соматических клеток	не более 400 тыс. в см ³
Термоустойчивость по алкогольной пробе	Не ниже II группы

*Молоко сырое, высший сорт



Стандарты качества Тетра Пак при производстве ультрапастеризованного молока



В компании Тетра Пак применяются критерии оценки качества пищевых продуктов, принятые в европейских странах. Для определения кислотности молока используется значение pH молока, а не титруемая кислотность ($^{\circ}\text{T}$).

Значение pH (при 20-25 $^{\circ}\text{C}$)	6,6-6,8
Общее количество спор, кое/см 3 (количество мезофильных спор)	не более 100
Количество термоустойчивых спор, кое/см 3 (количество термофильных спор)	не более 10

В таблице в качестве примера указано количество спорообразующих бактерий для максимального дефектного уровня 0,1% (объем продукта в пакете 1000мл и логарифмический эффект стерилизации 9).

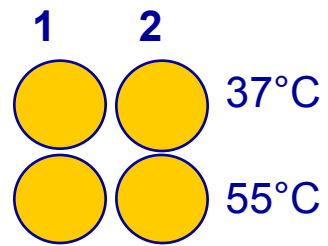


Микробиологический анализ сухого молока

Восстановленное молоко

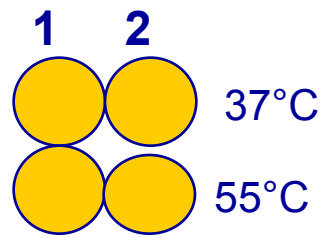
Без термообработки

Разведение:



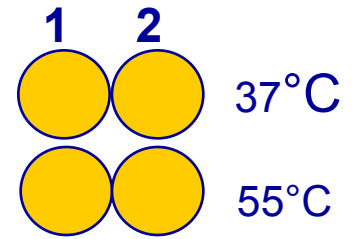
Термообработка 80°C/10 мин

Разведение:



Термообработка 100°C/10 мин

Разведение:

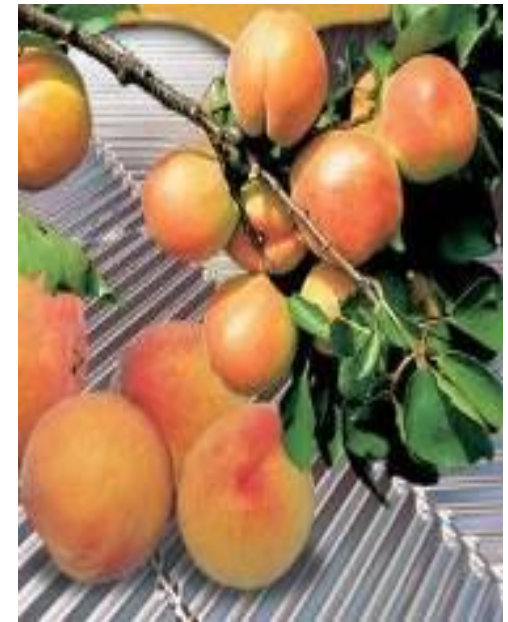


Все продукты, предназначенные для УВТ- обработки, должны анализироваться на содержание бактериальных спор. Бактериальные споры характеризуются высокой устойчивостью к температурам стерилизации.



Требования Тетра Пак по микробиологическим показателям к сырью (соки и нектары)

Общее число микроорганизмов	< 1000 КОЕ/мл
Дрожжи	< 100 КОЕ/мл
Плесень	< 10 КОЕ/мл
Термоустойчивая плесень	отсутствует в 10 мл
Колиформы и Энтерококки	отсутствуют в 1 мл

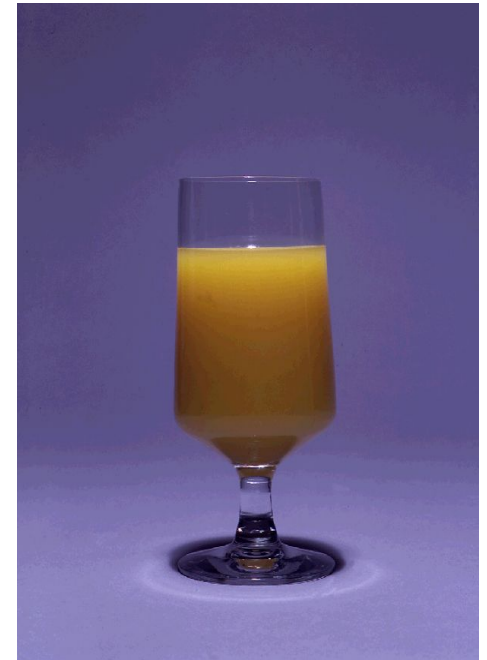




Контроль качества восстановленного продукта из апельсинового концентрата

Показатели восстановленного продукта:

- ▶ значение Брикс
- ▶ Содержание кислоты
- ▶ Размер волокон
- ▶ Мякоть
- ▶ Внешний вид
- ▶ Запах
- ▶ Цвет
- ▶ Вкус



Оценка качества готового продукта





Рекомендации Тетра Пак по оценке коммерческой стерильности продукта

После термостатной выдержки при температуре 30°C в течение 5-7 суток, после термостатной выдержки при 55 °C в течение 5 суток.

1. Определение общего количества бактерий
2. Изменение органолептических свойств продукта
3. Изменение значения pH продукта



Требования промышленной стерильности ультрапастеризованного молока “Технический регламент на молоко и молочную продукцию”

После термостатной выдержки при температуре 37°С в течение 3-5 суток отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие, изменение внешнего вида и др.), отсутствие изменений вкуса и консистенции.

После термостатной выдержки допускаются изменения:

1. Титруемой кислотности не более, чем на 2°Т
2. КМАФАнМ не более 10 КОЕ при посеве 1 мл



Требования промышленной стерильности на соковую продукцию при $pH > 4,2$ (технический регламент)



Спорообразующие мезофильные аэробные и факультативно анаэробные бактерии	<i>B. cereus</i> , <i>B. polymyxa</i> не допускаются в 1 мл, <i>B. Subtilis</i> не более 11 КОЕ/мл
Мезофильные клостридии	не допускаются в 1 г
Неспорообразующие бактерии, плесени, дрожжи	не допускаются в 1 г
Молочнокислые бактерии	не допускаются в 1 г

Подготовка образцов для микробиологического исследования





Внешняя стерилизация пакета 70% раствором спирта





Вскрытие пакета с помощью U-образного среза





Информация, которую необходимо записать при обнаружении нестерильного пакета

1. Дата и время производства.
2. Определение близости по времени производства пакета к следующим событиям: начало/конец производства, сращивание упаковочного материала или аппликаторной ленты, запуск после остановок и т.п.
3. Значение pH.
4. Изменения запаха и консистенции.
Газообразование.
5. Наличие повреждений на упаковке.
6. Качество запечатывания швов.
7. Тип бактерий в пакете.
8. Термоустойчивость бактерий, вызвавших порчу продукта.

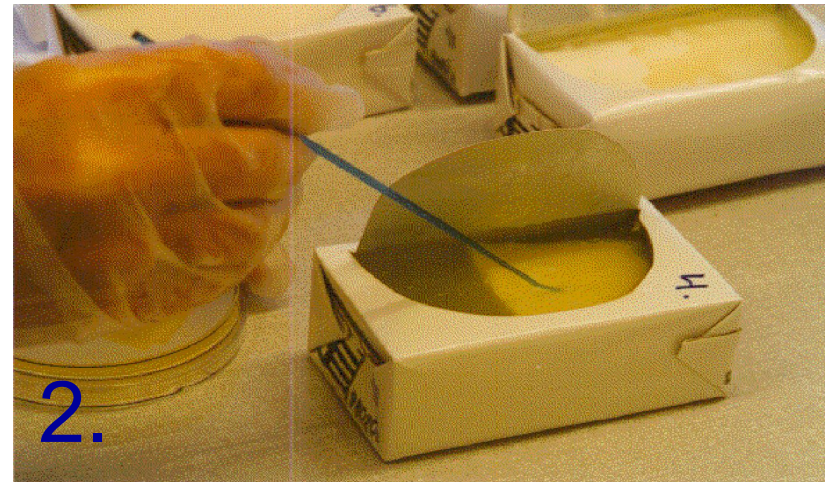
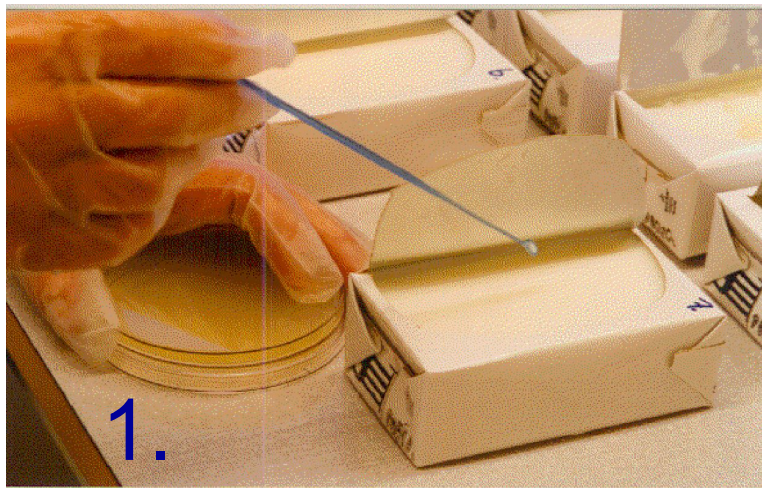


Органолептический анализ



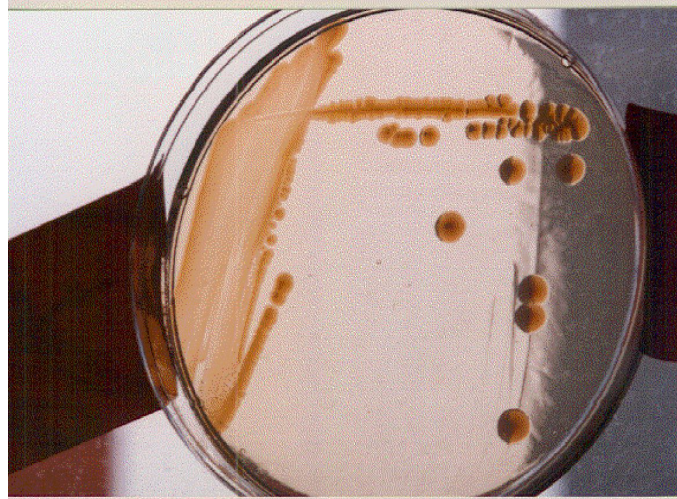


Отбор пробы петлёй

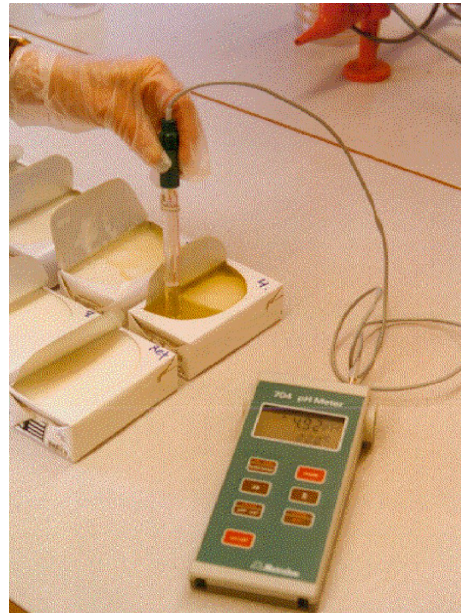




Посев продукта штрихом



Измерение значения pH





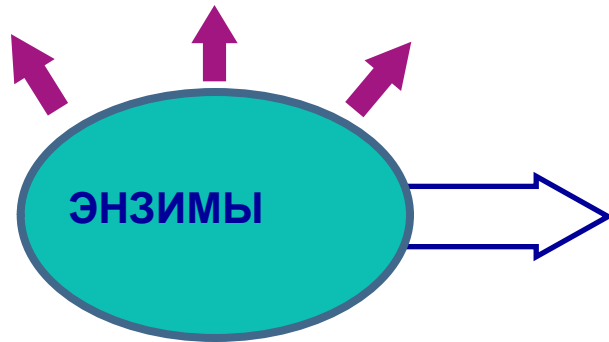
Определение термоустойчивости бактерий

- ▶ Для обнаружения бактерий пробу объемом 3-5 мл прогревают 10 мин на водяной бане при 60, 80, 100°C, охлаждают и переносят 1 мл пробы на чашку с агаром. Посев выполняется глубинным методом.
Для роста мезофильных бактерий чашку помещают на инкубацию при температуре 35-37°C на 48 часов.
Для роста термофильных бактерий чашку помещают на инкубацию при температуре 55°C на 5 дней.
Примечание: контроль температуры прогрева должен быть обеспечен в параллельной пробирке.



Микроорганизмы- причина порчи продукта?

Белки Липиды Углеводы



Продукты метаболизма

Оксидаза
выделением

органические кислоты с
газа, углекислый газ, этанол-
изменение кислотности и вздутие

Протеаза
Пептидаза

расщепление пептидов, горький вкус
аммиак- неприятный запах

Липаза

жирные кислоты- прогорклый вкус



Примеры микробиологической порчи стерилизованного молока

Контроль: молоко в пакете pH = 6,6

Все пакеты были проинкубированы в течении нескольких дней при 30 °C

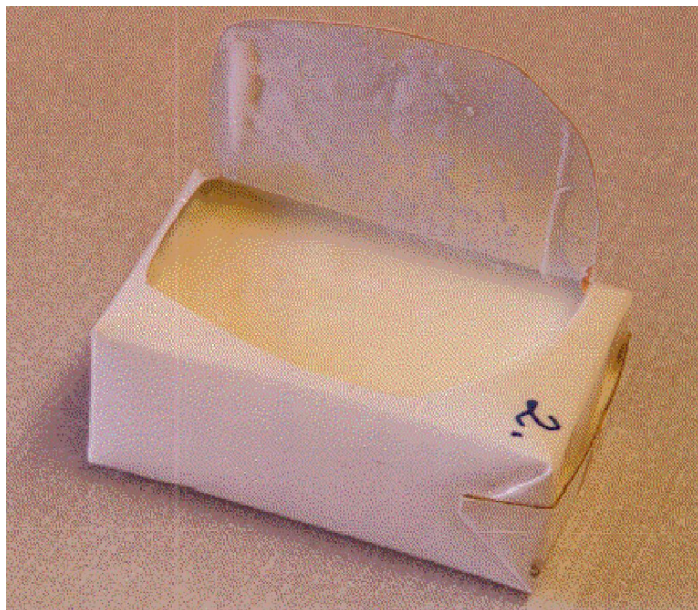
Изменения продукта





Изменения продукта

Escherichia coli (pH = 5,3)



Streptococcus cremoris (pH = 5,2)





Изменения продукта

Bacillus cereus (pH = 4,9)



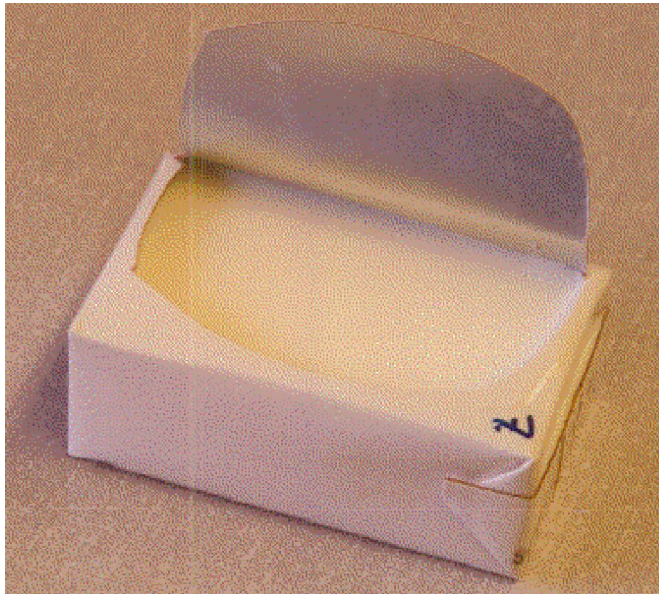
Lactobacillus sp. (pH = 3,5)





Изменения продукта

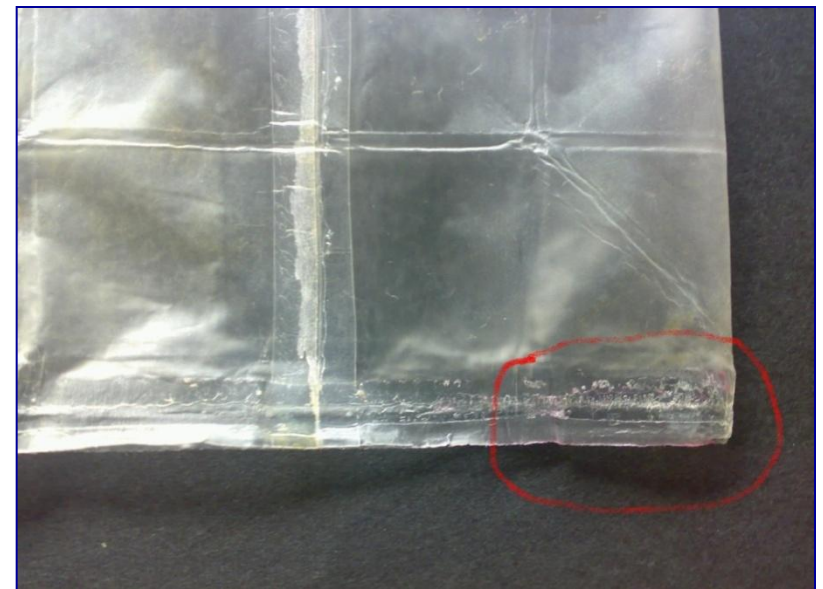
Sarcina sp. (pH = 6,6)





Необходимо проверить пакет на герметичность и качество запечатывания швов

Внимание! При проверке герметичности вздутых пакетов следует учитывать наличие повреждений в швах, вызванных давлением внутри пакета





Контроль герметичности пакетов

В настоящее время герметичность пакетов может быть проверена четырьмя различными методами:

1. Механический тест на разрыв поперечных и продольных швов.
2. Проверка электропроводимости и тест красными чернилами.
3. Введение красных чернил в воздушный канал продольного шва.
4. Проверка поперечных швов пакета после растворения алюминиевого слоя упаковочного материала.

Контроль герметичности пакетов

На сегодняшний день нет методов, которые могли бы заменить процедуру проверки швов на разрыв и растворение. Очень важно, чтобы операторы упаковочных автоматов (а также работники лаборатории) были обучены правильному выполнению данных процедур.

Проблемы с герметичностью пакетов могут быть вызваны неправильной настройкой автомата, его техническим состоянием и ошибками эксплуатации. Также проблемы с герметичностью могут произойти из-за неправильного обращения или транспортировки пакетов.



Проверка поперечного шва пакета

BoC

Book of Competence
Package Integrity



Способы растворения

Кислота, метод 1
(очень быстрый)

Кислота, метод 2
(быстрый) *

Щелочь
(медленный)

Применяемые
растворы

- Раствор HCl 1:1
- Раствор HCl 1:3
- Нейтрализующий
раствор

- 30% раствор HCl
- Нейтрализующий
раствор

- Щелочной раствор
- Нейтрализующий
раствор

Преимущества

очень быстрый
(образец готов за 15
минут)

быстрый
(образец готов за час
или меньше)

безопасный
(без использования
кислоты)

Недостатки

опасность порчи
образца в
результате слишком
сильного нагрева

более медленный, чем
метод 1

медленный (образец
будет готов через 6
часов)

Техника проведения идентификации микроорганизмов

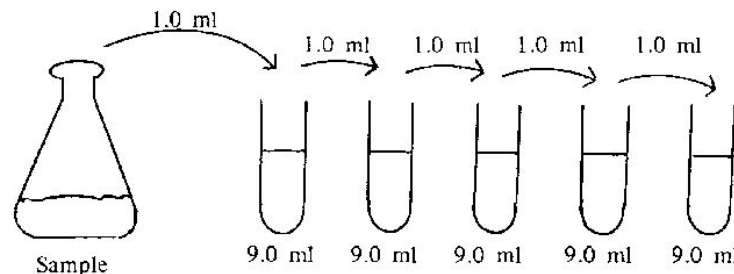




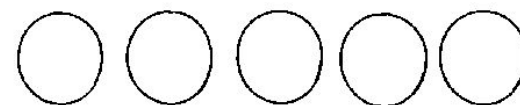
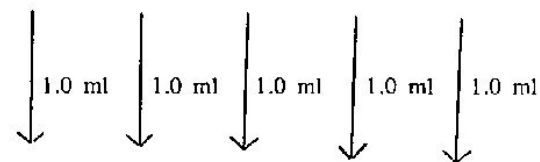
Техника последова- тельного разведения

Глубинный метод посева

Разведение
образца в
стерильной воде



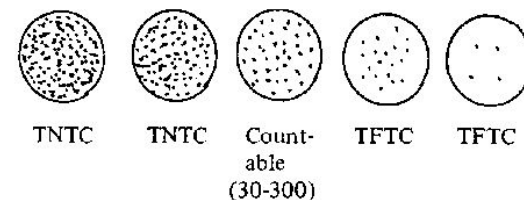
Расплавленный агар
заливается в чашку,
перемешивается и
застывает



Чашки необходимо
термостатировать 24 ч



Численность выросших
колоний различается
примерно по 10й степени,
согласно степени
разведения





Техника проведения процедуры глубинного метода посева

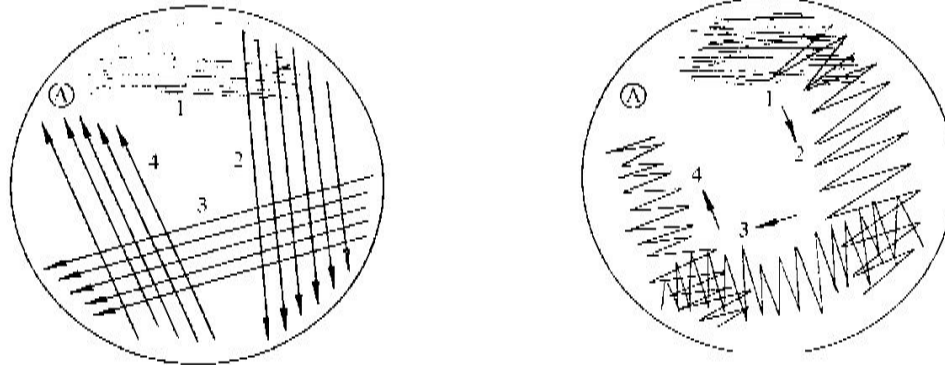
Согласно принятой методике, чашки, содержащие от 15 до 300 колоний, отбираются для подсчёта. Эти чашки считаются наиболее статистически достоверными для подсчёта, чем те, которые содержат большее или меньшее количество колоний.

- ▶ Чашки, в которых менее 15 колоний, записываются как «слишком мало для подсчёта», используется код *TFTC* (too few to count)
- ▶ Чашки, в которых имеется более 300 колоний, записываются как «слишком много для подсчёта», используется код *TNTC* (too numerous to count)

Метод выполнения посева



Два способа проведения истощающего штриха



Целью является получение единичных, хорошо изолированных колоний микроорганизмов после инкубации. Каждая колония растёт из единичной клетки или группы клеток, которая может быть выделена на поверхности агара.



Метод проведения штриха

Первый способ

1. Выполняя движения назад и вперед, необходимо равномерно распределить микроорганизмы на поверхности небольшого участка на краю чашки.
2. Скользить петлёй, избегая погружения в агар.
3. Обожгите в пламени петлю и охладите её, прикасаясь к агару в зоне А.
4. Сделайте 5 - 6 параллельных штрихов, начиная от зоны 1 и продолжая до зоны 2. Штрихи не должны пересекаться друг с другом.
5. Обожгите в пламени петлю и охладите её, прикасаясь к агару в зоне А.
6. Повторите серию параллельных штрихов к зонам 3 и 4 по кругу.



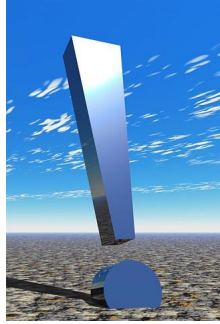
Метод выполнения посева

Второй способ

- ▶ Следуйте методике, описанной выше, производите зигзагообразные штрихи, вместо параллельных.
- ▶ Зигзагообразные штрихи должны располагаться близко друг к другу.



Полезные советы для исключения “грязной” работы



1. Наносите штрих на всю поверхность зоны 1.
2. Каждая группа штрихов должна перекрывать предыдущую, но не допускайте зоне 4 соприкоснуться с зоной 1.
3. Используйте как можно большую по размеру чашку.
4. Соблюдайте разделение штрихов (но во втором методе необходимо следить, чтобы штрихи были рядом).
5. Во избежание углубления в агаре, поддерживайте плоскость петли параллельно к поверхности агара.

Приготовление питательной среды





Подготовка питательной среды

1. Взвесьте сухую питательную среду согласно инструкции производителя и добавьте дистиллированную воду в кастрюлю из нержавеющей стали.
2. Доведите раствор до кипения, часто помешивая.
3. Налейте разогретый раствор в стеклянные бутылочки, предназначенные для автоклавирования, наполняйте не более 3/4 объёма.
4. Закройте плотно завинчивающуюся крышку и «приоткройте» её, покрутив на пол-оборота в другую сторону.
5. Автоклавируйте согласно инструкции.
6. Вынув из автоклава, закрутите плотнее крышку.
7. Дайте остыть до 45⁰С («тёплое прикосновение»).



Подготовка чашек Петри со средой

Разлейте приготовленную среду по чашкам Петри, соблюдая следующие предосторожности:

1. Вытрите насухо бутылку снаружи для того, чтобы вода (инфекция) снаружи бутылки не попала в чашки.
2. После удаления завинчивающейся крышки, обожгите пламенем горелки горлышко бутылки перед разливанием из неё расплавленного агара на чашки Петри.
3. Наливайте агар на чашки Петри до тех пор, пока около 75% дна чашки не будет покрыто средой, т. е. около 20 мл среды.
4. Дайте агару остыть. Для избежания появления большого количества конденсата желательно поставить чашки одна на другую в стопку.



Рекомендуемые селективные питательные среды для идентификации микроорганизмов

Низкокислотные продукты

- **Питательная среда MRS** – селективная среда для роста молочнокислых бактерий.
- **Питательная среда Сабуро-** селективная среда для роста дрожжей и плесеней.
- **Питательная среда ВНІ-** селективная среда для роста анаэробных бактерий на основе сердечно-мозгового бульона.
- **Питательная среда DEV-** желатиновый агар для роста споровых бактерий



Рекомендуемые селективные питательные среды

Высококислотные продукты

- **Питательная среда OSA-** для определения дрожжей, плесеней, молочнокислых бактерий при 25 °С.
- **Питательная среда BAT** применяется для идентификации роста Alicyclobacillus при инкубации на 45 °С.
- **Питательная среда MRS** – селективная среда для роста молочнокислых бактерий.
- ✓ **Питательная среда Сабуро-** селективная среда для роста дрожжей и плесеней.



Метод дифференцирования

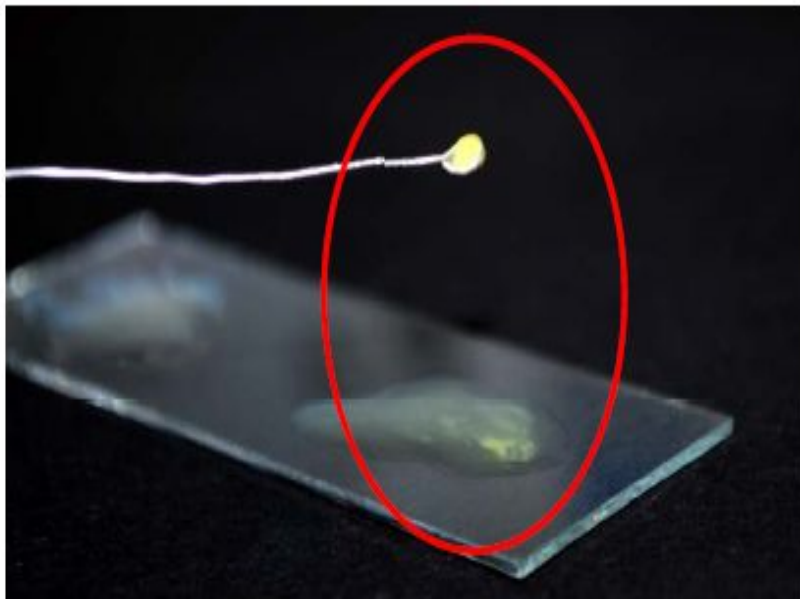
Цель: дифференцировать физические различия в структуре клеточных стенок Грам + и Грам- бактерий

Методика:

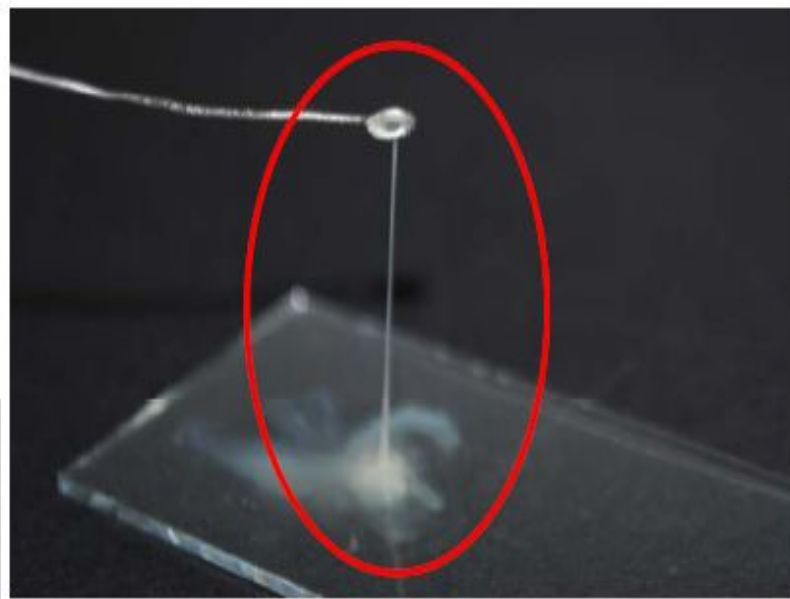
1. Нанести одну каплю 3% гидроксида калия (КОН) на микроскопический препарат.
2. Иглой взять материал из колонии на агаровой пластинке.
3. Тщательно эмульгировать материал в растворе КОН.
4. Примерно через 10 сек извлечь иглу из эмульгированного материала и проверить на наличие длинных клейких нитей между иглой и предметным стеклом.
5. Остановить перемешивание, если появление нитей не отмечено спустя 15-20 сек.



Метод дифференцирования



Грам +



Грам -



Метод окрашивания по Граму

Цель: определение бактерий с помощью дифференциального окрашивания

Методика приготовления мазка:

1. Нанести каплю воды на чистое предметное стекло.
2. Поместить иглу с микробным материалом из колонии на предметном стекле в каплю воды, смешать и распределить на участке площадью 1-2 кв. см.
3. Дать мазку высохнуть на воздухе.
4. Зафиксировать мазок нагревом, пронеся его через горячую часть пламени 2-3 раза.
5. Дать остыть на предметном стекле.



Метод окрашивания по Граму

1. Поместить предметное стекло на подставку для окрашивания над раковиной, нанести раствор 1 (кристаллический фиолетовый) на мазок.
2. Дать постоять в течение 30 сек. Промыть водой.
3. Нанести раствор 2 (йодистый раствор Грама).
4. Дать постоять в течение 1 мин. Промыть водой.
5. Нанести обесцвечивающий раствор 3 (ацетон/спирт) на 30 сек. Промыть водой.
6. Нанести раствор 4 (сафранин - красный краситель) на 30 сек. Промыть водой.
7. Аккуратно промокнуть насухо тканевой/бумажной салфеткой
8. Капнув каплю иммерсионного масла на мазок, под микроскопом определить цвет бактерий.



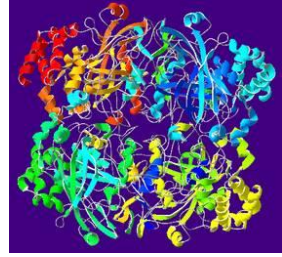
Метод окрашивания по Граму

Интерпретация результатов:

Грам + бактерии окрашиваются в тёмно-синий/фиолетовый цвет.

Грам – бактерии окрашиваются в красный цвет.





Тест на наличие каталазы

- ▶ **Реагент:** 10 % раствор перекиси водорода
- ▶ **Метод:** добавить 1 каплю H_2O_2 на поверхность одной колонии.
- ▶ **Положительный результат:** образование пузырьков на поверхности колонии указывает на присутствие фермента каталазы, который расщепляет перекись водорода на H_2O и кислород, что вызывает появление пузырьков.



Тест на наличие оксидазы



- ▶ **Реагент:** тетраметил-р-фенилендиамина дигидрохлорида. Реагент имеется в виде сухого порошка либо в виде бумажных индикаторов.
- ▶ **Метод:** каждую колонию, которую требуется проверить, распределите с помощью стеклянной палочки (или платиновой петли) по поверхности индикатора. По истечению 5 сек. оцените изменение цвета реагента.
- ▶ **Положительный результат:** бактерии являются оксидазоположительными, если индикатор приобретает фиолетовый цвет.

ПРИБЛИЗИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ



МИКРОПРЕПАРАТ

ПАЛОЧКИ

КОККИ

Coryneform group
Bacillus
Actinomyces
Lactobacillus
Pseudomonas
Enterobacteriaceae
Alkaligenes
Aeromonas
Serratia

Micrococci
Staphylococci
Sarcina
Streptococci
Pediococci

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ГРАМУ

КАТАЛАЗА

+

-

Bacillus
Actinomyces
Lactobacillus
Coryneform group (вариабельные)

Pseudomonas
Enterobacteriaceae
Alkaligenes
Aeromonas
Serratia

ОКСИДАЗА

Streptococci (цепочки)
Pediococci

+

КАТАЛАЗА

Micrococci

Staphylococci

Bacillus(палочки, споры)
Actinomyces (мицелий)
Coryneform
(вариабельные, нет спор)

Lactobacillus

ОКСИДАЗА

Pseudomonas (без газообразования)
Aeromonas (газообразование)
Alcaligenes (без газообразования)

Enterobacteriaceae (газообразование)
Serratia (без газообразования)



Изменения низкокислотной продукции *Staphylococcus/ Micrococcus*

<u>Изменения продукции</u> нет видимых изменений, коагуляция (изменением кислотности или без нее)	<u>Производственный источник</u> низкий уровень личной гигиены СИП мойка/ стерилизация
<u>Природный источник</u> эпидермис (кожа рук), вымя коровы- <i>Staphylococcus</i> воздушное обсеменение- <i>Micrococcus</i>	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> устойчивы к сухой среде некоторые штаммы обладают повышенной термоустойчивостью	



Изменения низкокислотной продукции *Streptococcus/ Lactobacillus*





Изменения низкокислотной продукции *Corinebacterium*

<u>Изменения продукции</u> однородный сгусток	<u>Производственный источник</u> повторное заражение
<u>Природный источник</u> воздушное обсеменение, персонал сырое молоко	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> устойчивы к сухой среде относительно термоустойчивы	



Изменения низкокислотной продукции *Vacillus*

<p><u>Изменения продукции</u></p> <p>однородный сгусток, незначительное снижение pH, газообразование</p>	<p><u>Производственный источник</u></p> <p>остаточная обсемененность, стерилизация оборудования, стерилизация упаковочного материала, предварительная обработка, СИП-мойка</p>
<p><u>Природный источник</u></p> <p>воздушное обсеменение сырые материалы, сухое молоко</p>	
<p><u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u></p> <p>высокая термоустойчивость, устойчивы к сухой среде и дезинфицирующим средствам</p>	



Изменения низкокислотной продукции *Enterobacteriaceae*

<u>Изменения продукции</u> газообразование повышение кислотности	<u>Производственный источник</u> повторное заражение нарушение герметичности упаковки несоблюдение санитарных норм и правил при проектировании и монтаже производственной линии
<u>Природный источник</u> вода персонал	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> низкая термоустойчивость быстро погибают в сухой среде	



Изменения низкокислотной продукции *Pseudomonas*

<u>Изменения продукции</u> в первые недели без изменений, незначительное повышение рН, постепенная коагуляция, фруктовый или рыбный запах	<u>Производственный источник</u> повторное заражение нарушение герметичности пакета
<u>Природный источник</u> вода	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> низкая термоустойчивость быстро погибают в сухой среде	



Изменения низкокислотной продукции *Actinomycetes/Thermoactinomycetes*

<u>Изменения продукции</u> однородный сгусток	<u>Производственный источник</u> предварительная обработка
<u>Природный источник</u> порошок (какао, кофе)	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> относительно термустойчивы устойчивы к сухой среде Thermoactinomycetes производят термоустойчивы споры	



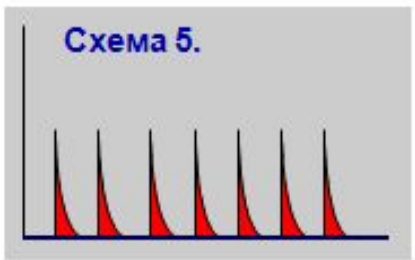
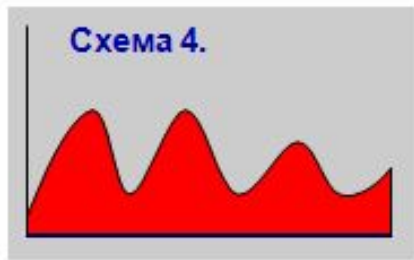
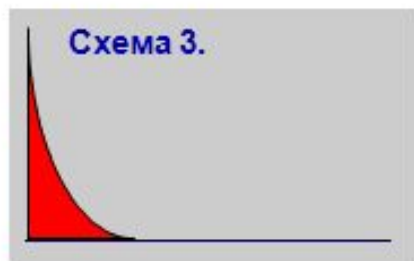
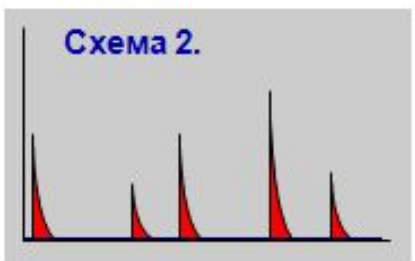
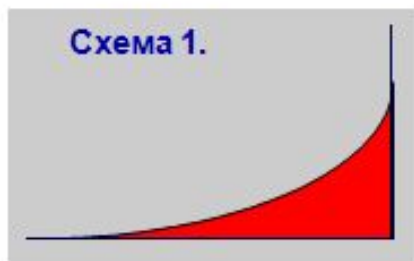
Изменения высококислотной продукции *Alicyclobacillus*

<u>Изменения продукции</u> тухлый запах, осадок, мутность	<u>Производственный источник</u> остаточная обсеменность
<u>Природный источник</u> сырье, соковые концентраты	
<u>Устойчивость к неблагоприятным внешним факторам</u> особенности роста pH=3,5-4,0 при 26°C-50°C термостойкость D _{95°C} = 1-5,3 мин рост колоний сопровождается изменением окраски питательной среды Гваякола в коричневый цвет	



Схемы распределения брака в партии

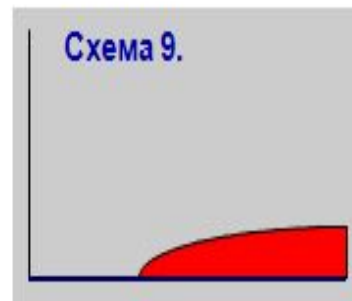
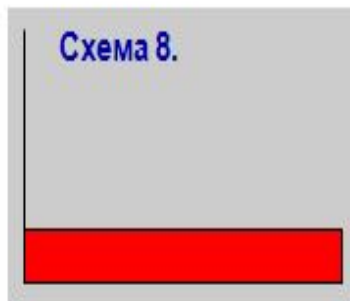
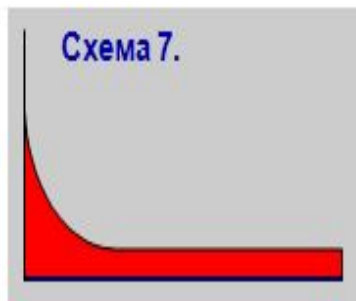
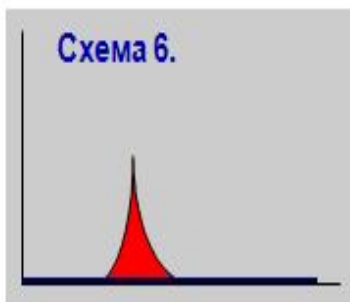
Информацию о распределении дефекта в партии важно учитывать при поиске причин нестерильности.





Схемы распределения брака в партии

Информацию о распределении дефекта в партии важно учитывать при поиске причин нестерильности.



Контроль санитарного состояния оборудования



Микробиологическое состояние



Место расположения	КОЕ/ мл	Микрофлора
Внутри помещения: сухой воздух		Доминируют пигментные грам+ бактерии
- Офис с людьми	240	
- Офис вдали от людей	16	
- Коридор для прохода	40	
Внутри помещения: влажный воздух		Большинство грам- бактерий
- Туалеты	280	
- Душевые	320	
Снаружи помещения:		Преобладают плесени
- Газоны	150	



Методы контроля качества мойки

- ▶ **Визуальный контроль:** Отсутствие видимых загрязнений, моющих веществ, явного запаха остатков продукта.
- ▶ **Бактериологический анализ:** Отбор пробы стерильным увлажненным тампоном с поверхности площадью 10×10 см. Посев 1 мл раствора на чашку Петри с агаром. Подсчёт колоний на чашке Петри через 72 ч.
- ▶ **Прямой анализ поверхности (экспресс-оценка):** Используется для определения органических остатков по косвенному анализу концентрации АТФ с помощью люминометра.





Санитарное состояние оборудования

Технологическое оборудование:

- ▶ Демпферы на гомогенизаторе
- ▶ Теплообменник - секция выдержки продукта, балансный бак
- ▶ Клапаны постоянного давления





Точки отбора смывов

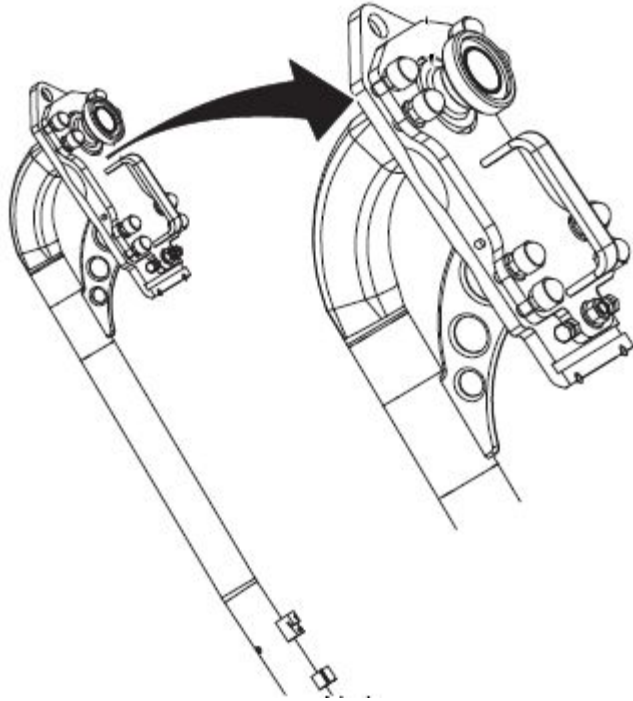
Упаковочный автомат:

- ▶ Внутренняя поверхность верхней наполнительной трубы
- ▶ Асептическая камера (внутренняя поверхность, ролики)
- ▶ Поплавок
- ▶ Нижняя наполнительная труба





Процедура обслуживания верхней наполнительной трубы (ТВА_08 11 2009)



После проведения СИП-мойки и ручной мойки продолжительность погружения верхней наполнительной трубы в дезинфицирующее средство должна составлять как минимум 60 минут



Действия оператора перед производством

- ▶ Стол для сращивания бумаги перед началом производства необходимо протирать дезинфицирующим средством (код G, Руководство по эксплуатации автомата) или 70% раствором спирта
- ▶ Перед заправкой бумаги в автомат оператор должен обработать руки дезинфицирующим раствором (Spitacid, Manodes и др.)





Проведение повторной мойки оборудования обязательно, если имеется:

- ▶ Превышение показателей по смывам
- ▶ Нарушение стерильных условий
- ▶ Наличие видимых остатков загрязнений



Максимальное время остановов/ожидания. Рекомендации Тетра Пак ТВА_2008_01_03

Тип автомата*	Максимальное время ожидания между Окончанием Производства и началом СІР	Максимальное время ожидания между окончанием СІР и началом Сушки СІР	Максимальное время ожидания между окончанием СІР и началом Дезинфекции	Максимальное время простоя между окончанием СІР и возобновлением работы автомата	Максимальная продолжительность остановов во время Производства* ***	Максимальная продолжительность стадии Производства
Не в классификации**	2 часа	n/a	ТВ автоматы: 5часов ТВА автоматы: n/a	36 часа	2 часа	24 часа
ТВ/21		n/a	5часов			
ТВА/21		5часов***	n/a			
ТВА/22		5часов***	n/a			
С3/Flex		n/a	5часов			
А3/Flex		5часов	n/a			
А3/CompactFlex		5часов	n/a			
А3/Speed		5часов	n/a			

*Данные рекомендации применимы только к указанным типам автоматов

**ТВА/3, ТВ-ТВА/8, ТВ-ТВА/9, ТВ-ТВА/19 и предыдущие системы

***Автоматы с программой PLC, обновленной для включения СІР Сушки

****Протяжка упаковочного материала каждые 10 мин для автоматов не асептических/с функцией повышенной гигиены.

Протяжка упаковочного материала каждые 20 мин для асептических автоматов.



Санитарно-гигиеническое состояние производства

Согласно СанПин 2.3.4.551-96

- ▶ Контроль воздуха (ОМЧ, БГКП, количество колоний дрожжей и плесеней)
- ▶ Контроль производственной воды (ОМЧ, БГКП)
- ▶ Контроль чистоты рук работника не реже 3 раз в месяц (ОМЧ, БГКП)

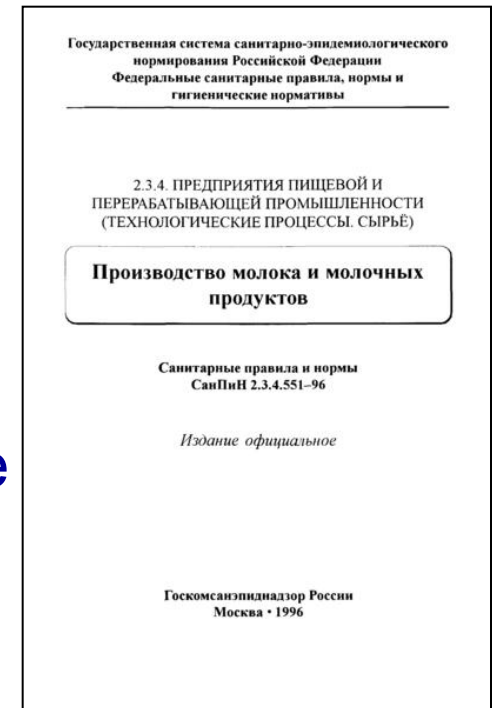
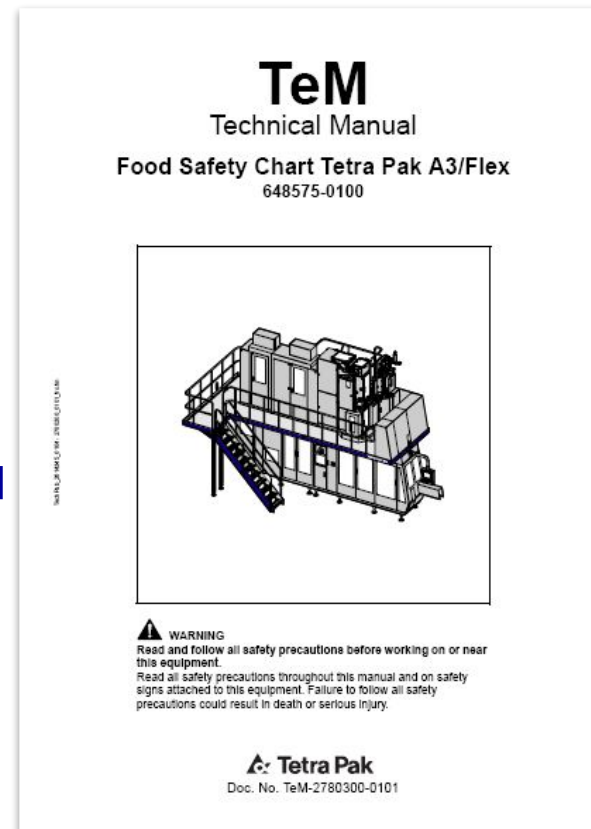




Диаграмма Пищевой Безопасности (FSC)

Безопасность пищевых продуктов связана с устранением и/или минимизацией риска опасностей для здоровья при потреблении продуктов питания. Поскольку риски продовольственной безопасности могут присутствовать на любой стадии производства пищевых продуктов, то важен надлежащий контроль по всей цепочке производства продуктов питания.

Тетра Пак предоставляет специализированный документ FSC (Food Safety Chart) для каждой единицы оборудования.





Проверочные листы для сбора предварительной информации



Проверочный лист № 1.

Заполняют:

1. Лаборатория завода
2. Отдел производства
3. Отдел технического обслуживания

Оборудование и схема производства

Пункты	Ответы
1. Сколько на заводе установлено автоматов (линий) выпускающих асептическое молоко / соки?	
2. Сколько и какие линии задействованы на производстве в последний месяц?	
3. На каком автомате (линии) была произведена партия нестерильного продукта?	
4. Модель автомата, на котором были произведены нестерильные пакеты тип пакета тип открывания	
5. Время прошедшее после окончания мойки автомата и началом производства партии имевшей нестерильную продукцию	
6. Модель модуля стерилизации молока (для соков и нектаров пастеризации) с которого поступал продукт Указать компанию изготовителя и производительность	

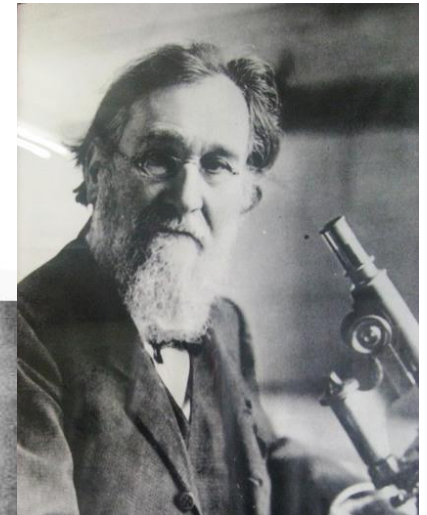
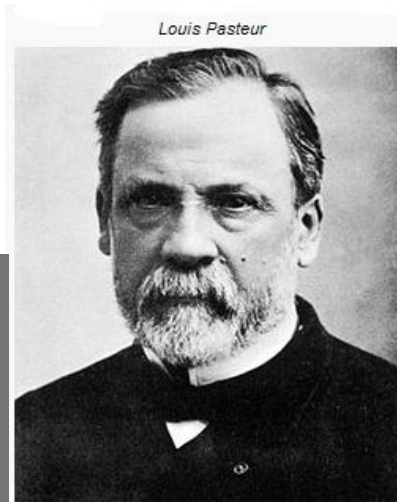
Основы общей микробиологии





Микробиология

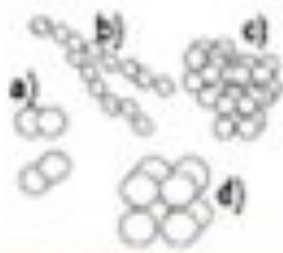
Это наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, называемых микробами или микроорганизмами





Морфология бактерий

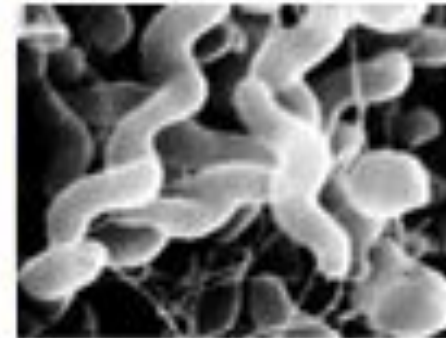
Кокки



Палочки

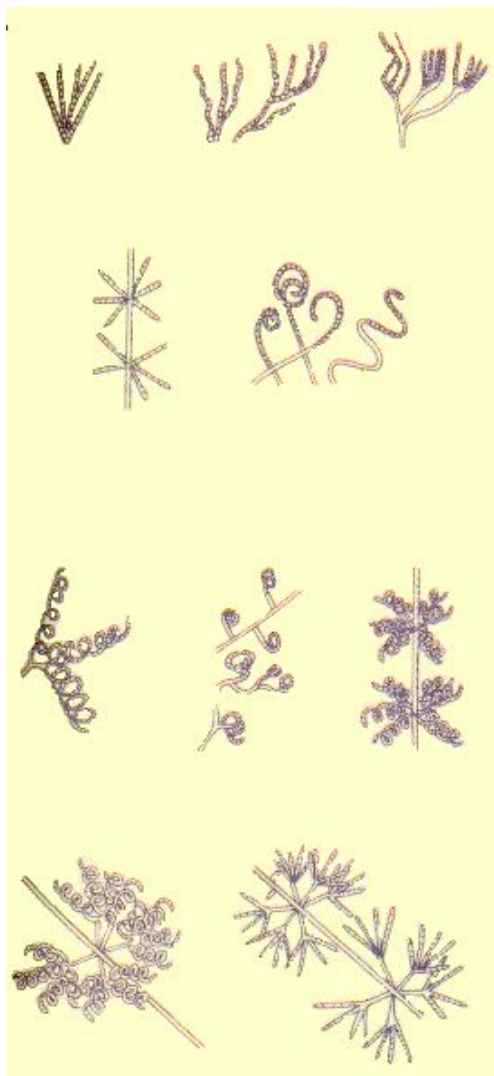


Спиралевидные



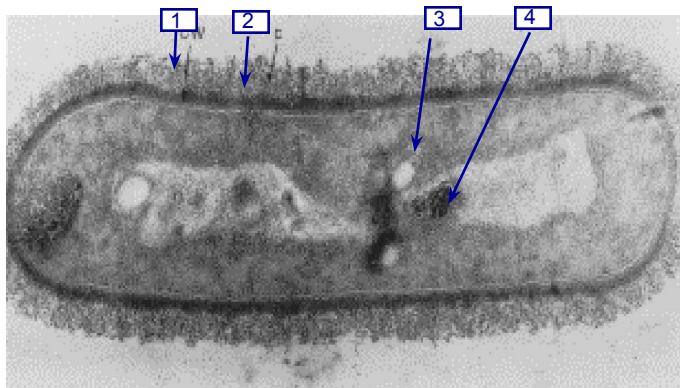
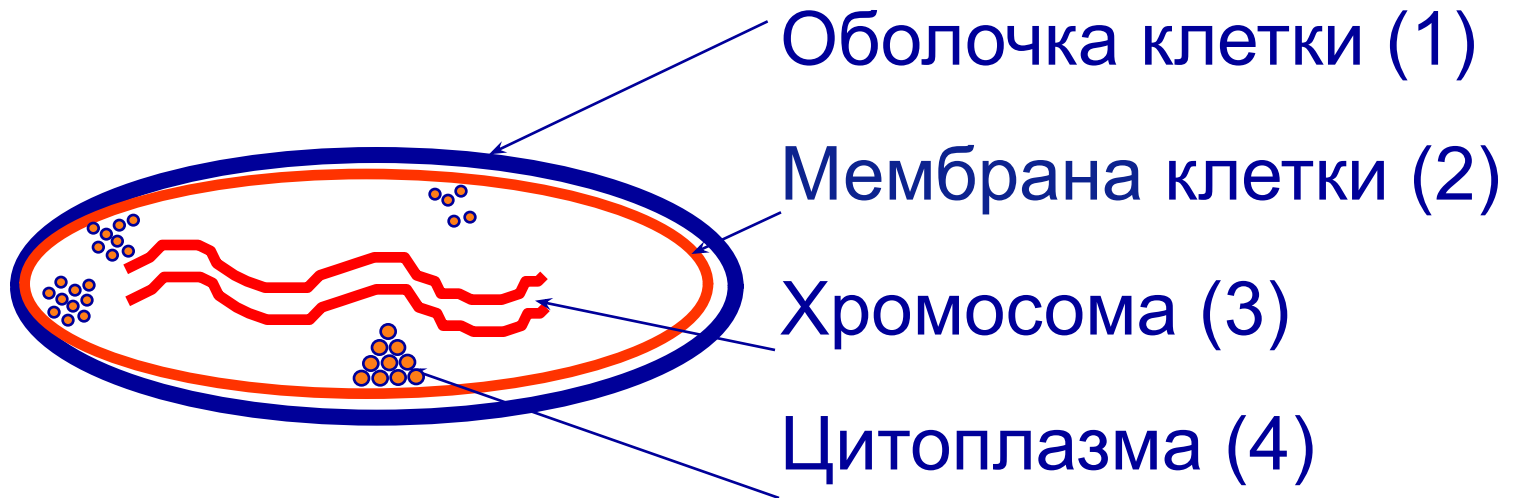


Актиномицеты





Основные структуры бактериальных клеток





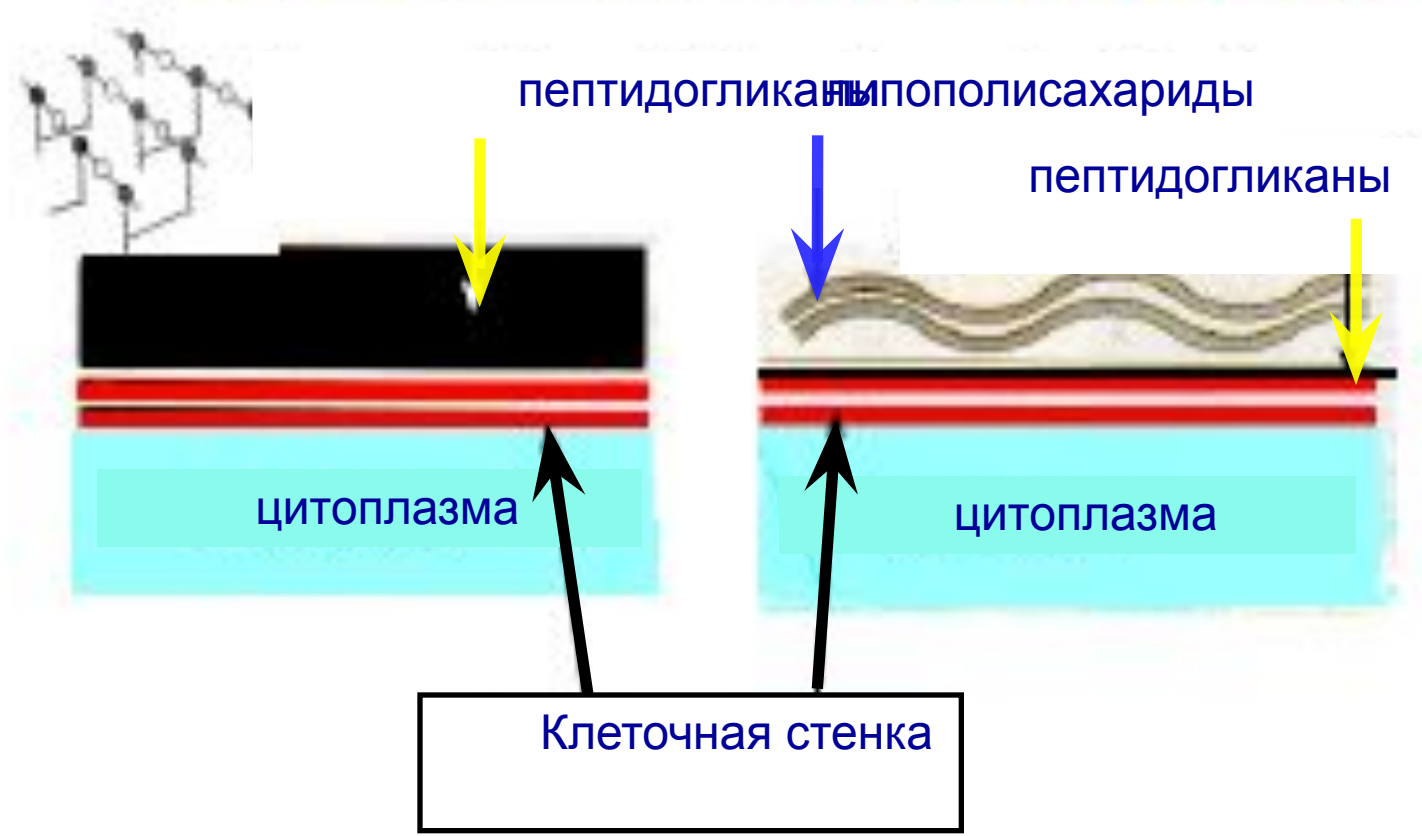
Компоненты клетки

- ▶ Протеины
- ▶ Нуклеиновые кислоты
- ▶ Липиды
- ▶ Углеводороды
- ▶ Микроэлементы
- ▶ Минеральные элементы (зола)
- ▶ Вода



Бактерии

грамположительные и грамотрицательные





Виды бактерий

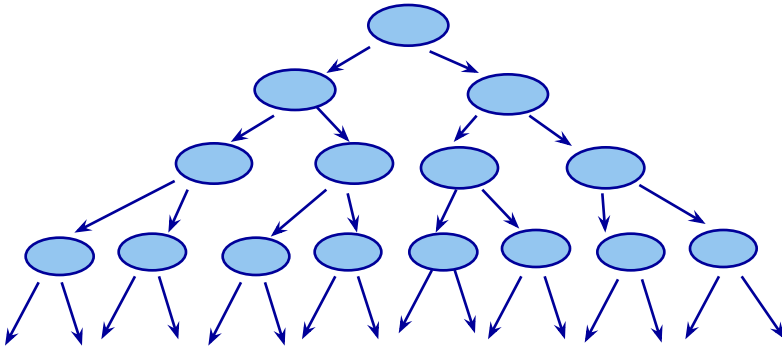
ГРАМ +

- Micrococcus
- Staphylococcus
- Corinebacteruim
- Lactobacillus
- Bacillus
- Actinomycetes

ГРАМ -

- Pseudomonas
- Escherichia coli
- Enterobacter

Размножение бактерий



$1 \Rightarrow 2 \Rightarrow 4 \Rightarrow 8 \Rightarrow 16 \Rightarrow 32 \dots$
 $2^0 \Rightarrow 2^1 \Rightarrow 2^2 \Rightarrow 2^3 \Rightarrow 2^4 \Rightarrow 2^5 \dots$

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

$$n = \frac{t}{g}$$

$$\lg N_t = \lg N_0 + \frac{t}{g} \times \lg 2$$

g = время генерации, т.е. время удвоения

n = число генераций

t = инкубационное время, т.е. время роста

N₀ = число бактерий в момент времени ноль

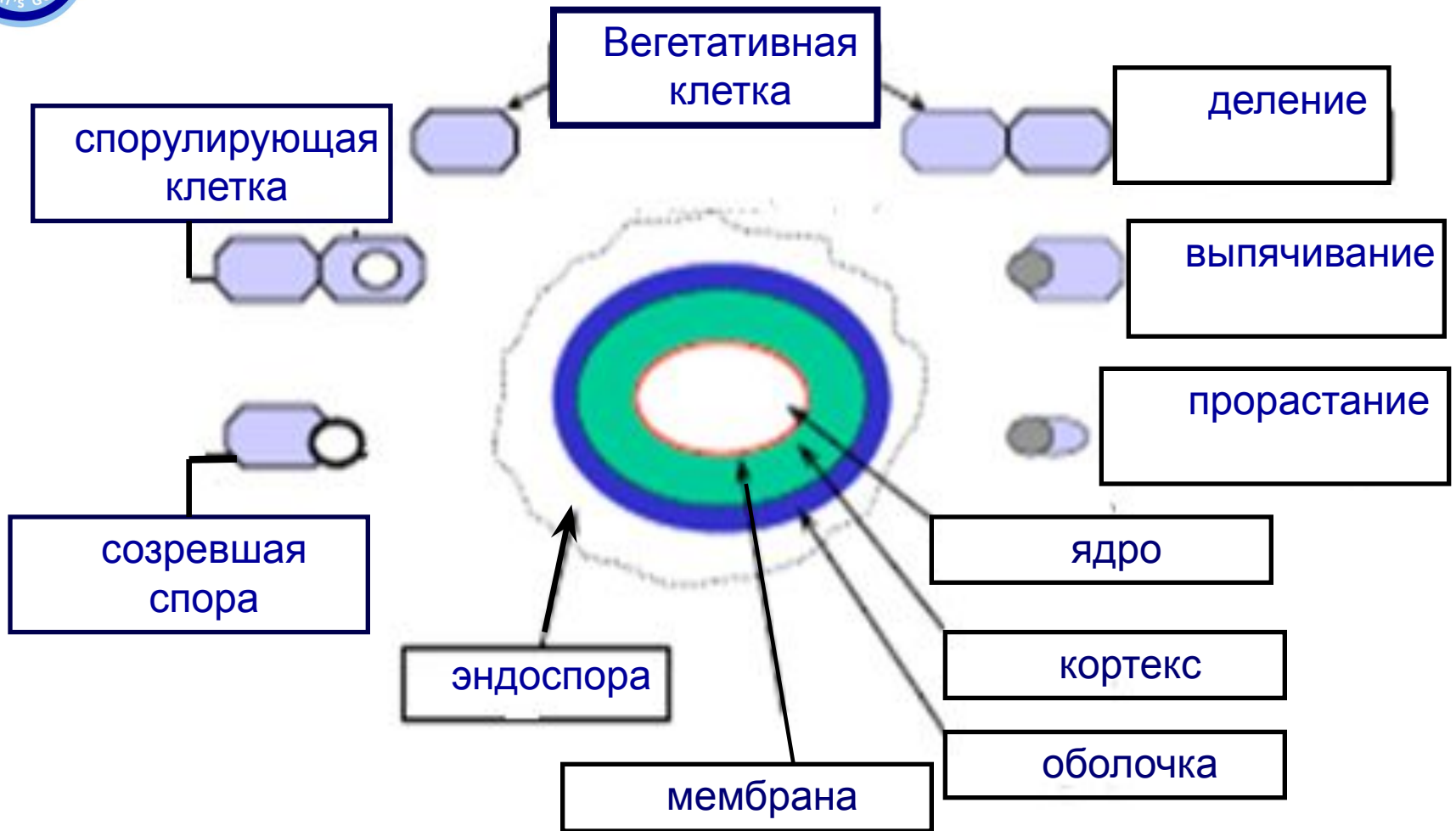
N_t = число бактерий в момент времени t



Кривая роста бактерий



Образование спор





Грибы

Дрожжи



почкование

Плесень

споры

спорофор

мицелий

гифы





Споровые грибы

Способ размножения

вегетативное

половое

хламидоспоры



конидиоспор



спорангиоспоры

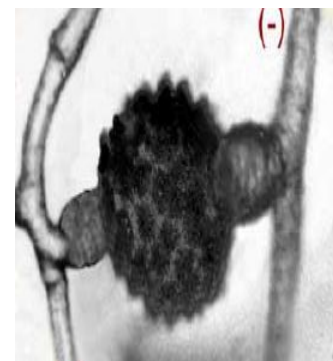
зигоспоры



аскоспоры

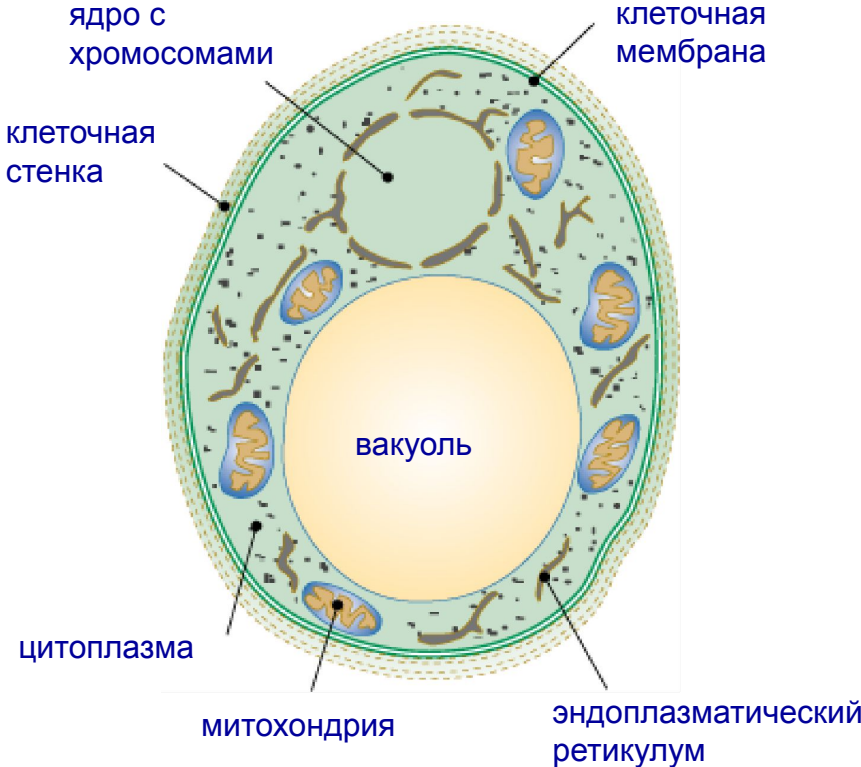
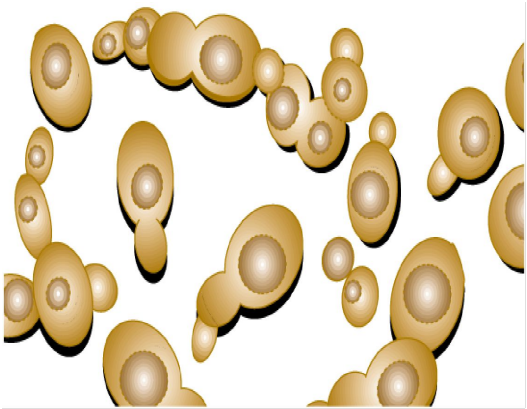


базидоспоры





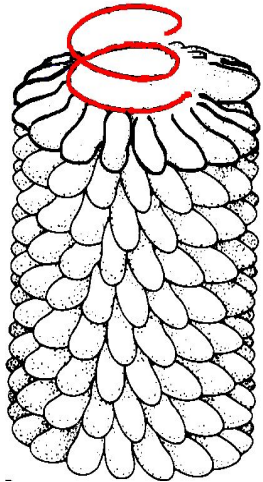
Размножение дрожжей



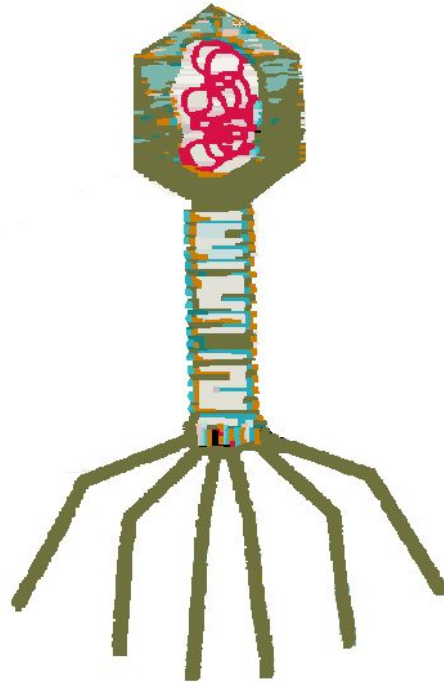


Вирусы

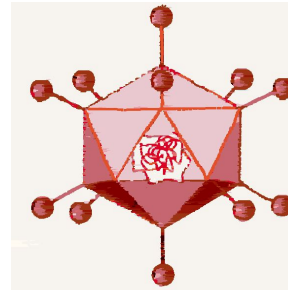
Мозаичная
болезнь
табака



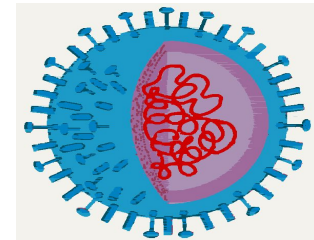
T-фаги



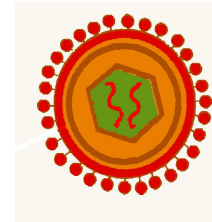
Аденовирус



Грипп

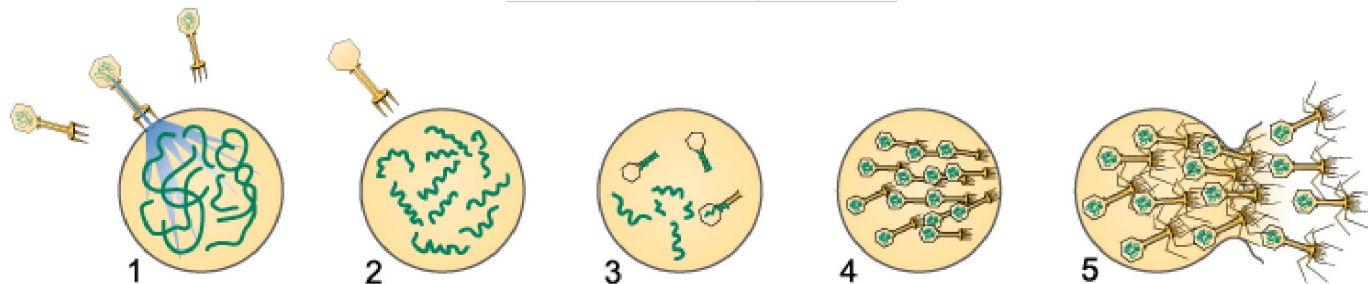
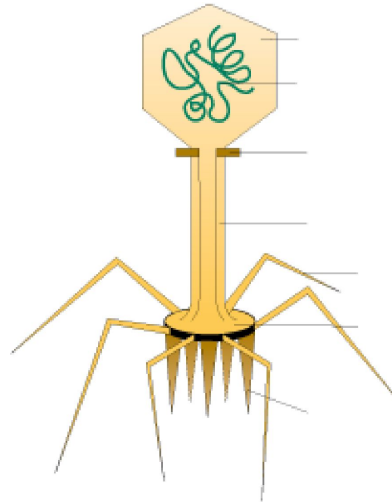


ВИЧ





Репликация вирусов





Важные факторы роста

- ▶ Питательные элементы (С, Н, N, Р, S и др.)
- ▶ Кислород
- ▶ Вода
- ▶ Температура
- ▶ Кислотность



Внешний фактор: кислород

Группа

Отношение к кислороду

Аэробы

Используют O_2 для роста и могут переносить O_2 при атм. уровне содержания 21% или выше.

Микроаэрофилы

Способны использовать O_2 для роста, но только при более низком содержании O_2 , чем в атмосфере. Некоторые могут дышать без O_2 .

Анаэробы

Неспособны к O_2 -зависимому росту и не могут при атмосферном уровне содержания кислорода. Некоторые являются бродильными, а некоторые имеют анаэробное дыхание.

Факультативные

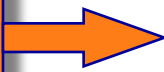
анаэробы

Способны хорошо развиваться как при отсутствии кислорода, так и при атмосферном уровне его содержания. Некоторые могут развиваться аэробно кислородом и анаэробно с брожением. Другие могут только с брожением. развиваться

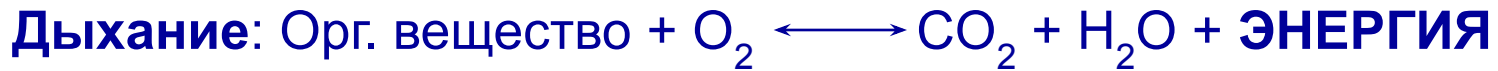
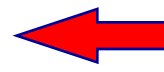


Схемы метаболизма

Аэробный метаболизм



Фотосинтезный метаболизм



Анаэробный метаболизм





Кислотность и показатель pH



$$pH = - \lg(H^+)$$

Высококислотные продукты $< 4,6$

Низкокислотная продукты $\geq 4,6$

Влияние кислотности



Нет роста патогенов

4,6

Плесень

Дрожжи

Бактерии

pH:

0

2

5

7

9

14

Фрукт. соки

Молоко

Овощные соки

Томатные продукты

Мясо, овощи, супы и т.д.

4,6

АКТИВНОСТЬ ВОДЫ



$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

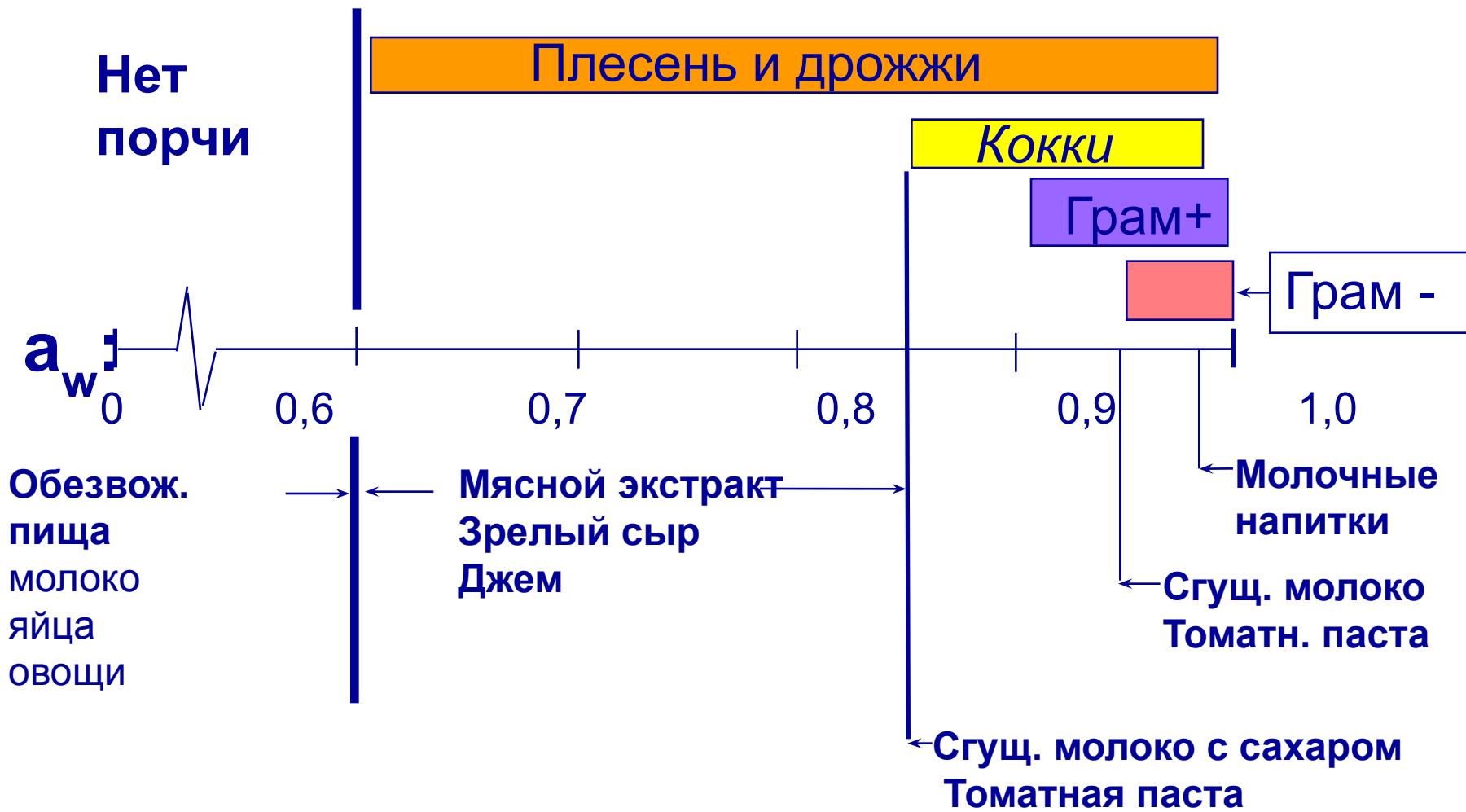
$$0 \leq a_w \leq 1$$

p = факт. давление водяного пара

p_0 = давление пара чистой воды



Влияние a_w на рост



Нет порчи

Плесень и дрожжи

Кокки

Грам+

Грам -

a_w

0,6

0,7

0,8

0,9

1,0

Обезвож. пища
молоко
яйца
овощи

Мясной экстракт
Зрелый сыр
Джем

Молочные напитки
Сгущ. молоко
Томатн. паста

Сгущ. молоко с сахаром
Томатная паста



Минимальная a_w для роста

Бактерии *Pseudomonas* 0,97
E.coli, Salmonella 0,95 *Bacillus*
0,90-0,95 *Clostridium botulinum* A,B,E
0,94-0,97
Lactobacillus, Micrococcus 0,93-0,94
Staphylococcus aureus 0,86

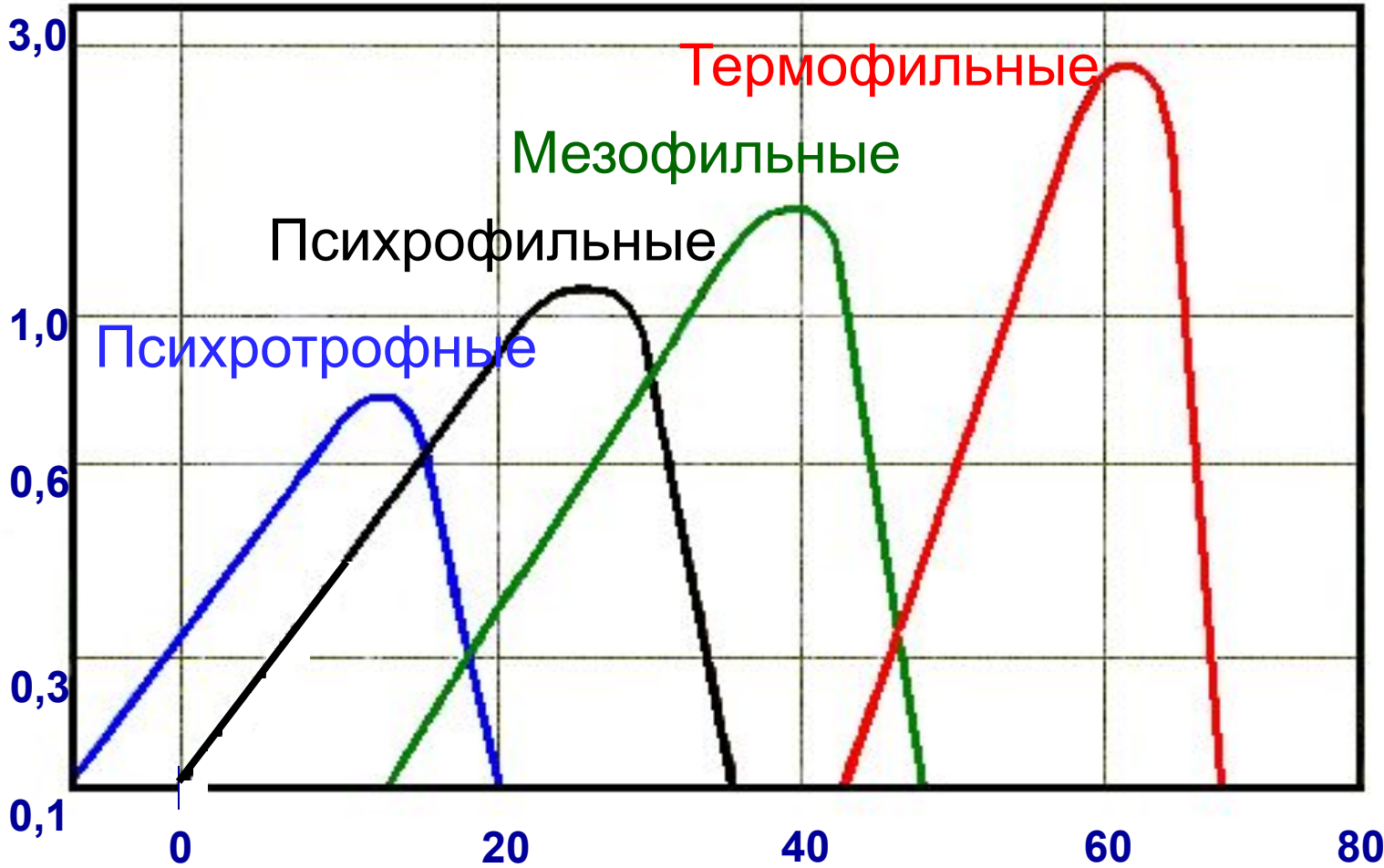
Плесень *Aspergillus* 0,70-0,84
Penicillium 0,79-0,83

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 0,90
Debaryomyces hansenii 0,83
Saccharomyces rouxii 0,62



Внешний фактор: температура

Количество делений клеток в час

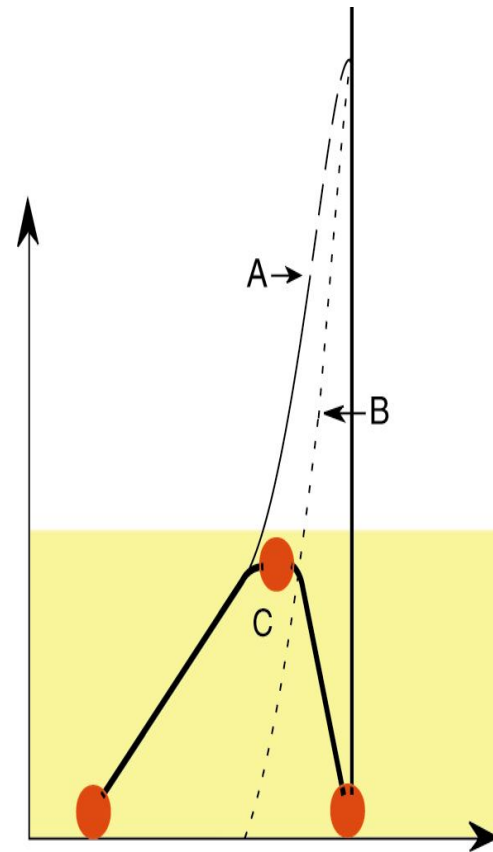
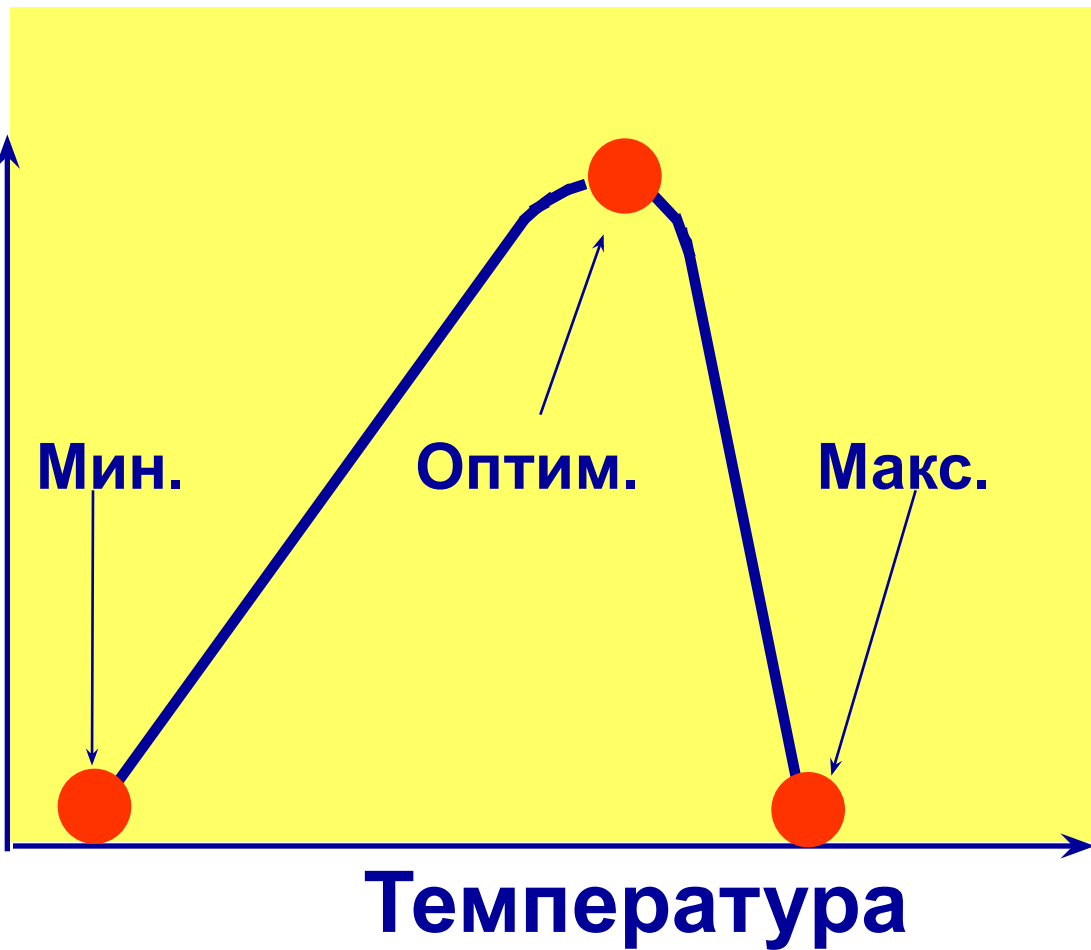


Температура (°C)



Влияние температуры на скорость роста

Скорость роста





Примеры психротрофных и мезофильных бактерий

Бактерии

Acinetobacter

Aeromonas

Alcaligenes

Bacillus

Citrobacter

Clostridium

Corynebacterium

Enterobacter

Escherichia

Klebsiella

Бактерии

Microbacterium

Micrococcus

Moraxella

Proteus

Pseudomonas

Serratia

Streptomyces

Vibrio

Yersinia

Listeria

Дрожжи

Candida

Cryptococcus

Rhodotorula

Torulopsis

Плесень

Aspergillus

Cladospodium

Penicillium

Trichothecium



Термостойкость бактерий и спор

<u>Бактерии</u> (ч)	<u>D₉₀</u>	<u>D₁₂₁</u>	(с)			
<i>L. monocytogenes</i>	0,01				“0”	
<i>B. cereus</i>	1		1,4			
<i>B. Subtilis</i>			30	60		
<i>B. Stearothermophilus</i>					>100	330
<i>C. botulinum</i> , штаммы В/Е					<0,02	<0,05
<i>C. botulinum</i> , штаммы А 3,3	12					



Методы уничтожения или удаления микроорганизмов

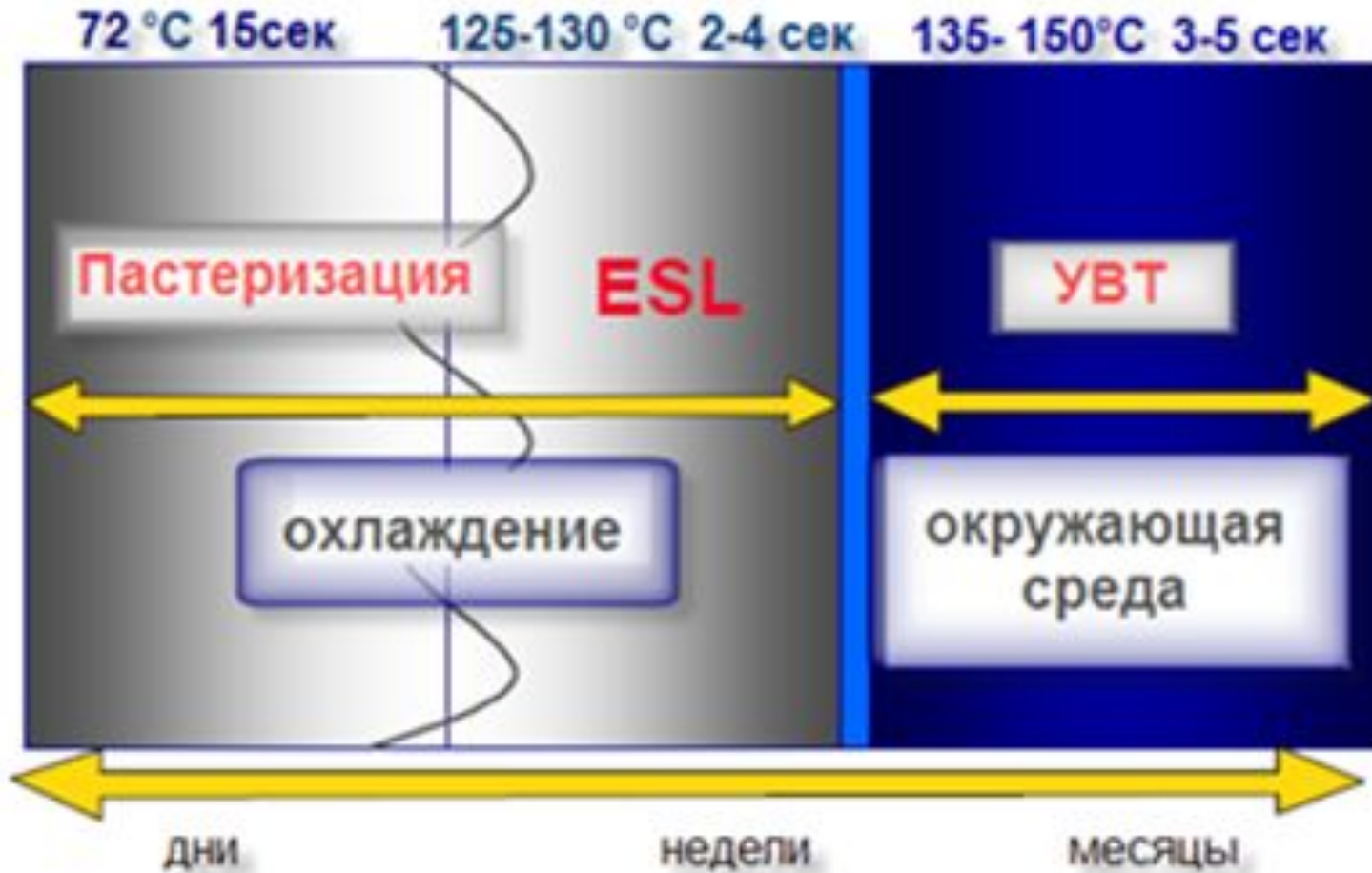
- Стерильная фильтрация
- Стерилизация облучением
 - УФ-излучение, гамма-излучение
- Тепловая стерилизация
 - Пар, сухое тепло
- Химическая стерилизация

Влияние тепловой обработки на микроорганизмы





Тепловая обработка молока





Стерилизация

Уничтожение или удаление
всех микроорганизмов

Достижение стерильности –
это вопрос
ВЕРОЯТНОСТИ





Промышленная стерильность

“ Отсутствие в продукте микроорганизмов, способных развиваться при температуре хранения, установленной для конкретного вида продуктов, а также микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья человека”



Российский
Союз предприятий
молочной отрасли

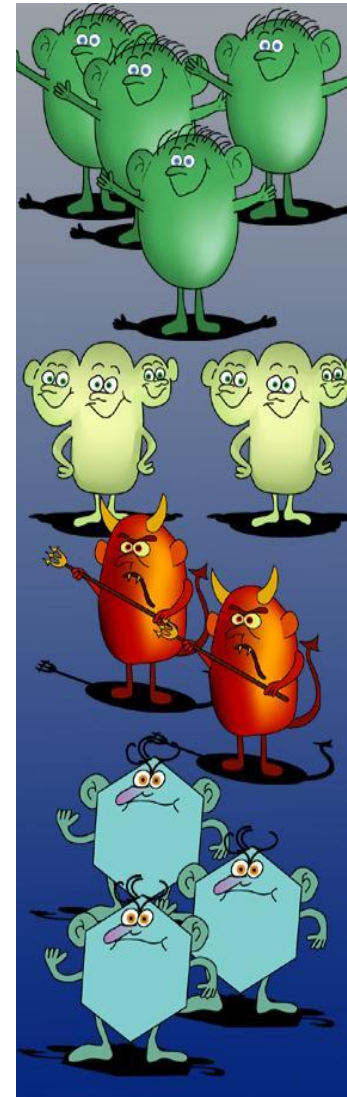


Российский
Союз
Производителей
Соков



Гибель

Необратимая потеря
способности
микроорганизмов к размножению



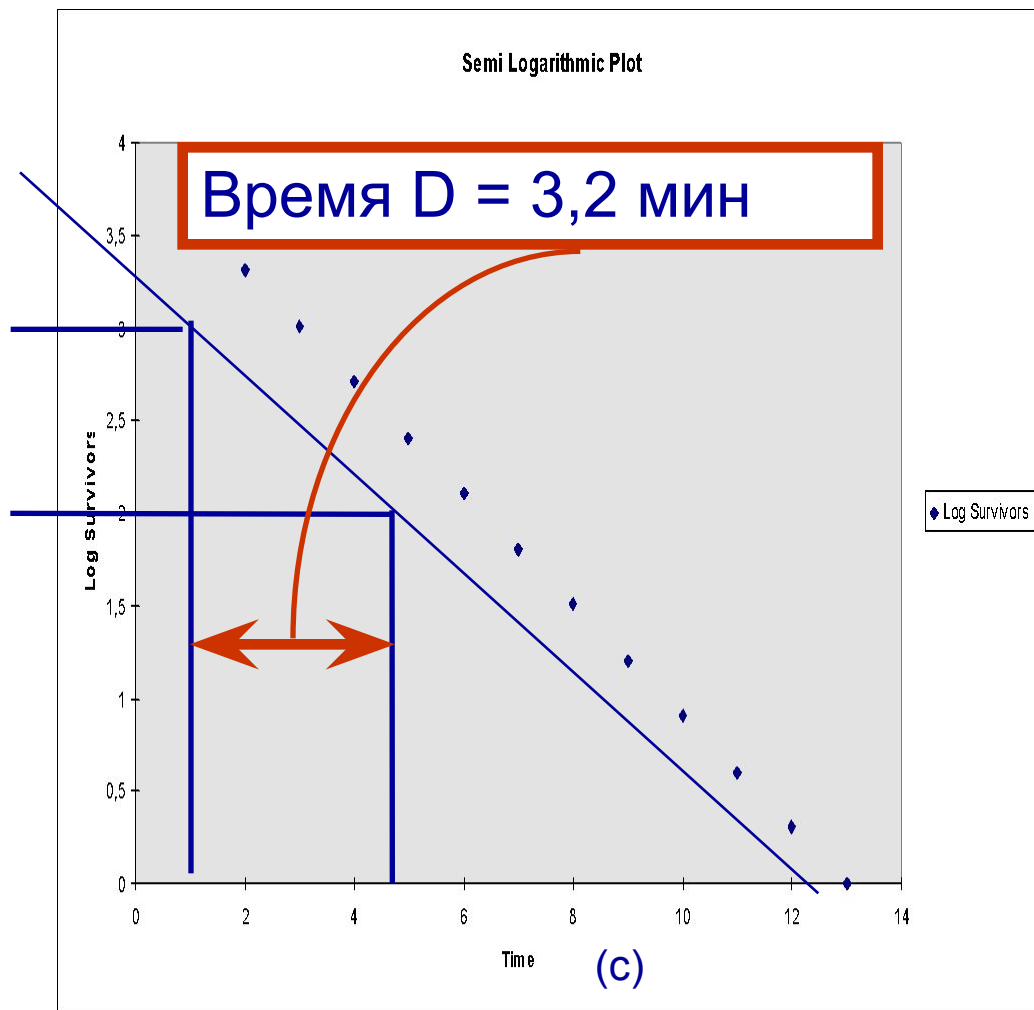


Кинетика гибели бактерий

Время	Выжившие	Число погибших в единицу времени		Общее число погибших	LCR
0					
1	100 000	900 000	=90%	900 000	1
2	10 000	90 000	=90%	990 000	2
3	1 000	9 000	=90%	999 000	3
4	100	900	=90%	999 900	4
5	10	90	=90%	999 990	5
6	1	9	=90%	999 999	6
7	0,1	0,9	=90%	999 999,9	7
8	0,01	0,09	=90%	999 999,99	8
9	0,001	0,009	=90%	999 999,999	9



Время десятичного снижения (время D)



Время D:

Время, требуемое
для снижения
числа
определенных
организмов на
90 % или на
1 Log Red или
1 D



D-показатель

Выражение $D_{65} = 1$ мин
означает, что число организмов
сокращается на 1D при температуре
воздействия 65°C в течение 1 минуты.
Две (2) минуты выражается результатом в 2D.

1D = снижение на 90 % = 1 Log Red

2D = снижение на 99 % = 2 Log Red

3D = снижение на 99,9 % = 3 Log Red

4D = снижение на 99,99 % = 4 Log Red



Значение z

Значение Z – это изменение температуры в $^{\circ}\text{C}$, требуемое для 10-кратного изменения времени D

$$Z = \frac{T_1 - T_2}{\text{Log } D_{T_2} - \text{Log } D_{T_1}}$$

где

Z – температура, $^{\circ}\text{C}$

$D_{T_1}^1$ и $D_{T_1}^2$ - результаты измерения времени D при температурах ($^{\circ}\text{C}$) T_1 и T_2 соответственно.



Эффективность стерилизации

Эффективность процесса стерилизации оценивается логарифмом снижения численности (LCR), которое дается для наиболее устойчивых микроорганизмов



Термостойкость бактерий, которые развиваются в НИЗКОКИСЛОТНЫХ продуктах

Микроорганизм	D-температура	D-показатель	Z-значение
Clostridium botulinum	121	0,2 мин	10
Bacillus subtilis	121	0,4-0,7 мин	6,8
Мезофильные споры	121	11 сек	10,4
Термофильные споры	121	25 сек	10,3



Термостойкость бактерий, которые развиваются в высокококослотных продуктах

Микроорганизм	D-температура	D-показатель	Z-значение
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60	1- 22 мин	4-6,5
<i>Aspergillus niger</i>	55	1 мин	4,9
<i>Lactobacillus fermentum</i>	65	1,13 мин	5
<i>Alicyclobacillus</i>	95	1-2,8 мин	7,2-7,7



Микроорганизмы- возбудители пищевых отравлений

- ▶ Пищевое отравление вызывается испорченными продуктами растительного и животного происхождения, ядовитыми грибами и растениями, а также пищевыми продуктами, ставшими при определенных условиях временно ядовитыми. Может также возникнуть вследствие употребления в пищу продуктов, содержащих токсичные химические вещества (соли тяжелых металлов, микотоксины и т.п.).



Лабораторный практикум



Форма заполнения



Результаты инокуляции пакетов с молоком

№	Исходный продукт		После термостатирования				Тестовая культура
	pH	T°	pH	вздутие	коагуляция	органолептика	
1							
2							
3							
4							
5							
6							

Результаты исследования тестовых культур



Вид бактерии	ID	Микроскопия	Цвет колоний	Отношение к кислороду	Источники развития	Изменение продукта	Рост при 30С	Рост при 55С	Среда селективная	Оксидаза тест	Каталаза тест
Грам положительные палочки											
<i>Bacillus stearotherophilus</i>	B-510	прямые палочки с закругленными краями, образуют эндоспоры	белые, кремовые	аэробы	некачественное сырье (выживание в процессе), вторичное обсеменение (секция регенерации теплообменника, негерметичность пакетов)		-	+			+
<i>Bacillus subtilis</i>	B-501	крупные палочки	кремовые	аэробы			-	+			+
<i>Bacillus coagulans</i>	B-731	палочки, образуют споры	белые колонии, на чашке образуют сплошной рост	аэробы	остатки продукта после СИП мойки, наличие остатков продукта в системе формирования пакета (щели, окончательный альцовщик)						

Спасибо за внимание

