



**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ  
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА  
ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ  
ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ  
ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЇ  
ЕКСПЕРТИЗИ**

**ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО  
БАКТЕРІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ  
В СИРОМУ КОРОВ'ЯЧОМУ МОЛОЦІ,  
ВИВЕДЕННЯ СЕРЕДНЬОЇ  
ГЕОМЕТРИЧНОЇ ВЕЛИЧИНИ**

**Методичні рекомендації**

**КИЇВ-2022**

## **УДК 637.075**

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від 23 червня 2021 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол №2 від 29.12.2021 р.).

**Розробники:** Гаркавенко Т.О., Козицька Т.Г., Бергілевич О.М., Дяченко Т.О.

### **Рецензенти:**

**Цвіліховський М.І.** – доктор біологічних наук, професор, академік НААН України, декан факультету ветеринарної медицини НУБіП;

**Хіцька О.А.** – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського БНАУ;

**Коваленко В.Л.** – доктор ветеринарних наук, професор, завідуючий завідувач сектору розробки нормативно-правової бази з питань біобезпеки ДНКІБШМ;

**Уховський В.В.** – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ.

**Визначення загального бактеріологічного забруднення в сирому коров'ячому молоці, визначення середньої геометричної величини: Методичні рекомендації / Т.О. Гаркавенко, Т.Г. Козицька, О.М. Бергілевич, Т.О. Дяченко. – Київ: ДНДІЛДВСЕ, 2022. – 21 с.**

У методичних рекомендаціях викладено методику визначення загального бактеріологічного забруднення в сирому коров'ячому молоці, визначення середньої геометричної величини.

Рекомендації призначені для фахівців регіональних, районних та міжрайонних державних лабораторій Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, операторів ринку молока та молочних продуктів, фахівців Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, що здійснюють контроль виробництва молока та його введення в обіг, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та здобувачів вищої освіти зі спеціальностей 211 «Ветеринарна медицина» і 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

## ЗМІСТ

	Вступ	2
1	Сфера застосування	6
2	Нормативні посилання	7
3	Суть методу досліджень	9
4	Обладнання, посуд, розхідні матеріали	9
5	Поживні середовища, розчинники	10
5.1	Розчинники	10
5.2	Поживні середовища	13
6	Відбір зразків	15
6.1	Знаряддя для відбору зразків	15
6.2	Відбір зразків для мікробіологічного дослідження	16
6.3	Відбір зразків з малих посудин, молочних відер та фляг	16
6.4	Відбір зразків з молочних цистерн та баків	16
6.5	Відбір зразків з роздрібних контейнерів (споживчої тари)	17
6.6	Збереження і транспортування зразків	17
7	Визначення загального бактеріологічного забруднення в сирому молоці	17
7.1	Проведення випробування	17
7.1.1	Відбір	18
7.1.2	Визначення загального бактеріологічного забруднення молока	18
7.1.3	Підрахунок колоній та оцінювання результатів	19
8	Визначення змінної середньої геометричної величини кількості мікроорганізмів	20
	Список використаної літератури	23

## ВСТУП

Молоко як харчовий продукт тваринного походження – джерело цінних харчових та біологічних речовин, проте інколи стає джерелом небезпечних факторів, що можуть спричинити шкідливий вплив на здоров'я людини.

Наявність або поява біологічного небезпечного фактора в молоці, а саме – мікроорганізмів, зумовлює його бактеріологічне забруднення, що у кількісному вимірі визначає його придатність для введення в обіг як харчового продукту.

Розглядаючи шляхи мікробного забруднення молока, слід відзначити, що секреторна тканина молочної залози здорових корів не містить мікрофлори, проте в дійковому каналі та молочної цистерні постійно знаходяться сапрофітні бактерії, що забруднюють перші порції молока. В основному це сапрофіти – непатогенні мікрококи, коринебактерії, що проникають ззовні через сосок. Контамінація молока патогенною мікрофлорою відбувається, в основному, через кров (збудники туберкульозу, бруцельозу, лептоспірозу з током крові надходять до паренхіми вимені, де розмножуються, викликають в ній патогенний процес і продовж довгого часу можуть виділятися з молоком).

Після доїння молоко зберігає свої натуральні властивості, доки в ньому зберігаються бактерицидні речовини, що не дають можливості розмножуватися мікрофлорі та спричиняють загибель мікроорганізмів, які потрапили в молоко ззовні. Про бактерицидні властивості свіжовидоєного молока свідчить той факт, що у стерильному молоці після його забруднення та за 6-годинного зберігання за температури 10–12°C кількість мікрофлори зростає в 435

разів, а в свіжому молоці при зберіганні за тих же умов 24 години – лише в 1,5–5 разів.

Проте низка патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, як і сапрофіти, проникають у вим'я з його шкіри, з волосяного покриву тварин чи із забрудненої підстилки (це, головним чином, збудники маститів: патогенні коки (стафілококи, стрептококи), іноді – грамнегативні палички (*E. coli*, *Salmonella*)).

Значною мірою рівень бактеріологічного забруднення молока залежить від санітарного стану доїльного обладнання та посуду, чистоти рук персоналу (особи), що здійснює доїння. Неякісне миття та дезінфекція доїльної техніки ведуть до накопичення, особливо у важкодоступних місцях систем (молочні крани, колектор трьохтактних апаратів, під гумовими прокладками тощо), молочних залишків, що скисають, розкладаються, утворюють сіруваті смуги, які містять гнилісні бактерії.

Суттєву роль в бактеріологічному забрудненні молока відіграє повітря тваринницьких приміщень та вода, що використовується для миття та ополіскування доїльного обладнання та ємностей.

З набранням чинності 12 липня 2019 р. наказу Міністерства аграрної політики та продовольства України «Про затвердження Вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів» №118 від 12 березня 2019 року (далі – Наказ №118/2019), до операторів ринку молока та молочних продуктів встановлені спеціальні гігієнічні вимоги, що наближені до відповідних вимог Європейського Союзу (ЄС), а саме Розділу IX, Додатку

III, Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 року.

Ці вимоги запроваджують належну практику виробництва, переробки та введення в обіг молока та молочних продуктів, встановлюють критерії до сирого молока, які обумовлюють його придатність для введення в обіг. Одним із таких критеріїв є кількість мікроорганізмів – загальне бактеріологічне забруднення (кількість мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів) молока та молочних продуктів.

Затверджені Наказом №118/2019 допустимі рівні критеріїв кількості мікроорганізмів є еквівалентними вимогам ЄС і застосовуються до операторів ринку молока та молочних продуктів, що здійснюють експорт або заявили компетентному органу про готовність до здійснення такого експорту, з дня набрання чинності цим наказом, а саме для сирого молока від корів:

- кількість мікроорганізмів за  $30^{\circ}\text{C} \leq 100\ 000$  колонієутворюючих одиниць/мл (далі – КУО/мл) за змінною середньою геометричною величиною за двомісячний період за зразками, які відбирають з частотою щонайменше двічі на місяць.

До всіх інших операторів ринку молока та молочних продуктів допустимі рівні критеріїв кількості мікроорганізмів застосовуються з урахуванням перехідних термінів, що були встановлені з 1 січня 2020 року, а саме для сирого молока від корів: не більш ніж 500 000 КУО/мл.

Дотримання цих вимог підлягає перевірці репрезентативною кількістю зразків молока, відібраних

рандомізованим методом у місці первинного виробництва та/або зберігання молока.

Статтею 40 Закону України «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» (далі – ЗУ 2042-19) передбачено контроль стану впровадження оператором ринку процедури періодичної перевірки сирого молока для визначення рівня загального бактеріологічного забруднення та кількості соматичних клітин. Якщо за результатами такої перевірки виявляється невідповідність, оператор ринку має негайно повідомити про це компетентний орган. Якщо протягом трьох місяців з дати такого повідомлення зазначену невідповідність не усунуто, відправлення сирого молока з відповідного господарства забороняється. Така заборона застосовується до моменту надання оператором ринку компетентному органу підтвердження усунення невідповідності.

Дослідження зразків мають відбуватися в уповноважених компетентним органом акредитованих на відповідність вимогам ДСТУ ISO/IEC 17025 лабораторіях згідно з національними та міжнародними стандартами, а саме ISO 4833-1 (ДСТУ ISO 4833-1).

В Додатку III до Виконавчого Регламенту Комісії (ЄС) 2019/627<sup>1</sup>, для перевірки відповідності допустимим рівням,

---

<sup>1</sup> Виконавчий Регламент Комісії (ЄС) 2019/627 від 29 березня 2019 року, яким встановлюються уніфіковані практичні заходи для здійснення офіційного контролю щодо продуктів тваринного походження, призначених для споживання людиною у відповідності до Регламенту (ЄС) 2017/625 Європейського Парламенту та Ради, і яким вносяться правки до Регламенту Комісії (ЄС) No 2074/2005 в частині офіційного контролю (OJ L 131, 17.5.2019 року, с. 51-100).

встановленим для сирого молока в Частині III Глави I, Розділу IX Додатка III до Правил (ЄС) № 853/2004, зокрема для підрахунку кількості мікроорганізмів за температури 30°C, можуть застосовуватися альтернативні методи, валідовані відповідно до референс-методу EN ISO 4833-1, згідно з протоколом, встановленим в стандарті EN ISO 16140-2, доповненим в стандарті EN ISO 16297 для специфічних випадків підрахунку кількості мікроорганізмів у сирому молоці.

Наближення національного законодавства до вимог ЄС передбачає формування еквівалентних європейським процедур контролю. Законодавство про харчові продукти чітко визначає обов'язок оператора ринку впровадити процедури періодичного контролю сирого молока, повідомляти про невідповідності зазначених критеріїв компетентний орган та негайно вжити коригувальних заходів. Така нотифікація є важливим інструментом як для ризик-орієнтованого підходу до контролю за безпечністю харчових продуктів, так і для своєчасного впровадження оператором ринку коригувальних дій і процедур перевірки усунення невідповідності.

## **1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ**

Ці методичні вказівки визначають процедуру встановлення відповідності сирого молока мікробіологічним критеріям шляхом визначення середньої геометричної величини.

Ці методичні вказівки поширюються на всіх операторів ринку незалежно від форми власності та підпорядкування, діяльність яких пов'язана з виробництвом, переробкою та введенням в обіг молока та молочних продуктів, державних



ветеринарних інспекторів, уповноважених осіб компетентного органу (уповноважені ветеринари, офіційні ветеринарні лікарі, уповноважені лабораторії).

## **2. НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ**

У цих методичних вказівках використовуються посилання на наступні стандарти:

- ДСТУ 7963:2015 «Продукти харчові. Готування проб для мікробіологічних аналізів»;

- ДСТУ 8051:2015 «Продукти харчові. Методи відбирання проб для мікробіологічних аналізів»;

- ДСТУ 8535:2015 «Продукти харчові. Методи культивування мікроорганізмів»;

- ДСТУ IDF 122C:2003 «Молоко і молочні продукти. Підготовка проб і розведень для мікробіологічного дослідження (IDF 122C:1996, IDT)»;

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

- ДСТУ ISO 3696:2003 «Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевіряння (ISO 3696:1987, IDT)»;

- ДСТУ EN ISO 4833-1:2014 «Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Частина 1. Підрахунок колоній за температури 30°C методом розливу по чашках (EN ISO 4833-1:2013, IDT)»;

- ДСТУ EN ISO 4833-2:2014 «Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів.

Частина 2. Підрахунок колоній за температури 30°C методом поверхневого посіву по чашках» (EN ISO 4833-2:2013 + EN ISO 4833-2:2013/AC:2014, IDT);

- ДСТУ ISO 707:2002 «Молоко та молочні продукти. Настанови з відбирання проб» (ISO 707:1997, IDT);

- ДСТУ ISO 7218:2014 «Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень» (ISO 7218:2007, ISO 7218:2007/Amd 1:2013, IDT);

- ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water – «Preparation, production, storage and performance testing of culture media»;

- ISO 3696:1987 «Water for analytical laboratory use – Specification and test methods»;

- ISO 4833-1:2013 «Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: colony count at 30 °C by the pour plate technique»;

- ISO 6887-1:2017 «Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions»;

- ISO 6887-5:2020 «Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products»;

- ISO 707:2008 [IDF 50:2008] «Milk and milk products – Guidance on sampling»;

- ISO 7218:2007 «Microbiology of food and animal feeding

stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations»;

- ISO 16140-2:2016 «Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method»;

- ISO 16297:2020 [IDF 161:2020] «Milk – Bacterial count – Protocol for the evaluation of alternative methods»;

- ISO 21187:2021 [IDF 196:2004] «Milk – Quantitative determination of microbiological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between results of an alternative method and anchor method results».

### **3. СУТЬ МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕНЬ**

При проведенні досліджень молока на загальне бактеріологічне забруднення метод ISO 4833-1:2013 (ДСТУ EN ISO 4833-1:2014) є референтним та базується на висіві визначеного об'єму сирого молока або його розведення в агаризоване поживне середовище, культивування посівів за температури 30°C протягом 72 год. в аеробних умовах з наступним підрахунком всіх видимих колоній. Результати досліджень можуть бути використані для визначенням середньої геометричної величини за двомісячний період.

### **4. ОБЛАДНАННЯ, ПОСУД, РОЗХІДНІ МАТЕРІАЛИ**

Апарат для сухої стерилізації (сушильна шафа) та для вологої стерилізації (автоклав) згідно з чинними нормативними документами.

Інкубатор, здатний підтримувати температуру 30°C ± 1°C

згідно з чинними нормативними документами.

Водяна баня, здатна підтримувати температуру 44°C – 47°C згідно з чинними нормативними документами.

Апарат для підрахунку колоній згідно з чинними нормативними документами (за наявності).

pH-метр з точністю  $\pm 0,1$  одиниці pH за температури 25°C згідно з чинними нормативними документами.

Ваги лабораторні не нижче 4-го класу точності з найбільшою межею зважування 500 г за ДСТУ 7270:2012.

Піпетки градуйовані номінальною ємкістю 1 см<sup>3</sup> з ціною поділки 0,1 см<sup>3</sup> за ДСТУ EN ISO 835:2018.

Пробірки бактеріологічні, флакони, колби необхідної ємкості, але не більше ніж 500 см<sup>3</sup>.

Циліндри, стакани мірні за ДСТУ ISO 4787:2009 .

Термометри скляні технічні прямі згідно з ДСТУ ISO 386:2018.

Чашки Петрі скляні або стерильні пластикові з внутрішнім діаметром дна від 90 мм до 100 мм.

Груша гумова/автоматичний дозатор згідно з чинними нормативними документами.

Вода дистильована згідно з ДСТУ ISO 3696:2003.

Змішувач (наприклад, вортекс, система для серійних розведень) лабораторний.

## **5. ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА, РОЗЧИННИКИ**

### **5.1. Розчинники**

#### **5.1.1. Забуферена пептонна вода**

*Склад:*

Пептон	10,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0 г
Однозаміщений фосфорнокислий натрій (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	9,0 г
Двозаміщений фосфорнокислий калій (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,5 г
Вода	1000 см <sup>3</sup>

*Приготування:*

Розчиняють компоненти у воді, у разі потреби – підігрівають. Встановлюють рівень рН так, щоб після стерилізації за температури (25±1)°С він дорівнював (7,0±0,2).

**5.1.2. Розчин фосфатного буферу**

*Склад:*

Калій фосфорнокислий однозаміщений (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	42,5 г
Вода	1000 см <sup>3</sup>

*Приготування:*

Розчиняють сіль в 500 см<sup>3</sup> води. Встановлюють рівень рН так, щоб після стерилізації за температури (25±1)°С він дорівнював (7,0±0,2). Доводять об'єм до 1000 см<sup>3</sup> водою. Зберігають готовий розчин в холодильнику.

**5.1.3. Розчин пептону**

*Склад:*

Гідролізат казеїну	1,0 г
Вода	1000 см <sup>3</sup>

*Приготування:*

Розчиняють пептон у воді. Встановлюють рівень рН так,

щоб після стерилізації за температури  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$  він дорівнював  $(7,0\pm 0,2)$ .

#### **5.1.4. Розчин Рінгера**

*Склад:*

Хлорид натрію (NaCl)	2,25 г
Хлорид калію (KCl)	0,105 г
Хлорид кальцію безводний (CaCl <sub>2</sub> )	0,06 г
Натрій вуглекислий однозаміщений (NaHCO <sub>3</sub> )	0,05 г
Вода	1000 см <sup>3</sup>

*Приготування:*

Розчиняють сіль у воді, встановлюють рівень рН так, щоб після стерилізації за температури  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$  він дорівнював  $(7,0\pm 0,1)$ .

#### **5.1.5. Пептонно-сольовий розчин**

*Склад:*

Хлорид натрію (NaCl)	8,5 г
Гідролізат казеїну	1,0 г
Вода	1000 см <sup>3</sup>

*Приготування:*

Розчиняють компоненти у воді, у разі потреби – підігрівають. Встановлюють рівень рН так, щоб після стерилізації за температури  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$  він дорівнював  $(7,0\pm 0,2)$ .

Розливають розчинники (5.1.1–5.1.5) для початкового розведення у колби або флакони, а розчинники для десятикратних

розведень – у пробірки. Кількість розлитого розчинника повинна бути такою, щоб після автоклавування за температури  $121\pm 1^\circ\text{C}$  протягом 15 хв кожна колба (флакони) або пробірка містили відповідно  $90\text{ см}^3$  або  $9\text{ см}^3$  розчинника.

Якщо розчинник не використовують відразу, його зберігають в темряві за температури від  $0^\circ\text{C}$  до  $5^\circ\text{C}$  не довше одного місяця, в умовах, які не призводять до будь-яких змін в об'ємі або в складі.

## **5.2. Поживні середовища**

Для рутинної лабораторної практики використовують сухе готове комерційне середовище (агар для підрахунку колоній на чашках (PCA)), приготування якого проводять у відповідності до інструкції виробника.

Дозволяється приготування середовищ з комерційних реактивів. Слід використовувати реактиви тільки встановленого аналітичного класу. Вода має бути вільна від сполук, які можуть перешкоджати росту мікроорганізмів, та відповідати вимогам ДСТУ ISO 3696.

Дотримуючись необхідних заходів обережності, акуратно зважують необхідну кількість зневодненого середовища або окремих інгредієнтів і поступово змішують із необхідною кількістю води, уникаючи утворення грудок, витримуючи необхідний баланс (допустима помилка становить 1% або менше, як це встановлено в ДСТУ ISO (ISO 7218)). Якщо не вказано інше, інгредієнти додають до необхідного об'єму води, а не доводять об'єм водою до потрібного рівня.

## **Агар для підрахунку колоній на чашках (РСА)**

*Склад:*

Дріжджовий екстракт	2,5 г
Ферментативний гідролізат казеїну (триптон)	5,0 г
Глюкоза, безводна (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 г
Агар	від 9 г до 18 г*
Вода	1000 см <sup>3</sup>

\* – залежно від желеутворювальних властивостей агару

*Приготування:*

Складники розчиняють у воді в такій послідовності: дріжджовий екстракт, ферментативний гідролізат казеїну, глюкоза. Для кращого розчинення всіх інгредієнтів воду попередньо нагрівають. Додають агар, перемішують для його просочування, після чого нагрівають до кипіння, ретельно збовтуючи до повного розчинення агару. У разі потреби фільтрують через паперовий фільтр.

pH вимірюють за допомогою pH-метра і регулюють перед стерилізацією так, щоб після стерилізації і охолодження до температури 25°C рівень pH середовища становив  $7,0 \pm 0,2$  од pH.

Значення pH слід встановлювати за температури 25°C, а його корегування здійснюють за необхідності, шляхом додавання соляної кислоти (HCl) концентрацією близько 36,5 г/дм<sup>3</sup> або натрію гідроксиду (NaOH) концентрацією близько 40 г/дм<sup>3</sup>.



При регулюванні рН середовища після стерилізації використовують стерильні розчини.

Розливають середовище по (100–150 см<sup>3</sup>) у колби/флакони або по (15–20 см<sup>3</sup>) – у пробірки. Стерилізують в автоклаві за температури 121±1°C протягом 15 хв.

Якщо поживне середовище використовують відразу, його охолоджують у водяній бані до 44–47°C. Якщо ні, то зберігають в темряві за температури 5°C±3°C не довше трьох місяців, за умов, які не призводять до будь-яких змін у його складі.

Перед початком мікробіологічних досліджень, щоб уникнути будь-яких затримок, пов'язаних з розливом середовища, його повністю розплавляють, після чого охолоджують до 45–47°C.

## **6. ВІДБІР ЗРАЗКІВ**

Зразки відбирають згідно з ДСТУ ISO 707:2002.

**6.1. Знаряддя для відбору зразків** має бути виготовлене із нержавіючої сталі або іншого матеріалу відповідної міцності та якості, який не буде викликати змін у зразку. Його поверхня має бути гладенькою, вільною від тріщин, усі кути – заокругленими.

Перед використанням обладнання має бути сухим і попередньо простерилізованим. Якщо використовується пластикове обладнання, то воно має бути стерильним.

Стерилізацію проводять двома методами:

**А.** Витримуванням в гарячому повітрі за температури від 170°C до 175°C протягом 2 год (у сушильній шафі);

**В.** Витримуванням на парі за температури  $(121\pm 1)$  °С не менше, ніж 20 хв (в автоклаві).

Після стерилізації методом А або В обладнання слід зберігати в стерильних умовах до використання.

Якщо, у деяких ситуаціях, стерилізація методом А або В неможлива, можна використовувати альтернативні методи, які є допоміжними і припустимими лише у разі негайного використання обладнання:

**С.** Витримування в полум'ї, яке б контактувало з усіма робочими поверхнями знаряддя для відбору зразків (фламбування);

**Д.** Занурювання в розчин етанолу з об'ємною часткою спирту не менше 70%;

**Е.** Випалювання розчином етанолу з об'ємною часткою спирту 96%.

## **6.2. Відбір зразків для мікробіологічного дослідження.**

Здійснюють в асептичних умовах. Мінімальний обсяг зразка має становити 100 см<sup>3</sup>. Обладнання з відбирання зразків і посуд мають бути простерилізовані відповідно до 6.1.

## **6.3. Відбір зразків з малих посудин, молочних відер та фляг.**

Молоко ретельно розмішують, наприклад, переливанням або перемішуванням з використанням колотівки.

## **6.4 Відбір зразків з молочних цистерн та баків.**

Молоко перемішують механічно протягом щонайменше

5 хв. Якщо цистерна забезпечена програмованою за часом системою перемішування періодичної дії, відбирання зразків можна проводити вже через 1-2 хв перемішування.

Не можна використовувати мішалку, якщо її гвинт знаходиться близько до поверхні молока, тому що це може призвести до утворення піни.

### **6.5. Відбирання зразків з роздрібних контейнерів (споживчої тари).**

Вміст неушкодженого і невідкритого пакування являє собою зразок.

**6.6. Збереження і транспортування зразків.** Зберігати і транспортувати зразки слід у такому стані, щоб вони не зазнавали впливу негативних факторів (сторонніх запахів, високих температур, прямого сонячного світла тощо). Після відбирання зразку його якнайшвидше доводять до температури зберігання (охолоджують). Час і температуру слід розглядати у взаємозв'язку. Температура до і під час транспортування зразків має бути у межах від 0°C до 4°C. Час доставки зразків молока до лабораторії не має перевищувати 24 год з моменту їхнього відбору.

## **7. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БАКТЕРІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ В СИРОМУ МОЛОЦІ**

### **7.1. Проведення випробування**

Щоб уникнути стресу мікроорганізмів раптовими коливаннями температури, температура розчинника в ході

операцій, описаних нижче, має бути приблизно такою ж, як і температура дослідного зразку.

Ретельно перемішують дослідний зразок 25-разовим обережним (щоб уникнути утворення піни) обертанням посудини, в якій він знаходиться. Інтервали між перемішуванням та перенесенням дослідної наважки не мають перевищувати 3 хв.

**7.1.1. Відбір.** Відбирають стерильною піпеткою 10 см<sup>3</sup> дослідного зразку, до якого додають 90 см<sup>3</sup> розчинника. Ретельно перемішують, отримують вихідне розведення (10-1). За допомогою нової стерильної піпетки 1 см<sup>3</sup> вихідного розведення переносять в пробірку 9 см<sup>3</sup> розчинника, уникаючи контакту між піпеткою та розчинником. Ретельно перемішують десятикратним видуванням новою піпеткою або за допомогою механічного змішувача (вортекса) протягом 5–10 с, щоб одержати розведення (10-2). Частота обертання змішувача має бути вибрана так, щоб рівень рідини підіймався на (2–3) см до краю посудини. Повторюють ці операції із стерильним розчинником, отримуючи таким чином необхідну кількість розведень (встановлюють з урахуванням найбільш ймовірного бактеріологічного забруднення).

**7.1.2. Визначення загального бактеріологічного забруднення молока.** Відбирають по 1 см<sup>3</sup> нативного молока або 1 см<sup>3</sup> його десятикратного розведення (для сирого молока найкраще брати розведення від 10-3 до 10-6), які вносять стерильними піпетками (для кожного розведення новою) в стерильні чашки Петрі (дві – для кожного розведення). Якщо для посіву використовується декілька десятикратних розведень,

можна обмежитись використанням однієї чашки Петрі для кожного розведення.

В кожную чашку вносять (12–15 см<sup>3</sup>) поживного середовища (5.2).

Круговими рухами перемішують інокулят із середовищем, внесеним до чашок Петрі, та залишають їх до застигання на холодній горизонтальній поверхні.

Час між закінченням приготування розведень продукту та їхнім змішуванням із середовищем не має перевищувати 15 хв.

Готові чашки (із застиглим вмістом) перевертають та поміщають в термостат. Посіви інкубують за температури 30°C±1°C протягом 72±3 годин в аеробних умовах.

Чашки необхідно правильно розташувати у термостаті, оскільки їхня велика кількість у висоту може призвести до нерівномірного прогрівання, що негативно впливатиме на точність обліку результатів. У більшості випадків оптимальна кількість чашок Петрі не має перевищувати 5 одиниць у стосі.

### **7.1.3. Підрахунок колоній та оцінювання результатів**

Підрахунок колоній мікроорганізмів проводять на чашках, використовуючи апарат для підраховування колоній (за наявності) або візуально у пронизувальному світлі.

Важливо врахувати усі колонії, відрізнивши їх від часток осадженого матеріалу, для цього можна використовувати збільшувальні оптичні прилади (наприклад, лупу).

Для підрахунку відбирають чашки Петрі (два послідовні десятикратні розведення), які містять від 15 до 300 колоній.

Якщо на чашці Петрі спостерігається суцільний ріст колоній на площі більшій, аніж чверть чашки, їх не відбирають для обліку. Якщо колонії злились на площі меншій, ніж чверть чашки, то підраховують колонії на решті її площі і переносять цю кількість на всю чашку. Колонії, які злились, беруть за одну колонію.

Кількість мікроорганізмів в 1,0 см<sup>3</sup> молока (N) вираховують за формулою:

$$N = \Sigma a / V(n_1 + 0.1n_2)d$$

де

$\Sigma a$  – сума колоній на чашках, відібраних для підрахунку;

V – об'єм інокуляту, який вносився у кожену чашку, см<sup>3</sup>;

n<sub>1</sub> – кількість чашок першого розведення, відібраних для підрахунку;

n<sub>2</sub> – кількість чашок другого розведення, відібраних для підрахунку;

d – ступінь розведення (першого), за яким ведеться підрахунок.

Одержані результати щодо кількості мікроорганізмів виражають абсолютним числом у колонієутворювальних одиницях (КУО)/мл).

## **8. ВИЗНАЧЕННЯ ЗМІННОЇ СЕРЕДНЬОЇ ГЕОМЕТРИЧНОЇ ВЕЛИЧИНИ КІЛЬКОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Відповідно до Наказу №118/2019, допустимі рівні критеріїв кількості мікроорганізмів не є максимальними значеннями, у

разі перевищення яких сире молоко не може вводитись в обіг, а обраховуються як змінна середня геометрична величина.

Для обрахунку змінної середньої геометричної величини беруться усі результати досліджень за останній двомісячний період за формулою:

$$G = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n},$$

де n – кількість зразків за певний період, а x – результати досліджень за цей період.

В таблицях Excel формула для розрахунку виглядає наступним чином: = **GEOMEAN(A1:A4)**, де A1 і A4 – це початкові та кінцеві мітки колонки зі значеннями.

В Таблиці 2 нижче наведено приклад, як результати досліджень з січня по квітень використовуються для розрахунку змінної середньої геометричної величини кількості мікроорганізмів в березні та квітні кожного року.

ІТ-платформа Держпродспоживслужби «Молочний модуль» має функцію регулярного і автоматичного розрахунку середньої геометричної величини на основі результатів досліджень, збережених в Національній базі даних результатів лабораторних досліджень зразків, відібраних за Програмою контролю сирого молока. Молочний модуль дозволяє користувачам проводити статистичний аналіз результатів досліджень та відображає їх у вигляді графіків, таблиць та списку.

**Приклад розрахунку змінної середньої геометричної  
величини для мікроорганізмів в березні і квітні  
кожного року**

<b>Місяць</b>	<b>Загальне бактеріологічне забруднення (ЗБЗ)</b>	
	<b>Результати досліджень</b>	<b>Розрахунок змінної середньої геометричної величини</b>
<b>Січень</b>	ЗБЗ Результат #1 ЗБЗ Результат #2	*)
<b>Лютий</b>	ЗБЗ Результат #3 ЗБЗ Результат #4	ЗБЗ Результат #1 ЗБЗ Результат #2 ЗБЗ Результат #3 ЗБЗ Результат #4
<b>Березень</b>	ЗБЗ Результат #5 ЗБЗ Результат #6	ЗБЗ Результат #3 ЗБЗ Результат #4 ЗБЗ Результат #5 ЗБЗ Результат #6
<b>Квітень</b>	ЗБЗ Результат #7 ЗБЗ Результат #8	ЗБЗ Результат #5 ЗБЗ Результат #6 ЗБЗ Результат #7 ЗБЗ Результат #8

\*) Розраховано з використанням результатів попередніх місяців, тому тут не відображається.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галат Б.Ф., Гриненко В.И. Змиев В.В., Иванов Л.Н., Машкин Н.И., Тиндитник В.С., Шевченко И.М. Молоко: производство и переработка. - Х. - 2006.
2. Мирошникова Е.П. Микробиология молока и молочных продуктов: учебное пособие. - Оренбург. - 2005. - 135 с.
3. Правосудова Н.А., Мельников В.Л. Основы санитарной микробиологии: учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов. - Пенза. - 2013. - 105 с.
4. Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
5. Pal, Mahendra & Mulu, Selamawit & Tekle, Muluken & Pinto, Suneeta & Prajapati, Jashbhai. (2016). Bacterial Contamination of Dairy Products. *Beverage and Food World*. 43. 40-43.
6. Taponen, S., McGuinness, D., Hiitio, H., Simojoki, H., Zadoks, R., & Pyorala, S. (2019). Bovine milk microbiome: A more complex issue than expected. *Veterinary Research*, 50, 44.
7. Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 120, 4–10. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0662-y/>.

**ГАРКАВЕНКО Тетяна Олександрівна**

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник,  
перший заступник директора з наукового забезпечення керівництва  
випробувальним центром ДНДІЛДВСЕ

**КОЗИЦЬКА Тамара Григорівна**

завідувач науково-дослідного бактеріологічного відділу  
ДНДІЛДВСЕ

**БЕРГІЛЕВИЧ Олександра Миколаївна**

доктор ветеринарних наук, професор кафедри громадського  
здоров'я Сумського державного університету

**ДЯЧЕНКО Тетяна Олексіївна**

провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії  
мікробіологічних досліджень харчових продуктів та кормів науково-  
дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

**ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БАКТЕРІАЛЬНОГО  
ЗАБРУДНЕННЯ В СИРОМУ КОРОВ'ЯЧОМУ МОЛОЦІ,  
ВИВЕДЕННЯ СЕРЕДНЬОЇ ГЕОМЕТРИЧНОЇ ВЕЛИЧИНИ**

**(Методичні рекомендації)**

В авторській редакції

Підписано до друку 25.05.2022 р. Формат 60x90 1/16

Папір офсетний. Ум. друк. арк. 1.75

Тираж 200 прим.

Замовлення № 20





Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Швейцарська Конфедерація

**FiBL**

  
**SAFOSO**

Цю публікацію було створено за підтримки Швейцарії в рамках швейцарсько-української програми «Розвиток торгівлі з вищою доданою вартістю в органічному та молочному секторах України», що впроваджується Дослідним інститутом органічного сільського господарства (FiBL, Швейцарія) у партнерстві із SAFOSO AG (Швейцарія). Відповідальність за зміст цієї публікації несе виключно автор(и). Точка зору автора(ів) не обов'язково відображає точку зору SECO, FiBL, SAFOSO AG, [www.qftp.org](http://www.qftp.org).