

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА
І ПЕРЕРОБКИ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА
ТА ВЕТЕРИНАРІЇ
КАФЕДРА ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ ТА МІКРОБІОЛОГІЇ**



**СОЛОМОН А.М.
БОНДАР М.М.**

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки для практичних занять
Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Галузь знань 18 «Виробництво та технології»
Спеціальність 181 «Харчові технології»
Освітньо-професійна програма «Харчові технології»

Вінниця
2021

Соломон А.М., Бондар М.М. **Технічна мікробіологія.** Методичні вказівки для практичних занять. Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський), галузь знань – 18 Виробництво та технології, спеціальність – 181 Харчові технології, освітньо-професійна програма – Харчові технології. Вінниця, 2021. 100 с.

Рецензент:

Розторгуєва С.М. – зав. виробництвом ПП «Еко-молпродукт».

Анотація

В оновлених методичних вказівках викладено короткий зміст заняття та завдання, які студентам необхідно виконати під час проведення практичних занять, а також питання і тестові завдання для самоконтролю, рекомендована література, яка необхідна для виконання поставлених завдань.

Призначено для аудиторних занять здобувачів вищої освіти денної форми навчання.

Затверджено до видання науково-методичною комісією ВНАУ
(протокол №3 від 12 жовтня 2021 р.)

за поданням навчально-методичної комісії факультету технології
виробництва і переробки продукції тваринництва та ветеринарії (протокол
№2 від 5 жовтня 2021 р.)

ЗМІСТ

		5
Вступ		
Практичне заняття № 1	Організація мікробіологічної лабораторії, правила роботи в лабораторії. Оптичний мікроскоп та правила роботи з ним. Техніка мікроскопії.	7
Практичне заняття № 2	Морфологічні та культуральні ознаки дріжджів. Кількісний облік мікроорганізмів.	15
Практичне заняття № 3	Морфологічні та культуральні ознаки бактерій. Культивування мікроорганізмів. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів.	18
Практичне заняття № 4	Морфологічні та культуральні ознаки міцеліальних грибів.	22
Практичне заняття № 5	Методи роботи з мікроорганізмами. Вплив фізико-хімічних та біологічних факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність клітин живих організмів.	25
Практичне заняття № 6	Санітарно-мікробіологічний аналіз об'єктів, що контактують з сировиною та робочими поверхнями при виробництві харчових продуктів.	28
Практичне заняття № 7	Санітарно-гігієнічний контроль сировини та готової продукції основних харчових виробництв. Визначення ефективності дезінфекції виробничих процесів у харчовій промисловості	35
Практичне заняття № 8	Проведення посіву на рідкі і густі поживні середовища молочнокислих і пропіоновокислих бактерій. Вивчення їх морфологічних, культуральних та біологічних властивостей.	39
Практичне заняття № 9	Проведення посіву на рідкі та густі поживні середовища маслянокислих, гнилослих бактерій, плісняви. Вивчення морфологічних та культуральних біохімічних властивостей.	44
Практичне заняття № 10	Мікробіологічне дослідження сирого молока.	47
Практичне заняття № 11	Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів.	51
Практичне заняття № 12	Мікробіологічне дослідження масла.	57
Практичне заняття № 13	Мікробіологічне дослідження сиру.	58
Практичне заняття № 14	Мікробіологічне дослідження м'яса.	62
Практичне заняття № 15	Мікробіологічне дослідження ковбас.	66

Практичне заняття № 16	Мікробіологічне дослідження консервів.	71
Практичне заняття № 17	Санітарно-бактеріологічний контроль спецій і кухонної солі.	74
Практичне заняття № 18	Мікробіологічне дослідження кондитерських виробів.	78
Практичне заняття № 19	Сучасні методи мікробіологічних досліджень сировини та харчових продуктів	82
Практичне заняття № 20	Мікробіологічний контроль матеріалів виробництва.	84
Практичне заняття № 21	Контроль особистої гігієни працівників.	87
Тестові завдання для самоконтролю		89
Рекомендована література		100

Вступ

Дисципліна «Технічна мікробіологія» - одна з основних біологічних дисциплін, яка вивчається студентами факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва та ветеринарії.

Метою дисципліни є формування у студентів системи знань з основ мікробіології, засвоєння морфологічних, фізіологічних і культуральних ознак мікроорганізмів; вивчення біохімічних процесів, зумовлених їх життєдіяльністю; визначення ролі мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі, зміні якості харчових продуктів і непродовольчих товарів при зберіганні.

Завданням дисципліни «Технічна мікробіологія» є вивчення технологічних процесів при виробництві, переробці та просуванні товарів, пов'язаних із життєдіяльністю мікроорганізмів, тобто визначення кількісного і якісного складу мікрофлори сировини, готових харчових продуктів і непродовольчих товарів, можливості вторинного їх забруднення сапрофітами та інфікування патогенними мікроорганізмами.

Компетентності та результати навчання

Промислове перероблення молока являє собою складний комплекс послідовно взаємопов'язаних хімічних, фізико – хімічних, мікробіологічних, біохімічних, теплофізичних та інших специфічних технологічних процесів.

У результаті вивчення навчальної дисципліни здобувач вищої освіти повинен володіти інтегральними, загальними та фаховими компетентностями, зокрема:

Загальні компетентності:

інтегральні компетентності (ІК): здатність розв'язувати спеціалізовані задачі різного рівня складності у процесі навчання, із застосуванням базових теоретичних знань, розвинутої системи логічного мислення, комплексу теорій та методів фундаментальних і прикладних наук та розв'язувати практичні проблеми технічного і технологічного характеру у виробничих умовах підприємств харчової промисловості та у процесі навчання, що передбачає застосування теоретичних основ та методів харчових технологій.

загальні компетентності (ЗК):

ЗК 1. Знання та розуміння предметної області, розуміння професійної діяльності.

ЗК 6. Здатність оцінювати та забезпечувати якість виконуваних робіт.

спеціальні (фахові) компетентності (ФК):

ФК 1. Здатність впроваджувати у виробництво технології харчових продуктів на основі розуміння сутності перетворень основних компонентів.

ФК 2. Здатність управляти технологічними процесами з використанням технічного, інформаційного та програмного забезпечення.

ФК 6. Здатність укладати ділову документацію та проводити технологічні та економічні розрахунки.

ФК 10. Здатність розробляти проекти нормативної документації з використанням чинної законодавчої бази та довідкових матеріалів.

програмні результати:

ПРН 1. Знати і розуміти основні концепції, теоретичні та практичні проблеми в галузі харчових технологій.

ПК 4. Проводити пошук та обробку науково – технічної інформації з різних джерел та застосовувати її для вирішення конкретних технічних і технологічних завдань.

ПК 7. Організовувати, контролювати та управляти технологічними процесами переробки продовольчої сировини у харчові продукти у тому числі із застосуванням технічних засобів автоматизації і систем керування.

ПК 9. Вміти розробляти проекти технічних умов і технологічних інструкцій на харчові продукти.

Практичне заняття № 1

Організація мікробіологічної лабораторії, правила роботи в лабораторії. Оптичний мікроскоп та правила роботи з ним. Техніка мікроскопії.

Мета: ознайомитись з обладнання мікробіологічної лабораторії; будовою мікроскопа та засвоїти правилами роботи з ним; ознайомитись з технікою мікроскопування, методами фарбування мазків.

Матеріали та обладнання: обладнання мікробіологічної лабораторії, мікроскопи, предметні скельця, бактеріологічні петлі, спиртівки, імерсійне масло, фільтрувальний папір, фарби (метиленовий синій, фуксин), набір фарб за Грамом, чашки з містками, пісочні годинники, пляшки з водою для змивання фарби, пробірки з культурами мікроорганізмів, прокисле пиво, пофарбовані препарати бактерій.

В мікробіологічній лабораторії необхідно суворо дотримуються певних правил:

1. Працювати необхідно в білих халатах, шапочках чи косинках;
2. На робочому місці не повинно бути зайвих предметів і всі прилади розміщують в певних місцях;
3. Пробірки і колби з мікробними культурами повинні мати чіткі надписи чорнилом по склу, ємності з реактивами - етикетки;
4. При роботі з спиртівкою слід остерігатись загорання спирту. Не можна підпалювати спиртівку від іншої спиртівки. Тушать полум'я спиртівки тільки спеціальними ковпачками;
5. При загоранні ватної пробки на неї не дмухають, а вставляють її у пробірку чи накривають рушником;
6. До і після роботи ретельно дезінфікують поверхню столу. Мікробна маса не повинна забруднювати руки, стіл і навколишні предмети. Петлі, голки, пінцети після кожного стикання з мікроорганізмами обпалюють в полум'ї спиртівки. Розливу мікробну масу знешкоджують дезінфікуючими речовинами;
7. Після закінчення роботи, забруднений мікроорганізмами посуд негайно стерилізують чи автоклавують і тільки після цього можна його мити. Поверхню щільних живильних середовищ заливають дезінфікуючим розчином, а через добу живильні середовища викидають і миють посуд. Піпетки поміщають у дезінфікуючий розчин, після чого миють і стерилізують. Предметні і накривні скельця витримують в дезінфікуючих розчинах потім миють в проточній воді. Миють посуд тільки в гумових рукавицях. Необережне поводження з мікроорганізмами може призвести до утворення в повітрі мікробного аерозолю.
8. При роботі з бактерицидними лампами користуються захисними окулярами. Не можна дивитися на світло лампи незахищеними очима - це може призвести до втрати зору.
9. Слід суворо дотримуватись правил роботи з приладами, що працюють під тиском чи при високій температурі.
10. В лабораторії не дозволяється палити, їсти, пити, багато ходити,

заносити в неї сторонні предмети. Категорично забороняється виносити з лабораторії мікробні культури.

11. Слід суворо дотримуватись правил особистої гігієни - ретельно мити і дезінфікувати руки після роботи і перед їдою.

12. Дотримуватись потрібних запобіжних заходів при роботі із електричними приладами: не включати електроприлад у розетку при несправному шнурі живлення і несправній розетці; не працювати з електроприладами вологими руками; повідомити викладача при виникненні несправності в електроприладі.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

1. негайно повідомити викладача про можливість виникнення аварійної ситуації або виникнення її.

2. Обережно припинити роботу або відключити електроприлади.

3. Надати першу допомогу потерпілому, при потребі викликати швидку медичну допомогу.

4. При пораненні склом стерильним пінцетом потрібно видалити уламки скла із рани, змастити навколо рани розчином йоду і перев'язати.

5. При виникненні опіків необхідно діяти так:

- при термічних опіках першого ступеня місце опіку обробляють ватою, яка змочена 96%-ним етиловим спиртом, 3%-ним розчином $KMnO_4$;

- при опіках хімічними речовинами (кислотами, лугами) вражену ділянку шкіри швидко промивають великою кількістю води, потім на опечене місце накладають пов'язку : при опіках кислотою - пов'язку, змочену 2% содовим розчином при опіках лугом - пов'язку, змочену слабким розчином оцтової кислоти;

- при більш складних опіках необхідно негайно звернутися до лікаря.

6. При виникненні отруєнь слід негайно звернутися до лікаря.

7. При ураженні електричним струмом необхідно діяти наступним чином:

- відключити джерело струму;

- обережно і як найшвидше звільнити потерпілого від струмопровідних частин, не доторкаючись до потерпілого;

- при необхідності негайно надати допомогу на місці події, виклавши одночасно медичну допомогу;

- при порушенні дихання потерпілому зробити штучне дихання;

8. Для зупинки кровотечі потрібно притиснути пальцями артерію до кістки вище рани в місцях найзручніших для цього; потім зверху на одяг накласти джгут із запискою, де вказано час його накладання. Джгут дозволяється тримати не більше 1,5-2 години. З правилами охорони праці ознайомлений(а) та зобов'язує їх виконувати.

Приміщення лабораторії. Навчальна мікробіологічна лабораторія складається з декількох приміщень: кімнати для проведення мікроскопічних робіт, біохімічної лабораторії, стерилізаційної, мийної і термостатної кімнат. Усі приміщення мають бути сухими, світлими, з належною вентиляцією, мати підвід гарячої і холодної води, обладнану каналізаційну систему.

Стіни кімнат фарбують у світлий тон, підлогу покривають лінолеумом або плитами, що легко миються. Столи для мікроскопування розміщують так, щоб світло падало спереду або збоку, краще лівого. Поверхню столів покривають пластиком або лінолеумом, щоб полегшити їх миття та дезінфекцію.

У приміщенні мікробіологічної лабораторії два рази на день здійснюють вологе прибирання. Підлогу, стіни, столи періодично протирають дезінфікуючими розчинами: 2-3 % розчином фенолу або лізолу (препарат фенолу із додаванням зеленого мила), 0,5-3%-м розчином хлораміну.

Деякі роботи, що потребують абсолютної стерильності (пересіви чистих культур і т.п.) проводять у спеціальному ізольованому приміщенні - боксі. Приміщення боксу періодично миють, дезінфікують, а після прибирання перед роботою протягом 30 - 60 хв. опромінують бактерицидними лампами.

У препараторській встановлюють робочі столи, шафи з інструментами, стерильним посудом і реактивами, центрифуги, холодильники.

У стерилізаційній кімнаті розміщують автоклави для стерилізації поживних середовищ і посуду, кип'ятильники Коха, сушильні шафи.

Мийну обладнують зручними раковинами з підводом гарячої та холодної води, полицями для сушіння посуду, газовими або електричними плитами та посудом для варіння середовищ, вагами, дистильаторами.

У термостатній кімнаті розміщують термостати різної форми та величини, які призначені для вирощування культур.

У навчальній лабораторії за кожним студентом закріплюють постійне робоче місце та обладнання. На лабораторному столі встановлюють спиртівки, набір фарб, бактеріологічні петлі голки, штатив для пробірок, градуйовані і пастерівські піпетки, скляні шпателі, предметні скельця, покривні скельця, бактеріологічний місток, кристалізатори, серветки, олівець по склу, імерсійне масло, фільтрувальний папір, сірники, мікроскопи. Робоче місце утримується в чистоті. Поверхню столу протирають ватним тампоном, змоченим хлораміном, лізолом, етиловим спиртом. Спирти використовують і для дезінфекції рук.

Робота з мікроскопом

1. Мікроскоп необхідно захищати від попадання пилу і вологи. Після роботи зберігати під скляним або поліетиленовим ковпаком.

2. На робочому столі мікроскопи ставлять ручкою до себе на відстані 3-5 см від краю стола.

3. Об'єктиви і окуляри протирають фланелевою серветкою.

4. При роботі з малим об'єктивом тубус опускають тільки макрогвинтом.

5. Не залишати тубус мікроскопу відкритим, т. б. без окуляра, тому що проходить накопичення пилу в тубусі і забруднення об'єктивів.

6. При зміні об'єктивів необхідно регулювати інтенсивність освітлення опускаючи або піднімаючи конденсор. При огляді препарату з об'єктивом х8 конденсор опускають, а при - х90 конденсор піднімають ввєрх до предметного столика.

7. При роботі з об'єктивом х8 відстань до препарату повинна бути до 1 см і з об'єктивом х90-0,15 мм.

8. Препарат розглядають в декількох місцях, рухаючи предметний столик за допомогою бокових гвинтів.

Після закінчення роботи тубус піднімають, препарат прибирають, а фронтальну лінзу імерсійного об'єктива протирають серветкою, злегка зволоженою спирт - ефіром. Не можна залишати імерсійний об'єктив в маслі.

Ознайомлення з технікою мікроскопування

Спочатку встановлюють об'єктив малого збільшення (x8) на відстані 1,5 см від предметного столика. За допомогою дзеркала наводять рівномірне освітлення. На предметний столик кладуть препарат, закріплюють його клеммами, визначають на препараті необхідне поле зору, опускаючи об'єктив макрогвинтом. Після цього об'єктив піднімають, а на препарат наносять краплю імерсійного масла. Переводять на імерсійний об'єктив (x90), який під контролем ока занурюють у краплю масла. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрогвинта повільно піднімають тубус до появи зображення, після чого мікрогвинтом встановлюють чітке зображення. Рухаючи предметний столик за допомогою двох спеціальних бокових гвинтів, оглядають кілька полів зору і виявляють мікроорганізми.

Будова мікроскопа. Біологічні мікроскопи використовують для розглядання прозорих, препаратів у проходящому світлі при збільшенні від 56 до 1350 раз. Найбільш поширеними є мікроскопи типу МБІ-1, МБІ-2, МБІ-3, МБІ-6, МБР-1, МБР-1А, «Біолам -70». Біологічний мікроскоп МБР-1 (рис. 1) складається із двох частин: механічної та оптичної.

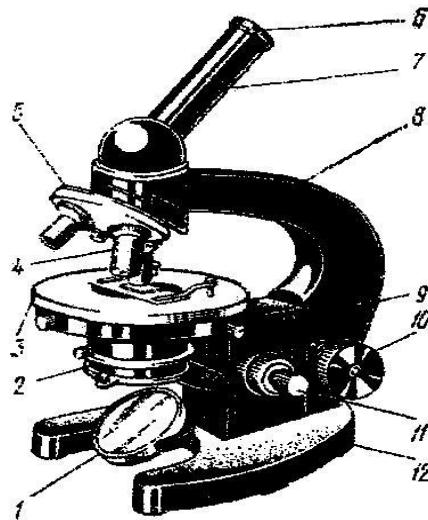


Рис. 1. Біологічний мікроскоп МБР-1

1 - дзеркало; 2 - конденсор; 3 - предметний столик; 4 - об'єктив; 5 - револьвер; 6 - окуляр; 7 - тубус; 8 - тубусотримач; 9 - гвинти для переміщення предметного столика; 10 - макрогвинт; 11 - мікрогвинт; 12 - штатив.

Механічна частина включає штатив, предметний столик, тубус з револьверною головою, макро- і мікрометричні гвинти. Нижня частина

штатива є опорою мікроскопа, верхня – тубусотримачем. У верхній частині тубусотримача знаходиться револьвер, в нижній частині якого вкручуються об'єктиви. Револьвер має гніздо для кріплення похилого вертикального тубуса. У верхній кінець тубуса вкладаються змінні окуляри.

Тубусотримач разом із тубусом можна переміщати по вертикалі на 50 мм за допомогою механізму, вмонтованого в основу штатива. Механізм приводиться у рух за допомогою макро- і мікрометричного гвинтів. Мікрометричний гвинт використовують для піднімання та опускання тубусотримача і для грубої наладки на фокус. Мікрометричний гвинт призначений для точного коригування зображення.

Предметний столик – буває різної форми, має в центрі отвір для проходження променів, що освітлюють препарат. Столик можна пересувати в горизонтальній поверхні на 8 мм двома гвинтами, що знаходяться праворуч і ліворуч. На поверхні столика знаходяться дві лапки для кріплення препарату. Під предметний столик на штативі розміщений кронштейн конденсора.

Оптична частина мікроскопа включає освітлювальний апарат, об'єктиви та окуляр. Освітлювальний апарат – призначений для рівномірного освітлення поля зору і складається із дзеркала і конденсора з ірисовою діафрагмою.

Дзеркало двостороннє (вгнуте з одного боку і плоске з другого) закріплено на основі штатива. Вгнутих боком дзеркала користуються у тих випадках, коли працюють без конденсора або при поганому освітленні. При роботі із конденсором та належним освітленням користуються плоским боком дзеркала. Над дзеркалом розміщений конденсор, до складу якого входить опукла, відкидна лінза та ірисова діафрагма, яка може звужуватись та розширюватись. Конденсор кріпиться до гільзи гвинтом, що розміщений з переднього боку. Зубчатим механізмом і спеціальним гвинтом конденсор піднімається та опускається. Під конденсором розміщене кільце для світлофільтра.

Правила роботи із сухими об'єктивами. Приготовлений препарат розміщують на предметному столику і закріплюють лапками. За допомогою сухого об'єктиву із збільшенням 8 х розглядають декілька полів зору, переміщуючи перед предметним столиком, боковими гвинтами. Потрібну для дослідження ділянку препарату встановлюють у центрі поля зору. Піднімають тубус і повертають револьвер, переводять об'єктив із збільшенням 40х або 80х. При мікроскопуванні потрібно обидва ока держати відкритими і користуватись ними по черзі, оскільки при цьому менше втомлюється зір.

Правила роботи з імерсійним об'єктивом. На фіксований і фарбований препарат наносять каплю імерсійного масла. Повертають револьвер і встановлюють на імерсійний об'єктив із збільшенням 90х. Конденсор піднімають до опору, ірисову діафрагму відкривають і за допомогою макрометричного гвинта опускають тубус до погруження об'єктива в масло. Це потрібно проводити дуже обережно, щоб фронтальна лінза не змістилась і не отримала пошкодження. Робоча відстань в імерсійному об'єктиві дорівнює 0,1 - 0,15 мм. Точну фокусировку здійснюють мікрометричним гвинтом.

Після закінчення роботи з імерсійним об'єктивом піднімають тубус, знімають препарат і протирають імерсійний об'єктив серветкою, змоченою чистим бензином.

Об'єктив - найбільш важлива частина мікроскопу. Складається з системи лінз, що розміщені у металевій оправі. Зовнішня лінза, що повернута до предмета, називається фронтальна. Це основна лінза, що дає збільшення, всі інші лінзи корекційні.

Мікроскопи оснащені трьома скидними об'єктивами із власним збільшенням 8x, 40x, 90x, позначеними на металевій оправі.

Окуляр мікроскопа складається із двох лінз очної (верхньої) і збиральної (нижньої). Між лінзами знаходиться діафрагма. Окуляр призначений для збільшення зображення, яке дає об'єктив. Окуляри мають власне збільшення 5x, 7x, 10x, 12x, 15x, 20x, що вказується на оправі.

Об'єктив дає зображення збільшене, оборотне і дійсне. Окуляр збільшує це зображення і робить його достовірним.

Основні характеристики мікроскопа. До основних характеристик мікроскопа відносять збільшення та дозволяючу властивість.

Збільшення мікроскопа визначається, як добуток збільшення окуляра та об'єктива. Але збільшення не характеризує якість зображення, воно може бути чітким або нечітким. Чіткість зображення характеризується дозволяючою властивістю мікроскопа, тобто найменшою величиною об'єктів або їх деталей, які можна побачити за допомогою даного приладу.

Виготовлення фіксованих препаратів бактерій

Готують препарати - мазки для пофарбування в декілька етапів: 1) приготування препарату; 2) висушування; 3) фіксація; 4) фарбування.

Приготування мазка. Препарати готують на предметному склі. Предметне скло це пластинки (76x26 мм) із тонкого скла з добре відшліфованими краями, товщина 1,2-1,4 мм. Предметні скельця повинні бути чистими та знежиреними. Скельця, які були у користуванні, витримують 1-2 год. у хромовій суміші (1 л води + 50 г діхромата калія + 100 г технічної H₂SO₄), після чого ополіскують теплою водою і спиртом, можна для видалення жиру змащувати предметні скельця милом і протирати серветкою.

Зберігають чисті предметні скельця в сухому стані або в банках з 96%-вим спиртом або сумішшю Нікіфорова. Виймати скло потрібно пінцетом.

Мазки готують на чистих знежирених предметних скельцях. Предметні скельця беруть пінцетом або пальцями за ребра, проносять через полум'я спиртівки та кладуть на бактеріологічний місток, що розмішений над кристалізатором. Потім беруть бактеріологічну петлю (для мікроорганізмів, що виростили на щільних поживних середовищах) або пастерівські піпетки (для мікроорганізмів із рідкого поживного середовища).

Для цього пробірку з культурою мікроорганізмів беруть у ліву руку і розміщують її між вказівним та середнім пальцем, притримуючи зверху великим. У праву руку беруть бактеріологічну петлю, обпалюють її у полум'ї спиртівки до почервоніння, мізинцем цієї ж руки біля полум'я витягують пробку з пробірки і вводять у пробірку петлю, заокруглений кінець якої занурюють у

рідину. Краплю рідини з культурою переносять на середину поверхні знежиреного скла і рівномірно розподіляють (на 1,5-2см) тонким шаром. Після цього залишки культури на петлі спалюють нагріванням у полум'ї спиртівки.

Якщо мазки виготовляють з культур, вирощених на щільному середовищі, то на середину чистого предметного скла спочатку наносять невелику краплю стерильного фізіологічного розчину (розчин NaCl), або дистильованої води, у яку вносять невелику кількість мікробної маси, знятої петлею з поверхні культури із щільного поживного середовища. Культуру вносять бактеріологічною петлею, яку попередньо фламбують до почервоніння у вертикальному положенні. Щоб не пошкодити клітини, петлю спочатку охолоджують до стінок чашки Петрі, пробірки або поживного середовища. Легким ковзаючим рухом відбирають невелику кількість мікробної маси, перемішують і розподіляють тонким шаром. Після нанесення культури добре розмішують до одержання слабомутної суспензії у вигляді тонкого рівного шару і залишають мазок для висушування.

Висушування мазка. Виготовлені препарати висушують на повітрі при кімнатній температурі. Якщо препарат довго сохне, тоді препарат мазком вверху високо піднімають над полум'ям спиртівки і обережно висушують у теплом повітрі без підігріву, або над полум'ям спиртівки на висоті 20см, інакше клітини деформуються. Після висушування проводять фіксацію.

Фіксують, проводячи 3-4 рази над полум'ям спиртівки (тримаючи мазком догори) і торкаючись кожного разу шкіри руки. Якщо це викликає ознаки припікання, то вважають, що мазок зафіксований. Мета фіксації - умертвити клітини мікроорганізмів і зробити їх безпечними, що особливо важливо при роботі із патогенними культурами; щільно прикріпити клітини до скла, в результаті чого вони не змиваються при наступних операціях; покращити фарбування, оскільки мертві клітини поглинають фарбу краще, ніж живі.

Методи фіксації. Найбільш простим, методом фіксації є термічна обробка. Для цього препарат мазком вверху 3-5 разів проводять над полум'ям спиртівки. Предметне скло нагрівають 2-3 с, поки не відчувається легкий опік, коли прикласти до долоні руки.

Використовують фіксацію хімічними речовинами:

занурюють предметне скло у мензурку з 96 %-ним етанолом на 15-20 хв;

ацетоном на 5 хв;

розчином Нікіфорова на 15-20 хв,

сумішшю 96 %-вого і 40 %-вого формаліну (співвідношення 95:5) на 2 хв.

Фіксатор можна наливати на мазок і витримувати вказаний час. Після закінчення фіксації мазок промивають водою, після чого фарбують.

Фарби і фарбуючі розчини. Для фарбування мікроорганізмів застосовують анілінові фарби. За хімічними властивостями їх розділяють на основні та кислі.

До основних фарб відносять:

червоні - нейтральний червоний, фуксин основний, сафранін, тіонін;

сині - метеленовий синій, Вікторія;

фіолетові - кристалічний фіолетовий, метиленовий фіолетовий, генціан фіолетовий;

зелені - малахітовий зелений, метиленовий зелений;

чорні - індумін.

До кислих фарб відносять:

червоні і рожеві - фуксин кислий, еозин, ерітрозін;

жовті - кон'ю, пікрінова кислота;

чорні - нігрозін.

Фарбування мазків

Простий метод. При цьому використовують тільки одну фарбу. Фіксований мазок кладуть на місток і наносять піпеткою декілька крапель фарби так, щоб покрилася вся поверхня мазка (фуксин на 1-2хв. або метиленовий синій на 3-5хв.). Після чого фарбу змивають водою, а мазок просушують між листками фільтрувального паперу або на повітрі.

Складний метод. При складному методі фарбування використовують декілька фарб. Вони дозволяють більш детально вивчити особливості будови бактеріальної клітини, виявляти окремі структури, що сприяє диференціації видів. Найбільш поширеним складним методом фарбування є метод Грама.

Техніка фарбування за Грамом

На фіксований мазок кладуть смужку фільтрувального паперу, на який наливають розчин карболового генціанвіолету на 1-2хв. Потім папір знімають, залишки фарби зливають і наливають на мазок розчин Люголя на 1-2 хв. Після чого його зливають, наносять на 30с 96° етиловий спирт. Мазок швидко промивають водою. На 1-2хв наливають водний розчин карболового фуксину.

Потім препарат промивають водою. Висушують і мікроскопують під імерсійною системою. За результатами фарбування бактерії поділяють на грампозитивні, що сприймають фіолетове забарвлення та грамнегативні, що сприймають червоний колір.

Неоднакове забарвлення бактерій пояснюється різною будовою та хімічним складом клітинної стінки. У **грампозитивних** стінка товста, містить багато (до 80%) пептидоглікану, мікрофібрили якого утворюють густу сітку, що міцно утримує комплекс з генціанвіолету і він не видаляється під дією спирту. У **грамнегативних** бактерій клітинна стінка значно тонша, містить мало пептидоглікану (від 1 до 10%), мікрофібрили утворюють більші "пори", які не втримують генціанвіолет, і він видаляється під дією спирту. Тому після фарбування розчином фуксину вони сприймають рожево - червоний колір.

Коки у більшості фарбуються грампозитивно, серед паличкоподібних зустрічаються грампозитивні (палички, які утворюють спори) та грамнегативні.

Для фарбування за Грамом студенти готують мазок із суміші мікроорганізмів (кишкової палички і капустяної бацили) або із прокислого пива (плівка – оцтовокислі бактерії, осад - дріжджі). На склі культури змішують, мазок висушують, фіксують і фарбують за Грамом. Кишкова паличка, оцтовокислі бактерії - грамнегативні. Капустяна бацила і дріжджі - грампозитивні.

Негативний метод фарбування

При цьому методі фарбується фон, а бактерії залишаються не пофарбованими. Використовують цей метод при вивченні спіралеподібних бактерій.

Приготувати мазок із зубного нальоту. На скельце наносять краплю 3%-ного водного розчину конгороту. Після чого знімають зубний наліт сірником розтирають у краплі, а потім розподіляють по спіралі, переводячи петлю кожний раз на нове місце. Мазок висушують і розглядають під імерсією. На червоно-коричневому фоні добре видно не пофарбовані спіралеподібні форми бактерій.

Фарбування по Козловському - мазок фіксують над полум'ям спиртівки. Потім фарбують 2 %-вим водним розчином сафраніну при слабкому підігріванні протягом 4-5 хв. Промивають водою і дофарбовують 1%-вим розчином малахітового зеленого протягом 1 хв. Фарбу змивають водою і висушують. Мікроорганізми фарбуються у червоно-коричневатий колір, фон зеленого кольору.

Контрольні питання

1. З яких приміщень складається навчальна мікробіологічна лабораторія?
2. Правила роботи у мікробіологічній лабораторії?
3. Дайте характеристику механічній частині мікроскопа?
4. Охарактеризуйте оптичну частину мікроскопа?

Практичне заняття № 2

Морфологічні та культуральні ознаки дріжджів. Кількісний облік мікроорганізмів.

Мета: Ознайомити студентів із приготуванням фарбуючих розчинів. Навчити готувати препарати-мазки та фарбувати їх простим та складним методом. Ознайомитися з основними формами бактерій. Навчитися визначати характер росту мікроорганізмів на щільних і рідких поживних середовищах. Ознайомитися із мікроскопічними дослідженнями грибів (препарат «придавлена крапля»), провести їх мікроскопію та замолювати в зошит. Дослідити мік-роорганізми у живому стані і визначити характер їх руху.

Матеріали та обладнання: обладнання мікробіологічної лабораторії, мікроскопи, предметні скельця, бактеріологічні петлі, спиртівки, імерсійне масло, фільтрувальний папір, фарби (метиленовий синій, фуксин), набір фарб за Грамом, чашки з містками, пісочні годинники, пляшки з водою для змивання фарби, пробірки з культурами мікроорганізмів.

Основні форми бактерій та колоній мікроорганізмів

Основні ознаки бактерій. Бактерії об'єднують велику групу одноклітинних мікроорганізмів різних за формою, розмірами та обміном речовин. Вони є прокаріотичними мікроорганізмами. Ядерна речовина та інші клітинні структури бактерій не відокремлені від цитоплазми спеціальними мембранами.

Морфологічні ознаки бактерій. Форма. За формою бактерії поділяють на шаровидні (коки), паличко видні (циліндричні), хвилясті, ниткоподібні.

Кулясті бактерії або коки (лат. *coccus* - ягода, зерно) - мікроби кулястої (шароподібної), бобоподібної та ланцетоподібної форми розміром біля 1 мкм. Клітини прокаріотичного типу, що утворюються у результаті поділу коків і до них відносять:

монококи чи *мікрококи* (лат. *micro-* дрібний) - поодинокі розміщені кулясті клітини. Як правило, це сапрофітні мікроорганізми і за звичайних умов не викликають захворювань у людини і тварини.

диплококи - коки, розміщені попарно. Типовими представниками диплококів є збудники епідемічного цереброспінального менінгіту та гонореї людини.

стафілококи - у вигляді китиць винограду. Чисельні їх представники спричиняють різноманітні гнійно-септичні захворювання: фурункульоз, карбункульоз, нефрит, холецистит, менінгіт, пневмонію, мастит тощо.

стрептококи - розміщені у ланцюжок. Частина їх є сапрофітами, представниками нормальної мікрофлори людини і тварин, інші викликають тяжкі гнійно-септичні процеси (пневмонію, менінгіт, мастит тощо).

тетракоки - коки, розміщені по чотири. Як правило, ці мікроорганізми не патогенні для людини та тварин.

сарцини - діляться у трьох взаємоперпендикулярних площинах і розміщуються у вигляді пакетів. Патогенних представників серед них не виявлено.

Паличковидні мають циліндричну форму, різну довжину і товщину. Поділяються на **спороутворюючі** (бацили) і **неспороутворюючі** (бактерії). До паличковидних форм відносять **кlostридії** - це мікроорганізми, у яких діаметр спори перевищує ширину клітини.

Фузобактерії - мають загострені кінці; **коринебактерії** - кінці із булавовидним потовщенням.

Хвилясті - у залежності від ступеня повороту тіла клітини навколо своєї осі розрізняють:

вібріони - нагадують кому;

стріли - мають 4-6 завитків;

спірохети - більше 6 завитків.

Розміри. Лінійні розміри бактерій лежать в границі 0,5 -3 мкм, але серед них є гіганти до 500 мкм і бактерії-карлики (0,12-0,25 мкм). Діаметр бактерій коливається від 0,5 до 2,5 мкм. Одиниці виміру бактерій мікромметр - (мкм) \times 1 мкм = 10^{-6} м, віруси вимірюються в нанометрах (нм) - 1 нм = 10^{-9} м.

Схема опису колоній

Форма: кругла, овальна, розгалужена.

Розміри: крапкові колонії діаметром не більше 1 мм, дрібні - діаметром 1-2 мм, середні - 2-4 мм, великі - більше 4 мм.

Поверхня: рівна або складчаста, матова або блискуча.

Краї: рівні, розірвані, горбисті, хвилясті.

Консистенція: слизова, крихка, щільна.

Пігмент: червоний, жовтий, чорний, синій і т.д.

червоний пігмент утворюють деякі актиноміцети, дріжджі, бак терії (кишечна паличка - *E.coli* чудесна паличка - *Serratia marcescens*);

синій пігмент виробляє синегнійна паличка - *Pseudomonas aewginosa*;

жовтий утворюють стафілококи, сарцини;

чорний - виробляють деякі гриби, азотобактерії.

Розрізняють 6 класів грибів:

нижчі гриби

1. хітрідіоміцети,
2. оміцети,
3. зігоміцети .

вищі гриби:

4. аскоміцети,
5. базидіоміцети,
6. дейтероміцети.

Гриби - гетеротрофи, тобто використовують для свого живлення вуглець із готових органічних сполук.

Всі гриби мають вегетативне тіло *міцелій* або *грибницю*. У *нижчих грибів* міцелій - одноклітинний, *вищих* - багатоклітинний. Від міцелію відходять плодоносячі тіла *спорангієносці* (*мукорові*) та *конідієносці* (*вищі*). Спорангієносці закінчуються розширенням - *спорангієм*.

Цвілеві гриби - безхлорофільні мікроорганізми, живуть на поверхні субстратів. Відносять до еукаріотів. Зустрічаються як сапрофіти так і паразити. Цвілеві гриби широко розповсюджені у природі.

Найсприятливішим середовищем для розвитку грибів є продукти харчування та корми.

Цвіль накосить велику шкоду народному господарству. Але її значення на сучасному етапі досить важливе. Її використовують для одержання різних цінних з'єднань: *пеніцилін*, *ацетон*, *бутиловий спирт*. У харчовій промисловості цвіль використовують для надання продуктам, специфічного запаху.

Дуже часто зустрічаються такі роди цвілі: *Cladosporium*, *Penicilium*. *Penicilium* - колонії сірувато-зеленого або синьо-зеленого кольору. Ростуть гриби даного роду при низьких температурах.

Актиноміцети (променеві гриби) - являють собою цвілеві мікроорганізми, що здатні утворювати розгалужені гіфи, які можуть розвиватись у міцелій, тобто володіють ознаками цвілевих грибів.

Актиноміцети - одноклітинні *грампозитивні* мікроорганізми, прокаріоти, нерухомі, факультативні аероби, хоча інколи зустрічаються анаероби. На поживних середовищах утворюють щільні колонії (діаметром 1-10 мм) із оксамитовою поверхнею. Характерною особливістю актиноміцетів при рості на поживних середовищах є поява земляного запаху. Актиноміцети можуть зброджувати глюкозу у результаті чого утворюється оцтова кислота.

Дріжджі являють собою одноклітинні нерухомі організми, що широко розповсюдженні в природі. Форма клітин дріжджів овальна, округла . Дріжджі

відносять до еукаріот. Будова їх клітин подібна до будови грибів. У всіх дріжджів відсутні джгутики, тому вони нерухомі.

Визначення рухливості мікроорганізмів

Приготування препарату. Цвілеві гриби розглядають у препараті «придавлена крапля», для чого матеріал препарувальними голками розподіляють на предметному скельці в краплі ізотонічної розчину хлориду натрію або стерильної води і накривають покривним склом.

Препарат розглядають під малим збільшенням 8х або збільшенням 40х. Необхідно пам'ятати, що цвілеві гриби розмножуються спорами. Тому препарат готують близько до предметного скла, не до пускаючи розсівання спорів.

Препарувальні голки після, закінчення роботи фламбують над полум'ям спиртівки.

Приготування препаратів живих клітин. Для визначення руху мікроорганізмів та їх розмірів розглядають препарат «придавлена крапля», «висяча крапля».

Препарат «придавлена крапля». На середину чистого предметного скла наносять невелику краплю води, фізіологічного розчину (0,5 %-вий розчин NaCl). У неї вносять петлею або голкою культуру, відібрану з щільного середовища або інший досліджуваний матеріал (дріжджі, тісто і т.д.), після чого розмішують до одержання мутної суспензії. При розгляданні мікроорганізмів, що виростили на рідких середовищах, краплю води можна не наносити. Накривають досліджуваний матеріал покривним склом.

Препарат «висяча крапля». Для приготування препарату використовують предметні скельця з круглим заглибленням - лункою. Краї лунки змащують вазеліном. На середину знежиреного покривного скельця наносять маленьку краплю суспензії мікроорганізмів, перекидають його краплею вниз та обережно притискають до вазелінового кільця. Крапля має бути у центр лунки та не торкатись країв і дна.

Контрольні питання

1. Методи фіксації?
2. Охарактеризуйте простий метод фарбування?
3. Метод фарбування по Козловському
4. Метод фарбування по Граму?
5. Які є за формою бактерії?
6. Скільки класів грибів розрізняють?
7. Охарактеризуйте цвілеві гриби?
8. Приготування препарату «висяча крапля»?

Практичне заняття № 3

Морфологічні та культуральні ознаки бактерій. Культивування мікроорганізмів. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів.

Мета: Ознайомитись з лабораторним посудом. Приготувати м'ясну воду і можливі середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) і м'ясо-пептонний агар (МПА). Визначити рН поживних середовищ. Вивчити методи стерилізації.

Матеріали та обладнання: Кастрюля або колба на 2-3 л. Термометр з поділками до 100°C. Шпатель, м'ясорубка, м'ясо, ніж, марля, вата, лійки. Колби Ерленмейєра ємкістю 1 л, мензурки, електроплити, спиртівки, терези. Пептон, хлорид натрію, агар-агар, желатин, ложечки, вода дистильована, чашки Петрі.

До складу поживних середовищ повинні входити *органогенні елементи* (вуглець, водень, кисень, азот), зольні макроелементи (фосфор, сірка, калій, кальцій, магній, залізо), деякі мікроелементи (марганець, мідь, натрій, хлор, цинк та ін.). Елементи мають знаходитись в легкозасвоюваній мікроорганізмами формі. Поживні середовища повинні бути збалансовані за складом, ізотонічними за концентрацією розчинених речовин, бути оптимальної вологості, в'язкості, реакції середовища (рН).

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

Натуральні середовища складаються із продуктів тваринного і рослинного походження, мають складний і непостійний склад. Відносять м'ясо-пептонний бульйон (агар), пивне сусло, сусло, агар, капустну воду і т.д.

Синтетичні середовища мають у своєму складі певні хімічні, органічні та неорганічні з'єднання (амінокислоти, вітаміни, мінеральні солі).

За **призначенням** розрізняють *універсальні, елективні та диференціально-діагностичні середовища*.

До *універсальних відносять* середовища, на яких вирощують багато видів мікроорганізмів: МПБ, пивне сусло та ін.

Елективні середовища забезпечують розвиток тільки певних мікроорганізмів: Ендо середовище, молоко.

Диференціально-діагностичні середовища використовують для диференціювання видів мікроорганізмів та ідентифікації чистих культур на основі вивчення біохімічних властивостей.

За **консистенцією** поживні середовища бувають *рідкими, щільними і сипучими*.

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси, зберігання, дослідження фізіолого-біохімічних властивостей: МПБ, м'ясна вода і т.д.

Щільні - для аналізу мікрофлори, виділення чистих культур мікроорганізмів, одержання ізольованих колоній і т.д., МПА, МПЖ.

Сипучі (висівки, буряковий жом, ґрунт) - для зберігання видів мікроорганізмів та їх спор, приготування посівного матеріалу.

Ущільнення поживних середовищ. Для одержання щільних поживних середовищ застосовують агар, желатин та кремнекислий гель.

Агар - полісахарид, одержують із морських водоростей шляхом екстракції при кип'ятінні. Це порошок жовтого кольору, який у воді набухає і утворює гель, що плавиться при 100 °С, а застигає при 40 °С.

Желатин - білок, одержують шляхом виварювання кісток, хрящів, сухожилів тварин. Світло-коричневого кольору, без запаху і смаку. Температура плавлення 22-26,5 °С.

Кремнекислий гель - готують шляхом змішування різних об'ємів соляної кислоти і рідкого скла (Na_2SiO_3 або K_2SiO_3)

Приготування поживних середовищ. Для приготування поживних середовищ використовують чистий посуд без сторонніх речовин. Новий посуд миють і занурюють на 8-10 год. в 1-2 %-вий розчин соляної або сірчаної кислоти, потім добре промивають і сушать. Посуд, що був у використанні, миють теплою водою, використовуючи кальциновану соду, мильний розчин, ополіскують спочатку в проточній воді, а потім у дистильованій. Сушать при кімнатній температурі або в сушильних шафах. Приготовлені поживні середовища розливають у пробірки або чашки Петрі. Зберігають стерильні поживні середовища в прохолодному місці, в щільно закритих шафах. Кожну колбу із середовищем позначають етикеткою із позначенням її складу і датою приготування.

Стерилізація поживних середовищ. *Стерилізацією* називають повне знищення вегетативних клітин мікроорганізмів та їх спор. Вибір способу стерилізації залежить від властивостей стерилізуючого матеріалу.

Автоклавування. Поживні середовища стерилізують в автоклавах насиченим паром під тиском 0,05-0,2 Мпа.

Стерилізація текучою парою - даний метод застосовується для стерилізації поживних середовищ, що змінюють свій склад і властивості під дією температури вище 100 °С. Суть полягає у тому, що нагрівання середовища проводять при 100 °С три рази по 30 хв три доби підряд.

Пастеризація. Пастеризація або неповна стерилізація запропонована Луї Пастером. Вона призначена для знищення вегетативних форм мікроорганізмів однократним нагріванням при температурі 60 -75°С і витримці 15-30 хв. або при 80°С протягом 10-15хв. Пастеризацію широко використовують у харчовій промисловості.

Культивування мікроорганізмів

Методи посіву та пересіву мікроорганізмів. *Порядок проведення посіву і пересіву мікроорганізмів.* Для виділення мікроорганізмів із виробничих і природних субстратів, при готуванні робочих культур з метою передачі на виробництво т.д. у лабораторній практиці часто користуються методами посіву та пересіву. **Посівом** називається внесення частини дослідного матеріалу в стерильне поживне середовище, **пересівом**. Переніс частини, вирощеної на поживному середовищі, культури мікроорганізмів на друге свіже стерильне середовище. *Посів на рідке середовище.* Проводять петлею або піпеткою (пастерівською або градуйованою). Обидві пробірки тримають під кутом. Петлю з мікробним матеріалом опускають безпосередньо у стерильне середовище і ополіскують. *Посів на щільні середовища.* *Посіви петлею на скошеному агарі* проводять: зигзагоподібним штрихом, вільно ковзаючи петлею по поверхні щільного середовища від одного краю пробірки до іншого; прямою лінією; суцільним посівом. *Посів у чашки Петрі* проводять таким

чином: щільне поживне середовище в пробірках або колбах розплавлюють на водяній бані, охолоджують до 48-50°C і розливають рівним шаром товщиною 3-5 мм в стерильні чашки. Посів здійснюють шпателем Дригальського або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних штрихів. У стовпчик МПА або МПЖ посів здійснюють уколом.

Методи виділення чистих культур. *Чистою культурою* називають потомство, яке одержане від одної клітини. Існує декілька методів виділення чистих культур. Усі методи основані на виділенні із мікробної популяції однієї єдиної клітини.

Метод розведення. Досліджуваний матеріал розводять в ізотонічному розчині натрію хлору або стерильній рідині поживного середовища. Розведення можуть бути 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} і т.д. раз. Із збільшенням розведення число мікробів зменшується, що дозволяє ізолювати окремі мікробні клітини і виділити культуру в чистому вигляді. З цією метою стерильний ізотонічний розчин або стерильну воду розливають у пробірки по 9 мл (або 1 г) вихідної проби вносять першу пробірку, закривають ватною пробкою, добре перемішують і одержують I розведення - 1:10 (рис. 5). Одержану в I розведенні суспензію за допомогою стерильної піпетки добре перемішують, беруть 1 мл розведення і переносять в другу пробірку з 9 мл води - II розведення - 1:10². Беруть нову піпетку і таким же чином готують III розведення - 1:10³ і т. д.

Метод розсіву. На щільне поживне середовище переважно у чашки Петрі, наносять краплю досліджуваного матеріалу. Стерильним шпателем краплю розподіляють на всій поверхні середовища. Цей же шпатель переносять в іншу чашку, розподіляють матеріал, який залишився на ньому, і так у декількох чашках. В останні чашки попадає менше мікробів, а значить і менше виросте колоній, які будуть ізолювані, що дозволить виділити чисту культуру.

Метод застосування елективних середовищ. Не усі мікроорганізми ростуть на простих поживних середовищах.

Для виділення і накопичення мікробів певного виду використовують елективні середовища. Вперше в лабораторну практику ввів такі середовища російський мікробіолог С.Н. Виноградський. Елективним середовищем для молочнокислих бактерій може бути молоко. Для виділення мікобактерій туберкульозу використовують гліцеринові, м'ясо-пептонні, яєчні та інші середовища.

Метод виділення бацил. У досліджуваному матеріалі можуть бути як спорові, так і вегетативні форми мікробів. Розділити їх можна нагріванням матеріалу при температурі 70-80 °С. протягом 10-15 хв.

Метод біологічної очистки. Інколи для виділення якої небудь культури мікроорганізмів із патологічного матеріалу або інших субстратів проводять зараження лабораторних тварин. Якщо досліджувана культура утворює спори, то матеріал прогрівають на водяній бані, як при виділенні бацил.

Культивування аеробних та анаеробних мікроорганізмів. Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається *культивуванням*.

Культивування аеробних мікроорганізмів. *Метод поверхневих культур.* Поверхнєве вирощування аеробів проводять на щільному або сипучому

середовищі, а також в тонкому шарі рідкого середовища в скляному посуді з широким дном: чашках Петри, колбах Виноградського, кюветах. Вирощування відбувається при постійній температурі в термостатах або термостатних кімнатах. Мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища і використовують кисень безпосередньо із повітря. На рідких середовищах аероби ростуть у вигляді плівки або утворюють суспензії, пластівці, осадок. На щільних середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колоній або суцільним газоном.

Даний метод використовується у промисловості для одержання лимонної кислоти, ферментних препаратів.

Методи культивування анаеробів. Створити анаеробні умови можна фізичним, хімічним, біологічним і комбінованими методами.

Фізичний метод. Видалення кисню із рідкого або щільного поживного середовища безпосередньо перед посівом досягається за рахунок кип'ятіння або прогрівання пробірок протягом 15-20 хв. і швидким охолодженням у холодній воді. Після посіву поверхню середовища заливають шаром стерильної суміші вазелінового масла і парафіну.

Вирощування анаеробів можна проводити у спеціальних пробірках, із яких видаляється повітря після посіву; в спеціальних приладах - анаеростатах.

Анаеростати - це вакуумні металічні або скляні ексикатори. Являють собою циліндр з щільною кришкою, що герметично закривається.

Хімічний метод. Зв'язування вільного кисню, що міститься у середовищі або посудині для вирощування анаеробів, проводять за допомогою хімічних речовин. У якості відновників, що додають у поживні середовища для культивування анаеробів, використовують органічні та неорганічні з'єднання: редукуючі цукри (глюкозу), речовини із сульфгідрильною групою (цистеїн, глутатіон), аскорбінову кислоту, сульфідиди, сірководень, а також деякі складні компоненти - пептони, шматочки печінки, м'язів, картоплі, яєчного білка.

Біологічні методи. Деякі анаеробні мікроорганізми можна вирощувати при доступі кисню разом із аеробами. У герметично закриті посудину поміщають 10-15 пробірок з посівами аеробних культур і одну пробірку з анаеробами. Аеробні мікроби енергійно поглинають кисень, виділяють CO₂, і створюють умови для росту анаеробів.

Контрольні питання

1. Які є поживні середовища за складом?
2. Що застосовують для ущільнення поживних середовищ?
3. Види стерилізації?
4. Мета пастеризації?
1. Які є методи посіву та пересіву мікроорганізмів?
2. Які є методи культивування анаеробів?
3. Охарактеризуйте метод поверхневих культур?
4. Методика визначення каталази?

Практичне заняття № 4

Морфологічні та культуральні ознаки міцеліальних грибів.

Мета: Ознайомитись з генетичним апаратом бактеріальної клітини.

Матеріали та обладнання: рідина Карнуа, вода дистильована, чашки Петрі, барвник Романовського-Гімза, термостат, фільтрувальний папір.

Як відомо, головна відміна прокаріотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК. Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокаріот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазмідні – невеликі, замкнені в кільце, ділянки ДНК. Плазмідні, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про додаткові властивості організму та при діленні бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

Генетичний матеріал у бактерій, так само, як і в еукаріотів, представлений дволанцюговою молекулою дезоксирибонуклеїнової кислоти, проте, на відміну від останніх, розміщена не у диференційованому ядрі, а в прототипі ядра - нуклеоїді. Нуклеоїд - відносно компактний утвір, знаходиться переважно у центральній частині клітини, на відміну від ядра еукаріотів він не має оболонки, безпосередньо контактує з цитоплазмою. ДНК бактерій прийнято називати *хромосою*, у *Escherichia coli* виявляють - від 2 до 8, у *Azotobacter chroococcum* - від 20 до 25 геномів.

Хромосома у функціональному відношенні поділяється на фрагменти, які називаються генами, що несуть генетичну інформацію і виконують роль структур, які детермінують спадкові ознаки. **Ген** - елементарна одиниця спадковості, що контролює синтез специфічного поліпептидного ланцюга (структурний ген) або діяльність структурних генів (ген-регулятор, ген-оператор). Генетичний код у мікроорганізмів такий же, як і код у еукаріотів - триплетний. Кожний триплет (*кодон*) - три, розташовані поряд нуклеїнові основи, кодує одну амінокислоту.

Гени, що контролюють резистентність до антибіотиків, інших препаратів, позначаються літерою r (*resistance* - стійкість). Чутливі до препаратів бактерії позначаються літерою s (*sensitive* - чутливий).

Існує певний механізм, за допомогою якого послідовність нуклеотидів у гені визначає послідовність амінокислот у білку.

У цитоплазмі мікробних клітин, так же, як і в еукаріотів, є особливі нуклеїнові кислоти, які називаються транспортними РНК (тРНК). На одному з кінців вони мають триплет нуклеотидів (антикодон), а на іншому - місце для з'єднання з відповідною амінокислотою (кодон). Вони доставляють необхідну амінокислоту до рибосоми з іРНК, де розпочинається синтез та відбувається

елонгація (*elongatio* - подовження) поліпептидного ланцюга. Після завершення синтезу білкової молекули, вона за допомогою ферменту звільняється та піддається певній модифікації (посттрансляційні перетворення білкових молекул).

Окрім хромосомної ДНК у багатьох бактерій виявляють також позахромосомну ДНК у вигляді плазмід (епісом). *Плазміди* - кільцеві молекули ДНК молекулярною масою до 10^6 - 10^8 Дальтон з 1,5-400 тис. пар основ. Вони можуть існувати в цитоплазмі у вільному стані або бути інтегрованими з клітинною хромосомою. Тоді їх називають *епісомами*.

Плазміди виконують регуляторну та кодуєчу функції. Регуляторний ефект їх полягає в здатності представляти власні реплікони при порушенні функціонування клітинних генів; кодуєча роль - у внесенні в клітину нових ознак, які надають їй певних переваг при взаємодії з організмом хазяїна.

Плазміди не мають вирішального значення для забезпечення існування бактерійних клітин, однак відіграють чи не найважливішу роль у створенні розмаїття генетичного матеріалу, детермінують синтез факторів патогенності, резистентності до лікарських засобів та ін.

Повний набір генів мікробної клітини становить її генотип. Прояв генетично детермінованих ознак при різних обставинах може відрізнятись. У таких випадках йдеться про фенотип мікроорганізму. Нерідко можна зустріти аналогічні за генотипом, але помітно відмінні за фенотипом мікроорганізми..

Фенотип - індивідуальний вияв генотипу в конкретних умовах існування.

Протягом багатьох століть панувала думка, що кожний вид мікробів є незмінним і його морфологічні ознаки залишаються постійними.

Встановлено, що мікроорганізми здатні до втрати вірулентності при збереженні антигенних властивостей, набувати стійкості до антибіотиків, збільшувати синтез певних продуктів життєдіяльності, змінювати морфологічні, культуральні та біохімічні ознаки.

Морфологічні зміни у старих мікробних клітин спостерігав М.Ф. Гамалія, який назвав це явище *гетероморфізмом*. Відомо, що температура, хімічні речовини, в тому числі антибіотики, антисептики, пестициди та інші екологічні фактори викликають зміни морфології мікробів. Наприклад, кишкова паличка під впливом пеніциліну може набувати кулястої форми, утворювати вирости або ризоїди.

Мінливістю називають здатність організмів змінювати свої властивості відповідно до зміни умов навколишнього середовища.

Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза.

Оскільки прокаріотні клітини мають достатньо малі розміри, для полегшення процедури мікроскопіювання генетичного матеріалу, рекомендується забарвлювати ядерний матеріал еукріотного мікроорганізму наприклад, дріжджів.

1. Виготовити мазок *Saccharomyces cerevisiae* та висушити при кімнатній температурі.

2. Зафіксувати мазок у рідині Карнуа протягом 15 хв.

3. На висушений фіксований мазок нанести барвник Романовського-Гімза та витримати 40-45 хв. в термостаті при температурі 37°C.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена у рожевий колір, а ядерний матеріал – у фіолетовий.

6. Зробити схематичний малюнок з позначенням ядерного матеріалу.

Контрольні питання

1. Ген і його значення.
2. Функції які виконують плазміни.
3. Хто увів термін гетероморфізм?
4. Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза.

Практичне заняття № 5

Методи роботи з мікроорганізмами. Вплив фізико-хімічних та біологічних факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність клітин живих організмів.

Мета: вивчити розповсюдження мікроорганізмів у зовнішньому середовищі.

Матеріали та обладнання: поживні середовища (МПА), дистильована вода, чашка Петрі, мірні піпетки, пробірки в штативах, сірники.

Мікроорганізми дуже широко розповсюджені в природі. Вони є в ґрунтах, у воді, в повітрі та відіграють важливу роль у кругообігу всіх біологічно важливих елементів у природі. Це зумовлено надзвичайною швидкістю їх росту та різноманітністю метаболічних процесів.

Взаємовідносини (співіснування) різних видів мікроорганізмів між собою, а також із іншими формами життя називають *симбіозом*. Види симбіозів досить різноманітні.

1. **Нейтралізм** - існуючі в одному біотопі популяції мікробів не стимулюють і не пригнічують один одного.

2. **Мутуалізм** - взаємовигідне співіснування, коли одна популяція синтезує речовини, які є основою живлення іншої (наприклад, бульбочкові бактерії та бобові рослини, аеробні й анаеробні мікроби в організмі людини чи тварини).

3. **Коменсалізм** - така форма симбіозу, коли мікроби живляться залишками їжі хазяїна, злущеним епітелієм кишечника тощо, але не завдають йому шкоди.

4. **Антагонізм** - пригнічення однієї популяції іншою. Мікроби-антагоністи виділяють антибіотики, бактеріоцини та інші речовини, які викликають загибель інших видів або затримують їх розмноження.

5. **Паразитизм** - вид симбіозу, при якому одна популяція (паразит) завдає шкоди хазяїнові, маючи для себе вигоду. До мікробів-паразитів відносять збудників інфекційних хвороб.

У природних умовах мікроорганізми змушені боротись за існування, неконкурентоспроможні - неминуче зникнуть із спільноти.

При **пасивному антагонізмі** спостерігають витіснення одного мікроорганізму іншим, якщо збільшення чисельності обох видів лімітовано одним і тим самим життєво важливим ресурсом, кількість та (або) доступність якого обмежені. Так, при вирощуванні на штучному поживному середовищі туберкульозних бактерій та сапрофітної мікрофлори переважно розвиваються сапрофіти через значно більшу швидкість їх росту та розмноження. Експериментально було доведено, що при зміні умов досліду можна змінити кінцевий результат конкурентних взаємовідносин симбіонтів. Так, при сумісному культивуванні *Spirillumsp.* та *Pseudomonas sp.* за температури 16° С і вище перевага була за *Spirillumsp.*, тоді як за зниження температури до 2° С на тому самому субстраті швидше розвивались *Pseudomonas sp.*

Активний антагонізм зумовлений виділенням бактерицидних речовин. Такими речовинами можуть бути неспецифічні продукти обміну (органічні кислоти, спирти, аміак, феноли, пероксид водню та ін.) або специфічні (антибіотики). Такі продукти обміну, як кислоти та спирти, токсичні для будь-якої клітини. Так, при розвитку бактеріальних популяцій у молоці спочатку спостерігається незалежний розвиток різних видів мікроорганізмів. Але за наявності бактерій, які здійснюють молочнокисле бродіння, молоко поступово підкислюється і перевага залишається за кислотостійкими молочнокислими коками та паличками. З часом молочнокислі палички, які є більш кислотостійкими, витісняють і коки. Оцтовокислі бактерії можна підтримувати в чистій культурі, не здійснюючи особливих заходів проти їх контамінації. Висока концентрація оцтової кислоти в середовищі запобігає розвитку інших мікроорганізмів. Уролі-тичні бактерії в процесі гідролізу сечовини сприяють накопиченню аміаку, за рахунок якого середовище стає сильно лужним. Висока лужність та висока концентрація аміаку в середовищі запобігають розвитку інших мікроорганізмів.

Найбільш яскраво конкуренція проявляється у формі **паразитизму** та **хижацтва**. Між цими типами взаємовідносин важко провести чітку межу, оскільки і паразити, і хижаки задовольняють свої харчові потреби за рахунок жертви. Різниця між ними полягає в тому, що хижаки вбивають свою жертву досить швидко, тоді як паразити живляться за рахунок живого організму.

Паразитизм мікроорганізмів на мікроорганізмах спостерігається досить рідко. Так, *Vampirovibrio chlorellavorus* є облігатним паразитом одноклітинної водорості *Chlorella*. Цей вібріон не здатний розвиватись на органічних середовищах і навіть на мертвих клітинах хлорели. Бактерії прикріплюються до оболонки водорості. До однієї клітини може прикріпитись декілька десятків вібріонів. Прикріплені вібріони збільшують проникність оболонки водорості й ростуть за рахунок речовин, що надходять у клітину водорості. З часом клітина водорості припиняє ріст і гине. Проте за допомогою антибіотиків, наприклад пеніциліну, можна вбити бактерії-паразити, не зашкодивши водорості. Вилікувані клітини хлорели здатні далі нормально розвиватись.

Інший вібріон (*Bdellovibrio*) може розглядатись як справжній хижак. Клітини бделовібріона можуть прикріплюватися до клітин інших бактерій і проникати в них. Після проникнення хижак росте, використовуючи вміст

клітини-жертви як поживний субстрат, і ділиться. З часом клітина-жертва лізується, а хижак знаходить нову жертву. Коло можливих жертв досить широке, але найчастіше це представники кишкових бактерій.

Позитивні взаємовідносини між різними видами мікроорганізмів можна характеризувати як синтрофію. **Синтрофія** - це здатність двох або декількох видів бактерій здійснювати сумісно такий процес, який жодний з них не здатен здійснити самостійно. Основою таких взаємовідносин може бути передача факторів росту, утворення одним організмом субстрату, придатного для розвитку іншого, видалення одним організмом продуктів, токсичних для іншого. Декілька механізмів можуть діяти одночасно. Синтрофія, основою якої є обмін субстратом, спостерігається, наприклад, при руйнуванні мікроорганізмами целюлози в середовищі, яке не містить зв'язаного азоту.

У деяких випадках симбіотичні взаємовідносини призводять до формування консорціуму (лат. **Consortium** - співучасть, співтовариство), в якому клітини двох видів об'єднані нібито в один організм. Такий консорціум утворюють бактерії роду **Desulfotomaculum** та клітини **Chlorobiumphaeobacteroidus**. У центрі асоціації містяться сульфатредуктори **Desulfotomaculum**, а на поверхні - фотосинтезуючі сіркобактерії.

Механізми «взаємодопомоги» у бактерій можуть бути пов'язані не лише з живленням. Так, патогенна для людини нерухома **Veillonella párvula** у ротовій порожнині прикріплюється до поверхні представників нормальної мікрофлори рота, здатних до ковзного типу руху, і таким чином направляється до ділянок сприятливої для її розвитку.

Явище **синергізму** (в асоціантів відбувається підсилення фізіологічних функцій) знайшло застосування в біотехнології при проведенні мікробіологічного синтезу біологічно активних сполук. Сумісне культивування двох культур актиноміцетів – **Streptomycesrimosus** (продуцент протеаз) і **S. Violicinereus** (не синтезує ферменти) супроводжується збільшенням виходу ферменту в шість разів. Виявилося, що **S. Violicinereus** продукує стимулятор, який впливає на розвиток продуцента ферменту.

Прикладами синтрофічних взаємовідносин можуть бути також полімікробні інфекції, зокрема газова гангрена, зумовлена дією декількох видів роду **Clostridium** в асоціації зі стафілококами та стрептококами.

Таким чином, між мікроорганізмами в природних асоціаціях існують певні динамічні взаємовідносини, які часто не мають чітких меж. Причини, які сприяють прояву тих або інших форм взаємовідносин, зумовлені конкретними умовами існування, а також особливостями обміну речовин самих мікроорганізмів.

Контрольні питання

1. Симбіоз і його види.
2. Активний та пасивний антагонізм.
3. Паразитизм.
4. Явище синергізму.

Практичне заняття № 6

Санітарно-мікробіологічний аналіз об'єктів, що контактують з сировиною та робочими поверхнями при виробництві харчових продуктів.

Мета: Освоїти санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту, води, повітря.

Матеріали та обладнання: поживні середовища (МПА), дистильована вода, чашка Петрі, мірні піпетки, пробірки в штативах, сірники.

Ґрунт - це несприятливе середовище для розвитку патогенних мікроорганізмів, але вони можуть потрапляти туди з випорожненнями, гноєм, слиною та іншими виділеннями, із трупами тварин та людей, що загинули від інфекційних хвороб і перебувати там досить тривалий час. При проведенні поточного санітарного нагляду обмежуються встановленням факту і оцінкою ступеня фекального забруднення ґрунту. Для встановлення давності фекального забруднення ґрунту визначають декілька санітарно-показових мікроорганізмів. Присутність у ґрунті певної кількості клітин *E. coli* та *Streptococcus faecalis* вказують на свіже фекальне забруднення, бактерій родів *Citrobacter* та *Enterobacter* - на несвіже, а *Clostridium perfringens* - на давнє забруднення.

Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту проводять з метою попереджувального нагляду за розширеним списком показників. Визначають колі-індекс - кількість бактерій кишкової палички у 1 г ґрунту, перфрингенс-титр - найменша маса ґрунту в грамах, в якій визначаються *Clostridium perfringens*, загальну кількість сапрофітних, термофільних та нітрифікуючих бактерій в 1 г ґрунту. Також санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту проводять з метою попереджувального санітарного нагляду, поточного санітарного нагляду за епідемічними показниками (наприклад, розслідування причин спалахів інфекційних захворювань).

Відповідно до ГОСТ 17.04.4.02.-84, на кожному гектарі ґрунту виділяють ділянку площею 25 м², з якої беруть 10 об'єднаних проб. Кожну з них формують із 3-5 проб масою 200-250 г, взятих пошарово з глибини 0-5 і 5-20 см по діагоналі ділянки. Ґрунтові проби відбирають у стерильні пакети чи колби. Для відбору ґрунту використовують стерильні металеві совки, шпателі або невеличкі лопатки. Кожен зразок супроводжується етикеткою, на якій вказується дата взяття проби, район ділянки і горизонт. Перед узяттям проби ґрунту стерильним шпателем знімають верхній шар ґрунту 1,5-2,0 см, який може бути забруднений сторонньою мікрофлорою. Далі відбирають 100-200 г ґрунту і висипають у пакет чи колбу.

Із окремих проб роблять середній зразок масою не менше 1 кг, з якого відбирають кінцеву пробу масою близько 300 г. Зразки ґрунту упаковують у стерильні пергаментні пакети, скляні банки, сумки-холодильники і відразу ж доставляють у лабораторію. Ґрунтові зразки бажано досліджувати в день їх відбору, так як кількість мікроорганізмів може змінитися і зберігають в холодильнику при температурі 4-5 °С не більше 24 год.

У лабораторії пробу розподіляють по стерильній поверхні, видаляють різні включення (коріння рослин, камінці тощо), потім збирають, розтирають у стерильній ступці і просівають через стерильне сито з діаметром вічок 3 мм. Після ретельного перемішування, для аналізу відважують 30 г ґрунту. В процесі досліджень визначають мікробне число (загальна кількість бактерій, що містяться в 1 г ґрунту), колі-титр, перфрінгенс-титр (табл. 1). Якісне дослідження з визначенням видового складу проводять за показниками наявності у ґрунті патогенних мікроорганізмів.

Визначення мікробного числа. В колбу, що містить 270 мл стерильної водопровідної води, вносять 30 г ґрунту і ретельно перемішують струшуванням. З одержаної суспензії готують серійні розведення проби з коефіцієнтом 10. Для чистих ґрунтів досить чотирьох ступенів розведення, для забруднених - шести - дев'яти.

У штатив ставлять відповідну кількість пробірок, які містять по 9 мл стерильної водопровідної води. Із колби з суспензією 1 : 10 стерильною піпеткою відбирають і переносять їх першу пробірку 1 мл суспензії, ретельно перемішують і послідовно переносять по 1 мл з першої в другу, потім в третю і т. д., одержуючи при цьому розведення суспензії 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 і г. д. Для зручності показники розведення краще записувати так: відповідно 10-1 10 -2, 10-3 і т. д.

З останніх трьох-чотирьох пробірок окремими піпетками у стерильні бактеріологічні чашки вносять по 1 мл суспензії, додають по 15-20 мл розплавленого й охолодженого до температури 50°C МПА, перемішують легеньким струшуванням. Після застигання агару, чашки поміщають в термостат при температурі 28-30 °С. Через 48 год. підраховують кількість колоній, що вирости в кожній чашці, перемножують на ступінь розведення й одержують середньоарифметичне число, яке і буде показником кількості мікроорганізмів у 1 г ґрунту.

Таблиця 1

Показники санітарно-бактеріологічної оцінки ґрунту

ґрунт	Мікробне число	Колі-титр	Перфрінгенс-титр
Чистий	10000	>1	>0,1
Слабко забруднений	Не більше 10 000	1-0,01	0,01-0,001
Помірно забруднений	100000-900000	0,01-0,001	0,001-0,0001
Сильно забруднений	1000 000 і більше	<0,001	< 0,0001

Для визначення кількості бацил використовують розведення ґрунтової суспензії в концентрації з 10^{-1} до 10^{-3} . Суспензію прогривають на водяній бані при температурі 80°C протягом 15 хв. Посів здійснюють на живильне середовище, яке складається із рівних частин сусло-агару і звичайного МПА.

Визначення колі-титру ґрунту. Колі-титр ґрунту найчастіше визначають титраційним методом на середовищі Кесслер-Свенертона. Перше розведення ґрунтової суспензії здійснюють у стерильній колбі, у співвідношенні 1 : 10 (10 г ґрунту розводять у 100 мл стерильної водопровідної

води). Решту розведень (по 10 мл) готують у пробірках описаним раніше способом.

Перше розведення (1:10) в об'ємі 10 мл сіють у колбу з 50 мл середовища Кесслер-34 Свенертона, що відповідає посіву 1 г ґрунту. Із наступних розведень в пробірки з цим же середовищем в об'ємі 9 мл сіють по 1 мл, що відповідатиме 0,1 г; 0,01; 0,001 г і т.д. маси ґрунту.

Засіяні пробірки витримують у термостаті при температурі 43 °С (допускається 37 °С). В розведеннях, де відмічено процеси газоутворення й помутніння, можуть мати місце бактерії групи кишкової палички. З таких пробірок здійснюють пересів у бактеріологічні чашки на середовище Ендо, які витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 24 год. У випадку присутності кишкової палички на поверхні середовища виростають характерні колонії темно-червоного кольору з металевим блиском фуксину. Найбільше розведення ґрунту, в якому вдається виявити кишкову паличку, відповідатиме колі-титру проби.

Визначення колі-індексу ґрунту. Розведення ґрунтової суспензії готують за описаним раніше способом. Для знищення неспоруютьчих мікроорганізмів, пробірки прогривають при температурі 80 °С протягом 15 хв, висівають в середовище Вільсона-Блер й інкубують у термостаті 24 год. *S. perfringens* виявляють за наявністю чорних колоній. За титр цього мікроорганізму - приймають найменшу масу ґрунту, в якій з'являється характерний ріст з почорнінням середовища. При підозрі на наявність патогенних мікроорганізмів (збудники сибірки, туберкульозу, бруцельозу тощо) ґрунт досліджують відповідно до методів індикації конкретних видів. При інтерпретації результатів дослідження керуються нормативними документами, в яких враховуються не лише загальні критерії, але і склад ґрунту, кліматична зона та інші фактори. Єдиного стандарту санітарно-мікробіологічної оцінки ґрунту не існує.

Мікробіологічний контроль води. Вода, що використовується на підприємствах харчової промисловості, повинна відповідати вимогам, що пред'являються воді діючим ГОСТом.

Один раз у квартал при користуванні міським водопроводом та один раз в місяць при нарахуванні власних джерел водопоста чання в воді визначають: загальну кількість бактерій, кількість бактерій групи кишкової палички і підрахування патогенних мікроорганізмів (збудників черевного тифу, холери, дизентерії).

Відбір проб. Посуд (пляшки на 0,25, 0,5 і 1 л) добре миють, закривають ватно-марлевими корками, накривають паперовим ковпаком, зав'язують і стерилізують в автоклаві при 120 °С протягом 30 хв.

Для проб хлорованої води у пляшки вносять перед стерилізацією 2 мл 1,5 %-вого розчину тіосульфату натрію.

Кран або край спускної труби обпалюють, відкривають і протягом 10 -15 хв. воду спускають, після чого проводять відбір проб.

Із відкритих водоймищ проби беруть на певній глибині за допомогою батометра, що являє собою металевий каркас, у середині якого встановлюють ся

стерильна скляна пляшка з металевим корком і прив'язаної до нього мотузки (рис. 2).

На пляшках з пробамі води роблять написи, в яких зазначають назву, місце знаходження джерела, дату і час взяття проби, метеорологічні умови (температура повітря, опади), мету дослідження, посаду і підпис особи.

Вода підлягає аналізу не пізніше 2 год. після відбору. Перевозити проби води потрібно при температурі не вище 5 °С і досліджувати не пізніше, ніж через 6 год. після взяття проби.

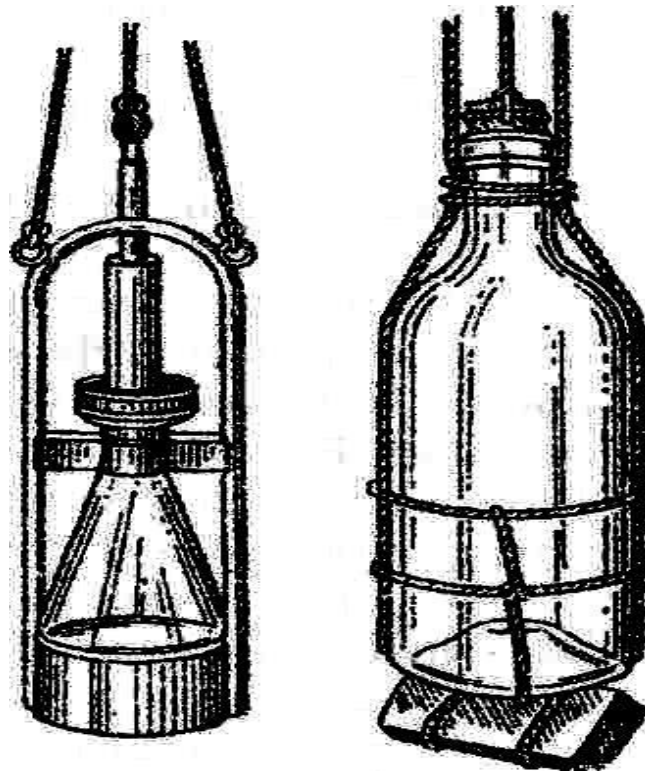


Рис.2. Батометри

Норми вмісту мікроорганізмів у воді. Санітарно-гігієнічну оцінку якості води проводять на основі показників, які виражають кількістю кишкових паличок в 1000 мл води (**колі-індекс**) або найменшим об'ємом, що містить одну кишкову паличку, і вираженим у мілілітрах (**колі-титр**).

Колі-титр = $1000 / \text{Колі - індекс}$.

Колі - індекс = $1000 / \text{Колі-титр}$.

За діючим ГОСТом для питної води, що пройшла очистку, титр кишкової палички повинен бути не нижче 300, коли-індекс — не більше 3; загальна кількість бактерій в 1 мл води — не більше 100.

Для інших джерел воли норми не встановлені, але прийнято вважати, що

а) артезіанська вода повинна містити не більше 100 бактерій в 1 мл і мати коли - титр не менше 500;

б) вода колодязів і джерел може містити не більше 100 бактерій в 1 мл і мати коли-титр до 250-200 (4-5 кишкових паличок у 1 л);

в) вода відкритих водоймищ (ставків, річок, озер) може використовуватись у харчових виробництвах тільки після очистки. Вода не повинна містити патогенних мікроорганізмів.

Визначення Coli-титру і Coli-індексу води. Найбільшу небезпеку представляє фекальне забруднення води, оскільки разом із фекаліями у воду можуть попасти патогенні мікроби. Основним показником фекального забруднення є кишкова паличка *E. coli* - постійний житель кишківника людини і тварин. Вона зберігається у воді тривалий час і легко визначається Coli-титром або Coli-індексом.

Для визначення Coli-титру користуються **методами бродильних проб і мембранних фільтрів**. Вони ґрунтуються на тому, що кишкова паличка розмножується при температурі 43-45°C, в той час як ріст більшості водних бактерій при такій температурі затримується. Під час росту кишкова паличка зброджує різні вуглеводи у поживних середовищах.

При визначенні Coli-титру беруть різні об'єми висівної води (залежно від джерела водопостачання). Водопровідну воду засівають у кількості 300 мл (2 об'єми по 100 мл і 10 об'ємів по 10 мл).

При посіві води відкритих водоймищ взятий об'єм залежить від ступеня забруднення. При середній забрудненості водоймища для посіву беруть 100 мл (перший об'єм), 10 мл (другий об'єм). Із забруднених водоймищ - відповідно 1; 0,1; 0,01; 0,001 мл. Висівають на середовище Булижа з поплавками.

Посіви вирощують в термостатах при t 43 °C протягом 24-48 год. Потім відзначають зміну кольору середовища, присутність газу і осаду. Якщо середовище не змінилось *E. coli* у пробі відсутня, дослідження припиняють.

Із пробірок, де утворився газ, осад, середовище змінило колір, роблять посів на середовище Ендо, і вирощують при 37 °C протягом 18-24 год.

Для визначення **Coli-індексу** користуються методом мембранних ультрафільтрів (кружельців діаметром 3,5см), які випускаються під 5 номерами (табл. 2).

Таблиця 2

Розміри та характеристика фільтрів

№ фільтра	серед	Швидкість фільтрування 500 мл води коливання (макс. і хв.)	Середній розмір пор, мкм
1	9 хв	6-12 хв	0,35
2	4,5 хв	3-6 хв	0,5
3	2,5 хв	1,5-3 хв	0,7
4	70 с	45-90 с	0,9
5	35 с	20-45 с	1,2

Чим більший розмір пор, тим вище його номер і швидше йде фільтрація. Для санітарно-бактеріологічного дослідження води найбільш придатний ультрафільтр №3. Матова сторона ультрафільтра називається повітряна. При фільтрації матова сторона повинна бути повернута догори, а зворотня (блискача) - вниз, торкаючись поживного середовища. Через мембрані

ультрафільтри, ви користовуючи прилади Рублевського або Зейтца, фільтрують від повідний об'єм води (рис. 3).

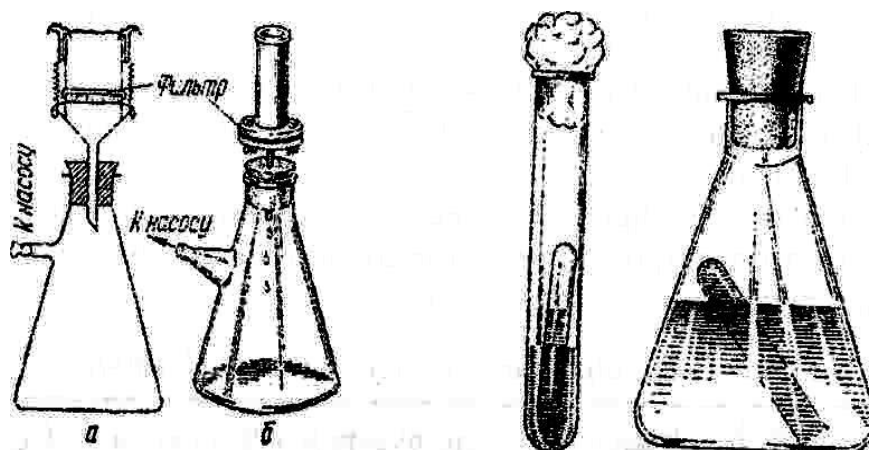


Рис. 3. Прилад Зейтца

Перед фільтруванням мембранні фільтри кип'ятять 10 -15 хв у дистильованій воді.

Фільтрувальний прилад стерилізують обпалюванням, кип'ятінням або автоклавуванням. Апарат охолоджують; на сітку розміщують простерилізований кружок фільтрувального паперу, змоченого в стерильній воді, а потім стерильний фільтр. Після закінчення фільтрування стерильним пінцетом накладають мембранні фільтри на середовище Ендо. Вирощують при 43°C протягом 24 год і роблять мазки, фарбують по Граму, мікроскопують і висівають на середовище Булижа з поплавком.

Визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл. Стерильними піпетками відбирають по 1 мл досліджуваної води і її розведення (1:10) і висівають по 2 чашки Петрі. Чисту воду (водопровідну артезіанську) можна висівати без розведення. Забруднену воду висівають по 1 мл із десятикратних розведень (1:10² - 1:10³; 1:10³ - 1:10⁴). Із кожної проби готують не менше двох розведень.

При виявленні в 1 мл від 0 до 100 колоній мікроорганізмів вода вважається чистою, від 100 до 1000 колоній - сумнівною, вище 1000 - непридатною.

Мікробіологічний контроль повітря. Повітря виробничих умов може стати джерелом мікробного забруднення сировини, напівфабрикатів, готових продуктів.

Це може призвести до погіршення їх якості, зниження термінів зберігання, а також викликати різні захворювання тварин і людей. Для визначення кількості мікроорганізмів в повітрі використовують різні методи.

Седиментаційний метод або шляхом осадження дуже простий і не потребує спеціальної апаратури. Ґрунтується на осадженні пилинок і крапель разом із мікроорганізмами на поверхню поживного середовища у відкритих чашках Петрі. Чашки переносять в охолоджуване приміщення і поміщають на розгорнутий папір, в якому вони стерилізувались. Не перевертаючи,

відкривають кришку на самий край стінки чашки так, щоб вся поверхня стерилізованого середовища була повністю відкрита.

Чашки залишають відкритими 5, 10 або 15 хв (час експозиції), у залежності від забруднення повітря. Потім їх закривають кришками, перекидають догори дном і розміщують в термостаті при температурі 37 °С, Підрахунок проводять візуально і з допомогою лупи.

Для розрахунку користуються формулою В.Л. Омелянського, згідно якої на поверхню чашки в 100 см² осідає протягом 5 хв стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л повітря. Кількість мікроорганізмів в 1 м³ – повітря:
 $x = \frac{a \times 100 \times 5 \times 100}{d \times T}$, де **a** - число колоній, що виростили у чашці Петрі;
d - площа чашки Петрі, см²; **T** - час осідання, хв; **100** - перерахунок площі чашки на 100 см²; **5** - експозиція чашки за Омелянським, хв; **100** - перерахунок на 1 м³.

Аспераційний метод ґрунтується на використанні апарату Кротова (рис. 3). Вентилятор обертається з частотою 4000-5000 об/хв. засмоктуючи повітря, яке надходить через клиноподібний отвір апарату і вдаряє о поверхню поживного середовища в чашці Петрі.

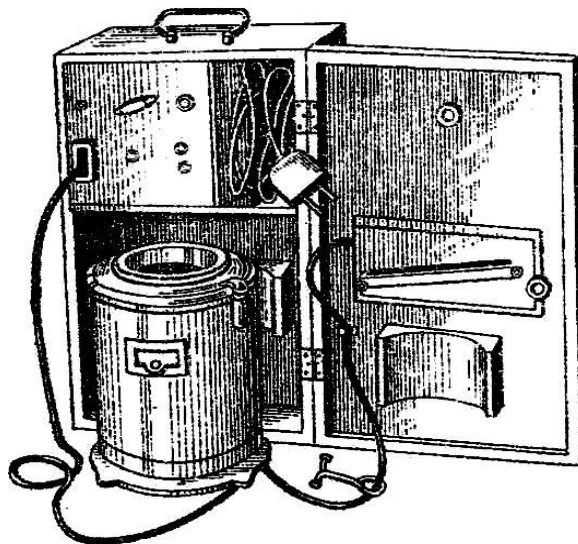


Рис. 3. Апарат Кротова для мікробіологічного дослідження повітря.

Повітря виходить із приладу через ротометр, градуйований в л/хв. Для рівномірного розподілу мікроорганізмів по поверхні середовища, диск із чашкою Петрі також обертається, але з частотою 60-100 об/хв. Протягом 1 хв через апарат проходить 25-50 л повітря. Засіяні чашки Петрі знімають і розміщують в термостатах при температурі 37°С для проростання. Повітря виробничих приміщень вважається чистим, якщо в ньому міститься не більше 500 мікроорганізмів в 1 мл.

Контрольні питання

1. Визначення Coli -титру ґрунту.
2. Визначення Coli-титру води.
3. Визначення Coli-індексу води.

4. Визначення кількості мікроорганізмів в повітрі використовуючи різні методи.
5. Седиментаційний метод визначення кількості мікроорганізмів в повітрі.

Практичне заняття № 7

Санітарно-гігієнічний контроль сировини та готової продукції основних харчових виробництв. Визначення ефективності дезінфекції виробничих процесів у харчовій промисловості.

Мета: вивчити мікрофлору тваринного організму.

Матеріали та обладнання: поживні середовища (МПА), дистильована вода, чашка Петрі, мірні піпетки, пробірки в штативах, сірники, водяна баня, термостат.

Нормальна мікрофлора тіла здорової людини і тварини (еумікробіоз) - сукупність мікробіоценозів усіх її біотопів. Найбільш чисельні мікробіоценози утворились на шкірі, в ротовій і носовій порожнинах, піхві, товстому кишечнику. Але внутрішнє середовище макроорганізму (кров, лімфа, тканини) не містить мікробів. Порівняно мало їх у бронхах, легенях, жовчних і сечовивідних шляхах, на слизовій ока.

Кількість і видовий склад мікрофлори залежить від виду, віку, статі, клімату, годівлі (режиму харчування), мікробіоценозів навколишнього середовища, зоогігієнічних та індивідуальних санітарно-гігієнічних навичок тощо. Особливу роль у змінах нормальних мікробіоценозів можуть відігравати антибіотики, інші хіміотерапевтичні та імунологічні препарати. Лікарям будь-якого профілю потрібно знати якісний і кількісний склад мікрофлори окремих біотопів, щоб раціонально призначати антимікробні препарати.

Організм людини і тварини населяють понад 500 видів бактерій, біля 50 видів вірусів і понад 20 видів найпростіших. Загальна кількість мікроорганізмів досягає 10^{14} , що в 10 разів більше, ніж всіх клітин макроорганізму.

Нормальна мікрофлора людини і тварини поділяється на дві групи:

1) **постійна** (резидентна), специфічна для даного біотопу (автохтонна, інди-генна);

2) **тимчасова**, занесена з інших біотопів хазяїна (алохтонна) або з інших біотопів довкілля (**заносна**).

Плід стерильний, поки знаходиться в утробі матері. Під час пологів він контамінується мікрофлорою статевих шляхів - лактобактеріями, стрептококами, кишковими паличками. Пізніше в організм новонародженого мікроби потрапляють із навколишнього середовища. Індивідуальна постійна мікрофлора формується з 10-12 доби. На слизових оболонках дитини з'являються нитчасті мікроорганізми, які своєю сіткою покривають поверхню. Величезна кількість мікроорганізмів у плівці розташовується не поодиноці, а у вигляді мікроколоній. Найбільшу товщину вона має на слизовій оболонці товстого кишечника, найменшу - на шкірі та в носовій порожнині.

Мікрофлора шкіри. Кількість мікроорганізмів, які населяють шкіру, досить велика (від 100/см² до 2,5 млн./см²). З поверхні всієї шкіри дорослої людини змивається біля 1,5 млрд. бактерій.

Мікрофлору шкіри поділяють на власну (постійну) і заносну. Найбільш характерними постійними мікробами шкіри є коринебактерії, пропіонібактерії, стафілококи, мікрококи, сарцини, актиноміцети, плісеневі й недосконалі гриби, мікобактерії. В окремих індивідуумів виявляють стрептококи, дріжджеподібні гриби *Candida*, спори аеробних бактерій та анаеробних клостридій та ін. Заносні мікроорганізми швидко гинуть під впливом бактерицидних властивостей шкіри або антагонізму автохтонних видів.

Основні місця проживання бактерій - роговий шар, протоки сальних і потових залоз та волосяні мішечки.

Визначення мікрофлори шкіри має велике практичне значення. Медики досліджують кількісний і якісний склад мікроорганізмів у хворих перед операціями, в динаміці лікування антибіотиками й гормональними препаратами. Часто обстежують мікрофлору шкіри рук медичного персоналу лікарень, дитячих закладів, працівників підприємств громадського харчування. На жаль у ветеринарній медицині цьому дослідженню поки що не приділяють належної уваги.

Мікрофлору вимені складають стафілококи, стрептококи, мікрококії, коринебактерії. Вим'я, кращий накопичувач мікробів і вони часто викликають у них мастити.

Мікрофлора ротової порожнини. Порожнина рота є унікальною екологічною системою для існування багатьох видів мікроорганізмів. Постійна температура, вологість, оптимальне значення рН, залишки вуглеводневих продуктів створюють сприятливі умови для їх розмноження. У перші години після народження дитини (тварини) бактерії колонізують слизову оболонку ротової порожнини, починають розмножуватись. У перші дні в слині новонароджених можна виявити стрептококи, молочнокислі бактерії, актиноміцети. Постійні бактерії з'являються при переході на звичайне харчування (годівлі).

Характер мікрофлори ротової порожнини у дорослих людей залежить від віку, режиму харчування та санітарно-гігієнічних навичок догляду за зубами. До її складу входять численні представники бактерій, грибів, найпростіших і вірусів.

Найчастіше ротову порожнину населяють різні види стрептококів (особливо *Streptococcus salivarius*, *S. raitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*), пептококів, вейлонел, бактероїдів, лактобактерій, лептотриксів, фузобактерій, актиноміцетів і спірохет. Рідше зустрічаються коринебактерії, вібріони, борелії, мікоплазми. У половини людей виявляють гриби роду *Candida*.

Аналогічна мікрофлора може виявлятися у ротовій порожнині тварин.

При певних умовах мікроорганізми ротової порожнини можуть викликати різні захворювання - карієс зубів, стоматит, гнійні запалення м'яких тканин щелеп - абсцеси та флегмони. При частому й нераціональному вживанні антибіотиків виникає кандидамікоз (молочниця).

Мікрофлора шлунку й кишок. Разом із водою та їжею у шлунок потрапляє багато мікроорганізмів, але більшість із них гине від дії соляної кислоти. У зв'язку з цим мікрофлора вмісту і слизової оболонки даного органа дуже бідна. Кількість бактерій не перевищує 10^3 в 1 мл. Це, в основному, спорові та лактобактерії, дріжджі, сарцини. Проникнення в шлунок і далі в кишечник патогенних організмів можливе лише при ослабленні його захисної функції.

Мікрофлора тонкої кишки в різних її ділянках неоднакова. У верхньому відділі, 12-палій кишці виявляють біфідо- та лактобактерії, ентерококи, гриби. Загальна кількість їх не перевищує 10^4 - 10^5 в 1 мл. У нижніх відділах мікрофлора дещо змінюється, стає більш чисельною, з'являються види, характерні для товстого кишечника.

Найбільш багата і важлива для організму мікрофлора товстої кишки (до 25^{10} в 1 г). Серед постійних представників мікробіоценозу домінують анаероби - біфідобактерії, бактероїди, лактобактерії, вейлонели, клостридії і пептококи. Вони складають 95-96 % усієї мікрофлори даного біотопу. Досить численні види і тимчасових мікробних популяцій: ентеро-бактерії, стафілококи, дифтероїди, ентерококи, спірили, гриби *Candida*, найпростіші, віруси. Мікрофлора товстого кишечника дуже важлива для людини. Вона підтримує її здоров'я.

Так у вмісті рубця близько 10% маси складають мікроорганізми. Це переважно збудники різних видів бродінь, зокрема целюлозолітичного (*Ruminococcus flavefacicus*, *R. albus*, *Cl. Cellolyticum* та ін.).

Поряд з сапрофітами у кишечнику людини і тварин можуть зустрічатись збудники правця, злоякісного набряку, некробактеріозу і ін., а також віруси, найпростіші тощо.

Мікрофлора дихальних шляхів. Переважна більшість мікроорганізмів вдиху-ваного повітря затримується в порожнині носа й гине. Постійна мікрофлора носа представлена дифтероїдами, стафілококами, нейсеріями, стрептококами, пептококами. У частини людей, особливо медичного персоналу, на слизовій носа постійно знаходять золотисті стафілококи, що треба розглядати як бактеріоносійство. На слизовій оболонці трахеї та бронхів дуже мало мікробів, а дрібні бронхи, альвеоли і тканина легенів стерильні. При ослабленні імунного стану людини і тварин, авітамінозах, переохолодженні власна мікрофлора може викликати гострі респіраторні захворювання, ангіну, бронхіт, ларингіт тощо.

Мікрофлора кон'юнктиви. У кон'юнктиві людини і тварини можуть знаходитись коринебактерії, стафілококи, стрептококи, нейсерії, гемофільні бактерії. При зниженні неспецифічної резистентності організму вони можуть спричинити запальні процеси слизової оболонки очей (кон'юнктивіти, блефарити тощо).

Мікрофлора сечостатевих органів. Паренхіма нирок, сечоводи та сеча у здорових людей і тварин вільні від мікробів. У зовнішній частині уретри зустрічаються пептококи, бактероїди, коринебактерії, кишкові палички. У тварин мікрофлора статевих органів подібна.

Значення нормальної мікрофлори. Нормальна мікрофлора тіла людини і тварин не випадкова. Вона сформувалась у процесі еволюції в мікробіоценози окремих біотопів і відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні організму, формуванні природного імунітету. Своєчасне формування мікробіоценозу і заселення грудних дітей біфідобактеріями має величезне значення не тільки для здоров'я новонароджених, а й для нормальної життєдіяльності дорослих людей. Мікробний антагонізм забезпечує **колонізаційну резистентність** - стійкість до заселення даного біотопу патогенними чи умовно-патогенними мікроорганізмами.

Окремі види нормальної мікрофлори синтезують і виділяють багато ферментів, гормонів, вітамінів. Численні ентеробактерії, насамперед *E. coli*, синтезують практично всі вітаміни групи В, вітаміни К, Е, іантотенову і фолієву кислоти, яких так потребує організм людини. Мікрофлора кишечника здатна розкладати складні органічні речовини і тим самим сприяє нормальному травленню.

Порушення нормальних екологічних взаємозв'язків між мікробіоценозами і макроорганізмом, значні зміни у самих біоценозах призводять до розвитку **дисбактеріозів**. **Дисбактеріоз** - кількісні та якісні порушення екологічного балансу між мікробними популяціями в складі мікрофлори. Його причини різні - нераціональне тривале вживання антибіотиків, пригнічення імунітету, вплив радіації, хронічні захворювання, перебування людей в екстремальних умовах тощо.

При певних умовах нормальна мікрофлора може призвести до розвитку сечокам'яної хвороби, виразкової хвороби шлунка, ревматизму, дерматитів, алергії і злоякісних пухлин.

Наука **гнотобіологія** - розділ експериментальної біології, який вивчає гнотобіотів, тобто безмікробних тварин. Гнотобіотів поділяють на кілька груп: 1) **монобіоти** - повністю безмікробні тварини; 2) **дубіоти** - тварини, заражені одним видом бактерій; 3) **полібіоти** - тварини, які мають два й більше видів мікроорганізмів.

Гнотобіологія дає змогу вивчати роль окремих видів нормальної мікрофлори в процесі синтезу вітамінів, амінокислот, розвитку інфекції, у формуванні вродженого і набутого імунітету.

Дослідження мікрофлори шкіри людини методом відбитків

Мікрофлору поверхні шкіри людини можна дослідити методом змивів і методом відбитків. При використанні першого методу стерильною ватою, змоченою стерильним фізіологічним розчином, протирають поверхню шкіри, нігті, потім вату переносять у пробірку з напіврідким живильним середовищем, ретельно перемішують, і через годину невеликий об'єм такої суспензії з додержанням умов стерильності переносять на тверде живильне середовище у чашках Петрі. Чашки витримують протягом доби у термостаті при температурі 36°C, а потім – іще 2-3 доби витримують при кімнатній температурі. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище МПА.

2. Із додержанням стерильності приблизно 10 мл охолодженого до 40- 45°C МПА внести у стерильну чашку Петрі та залишити до повного застигання.

3. Із додержанням стерильності легко притиснути палець до поверхні агарової пластинки у чашці Петрі.

4. Засіяні таким чином чашки Петрі поставити у термостат при температурі 35-36 °С.

5. На наступному лабораторному занятті дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів, які вирости на МПА у чашках Петрі.

Контрольні питання

1. Мікрофлора шкіри.
2. Мікрофлора ротової порожнини.
3. Мікрофлора шлунку й кишок.
4. Мікрофлора дихальних шляхів.
5. Значення нормальної мікрофлори.

Практичне заняття № 8

Проведення посіву на рідкі і густі поживні середовища молочнокислих і пропіоновокислих бактерій. Вивчення їх морфологічних, культуральних та біологічних властивостей.

Мета заняття. Вивчити морфологічну будову та основні властивості молочнокислих бактерій (лактококів та лактобактерій).

Завдання: 1. Виготовити препарати для мікроскопії молочнокислих бактерій, пофарбувати їх та провести мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів молочнокислих бактерій). Замалювати побачене.

2. Вивчити основні властивості молочнокислих бактерій (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, здатність зброджувати молоко, утворювати СО₂ та ароматичні речовини, тощо).

Обладнання та матеріали: Світловий мікроскоп, закваски із молочнокислих бактерій (або кисломолочні продукти: кисле молоко, сметана, кефір, ряжанка, тощо), предметні скельця, бактеріологічна петля, фізрозчин, набори фарб для виготовлення препаратів для мікроскопії або готові пофарбовані препарати молочнокислих бактерій, імерсійне масло. Чашки Петрі з середовищами (молочний агар та агар з гідролізованим молоком), пробірки з стерильним молоком.

Довідковий матеріал.

Молочнокислі бактерії - це специфічна група мікроорганізмів, що обумовлюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів (цукрів) до молочної кислоти. Поряд з основним продуктом бродіння — молочною кислотою — утворюються побічні продукти: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, етиловий спирт і ін.

До молочнокислих бактерій відносять молочнокислі стрептококи

(лактококи та лейконостоки) та молочнокислі палички (лактобактерії).

Вони в свою чергу поділяються на гомоферментативні та гетероферментативні (або ароматоутворюючі) бактерії.

гомоферментативні бактерії - це ті бактерії, які при розщепленні відповідних вуглеводівмолока дають головним чином молочну кислоту із залишками інших продуктів розпаду:

До **гомоферментативних лактококів** відносять молочнокислий стрептокок

Lactococcus lactis і вершковий стрептокок *Lactococcus cremoris*.

До**гетероферментативних лактококів** відносять *Lactococcus diacetylactis* *Lactococcus acetoinicus*.

Проміжне положення між гомо- і гетероферментативними стрептококами займає термофільний стрептокок *Streptococcus thermophilus*.

До **гомоферментативних лактобактерій** відносять мікроорганізми родів *Thermobacterium* (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*) та *Streptobacterium* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus (casei)*), а до **гетероферментативних лактобактерій** – роду мікроорганізми *Betabacterium* (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*). За відношенням до температурних режимів культивування молочнокислі бактерії поділяються на мезофільні, для яких оптимальна температура росту складає від 20 до 30°C та термофільні - оптимальна температура росту яких 40- 45°C наведена в таблиці.

Мезофільні і термофільні молочнокислі мікроорганізми

Мезофільні молочнокислі мікроорганізми		Термофільні молочнокислі мікроорганізми	
Лактококи	Лактобактерії	Лактококи	Лактобактерії
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus (casei)</i>		<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>		<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus buchneri</i>		<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>		
	<i>Leuconostoc cremoris</i>		
	<i>Leuconostoc dextranicum</i>		
	<i>Leuconostoc lactis</i>		

Природнім місцем існування молочнокислих мікроорганізмів є рослини, шлунково-кишковий тракт, молоко та молочні продукти.

Молочнокислі стрептококи (лактококита лейконоостоки).

Морфологія. Клітини *Lactococcus lactis* (молочний стрептокок) овальної форми, які у молодих культур розміщені у вигляді **коротких** ланцюжків (від двох до шести), а у старих - попарно. *Lactococcus cremoris*-(вершковий стрептокок) на відміну від молочного стрептококу утворює довгі ланцюжки з округлих клітин. Клітини гетероферментативних стрептококів *Lactococcus diacetylactis* та *Lactococcus acetoinicus* мають округлу форму, проте за розмірами дещо менші від *Lactococcus lactis* і розміщені в ланцюжках. Клітини термофільного стрептококу *Streptococcus thermophilus* найбільші за клітини інших молочнокислих стрептококів і розміщуються довгих ланцюжках.

Всі лактококи нерухливі, спор та капсул не утворюють, по Граму фарбуються позитивно.

Культуральні властивості. Лактококи - факультативні анаероби, тобто ростуть не тільки в анаеробних умовах (безкисневих), але і при доступі молекулярного кисню. Оптимальна температура для їх росту 25 - 30°C, окрім стрептококу *Streptococcus thermophilus*- 40 - 45°C.

Не ростуть на звичайних живильних середовищах (МПА Молочнокислі стрептококи культивують на знежиреному стерильному молоці або на щільному і рідкому штучному живильному середовищі з використанням гідролізованого молока, молочної сироватки та інших живильних речовин, отриманих з молока.

На щільних живильних середовищах мікроорганізми утворюють округлі та чечевицеподібні колонії. Округлі росинчасті колонії з рівним краєм утворюються на поверхні середовища, а чечевицеподібні чи човникоподібні колонії вростають в агар.

Lactococcus lactise активним кислотоутворювачем, тому молоко сквашується протягом 6-10 годин, з кислотністю 120°Т. Сквашене молоко має рівний щільний згусток та приємний кислуватий запах і смак. Деякі штами молочного стрептококу утворюють згусток в'язкої, тягучої консистенції, тому є непридатними для виробництва кисломолочних продуктів.

Lactococcus cremoris сквашує молоко протягом 8-12 годин, з кислотністю 110- 115°Т. При сквашуванні молока згусток має сметаноподібну консистенцію та кислуватий запах і смак, тому його використовують до складу заквасок при виробництві тих продуктів, де необхідно досягти в'язкої консистенції та помірного кислотоутворення (сметана, кисломолочний сир, тощо). При розмноженні вершкового стрептокока в молоці утворюється слиз.

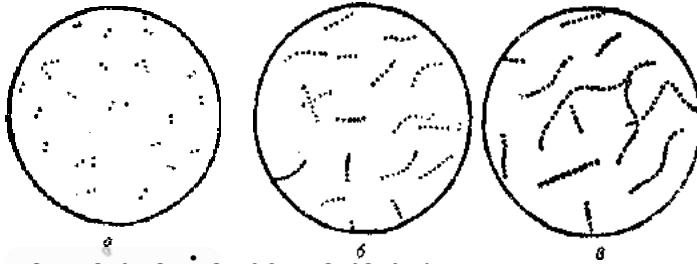
Lactococcus diacetylactis сквашує молоко від 10 годин до 2 діб, з кислотністю 70 - 100°Т і при цьому виділяє велику кількість летючих кислот (оцтову, пропіонову) та ароматичних речовин (деацетилену та ефірів). При сквашуванні молока згусток має рівну, щільну консистенцію з незначними пухирцями газу. Запах та смак його слабкий приємно кислуватий.

Саме тому він має промислове значення та входить до складу заквасок для кисломолочного сиру, сметани, кислого молока, масла і сирів.

Streptococcus thermophilus при оптимальній температурі (40-45°C) розвитку згортає молоко за 3,5-6 годин з граничною кислотністю 110 120°Т, утворюючи рівний щільний згусток сметаноподібної чи в'язкої тягучої консистенції з

приємним кисломолочним смаком та запахом. Деякі штами цього мікроорганізму виділяють діацетил.

Термофільний стрептокок разом із *Lactobacillus bulgaricus* використовують для виготовлення йогурту та в якості компонента культури для приготування ементальського сиру, сметани та кисломолочного сиру прискореним методом. *Streptococcus thermophilus* чутливий до пеніциліну та інших антибіотиків і тому його використовують в якості тест-культури для біологічного виявлення антибіотиків в молоці.



Молочнокислі стрептококи:

a - *Lactococcus lactis*, б - *Lactococcus*

Представники роду *Leuconostoc* морфологічно подібні до лактококів сферичної форми грам-позитивні, не спороутворюючі, не рухливі мікроорганізми, які з'єднуються попарно чи в ланцюжки, які переплітаються. Більш істотні представники цього роду утворюють капсули, тому при їх розвитку на живильних середовищах утворюється слиз.

Лейконостоки факультативні анаероби, ростуть на середовищах при температурі 20 - 30°C. У порівнянні з лактококами, лейконостоки є більш вибагливими до поживних середовищ і потребують додавання до них чи до молока в якому вони розвиваються стимуляторів росту (амінокислот, біотину, дріжджового екстракту).

На щільних живильних середовищах утворюють дрібні (менше 1 мм) гладкі круглі сіруваті колонії. Зброджують глюкозу та інші вуглеводи з виділенням молочної кислоти.

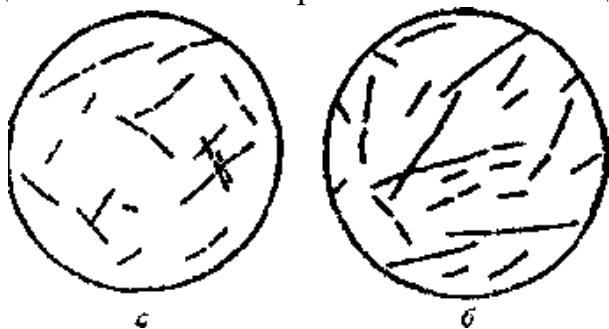
Із роду *Leuconostoc* тільки *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactista* та *Leuconostoc dextranicum* використовуються в молочній промисловості для ароматоутворення при виробництві кисловершкового масла, сирів, рідше молочних напоїв, сметани, кисломолочного сиру, так як ці організми — розщеплюють лимонну кислоту з утворенням діацетилю, що надає продуктам приємного смаку та аромату.

Молочнокислі палички (лактобактерії)

Молочнокислі палички відносять до роду *Lactobacillales*, роду *Lactobacterium*, який включає три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бета-бактерії). До термобактерій відносять 8 видів паличок, серед яких найбільш часто застосовують *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*. Підрід стрептобактерії включає 7 видів, серед

яких у молочній промисловості використовують *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* (*casei*) У підрід бета-бактерій входять 11 видів паличок, найбільш вивченими серед них є *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*.

Морфологія. Лактобактерії це палички, які розміщуються поодинокі, попарно чи короткими ланцюжками, розміром 4 - 10 x 0,5 - 0,6 мкм. Вони нерухомі, спор і капсул не утворюють, Грампозитивні. Клітини стрептобактерії дещо дрібніші за клітини термобактерій і часом розміщуються у вигляді ланцюжків. Бета-бактерії мають найбільш дрібні і тонкі клітини.



Молочнокислі палички:

a — болгарська паличка; *b* — ацидофільна паличка

Культуральні властивості. Молочнокислі палички є факультативними анаеробами. Стосовно температури стрептобактерії і бета-бактерії є мезофілами, термобактерії — термофілами. На звичайних живильних середовищах вони не ростуть, тому для їх культивування додають молоко (стерильне чи **гідролізоване**). На щільних живильних середовищах формують дрібні гладкі блискучі колонії сферичної форми сіробілого кольору. Колонії лактобактерій різних видів майже **не** різняться, проте є R-форми колоній (дрібні з шорохатою поверхнею колонії, що врастають у субстрат) та S-форми (гладкі, великі поверхневі колонії).

Контрольні питання

1. Що відносять до молочнокислих бактерій.
2. Що таке гомоферментативні гетероферментативні молочнокислі бактерії.
3. Наведіть представників кожної групи.
4. Перерахуйте представників лактококів. Які їх основні характеристики.
5. Назвіть представників лактобактерій. Які їх основні характеристики.
6. Наведіть приклади використання молочнокислих бактерій в молочній та інших промисловостях.
7. Яка роль молочнокислих бактерій у формуванні якості молочних продуктів.

Практичне заняття № 9

Проведення посіву на рідкі та густі поживні середовища маслянокислих, гнилослих бактерій, плісняви. Вивчення морфологічних та культуральних біохімічних властивостей.

Мета заняття. Ознайомитись з морфологічною будовою та основними властивостями мікроорганізмів, що викликають псування молока та молочних продуктів.

Завдання: 1. Виготовити препарати для мікроскопії із культур збудників псування молока та молочних продуктів, отриманих на живильних середовищах, пофарбувати їх по Граму та провести мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів). Замалювати побачене.

2. Ознайомитись з основними властивостями мікроорганізмів, що викликають псування молока та молочних продуктів (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, відношення до O₂, здатність зброджувати молоко).

Обладнання та матеріали: Світловий мікроскоп, культури збудників псування молока та молочних продуктів, отриманих на МПА, МПБ, агарі з молоком чи на стерильному молоці, предметні скельця, бактеріологічна петля, фізрозчин, набір фарб для фарбування по Граму або готові пофарбовані препарати для мікроскопії, імерсійне масло.

Довідковий матеріал.

До мікроорганізмів, які викликають псування чи вади молока та молочних продуктів відносять: маслянокислі бактерії, гнилісні бактерії, деякі види дріжджів та плісняві гриби, бактеріофаги.

За характером дії на складові частини молока шкідливі мікроорганізми умовнорозділяються на три підгрупи: 1 які діють переважно на молочний цукор і солі молочної кислоти (маслянокислі бактерії); 2. Які викликають розщеплення білків (гнильні бактерії); 3. які розщеплюють молочний жир гнилісні пігментоутворюючі бактерії).

Маслянокислі бактерії відносять до роду *Clostridium*, серед технічно небажаними в молочній промисловості є *Clostridium perfringens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*. Вони є збудниками маслянокислого бродіння, У результаті якого молочний цукор і солі молочної кислоти (лактати) розщеплюються з утворенням масляної та інших кислот і спиртів.



глюкоза масляна кислота

Маслянокислі бактерії - це ґрунтові мікроорганізми, тому потрапляють в молоко частинками ґрунту, навозу та кормів. В результаті надмірного газоутворення, викликають здуття сиру у другій половині дозрівання. Маслянокисле бродіння іноді відбувається в молоці, й інших молочних продуктах причому ці продукти здобувають прогірклий смак і неприємний запах. Результатом розвитку маслянокислих бактерій є також бомбаж жестянобаночних консервів.

Морфологія Маслянокислі бактерії це Грам позитивні великі палички циліндричної форми, розміром 5 — 2 на 0,5 - 1,5 мкм, рухливі до моменту спороутворення. Капсул не утворюють, завдяки наявності спор, які розміщені термінально та субтермінально, клітини мають вигляді веретина, булави, ракетки або ложки.

Культурально-біохімічні властивості. Маслянокислі бактерії є строгими анаеробами - ростуть і розмножуються лише без доступу кисню. Оптимальна температура розвитку 30—35°C, але температурні межі росту 8— 45°C. На рідкому середовищі (середовище Кітта-Тароцці) викликають помутніння з утворенням великої кількості газу та запахом масляної кислоти. Спори витримують кип'ятіння протягом 2—3 хв, а при пастеризації не гинуть. **Гнилісні (протеолітичні) бактерії** є основними збудниками псування молочних продуктів, так як викликають глибокий розпад білків. Спочатку ці мікроорганізми згортають молоко, завдяки продукуванню сичужного ферменту, а потім розщеплюють його до пептонів та поліпептидів. В молоці та молочних продуктах викликають вади кольору (темні п'ятна на поверхні сирів), смаку (гіркий, прогірклий, нечистий).

Гнилісні бактерії мають дуже широке поширення і зустрічаються в ґрунті, воді, повітрі, кишечнику людини і тварини, на харчових продуктах.

По відношенню до кисню гнилісні бактерії поділяють на три підгрупи: аероби, факультативні та строгі анаероби. Крім того, гнилісні мікроорганізми є спороутворюючі та безспорові.

Спороутворюючі гнилісні аероби

В молоці та молочних продуктах найчастіше зустрічаються *Bacillus subtilis* (сінна паличка), *Bacillus megatherium* (капустяна паличка), *Bacillus mycoides* (грибоподібна паличка), *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка) і *Bacillus cereus*. Спороутворюючі гнилісні аеробні мікроорганізми викликають вади молочних продуктів (прогірклий та гіркий смак) та викликають передчасне згортання молока без підвищення кислотності.

Морфологія. Це Грампозитивні, рухливі палички із заокругленими кінцями, що утворюють термостійкі спори. В залежності від вид розміщуються поодинокі, попарно чи в ланцюжках.

Культуральні властивості. Строгі анаероби, тому добре ростуть на звичайних живильних середовищах (МПА, МПБ).

На поверхні МПБ *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus* формують білового кольору зморшкувату плівку, бульйон залишається прозорим. Інші представники аеробних гнилісних бактерій викликають помутніння бульйону різного ступеню з незначним осадом.

На МПА *Bacillus subtilis* формує сухі бугристі колонії сіруватого кольору з нерівними краями, *Bacillus megatherium* - матові колонії з гладкою поверхнею та рівними краями, *Bacillus mesentericus* - сухі сіро-білі колонії з хвилястим краєм та радіальними складками, *Bacillus mycoides* - коренеподібні сіро-білого кольору колоній, що нагадують міцелій гриба, *Bacillus cereus* - великі колонії з бахромчатим краєм.

Неспороутворюючі гnilісні аероби

Ця група гnilісних мікроорганізмів представлені сімейством *Enterobacteriaceae* родами *Proteus* {*Proteus vulgaris* і *Proteus mirabilis*} та *Escherichia* (*Escherichia coli*).

Морфологія. Це Грамнегативні, безспорові палички, які розміщуються поодинокі. Капсул не утворюють.

Культуральні властивості. Оптимальна температура для росту мікроорганізмів 25 - 37°C. Мікроорганізми роду *Proteus* при розвитку на щільних живильних середовищах утворюють характерний повзучий ріст, внаслідок чого поверхня середовищ повністю покривається тонким прозорим слоєм. На МПБ

викликають рясне помутніння бульйону та появу плівки. *Escherichia coli* на МПА - утворює росинчасті напівпрозорі колонії, на МПБ - росте у вигляді помутніння середовища.

Неспороутворюючі гnilісні пігментоутворюючі мікроорганізми

Це бактерії видів *Pseudomonas fluorescens* (флюоресцююча паличка), *Pseudomonas aeruginosa* (синегнійна паличка), *Serratia marcescens* (чудова паличка). Викликають вади кольору, консистенції, запаху, смаку молочних продуктів, обумовлене розщепленням жиру, при довготривалому їх зберіганні в охоложеному стані (в холодильнику, холодильних камерах). У молоко частіше попадають із залишками води.

Морфологія. Це Грамнегативні рухливі палички, спор та капсул не утворюють. Розміщуються поодинокі.

Спороутворюючі гnilісні анаероби

Представлені мікроорганізмами роду *Clostridium* (*Clostridium perfringens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*), які також викликають маслянокисле бродіння. (Рис. 14, д, е, ж).

Крім того, що клостридії викликають маслянокисле бродіння в молочних продуктах, вони також є збудниками анаеробного гниття тобто розпаду білку в анаеробних умовах, тим самим викликають вади смаку, запаху та консистенції молочних продуктів. Так, при розвитку клостридій в сирах викликають їх пізні спучування: сир набуває неправильного щелевидного малюнку, розм'якшену, губчасту консистенцію неприємний салістий запах.

Контрольні питання

1. Назвіть мікроорганізми, що викликають псування молока та молочних продуктів.
2. Перерахуйте місця існування та джерела потраплянь мікроорганізмів псування в молоко та молочні продукти.
3. Які морфологічні та культуральні властивості маслянокислих бактерій.
4. Які морфологічні та культуральні властивості гnilісних бактерій.
5. Яка роль молочнокислих бактерій у формуванні якості молочних продуктів.

Практичне заняття № 10

Мікробіологічне дослідження сирого молока

Мета заняття. Ознайомитись з методикою визначення бактеріальної забрудненості сирого молока за редуктазною пробою (з метиленовим блакитним та з резазурином).

Завдання. 1. Ознайомитись із схемою мікробіологічного дослідження сирого молока.

Навчитись проводити відбір проб сирого молока та готувати їх для дослідження.

Визначити бактеріальну забрудненість сирого молока за редуктазною пробою (з метиленовим блакитним та з резазурином).

Обладнання та матеріали. Проби сирого молока, пробірки, піпетки, редуктазник або водяна баня, термометри, мірні циліндри на 100 та 200 х робочі розчин реактивів.

Довідковий матеріал.

Основним джерелом потрапляння мікробів у молоко є вим'я, шкірний покрив тварин, руки операторів, посуд, повітря. У процесі зберігання молока мікроорганізми змінюють його властивості. Отже бактеріальна забрудненість молока є важливим показником, який характеризує умови отримання та його санітарну якість.

Загальні правила відбирання проб сирого молока для мікробіологічного контролю проводять згідно ДСТУ ISO 707:1997, ДСТУ ISO 2859-1, ГОСТ 26809 та ГОСТ 13928 (назви дивись в списку нормативних посилань).

1. Відбирання проб для мікробіологічних досліджень повинна завжди проводити особа, що має досвід у застосуванні методики відбирання проб для алогічних досліджень. Ця особа не повинна хворіти будь яким інфекційним захворюванням.

2. Відібрана проба повинна буди достовірною, та не зазнати пошкоджень та забруднення під час зберігання та\або транспортування.

3. Слід відбирати паралельні проби і зберігати їх на випадок проведення арбітражу.

4. Проби для мікробіологічного контролювання відбирають у стерильний посуд, використовуючи стерильне приладдя та накривають стерильними накривками.

5. Обладнання з відбирання проб повинно бути виготовлене з нержавіючої сталі або іншого придатного матеріалу відповідної міцності, який не буде викликати змін у пробі, які зможуть вплинути на результати дослідження. Усі поверхні повинні бути гладкі і вільні від тріщин. Усі кути повинні бути заокруглені. Не дозволено застосовувати несправне, забруднене приладдя. Перед використанням обладнання повинне бути сухим.

6. Стерилізацію приладдя проводять такими методами:

- витримуванням в сушильній шафі за температури 170-175°C упродовж 2±0,5 год;

- витримуванням в автоклаві за температури $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ не менше, ніж 20хв.

- витримуванням упродовж 1-2 сек усіх робочих поверхонь обладнання в полум'ї спиртівки або газового пальника;

- зануренням у розчин етанолу концентрацією не менше 70 %;

- зануренням у етанол концентрацією 96 % та наступним фламбуванням.

7. Перемішування сирого молока перед відбиранням проб проводять мутовками ручними або механічними.

8. Відбір проб проводять відбірником, черпаком, металевую трубкою які кожного разу перед використанням повинні бути простерилізовані.

9. З точкових проб, відібраних з кожної фляги, відра, цистерни, баку готують об'єднану пробу. Кількість об'єднаної проби повинна бути не меншою ніж 100 см³.

10. Відібрані проби молока забезпечують етикеткою, на якій помічають номер проби, номер та обсяг партії, дату та час відбирання проби, посаду та підпис особи, що відбирала пробу;

11. Мікробіологічне контролювання продукту виконують не пізніше, ніж через 4 години з моменту відбирання проби.

До початку контролювання пробу зберігають у холодильнику за температури не вище 6°C . Проби продукту повинні бути доставлені в лабораторію не пізніше ніж через 2 год після їх відбирання.

Визначення бактеріальної забрудненості сирого молока за редуктазними пробами. Визначення бактеріальної забрудненості молока проводять методами визначення редуктази. **Редуктаза** - це фермент, який виробляють мікроорганізми і редуктазні методи базуються на здатності нього ферменту знебарвлювати (метиленовий блакитний) чи змінювати колір (резазурин) фарбників. Чим швидше відбувається знебарвлення чи зміна кольору фарбника тим більше в дослідній пробі молока редуктази та мікроорганізмів які її продукують. І тим самим низька якість молока.

Визначення бактеріальної забрудненості молока методами визначення редуктази можуть проводити двома методами: з метиленовим блакитним чи резазурином.

Метод визначення редуктази з метиленовим синім.

Сутність методу. Метод заснований на відновленні метиленового синього окислювально-відновлювальними ферментами, що виділяють в молоко мікроорганізми. По тривалості знебарвлення метиленового синього оцінюють бактеріальну забрудненість сирого молока.

Проведення аналізу. Визначити якість молока за редуктазною пробую можна стандартним або прискореним методом.

Стандартний метод. У пробірки наливають по 1 мл робочого розчину метиленового блакитного і 20 мл досліджуваного молока і змішують шляхом триразового перевертання пробірок. Пробірки вміщують у редуктазник або на водяну баню з термометром з температурою води $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Вода в редуказнику або у водяній бані після занурення пробірок з молоком повинна доходити до рівня рідини в пробірці або бути трохи вище. Температуру води необхідно підтримувати на рівні $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Момент занурення пробірок у редуказник вважають початком аналізу. Спостереження за зміною забарвлення ведуть через 30 хв, через 2 години, 5 годин та більше після початку аналізу.

Закінченням аналізу вважають момент знебарвлення молока. При цьому залишається невеликий кільцеподібний зафарбований шар зверху (близько 1 см) або невелика зафарбована частина внизу пробірки, та на це не зважають. Появу забарвлення молока в цих пробірках при струшуванні не враховують. Залежно від часу знебарвлення молоко відносять до одного із 4 гатунків.

Прискорений метод. В пробірки відміряють 10 мл молока і нагрівають до $38-40^\circ\text{C}$ у водяній бані чи редуказнику. В нагріте молоко додають метиленового блакитного, приготовленого аналогічно стандартному але розведеного в 10 разів (1 мл робочого розчину, який застосовують у стандартному методі, розводять 9 мл дистильованої води).

Розчин готують перед постановкою проби).

Закінченням аналізу вважають момент знебарвлення молока. Залежно від часу у знебарвлення вмісту пробірки визначають клас і якість молока.

Обробка результатів. Гатунок та орієнтовну кількість мікроорганізмів в сирому молоці встановлюють у відповідності з таблицею.

Критерії визначення класу молока за редуказною пробою з метиленовим синім

Гатунок молока	Тривалість знебарвлення, год.	Орієнтовна кількість бактерій в 1 см^3 молока, КУО
Екстра	Від 5 годин і більше	До 100 тис.
Вищий	Від 2 год. до 5 год	До 300 тис.
Перший	Від 30 хв. до 2 год	До 500 тис.
Другий	До 30 хв.	До 3 млн.

Метод визначення редуктази з резаурином.

Сутність методу. Метод заснований на відновленні резаурину окислювально-відновлювальними ферментами, що виділяють в молоко мікроорганізми. По тривалості зміни забарвлення резаурину оцінюють бактеріальну обсімененість сирого молока.

Проведення аналізу. Пробу з резаурином варто проводити не раніше ніж через 2 год. після доїння. У пробірки наливають по 1 см^3 робочого розчину резаурину і по 10 см^3 досліджуваного молока, закривають гумовими пробками і змішують шляхом повільного триразового перевертання пробірок. Пробірки поміщають у редуказник з температурою $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

При відсутності редуказника можна використовувати водяну баню, помещену в термостат з температурою $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Вода в редуказнику або

водяній бані після занурення пробірок з молоком повинна доходити до рівня рідини в пробірці або бути трохи вище, її підтримують протягом усього часу визначення $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Пробірки з молоком і резазурином протягом аналізу повинні бути захищені від світла прямих сонячних променів (редуктазник повинний бути щільно закритий кришкою).

Час занурення пробірок у редуктазник вважають початком аналізу. Показання знімають через 1 год. та 1,5 год.

Появу забарвлення молока в цих пробірках при струшуванні не враховують. Через 1 год пробірки дістають із редуктазника або іншого обладнання. Пробірки з молоком, які мають забарвлення від сіро-бузкового до бузкового зі слабким сірим відтінком, залишають у редуктазнику ще на 30хв.

Обробка результатів. В залежності від тривалості знебарвлення або зміни кольору молоко відносять до одного з чотирьох гатунків, зазначених у таблиці.

Рівень бактеріального забруднення молока за резазуриною пробою.

<u>Гатунок молока</u>	<u>Тривалість знебарвлення чи зміни кольору, год</u>	<u>Забарвлення молока</u>	<u>Орієнтована кількість бактерій у 1 см³ молока. КУО</u>
<u>екстра</u>	<u>більше 3,5</u>	<u>Сіро-бузкове до бузкового зі слабким сірим відтінком</u>	<u>до 100 тис.</u>
<u>вищий</u>	<u>3,5</u>	<u>Сіро-бузкове до бузкового зі слабким сірим відтінком</u>	<u>до 300 тис.</u>
<u>перший</u>	<u>2,5</u>	<u>Бузкове з рожевим відтінком або яскраво-рожеве</u>	<u>до 500 тис.</u>

Контрольні питання

1. Як відбирають проби сирого молока для мікробіологічного дослідження.
2. Як відібрані проби молока готують до дослідження.
3. Які методи використовують для визначення бактеріальної забрудненості молока.
4. Яка суть методів визначення редуктази з метиленовим блакитним тарезазурином.
5. Як проводять оцінку сирого молока за методом визначення редуктази з метиленовим блакитним.
6. Як проводять оцінку сирого молока за методом визначення редуктази з резазурином.

Практичне заняття № 11

Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів.

Мета заняття: Ознайомитись із схемою та методами мікробіологічного дослідження кисломолочних продуктів.

Завдання:1. Вивчити основні принципи вибору та підготовки проб кисломолочних продуктів для мікробіологічного дослідження.

Ознайомитись з методами визначення загальної кількості бактерій в кисломолочних продуктах.

Ознайомитись з вимогами до кисломолочних продуктів за мікробіологічними показниками згідно нормативних документів.

Обладнання та матеріали. Кефір, ряжанка, йогурт, кисломолочний сир та інші кисломолочні продукти, термостат, стерильні шпатели, ножі, колби, пробірки, чашки Петрі з середовищами (Ендо, МПА, Сабуро), пробірки з середовищем Кеслера, стерильний фізрозчин, піпетки, штативи.

Довідковий матеріал.

Проби для мікробіологічних аналізів відбирають у стерильний посуд за допомогою стерильних пристосувань. Відбір проб і перемішування продукту перед відбором роблять відбірником, черпаком, ложкою, металевою трубкою, щупом, шпателем або іншим відповідним пристосуванням, що кожен раз перед використанням повинні бути простерилізовані фламбуванням або в автоклаві.

Рідкі кисломолочні продукти (ряжанка, йогурт, кефір *тощо*) в споживному пакуванні перемішують перевертаючи пакування не менше 5 раз, а густіші (сметана) перемішують упродовж 1 хв шпателем, ложкою після з викривання пакування. Поверхню споживчого пакування перед відкриттям необхідно знезаразити спиртом. Всі відібрані пакування відкривають і продукт одного виду зливають у одну ємність, отримуючи об'єднану пробу.

Кисломолочний сир, сиркові вироби, сирні маси не фасовані з транспортного пакування, верхній шар від 2 до 3 см продукту відкидають, пробу беруть щупом на відстані від 3 до 5 см від краю, спрямовуючи щуп під кутом до протилежного боку і занурюючи його на $\frac{3}{4}$ довжини. Щуп обертають один повний оберт і виймають разом із стовпчиком продукту. Із стовпчика продукт відбирають стерильним шпателем чи ножем від 15 до 20 г продукту і готують об'єднану пробу шляхом перемішування точкових проб в стерильній посудині. Залишки продукту використовують для закриття отвору, що утворився після відбору проби.

Із об'єднаних проб готують пробу для лабораторного дослідження, яка повинна становити не менше ніж 200см^3 (рідкі кисломолочні продукти) або не менше ніж 200 г (кисломолочний сир).

Посуду із пробою або пробі в споживчій тарі необхідна етикетка, на якій указують:

- номер проби;
- найменування і сорт продукту (при наявності);

- номер і обсяг партії;
- день і година відбору проби;
- посада і підпис особи, що відібрала пробу;
- позначення нормативно-технічної документації, по якій вироблявся продукт.

Мікробіологічні аналізи продукту проводять не більш, ніж через 4 год. з моменту відбору проб. Проби повинні зберігатися і транспортуватися до початку дослідження в умовах, що забезпечують температуру продуктів не вище 6°C, не допускаючи підморожування.

Підготовка проб до дослідження

Кисломолочні напої та сметана

Відібрані проби перед дослідженням перемішують і нейтралізують. Для цього відбирають стерильною піпеткою 10см³ досліджуваного продукту в стерильну пробірку або колбочку і додають 1см³ стерильного розчину двовуглекислого натрію з масовою концентрацією 100 г/дм³, вміст перемішують.

Кисломолочний сир та сиркові вироби

10 г кисломолочного сиру або сиркових виробів зважують на стерильному склі, чашці Петрі, у бюксі, переносять у стерильну або проофламбовану ступку, прикриту кришкою від чашки Петрі, і ретельно розтирають.

Приготування розведення продуктів для посіву.

Перед посівом готують десятикратні розведення продукту в стерильних розчинах хлористого натрію, лимоннокислого натрію (для сирів) фосфатного буфера. Для приготування розведень готують усі необхідні стерильні матеріали і посуд у відповідності зі специфікою аналізу досліджуваного продукту: пробірки з 9 см³ або колби з 90 см³ розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера.

З проб сметани, кисломолочних напоїв відбирають стерильною піпеткою 10 см³ і вносять у 90см³ стерильних розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера. Одержують розведення 1:10.

До приготовлених наважок кисломолочного сиру або сиркових виробів по 10 г додають 90 см³ стерильних розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера, підігрітих до 40-45°C, і збовтують протягом 3-5 хв. до можливо більш повного емульгування. Одержують розведення 1:10.

З першого розведення 1:10 готують наступні 1:100 і т.д.

Для приготування кожного розведення беруть нову стерильну піпетку. При посіві на чашки Петрі посівний матеріал вносять від більшого розведення та до меншого. У цьому випадку користуються одною піпеткою.

В кисломолочних продуктах визначають :

- загальну кількість бактерій (чашковий метод)
- визначають кількість БГКТ (посів на середовище Кеслер)
- визначають патогенні мікроорганізми в тому числі сальмонели середовище ЕНДО).

-визначають наявність пліснявих грибів та дріжджів (на сусло агар чи агар Сабура).

Мікроскопія мазків

Для приготування препарату на чисте предметне скло наносять петлею невелику краплю досліджуваного матеріалу і розподіляють на площі близько 1см². При дослідженні сиру і сирних виробів на скло наносять краплю води, вводять у неї петлею продукт, ретельно перемішують і розтирають на площі 1см². Препарат висушують при кімнатній температурі, фіксують на полум'ї пальника і фарбують метиленовим блакитним.

Орієнтований склад мікрофлори досліджуваних продуктів по мікроскопічній картині визначають по таблиці.

Орієнтований склад мікрофлори кисломолочних продуктів

Найменування	Орієнтовний склад мікрофлори
Сир, сметана, сир домашній, простокваша звичайна	Молочнокислі стрептококи
Ацидофільне молоко, ацидофільна паста	Молочнокислі палички
Ацидофільно-дрожжеве молоко, ацидофільно-дрожжевий напій, кумис	Молочнокислі палички, дріжджі.
Простокваша Мечніковська, південна йогурт, скотини дієтичні, сметана ацидофільна, варинець	Молочнокислі стрептококки та палички
Ацидофілін	Молочнокислі стрептококки та палички, можливі дріжджі
Кефір	Молочнокислі стрептококки та палички, одиничні дріжджі

Бактеріальна забрудненість кисломолочних продуктів є важливим показником, який характеризує їх санітарну якість та умови одержання. Оцінку за бактеріальною забрудненістю проводять 1 раз у 10 днів.

Визначення загальної кількості бактерій. Метод оснований на можливості мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів розмножуватися на щільному живильному агарі при температурі 30± 1°С протягом 72 год. Кількість висіяного продукту встановлюють з лікуванням найбільш вірогідного мікробного обсіменіння.

Висів. Для визначення загальної кількості бактерій вибирають ті розведення, при висівах яких виростає не менше 30 і не більше 300 колоній. Із кожної проби роблять висів на 2 -3 бактеріологічних чашки із розведень. Кожне із розведень у кількості 1 мл висівають в одну бактеріологічну чашку попередньо маркірованою кришкою і заливають 10-15 мл розплавленим і охолодженим до температури 40-45°С живильним середовищем для визначення загальної кількості бактерій.

Допускається висів досліджуваного продукту на бактеріологічні чашки із одного і того ж розведення в кількості 1 та 0,1 мл. Відразу ж після заливання агару вміст чашки ретельно перемішують легкими обертальними похитуваннями для рівномірного розподілення посівного матеріалу. Після застигання агару бактеріологічні чашки перевертають кришками донизу і в такому вигляді ставлять у термостат з температурою $30 \pm 1^\circ\text{C}$ на 72 год.

Кількість колоній, що виростили на кожній чашці, підраховують, помістивши її доверху дном на темному фоні, користуючись лупою збільшенням у 4-10 разів та лічильниками. Кожну підраховану колонію відмічаю на дні чашки чорнилом.

При великій кількості колоній та рівномірному їх розподілі дно чашки ділять на чотири і більше однакових сектори, підраховують колонії на 2-3 із них (але не менше, ніж на $1/3$ поверхні чашки), знаходять середнє арифметичне число колоній і перемножують на загальну кількість секторів чашки. Це буде відповідати загальній кількості колоній, що виростили на одній чашці.

Загальну кількість бактерій в 1 мл або 1 г продукту (X) обчислюють за формулою:

$$X = n \cdot 10^m$$

де: n - кількість колоній, підрахованих на бактеріологічній чашці; m - число десятикратних розведень.

За кінцевий результат аналізу приймають середнє арифметичне, одержане по всіх чашках.

Крім того в дослідних пробах кисломолочних продуктах визначають **кількість** патогенних мікроорганізмів, в тому числі **сальмонел**, шляхом посівів розведень на середовище Ендо, дріжджів і пліснявих грибів - на середовищі Сабуро чи сусло агар.

За мікробіологічними показниками кисломолочні продукти повинні відповідати вимогам, що наведені нижче .

Мікробіологічні показники для кефіру згідно ДСТУ 4417:2005 «КЕФІР. Технічні вимоги»

Показник	Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій в 1 см ³ , не менше ніж	$1 \cdot 10^7$
Кількість дріжджів в 1 см ³ не менше ніж	$1 \cdot 10^3$
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 см ³ кефіру	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 см ³	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 см ³	Не дозволено
Плісняві гриби, в 1 см ³ не більше ніж	50

Примітка: плісняві гриби нормують тільки для кефіру, зі строком придатності більше 3 діб.

Мікробіологічні показники для кисломолочного сиру та виробів з нього згідно ДСТУ 4503:2005 «Вироби сиркові. Загальні технічні вимоги»

Показник	Норма
Кількість молочнокислих бактерій в 1 г, не менше ніж	10^7
Кількість дріжджів в 1 г не більше ніж	100
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,001 г продукту	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 г продукту	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 0,01 г продукту	Не дозволено
Плісняві гриби, в 1 г продукту не більше ніж	50

Мікробіологічні показники для сметани згідно ДСТУ 4418:2005 «СМЕТАНА. Технічні вимоги»

Показник	Норма
Кількість молочнокислих бактерій в 1 г, не менше ніж	$1-10^7$
Кількість дріжджів в 1 г не більше ніж	50
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,001 г	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 г	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 г продукту	Не дозволено
Плісняві гриби, в 1 г продукту не більше ніж	50

Примітка: дріжджі та плісняві гриби нормують тільки для сметани з терміном придатності до споживання більше 3 діб.

Мікробіологічні показники для простокваші (всіх видів) згідно ДСТУ 4539:2006 «ПРОСТОКВАША. Технічні вимоги»

Показник	Норма
Кількість молочнокислих бактерій в 1 г, не менше ніж	$1-10^7$
Кількість дріжджів в 1 г не більше ніж	50
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 г	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 г	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 г продукту	Не дозволено
Плісняві гриби, в 1 г продукту не більше ніж	50

ніж	
-----	--

**Мікробіологічні показники для йогурту, ряжанки та варенця згідно ДСТУ 4343:2004 «ЙОГУРТИ. Загальні технічні умови»
ДСТУ 4565:2006 «РЯЖАНКА ТА ВАРЕНЕЦЬ. Технічні вимоги»**

Показник	Норма
Кількість молочнокислих бактерій в 1 см ³ , не менше ніж для ряжанки (Streptococcus salivarius subsp. Termophilus)	1-10 ⁷
для варенця та йогурту (Streptococcus salivarius subsp. Termophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus або без неї)	1-10 ⁷
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 см ³	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 см ³	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 см ³ продукту	Не дозволено

Мікробіологічні показники для кисломолочних продуктів, виготовлених з використанням ацидофільних бактерій, згідно ДСТУ 4540:2006 «НАПОЇ АЦИДОФІЛЬНІ. Технічні вимоги»

Показник	Норма
Кількість молочнокислих бактерій в 1 г, не менше ніж	1-10 ⁷
Кількість дріжджів в 1 г не більше ніж	1-10 ⁷
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 г	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 г продукту	Не дозволено
Плісняві гриби, в 1 г продукту не більше ніж	50

Контрольні питання

1. Як проводять відбір та підготовку проб кисломолочних продуктів для мікробіологічного дослідження.
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів в дослідних пробах кисломолочних продуктів.
3. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів в дослідних

пробах кисломолочних продуктів.

4. Як приготувати препарати для мікроскопії з кисломолочних продуктів. Яку мікроскопічну картину спостерігають при мікроскопії мазків.

5. Які мікробіологічні показники є для кисломолочних продуктів згідно нормативних документів.

Практичне заняття № 12 **Мікробіологічне дослідження масла.**

Мета заняття: Ознайомитися із схемою мікробіологічного дослідження масла.

Завдання:1. Вивчити особливості відбору та підготовки проб масла для мікробіологічного дослідження.

2. Ознайомитися з методами визначення загальної кількості бактерій у маслі, визначення кількості протеолітичних бактерій (посів на молочний агар), дріжджів і цвілей (посів на середовище Сабуро) та бродильного титру. 3. Ознайомитися з вимогами по мікробіологічним показникам для різних видів масла згідно нормативних документів.

Обладнання та матеріали. Проби солодковершкового та кисловершкового масла, водяна баня, термометр, термостат, стерильні шпателі, ножі, колби, пробірки, чашки Петрі з середовищами (Ендо, МПА, Сабуро), пробірки з середовищем Кеслера, стерильний фізрозчин, піпетки, штативи.

Довідковий матеріал.

Відбір проб масла для мікробіологічного дослідження. Від продукції, що потрапила у вибірку в споживчій тарі, відбирають для аналізу стерильним шпателем 15—20 г (включаючи поверхневий шар), відібрану пробу поміщають у стерильний посуд, що закривають стерильною пробкою. Від продукту в брикетах масою 50 г і менше об'єднану пробу готують з цілих брикетів продукту без зняття зовнішнього шару, попередньо звільнивши їх від пакування.

Від продукції, що потрапила і вибірку в транспортній тарі, пробу відбирають стерильним щупом на відстані 3—5 см від краю, направляючи щуп до протилежної сторони і опускаючи на 3/4 його довжини. Якщо продукт знаходиться в бочці, щуп занурюють похило від краю бочки до центру, якщо в ящику - щуп занурюють за діагоналлю відторцевої стінки до центру моноліту продукту.

Зі стовпчика масла на щупі відбирають стерильним шпателем 15-20 г масла і поміщають у стерильний посуд. Стовпчик масла, що залишився після відбору проби на щупі повертають на колишнє місце, а поверхню масла акуратно зашпаровують,

Підготовка проб до досліджень. Перед дослідженням пробу (10 г) розплавляють на водяній бані при температурі 40-45°C і перемішують до одержання однорідної емульсії, з якої готують десятикратні розведення

(методику розведень дивись вище).

Проведення дослідження. В солодковершковому маслі визначають загальну кількість бактерій, шляхом посіву розведень на МПА (набільш часто висівають 2, 3, 4 та 5 розведення).

В кисловершковому маслі крім загальну кількість бактерій, визначають кількість молочнокислих бактерій, шляхом посіву на агар з гідролізованим молоком та крейдою.

В обох видах масла визначають кількість протеолітичних бактерій посівом на молочний агар та кількість дріжджів та плісняви - на сусло агар та на середовище Сабуро.

Бродильний титр встановлюють посівом розведень у дві паралельні пробірки на середовище Кесслер.

Чашки з засіяними середовищами ставлять в термостат при температурі 30⁰С на 2-3 доби. Після цього проводять підрахунок колоній.

Для приготування мазків масло підігрівають в центрифужних пробірках на водяній бані при температурі 70⁰С. Потім центрифугують 10 хв. При 1500 обертів. Верхній шар масла та білків зливають, а із осаду роблять мазки.

Мазки фіксують сумішшю спирт-ефіру чи хлороформом, фарбують по Граму та мікроскопують з використанням імерсійного об'єктиву.

В свіжому маслі виявляють молочнокислі стрептококи. В мазках із старого масла, крім молочнокислих стрептококів, зустрічаються дріжджі та мікроскопічні гриби.

Контрольні питання

1. Як проводять відбір та підготовку проб масла для мікробіологічного дослідження.
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів в дослідних пробах масла.
3. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів в дослідних пробах масла.
4. Як визначають кількість дріжджів та пліснявих грибів в дослідних пробах масла.
5. Як приготував ти препарат для мікроскопії з масла.
6. Яку мікроскопічну картину спостерігають при мікроскопії мазка з масла.
7. Які мікробіологічні показники є для масла згідно ДТСУ.

Практичне заняття № 13 Мікробіологічне дослідження сиру.

Мета заняття: Ознайомитись із схемою мікробіологічного дослідження сиру.

Завдання: 1. Вивчити особливості відбору та підготовки проб сиру для

мікробіологічного дослідження.

2. Ознайомитись з методами визначення загальної кількості бактерій в сирі (посів на МПА).

3. Визначення кількості протеолітичних бактерій (посів на молочний агар), дріжджів і пліснявих грибів (посів на середовище Сабуро) та бродильного титру.

4. Провести мікроскопію мазків сиру на наявність молочнокислих бактерій. Препарати по фарбувати по Г раму.

Обладнання та матеріали. Проби досліджуваного сиру, стерильні ступки, предметні та покривні скельця, розчини фарб для фарбування по Граму, пробірки з стерильним розчином хлориду натрію або фосфатного буфера, чашки Петрі з середовищами МГ1А, Сабуро (сусло-агар). Молочним агаром, агар з гідролізованим молоком, пробірки з середовищем Кесслер піпетки, мікроскоп, термостат.

Довідковий матеріал.

Відбір проб сиру (твердого, напівтвердого, м'якого, розсольного, плавленого) для мікробіологічного дослідження. Від продукції, що потрапила у вибірку, поверхню сиру дезенфікують навколо місця відбирання проби етанолом. Відбір проб сиру проводять стерильним щупом, вводячи його у товщу продукту на глибину 25 см, повертають на один повний оберт і виймають разом із стовпчиком сиру. Стовпчик зберігають і використовують його пізніше для закриття отвору.

Точкові проби сиру відбирають щупом із двох протилежних сторін кожної голівки сиру, залученої у вибірку, вводячи його на глибину не менш, ніж 3/4 найбільшого розміру голівки. Під час відбирання точкових проб:

- Із великих твердих сирів, що мають форму циліндр аабо бруска, щуп вводять з торцевої сторони ближче до центру;
- Із дрібних твердих сирів круглої форми, щуп вводять з верхньої частини голівки до центру.

Від вийнятих стовпчиків сиру відрізають близько 1,5 см верхньої частини стовпчика, нижню частину $4,5 \pm 0,5$ см переносять у посуд для складання об'єднаної проби.

Від батона ковбасного сиру точкові проби відбирають ножом поперек на відстані близько 5 см від краю батона, знімаючи затверділий шар сиру товщиною 0,2 — 0,3 см.

Від усіх видів плавлених сирів у споживчому пакуванні залучених у вибірку, точкові проби відбирають ножом рівномірно з різних частин кожної одиниці споживчого пакування і переносять у посуд для складання об'єднаної проби.

Від плавленого сиру в брикетах масою 30 г і менше, пробу готують із цілих брикетів, попередньо звільнивши їх від пакування.

Маркування та зберігання відібраних проб.

Підготовка проб до досліджень. Перед дослідженням пробу будь якого виду сиру (10 г) переносять у стерильну ступку та ретельно розтирають

товкачиком . Після цього додають 90 см³ розчинника і отримують первинну суспензію, з якої готують десятикратні розведення.

Проведення дослідження. При мікробіологічному дослідженні сирів визначають загальну кількість бактерій шляхом посів розведень на МПА, кількість бактерій ірупи кишкової палички шляхом посівів на середовище Кесслера (бродильний титр), кількість патогенних мікроорганізмів, в тому числі сальмонел, шляхом посівів розведень на середовище Ендо, дріжджів і пліснявих грибів - на середовище Сабуро чи сусло агар.

Мікробіологічні показники для сирів згідно нормативних документів дивись нижче.

Мікробіологічні показники сиру, згідно ДСТУ 4558:2006 «СИР ПОШЕХОНСЬКИЙ. Технічні вимоги»

ДСТУ 4669:2006 «СИРИ НАПІВТВЕРДІ. Загальні технічні умови» ДСТУ 4395:2005 «СИРИ МЯКІ. Загальні технічні умови»

Назва показника	Норма
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,01 г продукту	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, у т. ч. бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г продукту	Не дозволено
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г продукту <i>Staphylococcus aureus</i> , КУО в 1 г продукту, не більше ніж	Не дозволено 5-10 ²

Мікробіологічні показники плавлених сирів, згідно ДСТУ 4635:2006 «СИРИ ПЛАВЛЕНІ. Загальні технічні умови»

Назва показника	Норма
Кількість мезофільних аеробних та анаеробних мікроорганізмів(МАФАМ), КУО, в 1 г сиру, не більше ніж	5x10 ⁴ Не дозволено

Бактерії групи кишкових паличок(коліформи), в 0,01 г продукту	
Патогенні мікроорганізми, у т. ч. бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г продукту	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , КУО в 1 г продукту, не більше ніж	Не дозволено 50
Дріжджі, КУО, в 1 г сиру, не більше ніж	50
Плісеневі гриби, КУО, в 1 г сиру, не більше ніж	

Контрольні питання

1. Як проводять відбір та підготовку проб сиру для мікробіологічного дослідження.
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів в дослідних пробах сиру.
3. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів в дослідних пробах сиру.
4. Як визначають кількість дріжджів та пліснявих ірибів в дослідних пробах сиру.
5. Як приготувати препарат для мікроскопії з сиру. Яку мікроскопічна картинуюспостерігають при мікроскопії мазка з сиру.

Практичне заняття № 14 **Мікробіологічне дослідження м'яса.**

Мета: Ознайомитись з методами бактеріологічного дослідження м'яса і дати його санітарну оцінку в залежності від результатів дослідження. Ознайомлення з методами бактеріологічного контролю ковбас. Ознайомитись з методами бактеріологічного дослідження консервів. Ознайомитись з методами дослідження розсолу і солонини.

Обладнання та матеріали. Проби м'яса (свіже, підозрілої свіжості, несвіже); ножиці, шпателі, пінцети, скальпелі, предметне скло, спиртівки, набір фарб, мікроскопи, чашки Петрі з МПА, пробірки з МПЖ, МПБ, ступки з товчачиками, розчин реразурину.

На м'ясних підприємствах проводять періодичний контроль продукції і виробництва з профілактичною метою або як вимушений, коли потрібно виявити у м'ясі патогенні і умовно-патогенні бактерії. Мікробіологічному дослідженню м'ясо піддають тільки у тих випадках, коли передбачено правилами ветеринарно-санітарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса і м'ясопродуктів або за вимогами ветеринарно-санітарної інспекції. Бактеріологічні дослідження м'яса і м'ясопродуктів проводять при підозрі на інфекційні захворювання: сибірську язву, рожу свиней.

Лабораторії м'ясокомбінатів не проводять бактеріологічного дослідження на такі захворювання як: бруцельоз, сибірка, туберкульоз.

Бактеріологічному дослідженню м'ясо піддають також: а) у всіх випадках вимушеного забою тварини; б) при шлунково-кишкових захворюваннях, при тяжких захворюваннях дихальних органів, а також в усіх випадках при підозрі на сальмонели; в) при видаленні шлунку з туші більш ніж через 2 години після забою тварини (птиці); г) при сумнівах у відношенні придатності м'яса і неможливості виявити придатність його в їжу шляхом ветеринарно-санітарного огляду.

Мікробіологічному дослідженню піддають сировину, готові вироби, а також тару, інвентар і руки робочих, безпосередньо пов'язаних з м'ясною продукцією.

Взяття матеріалу для дослідження. У залежності від діагнозу і характеру патологічних уражень для бактеріологічного дослідження у лабораторію направляють: частину м'яса згибача і розгибача передньої і задньої кінцівок туші, покриту фасцією довжиною не менше 8 см, або шматок іншого м'яса на дослідження у лабораторію лімфатичні вузли - поверхневий шийні або власно-відкрильцьований і зовнішній поздовжній разом з оточуючою їх сполучною і жировою тканиною, а від свиней - поверхневий шийний дозальний (при відсутності патологічних змін в області голови і шиї) або підкрильцьовий 1-го ребра і надколінний; долю легкого, селезінку, нирку, (або при відсутності лімфовузла жовчний пузир без жовчі) і трубчасту кістку.

Проби запаковують у вологонепроникну тару і в запломбованому вигляді направляють в лабораторію із супровідним документом, у якому

вказують: дату забою, дату взяття проби, вигляд тварин, номер туші, адресу власника, характеристику і кількість направленої матеріалу на дослідження, установка в продукті зміни, попередній діагноз і дослідження, які потрібно провести (бактеріологічні, бактеріоскопічні та ін.)

Доставлені у лабораторію для дослідження матеріали піддають зовнішньому огляду. Відхилення кольору, запаху, консистенції від норми відзначають у журналі реєстрації. Потім із кожної проби роблять не менше 5-10 мазків - відбитків. Висушують, фіксують, зафарбовують по Граму.

Іноді препарати зафарбовують не тільки по Граму, але і 1-2 % водним розчином сафраніну або 2 % розчином метиленового синього. Виявлення у мазках грам позитивних паличок або ланцюжків паличок з обрубленими кінцями, а також ланцюжків і паличок, оточених капсулою, викликає підозру на присутність в матеріалі збудника сибірки - *Bac. anthracis*.

Про це негайно повідомляється адміністрації і вживаються всі заходи, передбачені для випадків даної інфекції. Проба м'яса піддається докладному дослідженню у лабораторії Державної санітарної інспекції (ДСІ).

Виявлення у мазках спорових поліморфних грампозитивних паличок, які нагадують тенісну ракетку, викликає підозру на присутність *Clostridium botulinum* - палички ковбасної отрути). Матеріал передають для подальшого дослідження у лабораторію ДСУ і ДСІ.

Дослідження на присутність аеробів. М'язи, лімфатичні вузли, паренхіматозні органи звільняють від жирової тканини і потім кожну пробу опускають у спирт, дворазово обпалюють поверхню вирізають з різних місць шматочки (2-3 см) і засівають на поживні середовища (МПА і елективні) шляхом відбитків на поверхні середовища. Одночасно проводять посів з присланого матеріалу в середовище накопичення (Кауфмана, Мюллера). Шматочки м'язів і лімфатичні вузли спочатку подрібнюють і засівають в одну колбу, а шматочки паренхіматозних органів, в другу. У випадку виявлення в мазках бактерій, схожих на збудників сибірки, посіви на елективні середовища і середовища накопичення не здійснюють. Посіви вирощують при температурі 37°C. Після закінчення 16-24 годин їх продивляються під малим збільшенням мікроскопа або лупи. На МПА можуть розвиватися колонії, характерні для бактерій сибірки, рожі свиней; на елективних середовищах - колонії, характерні для бактерій колі - паратифозної групи. Підозрілі колонії пересівають і диференціюють за схемою для даної групи бактерій.

Дослідження на присутність анаеробів. Для визначення діагнозу на аеробні інфекції проводять бактеріоскопію, посіви і зараження лабораторних тварин. З присланого матеріалу для бактеріоскопії готують мазки; одні зафарбовують розчином метиленового синього, інші - по Граму. Насамперед необхідно відкинути паличку ботулінуса. При підозрі на присутність у досліджуваному матеріалі *Clostridium botulinum*, як уже вказувалось, матеріал передають для повного дослідження у лабораторії ДСУ. Перед посівом проби занурюють у спирт обпалюють, поміщають у стерильну ступку, куди наливають велику кількість стерильного фізіологічного розчину

і стерильним пестиком пробу розтирають. Засівають 3-4 пробірки з середовищем Кітта-Тароцці, які перед посівом прогрівають на водяній бані протягом 20-30 хвилин, а потім швидко охолоджують до 55 °С. У кожену пробірку вносять по 3-5 мл досліджуваного матеріалу, 1-2 пробірки підігрівають протягом 20 хвилин при 80 °С, інші залишають непрогрітими. Всі пробірки поміщають у термостат, де витримують їх протягом 8-10 діб при температурі 37 °С. При виявленні росту подальші виділення культури і її ідентифікацію проводять методами, прийнятими для нього виду культур.

Контроль свіжості м'яса. За доброякістю або свіжістю м'ясо прийнято ділити на 3 категорії. До першої категорії відносять до броякісне (свіже) м'ясо, до другої - сумнівне за свіжістю, до третьої - непридатне в їжу.

Для дослідження на свіжість від кожної туші відбирають пробу масою біля 200 г (у надрізу проти 4 і 5 шийних хребців; із м'язів в області лопатки; із м'язу стегна в товстій частині). Відібрані проби, кожену окремо завертають в пергаментний папір, помічають номер туші, назву тканини.

Проби одної туші поміщають у паперовий кульок, складають в ящик і відправляють у лабораторію. У супроводжуваному документі вказують вид тварини, номер туші, причину і мету дослідження.

Органолептичне дослідження. Органолептична оцінка м'яса проводиться загальноприйнятими методами - зовнішній вигляд, колір, консистенція, запах, бульйон при варці. Свіже м'ясо має суху шкуринку підсихання, блідо-рожевий або блідо-червоний колір; запах - приємний, характерний для кожного виду тварин; на розрізі - щільне, еластичне. Бульйон з нього прозорий, ароматний. Несвіже м'ясо має вологу або підсохлу, липку, іноді покриту плісенью поверхню: колір сірий або зеленуватий. У глибоких шарах м'язової тканини відчувається гнійний запах, колір жиру - сірий, консистенція - в'язка, запах - прогірклий.

Хімічне дослідження. Хімічне дослідження м'яса передбачає визначення основних показників: рН, кількість аміноаміачного азоту, вміст жирних легких кислот. Величина рН свіжого м'яса не вище 6,2; підозрілої свіжості - 6,2-6,3; несвіжого більше 6,5. Кількість аміноаміачного азоту на 100 г свіжого м'яса не вище 80 мг, м'яса підозрілої свіжості - 81-130 мг, несвіжого - більше 130 мг.

Бактеріоскопічне дослідження. Для мікроскопічного дослідження з проб м'яса готують не менше трьох мазків-відбитків, один з поверхневого шару з глибини 1-2 см, другий з глибини 2-2,5 см, третій з глибини 3-3,5 см.

Для того, щоб приготувати препарат-відбиток з поверхневого шару м'яса стерильними ножицями вирізають кусочок 0,5 -1 г і зрізаною стороною роблять тонкі відбитки на злегка підігрітому предметному склі. Щоб приготувати препарат - відбиток з глибоких шарів, поверхню м'яса спочатку припікають нагрітим шпателем, глибокий розріз, пінцетом розводять краї, вирізують кусочки м'яса і прикладаючи до поверхні предметного скла, роблять відбитки.

Підготовлені мазки підсушують на повітрі, фіксують на вогні спиртівки фарбують по Граму і мікроскопують.

Проглядають не менше п'яти точок зору. У кожній точці зору підраховують окремо кокові і паличковидні мікроби, а по тім обчислюють їх середньоарифметичну кількість в одній точці зору.

Свіже м'ясо. У точці зору в мазках-відбитках, виготовлених з поверхневого шару доброякісного м'яса, знаходиться невелика кількість мікробів (одиночні кокки і палички), пофарбовані грампозитивно, і клітини дріжджів. У мазках з глибоких шарів мікробів зовсім не виявляється, або зустрічаються тільки одиночні клітинне. На склі немає слідів розривання тканини м'яса.

М'ясо підозрілої свіжості. У точці зору в мазках, приготовлених з м'яса підозрілої свіжості, з поверхневого шару знаходять декілька десятків мікробів; в мазках з глибоких шарів - не більше 20-30 бактерій з домінуючою кількістю кокових форм. Зустрічаються як грампозитивні, так і грамнегативні мікроорганізми. По мітні сліди розкладу м'язової тканини.

Несвіже м'ясо. У мазках-відбитках як з поверхні, так і з глибоких шарів несвіжого м'яса, у всьому полі зору є мікробні клітини з перевагою грамнегативних паличок. У м'ясі, яке розклалося - коки відсутні. У полі зору знаходяться у великій кількості палички і розірвана тканина. Таке м'ясо непридатне в їжу.

Дослідження мікрофлора, яка знаходиться на поверхні м'яса. Для того, щоб визначити кількість поверхневої мікрофлори на 1 см² м'яса, проводять вибір проби методом зрізу. Гострим стерильним скальпелем, зрізають тонку пластинку м'яса, товщиною 2-3 мм і поміщають у (раніше зважену) стерильну порцелянову чашку з кришкою. Визначають масу досліджуваної проби, потім розтирають з стерильним піском, отриману кашу заливають у колбу з відомим об'ємом стерильної води, збовтують протягом 5 хвилин і роблять посів 1 мг змивної води у чашки Петрі з м'ясопептонним агаром. Після вирощування у термостаті підраховують колонії, які вирости. Прийнято вважати, що 1 г зрізу відповідає 1,5 см² поверхні м'яса. Виходячи з цього, визначають кількість мікробів на 1 см² продукту.

Приклад. Маса зрізу 2 г, об'єм води — 10 мл. При посіві 1 мг змивної води в чашці Петрі виросло 360 колоній $360 \times 10 = 3600$ мікроорганізмів в 10 мл, змитих з 2 г м'яса. В 1 г їх буде 1800, звідси:

$$1,5 \text{ см}^2 - 1800;$$

$$1 \text{ см}^2 - X.$$

В 1 см² — 1200 мікроорганізмів.

Щоб підрахувати кількість спор у досліджуваному матеріалі його занурюють у рідкі середовища і прогривають при 80 °С протягом 20 хвилин; частину пробірок залишають не прогрітими. Вирощують в аеробних умовах при температурі 37°С протягом 24-28 годин. Печінковий бульйон для виділення анаеробів витримують у термостаті 8-10 діб. При наявності росту проводять мікроскопічне дослідження.

У свіжому м'ясі кількість аеробних мікроорганізмів на 1 см² поверхні м'яса не повинно перевищувати 10-100 тис. Спороутворюючих аеробів в 1 г продукту — не більше 10-100 мікробних клітин.

У середовищах з посівами піддають прогріванню, в 1 г не повинно бути спор. Загальна кількість мікробних клітин в 1 г сирого м'яса не повинна перевищувати 100 тис. клітин.

Визначення загальної кількості бактерій в м'ясі. 100-150 г досліджуваного м'яса занурюють на 1-2 хвилини у киплячу воду, щоб вбити мікроби на поверхні. Після цього стерильним ножом з глибини вирізають шматочок м'яса масою 1-2 г, занурюють

у стерильну ступку і зважують для визначення його чистої маси. Розтирають з 5 г стерильного піску, поступово підливаючи стерильну воду до розведення 1:10. З верхнього шару рідини беруть піпеткою 0,1 мл або 1 мл, виливають в стерильну чашку Петрі і заливають розплавленим МПА (температура 50 °С). Посів обережно змішують і після застигання поміщають на 20-24 години в термостат при температурі 37 °С. Потім підраховують колонії, які вирости і для визначення мікробів в 1 г м'яса множать число колоній на розведення.

Резазурінова проба для визначення загальної кількості мікробів в 1 г м'яса. 1 г проби (взятий з точністю до 0.01 г) подрібнюють ножицями розтирають в стерильній ступці і вносять в пробірки з 10 мл стерильного МПБ і додають по 1 мл 0,01 %-ого розчину резазуріна. Пробірки поміщають у термостат і спостерігають за реакцією. Для контролю кольору реактиву беруть 9 мл МПБ без м'яса, додають 1 мл розчину резазуріна і витримують аналогічним способом. Санітарну оцінку м'яса проводять з урахуванням часу відновленого кольору резазуріна від синього через фіолетовий до рожевого.

Якщо в пробірках з пробою охолодженого м'яса рожеве забарвлення з'являється, через 4-6 г, це відповідає 8-10 мікробним клітинам у 1 г м'яса; через 2-3 г - 1,6 тис; через 45-60 хв - до 20 млн; через 15-30 хв - більше 20 млн. клітин.

Контрольні питання

1. Як проводять взяття матеріалу для дослідження?
2. Як проводять бактеріоскопічне дослідження м'яса?
3. Проведення резазурінова проба для визначення загальної кількості мікробів в 1 г м'яса?

Практичне заняття № 15 Мікробіологічне дослідження ковбас.

Мета: Ознайомлення з методами бактеріологічного контролю ковбас.

Обладнання та матеріали. Проби м'яса (свіже, підозрілої свіжості, несвіже); ножиці, шпатель, пінцети, скальпелі, предметне скло, спиртівки, набір фарб, мікроскопи, чашки Петрі з МПА, пробірки з МПЖ, МПБ, ступки з товчачиками, розчин резазурину.

При порушенні технологічного процесу і санітарно-гігієнічного режиму і одержання недоброякісної продукції бактеріоскопічному дослідженню підлягають не ТПЛ БК И готова продукція, але й продукти по

ходу технологічного процесу приготування ковбаси, а також сировина, шпик, мука, спеції та ін. При необхідності проводяться бактеріологічні дослідження повітря цеху, води, рук робітників, прилади і т. д.

Бактеріологічні дослідження ковбаси проводять у тих випадках, коли виникає підозра на погану якість ковбас при органолептичній оцінці, а також при використанні сумнівного за якістю м'яса та субпродуктів. Мікрофлора ковбас в основному залежить від бактеріологічного складу шпика, муки, спецій та іншої сировини. У фарш можуть попадати мікроби з повітря і обладнання, рук робітників і т. д.

Кількісний і якісний склад мікрофлори залежить від сорту ковбаси. Так, ліверні ковбаси мають сильно змільчений, рихлий (з повітряними просторами) фарш, містять до 75 % вологи. Оболонка є більш проникною для мікроорганізмів, оскільки не підлягають обжарюванню. Все це допомагає розвитку мікрофлори у цих ковбасах, вони є менш стійкими при зберіганні і в продаж повинні бути реалізовані не пізніше 12 годин з моменту виготовлення. При більш довготривалому зберіганні мікрофлора, що розвивається, може бути причиною харчового отруєння.

У варених ковбасах, що піддаються дії високих температур (168 -170 °С у середині батону), гинуть безспорові бактерії, але залишаються неушкодженими спори і частково кокові форми і одиничні палички, тому що вони бувають захищені шаром жиру. Частіше всього це відзначається у тих випадках, коли порушуються санітарно-гігієнічні правила і проходить сильне обсіменіння фаршу бактеріями.

Порушення санітарного і технічного режиму виготовлення ковбасних виробів здебільшого веде до псування продукції споровими і безспоровими бактеріями. Велику загрозу являє *Clostridium botulinum*. При зберіганні ковбас при температурі вище 10 °С бацили розмножуються і виділяють токсини, що призводять до тяжких харчових отруєнь.

Виявлення у товщі батона ковбаси кишкової палички свідчить про порушення технології (недовар батонів) або порушення санітарно-гігієнічних правил, виявлення кишкової палички на поверхні батона — про повторне забруднення при порушенні санітарного режиму (обтирають батони від напливів, складування, транспортування). Мікрофлора, яка потрапила, при повторному обсмаженні, може викликати псування при зберіганні, продукту, покриття цвіллю, мучнистий наліт і гниття.

У готових ковбасах не повинно бути кишкової палички, а також інших неспорових бактерій. Допускається присутність у ковбасних виробках сапрофітних спорових бацил групи *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*.

Для дослідження ковбасних виробів вибирають зразки масою 250 -300 г, кожний окремо запаковують у пергаментний папір, вказуючи сорт і вид виробу. Зразок поміщають у ящик або в пакет, який пломбують або опечатують. Разом з пробами направляють акт відбору, в якому вказують найменування і час виготовлення продукту, час і причину відбору проб і мету дослідження. Якщо відібрані проби направляються у промислову

лабораторію, зразки замотують у пергаментний папір і додають службову записку.

У лабораторії проби ковбасних виробів підлягають органолептичному, бактеріоскопічному і бакте-ріологічному дослідженню. При органолептичному дослідженні відзначають зміну кольору, консис тенцію і наявність стороннього запаху. Для бактеріологічного до слідження після видалення оболонки готують мазки-від печатки з поверхні і з розрізу глибоких шарів ковбас. Препарат підсушу - ють, фіксують, фарбують по Граму. Бактеріологічне дослідження реєструють у журналі результатів дослідження.

Для бактеріологічного дослідження поверхню ковбасних бато нів протирають ватним тампоном, змоченим спиртом, потім го рючим тампоном. Після такою обробітку скальпелем, профламбованим на вогні, розрізають батон по довжині, не чіпаючи протилежної сторони. Вирізають фарш по всій поверхні обох полови нок розрізаного батона. З копченостей (окороків) проби беруть па глибині 2 -3 см від поверхні вище до кістки. Якщо виріб не має оболонки (м'ясний хліб та ін.), пробу беруть з 2-3 ділянок поверхні і складають середню пробу для кожного зразка.

Визначення загальної кількості бактерій. Пробу кожного зразка поміщають окремо у стерильні бокси і зважують. Кожну пробу окремо переносять у стерильну ступку і товкачиком розтирають до одержання кашеподібної маси, додають невеликими порціями 10 мл стерильного фізіологічного розчину (співвіднош ення досліджуваного продукту і фізрозчину 1:10 або 1:5). З верхнього шару приготовленої суспензії стерильною піпет кою переносять 0,1 або 0,2 мл у стерильну чашку Петрі і залива ють розплавленим і охолодженим до 50 °С МПА, перемішують вміст чашки. Після застигання агару помішають у термостат, вирощують при температурі 37 °С в продовж 24 -28 год. Підрахунок колоній і розрахунок числа мікробів у 1 г продукту проводять так як і Д Л Я м'яса.

Допустима кількість кінцевої мікрофлори в 1 г ковбасних ви робів не встановлена. У готових виробах кінцева мікрофлора ви являється у вигляді спорових і кокових форм.

Дослідження на присутність кишкової палички .З батона вирізають 2-3 невеликих шматочка ковбаси, поміщають у пробірку, заповнену не менш як на половину розоловим середовищем. Для дослідження ліверної ковбаси та інших продук тів, що мають масляну консистенцію у пробірці, заповнену не менше, ніж на половину розоловим середовищем. Для досліджен ня ліверної ковбаси та інших продуктів, що мають масляну консистенцію, у пробірку стерильним пінцетом вносять шматок сте - рильного фільтрувального паперу і разом з досліджуваним матері алом поміщають її в середовище. Посіви ставлять у термостат і вирощують при температурі 37 °С. Через 12-14 годин посіви розглядають. При наявності росту кишкової палички проходить зброжування манніта з утворенням кислоти і рН середовища понижується до 4,6-5,0. Середовище приймає жовтий колір.

Стерильне розолове середовище має рН 7,0 -7,6, колір — червоно-фіолетовий. При підлужуванні (рН вище 7,6) середовище приймає червоний колір, а при сильному підкисленні (рН нижче 5) трав'янисто-зелений. При незначному підкисленні середовище втрачає колір.

При відсутності росту бактерій розолове середовище не змінюється. Середовище може втратити колір внаслідок чисто хімічних реакцій при довготривалому знаходженні пробірок в термостаті.

Сильне помутніння з виділенням газів і втрата кольору середовища може наступити в результат розвитку анаеробних бактерій, що містяться в ковбасах. рН середовища при цьому змінюється незначно.

Для більш точної ідентифікації проб, що дали зеленувато-жовтий колір, проводять посіви на середовище Ендо і визначають різ новидність кишкової палички в досліджуваному матеріалі.

Метод ВНДІМПА. З метою прискореного дослідження ковбасних виробів і гарантією їх санітарної доброякісності застосовують метод, розроблений ВНДІМПА для визначення кишкової групи бактерій:

1) з ковбасних виробів готують 10 % -ву наважку на фізіологічному розчині і по 1-2 мл вносять в пробірки із середовищем ХБ;

2) вирізають з середини батона 2-3 шматочки по 1 г, подрібнюють і розмішують у пустій стерильній пробірці, заливають середовищем ХБ, поміщають в термостат при t 37 °С. Через 12-14 годин при наявності в ковбасі кишкової палички середовище мутніє, а колір його з фіолетового стає пурпурово-жовтим. При відсутності кишкової палички середовище стає прозорим.

Для приготування середовища ХБ в 1л дистильованої води додають 1 % пептону,

0,5 % NaCl 0,5 % маніту. Встановлюють рН 7,4-7,6, кип'ятять 15-20 хв., фільтрують, знову кип'ятять 10 хв. і охолоджують до 60 °С. Стерильно додають 30 мл дріжджового автолізу, 15 мл жовчі (к.р.л.), 10 мл хінозону (розведення 1:1000), 10 мл бромкрезолового червоного, (1,6 % спиртовий розчин).

Дослідження на присутність сальмонел. Проводять посів 0,1 мл суспензії на середовища Ендо або Левіна. Після рівномірного розподілу внесеного матеріалу чашки з посівами ставлять в термостат при t 37 °С на 24 години з підозрілих, колоній, готують мазки, фарбують їх по Граму, визначають рухливість мікробів. Подальші дослідження ведуть за схемою бактеріоскопічного дослідження м'яса.

Дослідження на присутність анаеробів (*Cl.botulinum*, *Cl.perfringes*, *Cl.putrificum* та інші)

По 1-2 мг суспензії продукту, розтертою з піском, засівають в 2 пробірки з середовищем Кітта-Тароцці, які перед посівом кип'ятять 20 хв, а потім швидко охолоджують. Після посіву одну з пробірок прогрівають 20 хв. при t 80 °С. Посіви вирощують 5-7 діб при t 37°С . При вивченні росту подальші

виділення культури і її ідентифікацію проводять методами, прийнятими для цього виду культур.

Визначення у ковбасі паличок протей. Щоб визначити загальну кількість *Bact. Proteus Vulgaris* в продукті і дати відповідну оцінку ролі протей при харчових токсикоінфекціях, вдаються до визначення *титру-протей* найменшої кількості досліджуваного субстрату, в якому ще вдається виявити паличку протей.

Взятий з середини батона ковбаси 1 г матеріалу заливають у ступці стерильною водопровідною водою у співвідношенні 1:10 і розтирають. Дають суспензії відстоятись, з поверхні набирають 1 мл і рідину переносять в колбу з 100 мл. стерильної води, одержуючи розведення 1:100. Добре перемішують 2 -3 хв. З колби беруть 1 мл рідини і вносять в 9 мл стерильної води у пробірці № 1, одержуючи розведення 1:1000. З пробірки № 1 після збовтування переносять 1 мл у пробірку №2 з 9 мл стерильної води, одержуючи розведення 1:10000, а з неї 1 мл переносять у пробірку № 3, одержуючи розведення 1:100 000.

Піпетки змінюють при кожній новій концентрації розведення. З кожної пробірки роблять засів 0,1 мг рідини в конденсаційну воду свіжескошеного агару. Засіяні пробірки поміщають в термостат при 37 °С. Через добу на поверхні агара можна спостерігати повзучу вгору плівку культури посіву.

Чим менший титр (розведення в цифровому вираженні), тим правильніші докази того, що причиною харчових отруєнь були палички протей, особливо якщо в продукті не виявлено сальмонели.

При виявленні у ковбасних виробів умовно -патогенних бактерій (групи кишкової палички і протей), наявність неприємного смаку і запаху, зміна кольору фаршу ковбасні вироби направляють на технічну утилізацію.

Якщо органолептичні властивості не мають відхилень від норми, варені та напівкопчені ковбасні вироби переробляють на інші сорти ковбас, а сирокопчені додатково витримують ще на протязі 10-12 діб і повторно проводять бактеріологічне дослідження. При одержанні кормів їх результатів ковбасні вироби переробляють на ковбаси нижчих сортів, а, якщо при повторному дослідженні бактерій кишкової палички і протей не будуть виділені, ковбасні вироби випускають без обмежень. Без обмежень ковбасні вироби випускають і в тому випадку, якщо в ковбасних виробках виявлені сапрофітні аеробні бацили (субтиліс, мезонтерікус) при умові нормальних органолептичних ознаках.

Контрольні питання

1. Як проводять взяття матеріалу для дослідження?
2. Як проводять дослідження ковбас на присутність сальмонел?
3. Дослідження на присутність анаеробів (*Cl.botulinum*, *Cl.perfringes*, *Cl.putrificum* та інші)?

Практичне заняття № 16

Мікробіологічне дослідження консервів.

Мета: Ознайомитись з методами бактеріологічного дослідження консервів..

Обладнання та матеріали. Проби м'яса (свіже, підозрілої свіжості, несвіже); ножиці, шпателі, пінцети, скальпелі, предметне скло, спиртівки, набір фарб, мікроскопи, чашки Петрі з МПА, пробірки з МПЖ, МПБ, ступки з товкачками, розчин реразурину.

Дослідження консервів після стерилізації. Готові консерви після стерилізації підлягають дослідженню у тому випадку, якщо був порушений режим стерилізації, знайдена підвищена бактеріальна забрудненість речовини до стерилізації, або мали місце помилки в самому технологічному процесі приготування.

Для дослідження із партії консервів вибирають дві банки. Також для досліду беруть банки однієї варки (1 на кожні 500), в яких знайдені неспорутворюючі мікроби із колі — паратифозної групи, групи протей і коків. Для дослідження відбирають герметичні банки.

Для визначення герметичності банки поміщають в нагріту воду (85 °С) тримають 5-7 хв. Поява бульбашок вказує на негерметичність банки. Банки також: кладуть в термостат при t 37 °С до 5 діб. Тоді банки охолоджують до t 30 °С і оглядають. Бомбажні банки бактеріологічному обстеженню не підлягають

Поверхню банки перед відкриванням обтирають спиртом, обпалюють кришку ватним тампоном, потім кладуть на кришку тампон, змочений спиртом, запалюють і під ним пробивають отвір 1-1,5 см. Отвір закривають кришкою чашки Петрі. Проби відбирають стерильними трубочками, закривають з одного боку ватою.

У пробі повинна бути тверда і рідка частини консерви.

Проби виливають у пробірку з МПБ. Для вияву анаеробів посів у проб консерви проводять на дві пробірки з МПБ, для вияву анаеробів — у дві пробірки з середовищем Кітта-Тароці. Тоді витримують у термостаті при t 37°С, протягом 5 діб. Готують мазки фарбують по Граму. Якщо у мазках знаходяться грамнегативні па-лички і коки, то проводять посів на МПА з 1 % глюкози, на середовище Ендо.

Проби відбирають перед стерилізацією зразу після закати із 10 перших банок. Для проведення дослідження беруть скляну або бляшану банку. Воду беруть, в об'ємі рівному об'єму вміщеного в консерви. Банку стерилізують в автоклаві.

Для визначення загальної кількості бактеріологічного обстеження 1 мм, розведення заливають у чашку Петрі і добавляють 20 мл МПА. Пробу закривають і кладуть у термостат при 37 °С на 24 год.

Спори термофільних бактерій виявляють за тією ж схемою. Але відбирають проби у кількості 5 мл і переносять у пробірку, кип'ятять і виливають в чашку Петрі.

Середовище повинно мати слабофіолетове забарвлення. Кладуть у термостат при t 55 °С. протягом 24-48 год. Облігатні анаероби виявляють методом посіву 1 мг (г) у чашку Петрі на МПА. Внесену чашку Петрі заливають 30 мл середовища.

Проби виливають у пробірку з МПБ та із середовищем Кітта-Тароцці 9мл (по 1 г для анаеробів та 2,5 г для анаеробних мікроорганізмів).

Для виявлення анаеробів посів із проб консервів проводять у дві пробірки з МПБ 34 (рН 7,2—7,4), для виявлення анаеробів — у дві пробірки із середовищем Кітта-Тароцці. Засіяні пробірки витримують в термостаті при температурі 37 °С протягом 5 діб. Щоденно спостерігають за появою росту. Якщо він з'явиться раніше вказаного терміну, пробірки виймають і досліджують посіви. Готують мазки, фарбують по Граму, мікроскопують.

Якщо у мазках із анаеробних посівів знаходять грампозитивні палички і коки, то здійснюють посів на МПА з 1 % глюкози, на середовище Ендо та конденсаційну рідину скошеного МПА. У мазках із анаеробної культури через 18-24 год витримки у термостаті знаходять грампозитивні палички. Середовище при розвитку у ньому анаеробних бактерій має гнійний, сирний і маслянокислий запах. Через 3-4 доби середовище освітлюється і на дні пробірки утворюється невеликий осадок. У мазках із цього осаду можна знайти палички із спорами, розміщеними субтермінально, термінально або у вигляді ракеток,

При підозрі на присутність *Clostridium botulinum* пробірку запаюють і відсилають для дослідження у санітарно-епідеміологічну лабораторію і всю партію консервів бракують.

У деяких випадках псування консервів відбувається без ознак бомбажу — спостерігається так зване плоскокисле псування. Для визначення при сутності у консервах збудників плоскокислого псування консерви перед дослідженням витримують при 55 °С протягом двох діб. Після цього відкривають банки і в 4 пробірки відбирають по 0,15-0,2 мл 0,004 %-вого водного розчину бромкрезолового червоного. Все це перемішують, якщо відбулось фарбування в жовтий колір, із цих проб готують мазки, фарбують по Граму і мікроскопують. В мазках знаходять споруутворюючі палички. У випадку відсутності фарбування, у жовтий колір при додаванні індикатора роблять посів по 1-2 мл в чашку Петрі заливають 20 мл МПА з 1 % глюкози, добавляють 0,004 %-вого бромкрезолового червоного і вирощують при t 55 °С дві доби. При нарахуванні кислотоутворюючих термофільних бактерій навколо колоній з'являється жовта зона (може пожовтіти середовище).

До збудників плоскокислого псування консервів відносять різних представників аеробних і анаеробних мікроорганізмів.

Clostridium nigrificans — анаероб, що являє собою палички із заокругленими кінцями, викликаючи сульфідне псування консервів без бомбажу. Утворений H_2S апробується продуктами, які набувають запах протухнення яєць. Грампозитивний, рухомий.

Bac. stearothermophilus — палички, що розміщуються інколи у вигляді ниток. Грампозитивні, рухомі. Спори розміщуються термінально або

субтермінально, клітини роздуті, мають форму ракеток. МПЖ не розжижають, індол не утворюють. Можуть рости при температурі 37 -70 °С. При 28 °С не ростуть.

Vac. arothermophilus — облігативний термофіл — аероб. Грампозитивний. У МПБ утворює помутніння і осадок у вигляді пластівців.

Дослідження консервів до стерилізації. Всі консерви до стерилізації допускаються

х такими нормами бактеріальної забрудненості.

Дослідження проводяться з метою визначення загальної бактеріальної забрудненості.

Проби відбирають перед стерилізацією зразу після закати із 10 перших банок, приготовлених на початку зміни, потім повторюють по одну пробу відбирають із перших банок, виготовлених після обідньої перерви.

Для проведення дослідження беруть скляну або металеву банку в 1,5 рази більшу за об'ємом, ніж досліджувана із стерильною водопровідною водою. Воду беруть, в об'ємі, рівному об'єму вмістимого консервів. Банку стерилізують в автоклаві.

Вміст консервної банки перекладають у банку з водою, і струшують 2-3 хвилини і відбирають проби для посіву.

Для визначення загальної бактеріальної забрудненості 1 мл розведення заливають чашку Петрі і додають 20 мл розплаву леного та охолодженого до 45 -47 °С МПА. Пробу перемішують із середовищем і після застигання поміщають в термостат при температурі 37°С на 24 год.

Спори термофільних бактерій-збудників плоскокислого псування консервів виявляють за тією ж схемою, що і визначення спорів готових консервів. Але відбирають проби у кількості 5 мл і заливають середовищем у кількості 25 мл МПА з 1 % глюкози і 0,004 % бромкрезолового червоного.

Середовище повинно мати слабофіолетове забарвлення. Посіви витримують у термостаті при температурі 55 °С протягом 24 -48 менш. Зміна кольору від фіолетового до жовтого свідчить про присутність у пробі термофільних бактерій.

Контрольні питання

1. Як проводять взяття матеріалу для дослідження?
2. Як проводять дослідження ковбас на присутність сальмонел?
3. Дослідження на присутність анаеробів (*Cl.botulinum*, *Cl.perfringes*, *Cl.putrificum* та інші)?

Практичне заняття № 17

Санітарно-бактеріологічний контроль спецій і кухонної солі.

Мета: Ознайомитись з методами бактеріологічного дослідження спецій і кухонної солі.

Обладнання та матеріали. Проби м'яса (свіже, підозрілої свіжості, несвіже); ножиці, шпателі, пінцети, скальпелі, предметне скло, спиртівки, набір фарб, мікроскопи, чашки Петрі з МПА, пробірки з МПЖ, МПБ, ступки з товкачиками, розчин реразурину.

Посол є важливою технологічною операцією у виробництві м'ясопродуктів: шинки, окостів, ковбас. У результаті засолу м'ясопродукти набувають характерні органолептичні властивості: смак, аромат, забарвлення. Посол грає провідну роль у утворенні специфічних властивостей продуктів і їх стійкості при зберіганні. Під час посолу у м'ясі відбуваються зміни, зумовлені ферментами м'яса і ферментами мікроорганізмів, що взаємопов'язані і мають вплив один на одного. Розрізняють декілька способів посолу. Нині широкого поширення набув метод розсільного посолу, шприцювання, при якому розсіл нагнітається безпосередньо вглиб м'яса. У розсіл поряд з сіллю вносять цукор, спеції, нітрит, аскорбінову кислоту. Цукор надає продукту ніжність, м'якість; спеції – аромат; нітрит – для пігментоутворення. Нітрит надає згубну дію на грамнегативні палички сімейства кишкових бактерій і багато видів клостридій, і зокрема на *Clostridium botulinum*. Багато авторів саме цим обґрунтовують застосування нітриту при посолі м'ясопродуктів. Важливу роль при цьому відіграє рН, оскільки при рН 6,0 і нижче гнітючий вплив нітриту на мікроорганізми зростає в 10 разів. Кухонна сіль володіє комплексним впливом на мікроорганізми. Консервуючий вплив кухонної солі пов'язано з підвищенням осмотичного тиску середовища і прямою антимікробною дією іонів хлору. Як відомо, у середовищі з високим осмотичним тиском виникає зневоднення і плазмоліз клітин мікроорганізмів. У результаті порушується життєдіяльність багатьох мікробів, частина з яких гине, а частина переходить у стан анабіозу. Встановлено також, що іони хлору справляють гнітючий вплив на мікробні клітини, знижуючи їх ферментативну активність. Особливо пригнічуються протеолітичні ферменти. 177 178 2.2.2. Вплив кухонної солі на мікроорганізми

Мікроорганізми, що містяться в м'ясі і розсолі, характеризуються різною чутливістю до кухонної солі. Серед них розрізняють несолелюбиві, солестійкі і солелюбиві мікроорганізми. Несолелюбиві (негалофільні) мікроорганізми розвиваються в середовищах з концентрацією повареної солі 1 - 2% і припиняють розвиток при концентрації солі близько 6%. Такими є неспорують грамнегативні палички (протей, БГКП, псевдомонас). Солестійкі (солетолерантні) мікроорганізми здатні рости в середовищах з концентрацією солі 6 - 8% і зберігати життєздатність у середовищах з високим вмістом солі: 20% і більше. До них відносять багато видів коків,

молочнокислі бактерії, бацили, клостридії. Несолелюбиві мікроорганізми, чутливі до дії кухонної солі, у розсолі припиняють свій розвиток і відмирають. Солестійкі мікроорганізми зберігаються, частина з них адаптується до високої концентрації кухонної солі і починає розмножуватись, наприклад, молочнокислі бактерії, мікрококи. Активно розмножуються в розсолі галофільні мікроорганізми. Низькі температури в процесі посолу мають велике значення, тому що істотно обмежують розмноження мезофільних мікроорганізмів. Найбільш ефективна температура 3 - 5 оС, котра являється одним із факторів, що забезпечує пригнічення життєдіяльності цих мікроорганізмів. Зазвичай посол проводять за температури 6 - 9 оС і відносній вологості повітря 80 - 85%. При більш високих температурах процес посолу прискорюється, але зростає небезпека отримання бракованої продукції в зв'язку з розвитком небажаних мікроорганізмів. Необхідно відзначити, що в розсолі і м'ясопродуктах багато мікроорганізмів зберігають життєздатність тривалий час. Зокрема, високою стійкістю до умов посолу відрізняються деякі патогенні і токсикогенні мікроорганізми. Наприклад, сальмонели, бруцели, золотистий стафілокок зберігають життєздатність при посолі протягом декількох місяців. 179 Отже, не можна направляти в посол м'ясо хворих, ослаблених, стомлених тварин. Для засолу слід використовувати м'ясо, благополучне в санітарному відношенні. 2.2.3. Зміна мікрофлори в розсолах і м'ясопродуктах У процесі використання кількісний і якісний склад мікрофлори в розсолах змінюється, створюється характерна мікрофлора розсолів. Зміну складу мікрофлори пов'язано з впливом консервуючих факторів розсолу, а також з антагоністичними відносинами між мікроорганізмами. Як правило, у розсолах переважають галофільні і солестійкі мікроорганізми: мікрококи, молочнокислі бактерії, грамнегативні бактерії роду *Pseudomonas*, грампозитивні бацили картопляно-сінної групи. Молочнокислі бактерії і мікрококи складають корисну мікрофлору розсолів. У доброякісних зрілих розсолах кількість цих бактерій становить 90 % від загального числа мікроорганізмів. Молочнокислі бактерії і мікрококи володіють антагоністичною дією по відношенню до гнильних бактерій. Вони обумовлюють стійкість розсолів, оберігають їх і солоні м'ясопродукти від псування. Таким чином, при посолі м'яса мають місце такі захисні фактори: концентрація кухонної солі, понижена температура, мікробний антагонізм, що забезпечують стійкість розсолів і м'ясопродуктів. У результаті діяльності корисних мікроорганізмів рН розсолів і м'ясопродуктів поступово знижується і встановлюється в інтервалі 5,8 - 6,0, тобто реакція середовища перестає бути оптимальною для бактерій, що розщеплюють білок, але не пригнічує впливу на корисні мікроорганізми. Молочнокислі бактерії і мікрококи беруть участь у створенні специфічного смаку, аромату і поліпшення кольору в зв'язку з утворенням ароматичних сполук, органічних кислот, спиртів, летких жирних кислот і ін. 180 Нині розроблена методика інтенсифікації посолу окостів з використанням штамів молочнокислих бактерій, адаптованих до умов посолу. У результаті ферментативної

діяльності корисної мікрофлори в продукті накопичуються органічні кислоти, спирт, амінокислоти, карбонільні сполуки, що створюють специфічний аромат. 2.2.4. Санітарні вимоги до розсолу Розсоли повинні відповідати певним санітарним вимогам. Вони не мають містити патогенних мікроорганізмів, стійких до високих концентрацій солі, зокрема сальмонел. До шприцювальних розсолів пред'являють особливі високі санітарні вимоги: не допускається наявність спороутворюючих бактерій, наявність ентерококів допускаються тільки в незначній кількості (більше ніж в 50 мл), так, як вони викликають закисання розсолів і м'ясопродуктів. У заливочних розсолах після 5-хвилинного кипіння ентерококи не повинні міститись в 500 мл, а спори анаеробних клостридій і аеробних бацил – в 50 мл розсола. Псування розсолів відбувається при підвищеній температурі посолу, недостатній концентрації солі, підвищеному мікробному обсіменінні сировини, порушенні санітарно-гігієнічних умов. У зіпсованих розсолах відзначається поява неприємного запаху і смаку, утворення мути, пластівців, піни. Доброякісність розсолів оцінюється за результатами редуцтазної проби з метиленовим синім. У пробу розсолу додають розчин метиленовий синій і спостерігають за часом його знебарвлення. У розсолах з ознаками псування знебарвлення метиленового синього відбувається через 5 - 30 хв., у той час, як в доброякісних розсолах – через 1 годину. Збудниками псування розсолів найчастіше є ентерококи, бактерії роду *Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. 181 При зберіганні солоних м'ясопродуктів можливе їх псування під дією мікроорганізмів. Це може бути поверхнєве і внутрішнє гниття, пліснявіння, зміна кольору, запаху, смаку. Запобігання псуванню копчених і варених м'ясопродуктів досягається дотриманням температури 4 - 6 оС і обмеженням терміну зберігання. Продукти тривалого посолу (шпиг, окіст, копчений і солоний свинячий рулет) дозволяється зберігати за температури не вище 12 оС і відносній вологості повітря 70 - 80% протягом 5 - 9 місяців.

Контрольні питання

1. Як проводять взяття матеріалу для дослідження?
2. Як проводять дослідження спецій?
3. Як проводять дослідження кухонної солі?

Практичне заняття № 18

Мікробіологічне дослідження кондитерських виробів.

Мета: Ознайомитись з основними методами мікробіологічного дослідження **кондитерських виробів**

Обладнання: Зразки хлібобулочних виробів зразки кремових виробів, зразки цукру та кондитерських виробів, стерильний трафарет, водяна баня, ватний тампон, стерильна вода, середовище Ендо, стерильний пінцет, стерильна колба, м'ясо-пептонний бульйон, термостат, чашки Петрі, ексікатори, мікроскоп. стерильні ложки, стерильний фізіологічний розчин,

середовище Кесслера, піпетка, молочно-жовтковий сольовий агар Чистовича, шпатель Дригальського.

Виявлення зовнішнього забруднення хліба кишковою паличкою. На поверхню хліба накладають стерильний трафарет (10x10 см) і зазначену поверхню протирають ватним тампоном, змоченим в стерильній воді. В промивній воді засобом висіву на середовище Ендо визначають колонії кишкової палички. Наявність колоній з металевим блиском та негативне забарвлення за Грамом свідчить про наявність кишкової палички. Наявність бактерій групи кишкової палички на хлібі не допускається.

З м'якушки пшеничного хліба стерильним пінцетом вирізають скибку масою 10-20 г, поміщають в стерильну колбу, заливають 100 мл стерильної води і енергійно перемішують 5 хв. З отриманої емульсії готують розведення $1-10^2$ - $1-10^3$. По 1 мл кожного розведення висівають в рідкий м'ясо-пептонний бульйон. Посіви термостатують 48 год. при 37 °С. Білу булку ріжуть на скибки товщиною 2-3 см, які розкладають в чашки Петрі і стерилізують 20 хв при 0,15 МПА. Після охолодження на поверхню скибок наносять по 10 мл бульйонної культури в стадії бродіння. Чашки поміщають в ексікатори, на дно яких наливають воду, і поміщають в термостат при температурі 35-37°С на 2 доби. За наявності картопляної палички спостерігається ослизнення та потемніння скибок і з'являється специфічний запах. Оцінку хліба проводять таким чином: хліба з титром 1 : 10 - заражений слабо; з титром 1 : 10^2 - середньо, з титром 1 : 10^3 —сильно.

Загальні відомості про мікроорганізми, що викликають хвороби хліба. *Пліснявіння хліба.* Це найбільш поширена хвороба хлібу. Під дією ферментів плісняви у виробках відбуваються небажані процеси: з'являються неприємний смак і запах. Зовнішній вигляд хлібних виробів різко погіршується.

Оптимальні умови розвитку даної хвороби хліба є висока вологість середовища (виробів), температура в межах 25-30°С, відносна вологість повітря від 70 до 80 %, рН 5-6. Особливо швидко пліснявіє хліб, нарізаний скибочками. Небезпека пліснявіння збільшується при пакуванні недостатньо охолодженого хліба. Зараження хліба спорами міцеліальних грибів може відбуватися через і забруднене повітря, транспортні і пакувальні засоби, руки і одяг працюючих. Міцелій грибів розповсюджується спочатку по поверхні хліба, після цього по тріщинам і порам проникає всередину м'якушки. Пліснявіння хліба викликають гриби роду *Aspergillns* що утворюють пухнасті покриття, пофарбовані в різні кольори: жовто-зелений – *Asp. flavus*, сіро-блакитний - *Asp. fumigatus*, сіро-зелений - *Asp. glaucus*, чорний — *Asp. niger*, світло-коричневий — *Asp. nidulans*, жовто-оранжевий — *Asp. ochraceus*, блідо-жовтий – *Asp. Candidus*; роду *Penicillium*: сіро-зелений — *P. crustosum*, жовто-зелений — *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. Stoloniferum*; роду *Mucor*: жовтуватого-сірий - *M. mucedo*, сірий - *M. pusillus*, сіруватого-чорний – *M. plumbeus*, білий з чорними головками - *Rhizopus nigricans*, білий *Geotrichum candidum*. Ферменти міцеліальних грибів гідролізують вуглеводи, білки і жир і несприятливо впливають на якість хліба внаслідок появи затхлого запаху і

неприємного смаку. Деякі види грибів утворюють в хлібі мікотоксин (афлатоксини, патулін, охра-токсин, рубратоксин і ін.) не тільки шкідливі, але і канцерогенні для людей

Для попередження пліснявіння хліб необхідно зберігати в сухому, добре вентиляваному приміщенні з температурою не вище 10-12 °С. Поверхня хліба повинна бути без тріщин і пошкоджена. Бажано очищати повітря, дотримуватися правил особистої гігієни. Для того щоб запобігти пліснявінню хліба, необхідно: додавати в тісто консерванти; стежити за належним станом транспортних засобів, приміщень, обладнання, інвентарю; видаляти пліснявілий хліб із загальної маси виробів; проводити своєчасно дезінфекцію транспортних засобів, обладнання і торговельного інвентарю при виявленні ознак пліснявіння; систематично провітрювати приміщення; упаковувати хліб (цілий або скибочки) у герметичну вологонепроникну термостійку плівку з наступною тепловою стерилізацією (температура в центрі м'якушки має бути 85-90 °С, строк зберігання хліба кілька місяців); обробляти по верхню хліба сорбіновою кислотою з наступним упаковуванням у плівкові матеріали (строк зберігання хліба від 4 до 6 місяців); обробляти поверхню хліба 96 %-ним спиртом з наступним упаковуванням у плівкові матеріали (строк зберігання хліба від 2 до 6 тижнів); упаковувати хліб у полімерні плівки з наступним вакуумуванням; зберігати хліб в атмосфері вуглекислого газу або азоту. Запропоновані засоби стерилізації хліба (термічні, струмами високої частоти, ультрафіолетовим і іонізуючим опроміненням).

Крейдоподібна хвороба хліба. На поверхні скоринки або в м'якушці на місцях розрізу з'являються білі плями, що висихають і стають схожими на борошністий пил або розтерту крейду. Збудниками даної хвороби є дріжджі *Endomycopsis fibuliger* і *Trichosporon variabile*, що попадають на хліб після його випікання. Крейдоподібна хвороба зустрічається порівняно рідко, вважається безпечною для здоров'я людини, але пошкоджений хліб втрачає свою товарну цінність.

Почервоніння м'якушки хліба. При високій вологості повітря на випечених хлібобулочних виробках бактерії *Serratia marcescens* (чудова паличка) утворюють колонії червоного кольору, продукуючи при цьому червоний пігмент продигіозін. Ферменти *Serratia marcescens* зацукрують крохмаль і розпушують клейковину. Хліб з м'якушкою, що почервоніла втрачає товарний вигляд і є непридатним до вживання. На хлібі можуть розвиватися і інші бактерії, що утворюють пігменти жовтого, синього, фіолетового кольору. Деякі представники дріжджів роду *Rhodotorula* утворюють барвні речовини і викликають появу на хлібі жовтих, рожевих або яскраво-червоних слизистих плям.

«П'яний хліб». Зараження хліба викликають гриби роду *Fusarium*, токсини, що накопичуються і є небезпечні. При випіканні хліба вони не руйнуються і виявляються тільки при вживанні хліба в їжу. Зерно, що перезимувало на полі, не повинно перероблятися в борошно без прийняття відповідних заходів.

Картопляна (тягуча) хвороба спричиняється спорами картопляної (сінної) палички, які потрапляють у хліб разом з борошном. Ці мікроорганізми не гинуть при температурі 100°C, протягом 10 хв. витримують температуру 125 °С. При температурі 130 °С миттєво гинуть. Стимулює проростання спор і розвиток вегетативних клітин бактерій зберігання хліба при температурі більш 20 °С, підвищена вологість, рН 7. При рН 4,5-4,8 бактерії не розвиваються. Зараження хліба картопляною хворобою спостерігається в основному в теплий період року після 10 год. зберігання при температурі 30-40 °С. Прискорюють цей процес низька кислотність та підвищена вологість виробів. Картопляною хворобою заражує в основному пшеничний хліб. Особливо це стосується хліба великої маси. Про початок хвороби свідчить поява специфічного слабкого фруктового запаху. При розламуванні м'якушки виявляються тонкі слизисті сріблясті нитки. Після цього м'якушка стає вологою, липкою, ослизлою. При його розрізуванні видні довгі, тягучі, пружні нитки. Колір м'якушки змінюється від світло-жовтого до жовто-коричневого. Запах стає неприємним, викликає огиду.

Для того, щоб запобігти хворобі, необхідно: швидко охолоджувати хліб; випікати вироби меншою масою; підвищувати кислотність хліба в межах одного градуса, використовуючи молочно - кислі закваски, рідкі дріжджі, дозрілу опару, молочну і оцтову кислоти, пропіоновокислі і мезофільні молочнокислі бактерії; зберігати хліб у сухому, добре вентильованому, прохолодному приміщенні (при температурі нижче за 16 °С хвороба не розвивається); стежити за належним санітарним станом транспортних засобів, приміщення, обладнання, інвентарю; видаляти заражений хліб із загальної маси виробів; проводити своєчасно дезінфекцію (оцтовою кислотою) транспортних засобів, приміщення, обладнання, торговельного інвентарю; в разі повторного використання для випікання пшеничного хліба сушити черствий хліб при температурі понад 80 °С.

Креми є сприятливим поживним середовищем для розвитку мікроорганізмів. При порушенні санітарного режиму виготовлення, зберігання і реалізації в кремових виробах можуть виявлятися мікроорганізми — сапрофіти (кишкова, сінна палички, молочнокислі бактерії, плісняві гриби, дріжджі та ін.); можливий також вміст умовно-патогенної та патогенної флори. З патогенних мікроорганізмів, здатних активно розвиватися в кремах, особливої уваги заслуговує золотистий стафілокок. Деякі штами його утворюють ентеротоксин і можуть стати причиною важких харчових отруєнь. Джерелом зараження виробів з крему стафілококами є, як правило, люди, хворі гнійними і простудними захворюваннями, пил неприбраних приміщень, забруднена сировина (молоко, яйця).

В кремі можуть також розмножуватись сальмонели.

Можливість розвитку мікрофлори найбільш ймовірна в виробах з заварним кремом внаслідок порівняно низької концентрації цукру і підвищеної вологості.

Бактеріологічне дослідження якості кондитерських кремових виробів передбачає: 1) визначення титру бактерій групи кишкових паличок; 2) виявлення плазмокоагулюючих стафілококів в 1 г виробів; 3) виявлення бактерій роду сальмонел. Бактеріологічний аналіз кремових виробів здійснюється в комплексі досліджень при планових обстеженнях підприємств кондитерсько-кремових виробів, при контролі умов зберігання і реалізації виробів в торговельній мережі, а також з епідемічних показань. Об'єктом дослідження є крем на різноманітних етапах його виготовлення і в готових виробах.

В відповідності з методичними вказівками, затвердженими Міністерством охорони здоров'я, титр бактерій групи кишкових паличок в кремових виробах повинен бути не нижче 0,01 г, кількість плазмокоагулюючих стафілококів — не більш 500 в 1 г (або 1 мл), присутність бактерій роду сальмонел не допускається.

Завдання № 1.

1. Приготувати середню пробу крему. З цією метою стерильною ложкою відібрати 50 г крему з різних ділянок виробу, розтопити його в стерильній колбі в водяній бані при температурі 45 °С.

2. Для визначення колі-титру приготувати ряд послідовних розведень крему:

а) взяти три пробірки зі стерильним фізіологічним розчином (по 9 мл);

б) з нижнього шару розтопленого крему відібрати 1мл, внести його в 1-у пробірку з 9 мл фізіологічного розчину (розведення 1:10) і приготувати ряд послідовних розведень (1:100 і 1:1000);

в) зробити посів вхідного матеріалу і його розведень на середовище Кесслера: розтоплений крем (1 мл) в колбу з 20 мл середовища, розведення крему (по 1 мл кожного розведення) — в пробірки. Термостатування при температурі 43 °С.

3. Для визначення наявності плазмокоагулюючих стафілококів відібрати піпеткою з нижнього шару розтопленого крему 0,1 мл, перенести на поверхню молочно-жовткового сольового агару Чистовича (МПА з 10 % NaCl і 20 % жовткової суспензії) і рівномірно розподілити по поверхні агару шпателем Дригальського. Термостатування при температурі 37 °С.

Завдання № 2.

1. Для визначення колі-титру крему врахувати бродильну пробу (поява бульбашки газу у поплавку). В навчальних цілях дослідження закінчити. Обчислити колі-титр по 1-й бродильній пробі (табл. 4). Відзначити в протоколі, що в бактеріологічних лабораторіях дослідження продовжується за звичайною схемою ідентифікації бактерій групи кишкових паличок (посів на середовище Ендо, мікроскопія мазків, порушення 2-ї бродильної проби).

2. На середовищі Чистовича (виявлення патогенних стафілококів) відзначити підозрілі колонії, що містять золотистий пігмент і оточені зоною

просвітлення (розщеплення лецитину за рахунок лецитинізації активності штамму). Визначити за кількістю колоній число стафілококів в 1 г продукту (число колоній помножити на 10 у відповідності з кількістю взятого матеріалу).

2. Демонстрація:

- а) ознайомитись з особливостями патогенного стафілококу переглянувши посіви на кров'яному агарі і відзначити зону гемолізу навколо колоній;
- б) переглянути посів стафілококу в плазму крові і відзначити коагулювання плазми.

Результати аналізу записати за формою:

Назва продукту	Колі-титр	Наявність патогенного стафілококу	Відповідність санітарним вимогам
Крем заварний			

Забруднення цукру-піску мікроорганізмами відбувається в процесі його очищення, сушіння, упаковки і зберігання. В сухому цукрі-піску виявляють осмофільні дріжджі, спори мезофільних і термофільних бактерій *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Desulfotomaculum nigricans*, кислотоутворюючі бактерії, *Leuconostoc mesenteroides* і *L. dextrarucum*, конідії міцеліальних грибів (*Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. flavus*, *Asp. clavatus*, *P. glaucum*), спори *Rhizopus nigricans*. При підвищеній вологості (більш 0,15%) кількість мікроорганізмів в 1 г цукру-піску зростає.

На поверхні мармеладно-пастильних виробів частіше розвиваються колонії міцеліальних грибів роду *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Для попередження їхнього розвитку рекомендується мармелад упаковувати в пергаментний папір, оброблений 1 %-ним розчином бензойнокислого натрію або 0,4 %-ним спиртовим розчином сорбінової кислоти. Розривання, розтріскування і псування форми шоколадних виробів з кремовим наповнювачем або помадкою пов'язані з газоутворенням в результаті розмноження осмофільних дріжджів роду *Saccharomyces*, рідше *Brettanomyces*. В середині цих виробів можуть бути виявлені також гриби *Penicillium* і *Aspergillus*.

Виготовлення карамелі, цукерок, шоколаду на механізованих поточних лініях виключає контакт готових виробів з руками обслуговуючих осіб. Невелика вологість, висока концентрація цукру і тверда консистенція перешкоджають розвитку мікроорганізмів. Тільки деякі сорти цукерок із вершковою помадкою або лікерною начинкою мають підвищену вологість, і при зберіганні можливо їх спучування, розтріскування і деформація корпусів. Причиною є виділення газів при зброджуванні цукрів осмофільними дріжджами і газоутворюючими видами бактерій.

Проби цукру-піску відбирають в стерильні скляні або металеві банки з добре притертими або герметичними кришками. З кожних 5 мішків відбирають біля 250-300 г цукру. Термін зберігання проб не більше 7 діб.

Кількість мікроорганізмів в 1 г цукру визначають шляхом висівання розведень (1:10, 1:10², 1:10³ і т.д.) глибинним методом в чашки Петрі на щільні диференціально-діагностичні середовища з прогрітих протягом 5 хв. і непрогрітих проб. В цукрі-піску визначають термофільні бактерії (кислотоутворюючі, анаеробні, що утворюють H₂S та анаеробні, що не утворюють H₂S); мезофільні мікроорганізми (слизоутворюючі бактерії, осмофільні дріжджі, міцеліальні гриби).

Мікробіологічний контроль шоколадної продукції проводять на вимогу санітарної інспекції і визначають колі-титр, загальний вміст бактерій і наявність патогенних видів. В виробі не повинно бути виявлене кишкових паличок і тим більш патогенних мікроорганізмів.

Контрольні питання

1. Як проводять взяття матеріалу для дослідження?
2. Крейдоподібна хвороба хліба?
3. Картопляна (тягуча) хвороба?
4. Почервоніння м'якушки хліба.

Практичне заняття № 19 Сучасні методи мікробіологічних досліджень сировини та харчових продуктів

Мета: Ознайомитись з основними методами мікробіологічного дослідження плодів та овочів.

Обладнання: Зразки плодів та овочів, рушник, вата, спирт, скальпель, бактеріологічна петля, стерильна вода, предметні скельця, стерильна ступка, шпатель, агар, стерильні чашки, скляні палички, термостат, мікроскоп.

Овочі миють водою для видалення механічних включень або обтирають рушником, після цього оглядають. Здорова тканина плодів і овочів стерильна, тому аналізу підлягає тільки уражена частина. Призначену для аналізу частину продукту обтирають тампоном, змоченим у спирті. В місці ураження стерильним скальпелем зрізують шматочок тканини і захоплюють матеріал на межі ураженої і здорової ділянки стерильною петлею. Суспензують його в краплі стерильної води на опаленому предметному склі (якщо матеріал рідкий, вода на склі не потрібна). Після цього готують препарат. Одночасно з зрізу ураженої поверхні готують препарат - відбиток.

Для виділення збудників захворювання шматочок ураженої тканини розтирають в стерильній ступці. Петлю кашки або краплю тканинної рідини розподіляють шпателем по пластинці живильного агару. Після першого

посіву шпатель переносять на нові стерильні пластинки живильного агару. Посіви термостатують. Невеликий шматочок ураженої тканини або одну-дві петлі тканинної рідини поміщають в цукровий МПБ або в елективні середовища. Посіви термостатують при 22-25 °С протягом двох-трьох діб. З середовища накопичування роблять посів мікробної суспензії засобом послідовних посівів на пластинки живильного агару. Після термостатування посівів виділяють масову мікрофлору в чисті культури, вивчають комплекс ознак і ідентифікують їх. При груповому аналізі визначають кількість груп мікроорганізмів за морфологічним ознаками; однакові колонії об'єднують в одну групу.

Для перевірки паразитарних властивостей чистих культур мікроорганізмів, виділених з уражених ділянок, здорові плоди (овочі) ретельно промивають звичайною, а після цього стерильною водою. Стерильним скальпелем розрізають плоди (овочі) на половинки. В стерильні чашки наливають трохи стерильної води і кладуть вимиті спиртом і опалені скляні палички, на них поміщають підготований продукт. Стерильним скальпелем роблять повздовжні глибокі подряпини на зрізаній поверхні плоду, в які вносять бактеріологічною петлею чисті дослідні культури. Чашки закривають кришками, посіви поміщають в термостат на декілька днів, постійно спостерігаючи за станом інфікованих зразків. Якщо виділені чисті культури є паразитами або напівсапрофітами даних плодів і овочів, то на пораненій поверхні через деякий час будуть помітні зовнішні зміни тканини: ослизнення, потемніння, утворення плівки або нальоту. Ці зміни є наслідком розмноження культури мікробу на поверхні плодів і овочів. Переконатися в цьому можна при мікроскопуванні препарату з матеріалу зміненої тканини.

Мокра бактеріальна гниль картоплі. Із ураженої мокрою гниллю бульби картоплі препарувальною голкою відбирають трохи слизистого нальоту і виготовляють мікропрепарати живих і вбитих бактерій. При виготовленні фіксованих препаратів на предметному склі в краплині дистильованої води виготовляють мазок, фіксують його і фарбують фуксином. Виготовлені препарати старанно вивчають під мікроскопом при сухій та імерсійній системах. У полі зору його виявляються бактерії, що мають форму невеличких паичок, - *Bacterium xanthochlorum Schuster*.

Фітофтороз картоплі. Із зараженої частини рослини (бульба, листя або інші органи) за допомогою препарувальної голки знімають трошки білувато-сірого пухнастого нальоту, з якого у краплині дистильованої води на предметному склі виготовляють препарат «роздавлена крапля». Його вивчають при малому і великому збільшенні за допомогою сухої системи мікроскопа. В полі зору добре видно спорангієносці зі спорангіями гриба. Препарат описують і зарисовують. Таким же методом можна вивчати збудників фузаріозів, інших пліснявих грибів, що спричиняють псування різних плодів, овочів, хліба та інших продуктів (*Fusarium*, *Rhizopus*, *Botrytis*, та ін.).

Бронзовість помідорів. На навчально – дослідній ділянці або в оранжереї чи парнику шукають рослини з характерними симптомами хвороби (типovими ознаками захворювання помідорів на мозаїку є наявність різнокольорових кілець на листках, бронзовий «загар» і некротичні плями). При уважному розгляданні рослин на їхніх листках можна побачити нерівномірний розподіл жовтих, світло-зелених і темних плям. Хвороба також виявляється і потовщенням жилок молодих листків.

Після виявлення таких рослин визначають відсоток зараженості. Для цього на однорідній ділянці обстежують 100 рослин серед них виявляють кількість заражених. Щоб підтвердити діагноз хвороби, бритвою роблять зріз із листка з волосками зараженої рослини і виготовляють препарат «роздавлена крапля», який розглядають під мікроскопом. Якщо в клітинах волосків будуть наявні безбарвні кристали, то це свідчитиме про правильність встановленого діагнозу хвороби рослин.

Контрольні питання

1. Що таке мокра бактеріальна гниль картоплі?
2. Що таке бронзовість помідорів?
3. Охарактеризуйте фітофтороз картоплі?

Практичне заняття № 20

Мікробіологічний контроль матеріалів виробництва.

Мета: Ознайомитись з методами мікробіологічного контролю апаратів та обладнання.

Контроль апаратів і обладнання. Контроль проводять після мийки, дезінфекції і пропарювання перед початком роботи шляхом посіву відібраних змивів для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл, а у випадку необхідності присутність слизоутворюючих бактерій. У ряді харчових підприємств (безалкогольні, дріжджові) змиви одночасно досліджують на присутності бактерій кишкової палички.

Підготовлюють стерильні ватні чи марлеві тампони, пробірки з 10 мл стерильною водою (чи фізіологічний розчин) і стерильні пінцети.

Тампони можна закріпити на дерев'яних стержнях, кожний окремо опустити у пробірки, з 10 мл води і простерилізувати при 0,1 МПа протягом 20-30 хв. Змиви з великого обладнання апаратів беруть за допомогою нержавіючих металевих трафаретів, з вирізаною серединою (площа вирізу 10,25 або 100 см²).

Перед тим, як взяти проби, трафарет замочують спиртом, обпалюють і накладають на досліджувану поверхню. Обмежену площу промивають змоченим тампоном, після чого тампон опускають у ту ж пробірку, опускають у воду, що залишилася або в фізіологічний розчин і добре перемішують. Висівають 1 мл змиву на м'ясопептоний агар. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування при 37°C протягом

48 год. Змив можна використати для визначення слизоутворюючих бактерій (лейкоостока) висівом на спеціальні середовища. Залишок змивної рідини разом з тампоном висівають в пробірки з поплавками і 5 мл середовища Кесслера, витримують в термостаті при 43 °С протягом 18-24 год. Використовуючи індикаторний папір, аналіз реєструють через 12 год при 43 °С.

У змивах стерильного обладнання і апаратів мікроорганізми відсутні. У добре вимитих апаратах загальна кількість мікроорганізмів і титр кишкової палички не повинна перевищувати їх вміст в чистій воді, яка поступає для миття. Кількість слизоутворюючих бактерій не повинна бути більше 0-5 в 1 мл.

Контроль трубопроводів, рукавів, шлангів. Внутрішня поверхня трубопроводів, рукавів, шлангів деяких апаратів недоступна для взяття змивів за допомогою траферета. У цьому випадку перевірку на присутність мікроорганізмів і Колі-титр проводять шляхом мікроскопування препаратів і посівом останньої промивної води.

У стерильний посуд відбирають зразки води при виході з досліджувальних об'єктів, 10 мл промивної відцентрифугують при 1500-2000 об/хв протягом 10 хв. Центрифугат зливають, осад мікроскопують. В 10 полях зору повинно бути не більше 5-6 клітин. На присутність мікроорганізмів у кожному полі зору вказує на незадовільне миття. Посів на загальну кількість мікроорганізмів проводять на пептидний чи сусло-агар.

Колі-титр визначають методом мембранних фільтрів чи бродильних проб. Загальна кількість мікроорганізмів і колі-титр промивної води не повинні відрізнятися від показника води, яка застосовується у промисловості.

Контроль посуду та інвентарю. З кожної мийної машини відбирають 5-10 вимитих пляшок і закривають стерильними ватними корками. У лабораторії їх добре прополіскують 100 мл стерильної води (чи фізіологічного розчину), послідовно переливають з однієї пляшки в іншу і змочують всю поверхню. З останньої пляшки роблять посів для визначення загальної кількості мікроорганізмів. У перерахунку на одну пляшку повинно бути не більше 300, в 1 мл промивної води не більше, ніж у воді, яка застосовується для прополіскування пляшок, слизоутворюючих бактерій; колі-титр повинен бути не менше 100.

Бочки, бідони, цистерни. Визначення якості миття проводять мікроскопуванням осаду після центрофугування проти останньої промивної води чи шляхом її посіву на щільні поживні середовища. Загальна щільність мікроорганізмів у 1 мл і колі-титр не повинні відрізнятися від води, яка застосовується у промисловості.

Шканти-корки, кронен-корки: для аналізу відбирають 300-500 мл води, в якій знаходились у період роботи корки і шканти. Посів на загальну кількість мікроорганізмів роблять на м'ясо-пептидний чи сусло-агар. На присутність бактерій групи кишкової палички визначають фільтруваннями через мембранний фільтр. Загальна кількість мікроорганізмів і кишкових паличок повинна бути така не, як у воді, що поступає у промисловість.

Кронен-корки (10 шт.) відбирають пінцетом у стерильну кружку 100
мл
стерильної води і протягом 5 хв трусять у воді, визначають загальну кількість
мікроорганізмів і колі-титр.

Цеховий інвентар. Для оцінки миття цехового інвентарю проби відбирають в той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. З дрібного інвентаря (мішалки, пробники, термометри, ножі, шприци) мазки беруть стерильними тампонами з всієї поверхні предмета і досліджують на загальну кількість мікроорганізмів, а також роблять посів в середовище Кесслера для визначення при сутності кишкової палички. Зі столів, лотків, відер, лопат і т.д. мазки беруть стерильним тампоном за допомогою обпаленого трафарету і роблять аналогічні аналізи.

Контроль чистоти промислових приміщень. Чистоту стін і підлоги приміщень контролюють шляхом мікроскопування проб, взятих таким шляхом: збирають частину забрудненої поверхні, цю частину поміщають у пробірку зі стерильною водою, добре збовтують, готують препарат і розглядають під мікроскопом без забарвлення або після забарвлення масел метиленовим синім. Для кількісного розрахунку мікроорганізмів користуються трафаретом і стерильним, змоченим ватним тампоном, з наступним посівом на щільні середовища у чашці Петрі.

Контрольні питання

1. Як проводять контроль апаратів і обладнання?
2. Як проводять контроль трубопроводів, рукавів, шлангів?
3. Як проводять контроль посуду та інвентарю?

Практичне заняття № 21

Контроль особистої гігієни працівників.

Мета: Ознайомитись з методами мікробіологічного контролю особистої гігієни працівників.

Контроль апаратів і обладнання. Контроль проводять після мийки, дезінфекції і пропарювання перед початком роботи шляхом посіву відібраних змивів для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл, а у випадку необхідності присутність слизоутворюючих бактерій. У ряді харчових підприємств (безалкогольні, дріжджові) змиви одночасно досліджують на присутності бактерій кишкової палички.

Контроль чистоти рук і одягу. Чистоту перевіряють перед початком процесу у робітників, маючи контакт з продукцією чи чистим обладнанням. Контроль про-водять без попередження.

Закріплений на дерев'яному стержні стерильний тампон змочують стерильною водою (чи фізіологічним розчином) і протирають ним долоні, поверхню рук, під нігтями і між пальцями рук. Тампон занурюють у ту ж пробірку, в якій проходило змочування, добре збовтують, відбирають 1 мл і підготовлюють розведення (1:10 і 1:100).

Для визначення загальної кількості мікроорганізмів у 1 мл змиву проводять посів розведений на м'ясо-пептонний агар з послідовним термостатуванням при 37 °С протягом 43 °С. Потім визначають присутність кишкових паличок за метолом бродильних проб.

Можна використати і такий метод: у складені долонями разом кисті рук наливають 100 мл стерильної води так, щоб вода добре промокла пальці. Стерильним тампоном протирають долоні й нігті. Воду збирають у стерильну склянку і туди кидають тампон. Змивну воду перемішують і проводять аналогічні посиви. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів у 1 мл зливу при відсутності кишкових паличок.

Періодично перевіряють обробку рук хлоруванням. Для цього проводять якісну реакцію: ватний тампон змочують йодкрохмальним розчином і протирають деякі частини рук. У присутності хлору тампон і протерта частина рук забарвлюються у синьо-бурий колір.

Халати, куртки, рукавиці з тканини періодично досліджують на присутність кишкових паличок посівом 1 мл змивної води у середовище Кесслера. Кишкові палички на чистому спецодязі відсутні.

Облік бакдослідження рук робітників

в) Визначення БГКП (по індикаторному папірцю) Для обліку роздивляються індикаторні папірці. Наявність червоних плям на них свідчить про присутність бактерій групи кишкової палички. Підраховують кількість плям та проводять розрахунки за формулою:

$$\text{БГКП} = a * c ,$$

де а – кількість плям з обох сторін папірця; с – кратність вбирання папірцем фізрозчину; с=2.

Отримані результати порівнюють з допустимими нормами.

Б) Визначення БГКП (по середовищу Кеслер). Для визначення результатів аналізу на БГКП по середовищу Кеслер роздивляються пробірки з посівами. Наявність газоутворення або змінення кольору свідчить про присутність БГКП.

Контрольні питання

1. Проведення контролю чистоти рук і одягу?
2. Коли перевіряють чистоту рук у робітників?
3. Коли перевіряють чистоту одягу у робітників?

Тестові завдання для самоконтролю

1. З яких частин складається мікроскоп:
 - Механічно та оптичної;
 - Предметного столика;
 - Тубосотримача;
 - Окуляра.
2. Предметне скло являє собою:
 - Грубе скло;
 - Пластинка розміром 76*26 мм;
 - Пластинка розміром 28*58;
 - Частина мікроскопу.
3. Зберігають скельця в:
 - В банках з 96% спиртом;
 - В реактиві Несслера;
 - В банках з гліцерином;
 - В банках з водою.
4. Після висушування проводять:
 - Фарбування;
 - Фіксація;
 - Внесення культури на предметне скло;
 - Дезінфікують.
5. На скільки часу наносять фарбу фуксин:
 - 7-8 хв.;
 - 4-5 хв.;
 - 1-2 хв.;
 - 3-5 хв.
6. До складних методів відноситься:
 - Простий метод;
 - Грамнегативний;
 - Негативний метод;
 - Грампозитивний.
7. При фарбування по Козловському використовують фарбу:
 - Сафранін;
 - Фуксин;
 - Розчин Люголя;
 - Метиленовий синій.
8. Негативний метод базується на:
 - Фарбуванні бактерій, а не предметного скельця;
 - Фарбуванні фону, а бактерії залишаються не пофарбовані;
 - Фарбування і фону, і бактерій;
 - Не фарбуванні і фону, і бактерій.
9. За методом Грама грамнегативні бактерії зафарбовуються у:
 - Фіолетовий;

- Синій;
 - Червоний;
 - Зелений.
10. Культуру на предметне скло вносять:
- Бактеріологічною петлею;
 - Руками;
 - Щупом;
 - Стерильною паличкою.
11. Що розміщують у стерилізаційній кімнаті:
- робочі столи;
 - шафи з інструментами;
 - бокси;
 - автоклави для стерилізації поживних середовищ і посуду.
12. При роботі з об'єктивом х8 відстань до препарату повинна бути до:
- До 1 см;
 - Більше 1 см;
 - 1,5 см;
 - 2,5 см.
13. Призначений для рівномірного освітлення поля зору і складається із дзеркала і конденсора з ірисовою діафрагмою – це:
- Об'єктив;
 - Дзеркало;
 - Освітлювальний апарат;
 - Тубус.
14. Біологічні мікроскопи використовують для розглядання прозорих, препаратів у проходящому світлі при збільшенні:
- Від 100 до 10000;
 - Від 20 до 35;
 - Від 5 до 10;
 - Від 56 до 1350.
15. Окуляр мікроскопа складається із:
- 5-ти лінз;
 - 2-ох лінз;
 - 3-ох лінз;
 - 10-ох лінз.
16. Монококи – це:
- Поодинокі кулясті клітини;
 - Коки, як розміщені попарно;
 - Розміщені у ланцюжок;
 - Нагадують кому.
17. За формою поділяють на:
- Шаровидні, хвилясті, кулясті, ниткоподібні;
 - Тетракоки, стрептококи:

- Трикутні, паличковидні;
 - Хвилясті, клосридії, кулясті.
18. З латинської “soccus”:
- Бактерії;
 - Віруси;
 - Ягода, зерно;
 - Спірохети.
19. Безхлорофільні мікроорганізми, які живуть на поверхні субстратів:
- Променеві гриби;
 - Цвілеві гриби;
 - Дріжджі;
 - Віруси.
20. Хітрідіоміцети, оміцети, зігоміцети – це:
- Середній клас грибів;
 - Надвищий клас грибів;
 - Нижчий клас грибів;
 - Вищий клас грибів.
21. Актиноміцети утворюють на поживних середовищах колонії розміром:
- 2-3 мм;
 - 15-20 мм;
 - 0,1-2 мм;
 - 1-10 мм.
22. Дріжджі відносять до:
- Еукаріотів;
 - Прокаріотів;
 - Клостридій;
 - Коринебактерій.
23. Для приготування якого препарату використовують предметні скельця з круглим заглибленням – лункою:
- Препарат «придавлена крапля»;
 - Препарат «висяча крапля»;
 - Препарат «живих клітин»;
 - Препарат «бактерій».
24. При якій температурі ростуть роди цвілі: *Cladosporium*, *Penicilium*.
- Penicilium*:
- Високих;
 - Низьких;
 - +15^oС;
 - Від 0 до +5^oС.
25. Актиноміцети – це:
- одноклітинні грампозитивні мікроорганізми;
 - багатоклітинні грамнегативні мікроорганізми;
 - одноклітинні грамнегативні мікроорганізми;

- колонії сірувато-зеленого або синьо-зеленого кольору.
26. Діляться у трьох взаємоперпендикулярних площинах і розміщуються у вигляді пакетів – це:
- Тетракоки;
 - Сарцини;
 - Диплококки;
 - Стріли.
27. аскоміцети, базидіоміцети, дейтеромицети – це:
- Середній клас грибів;
 - Надвищий клас грибів;
 - Нижчий клас грибів;
 - Вищий клас грибів.
28. Препарат «придавлена крапля» розглядають об'єктивом:
- 8х або 40х;
 - 10х;
 - 2х;
 - 8х або 15 х.
29. Чим змащують краї лунки препарату «придавлена крапля»:
- Кремом;
 - Водою;
 - Вазеліном;
 - Не змащують.
30. У препараті «придавлена крапля» розглядають:
- Цвілеві гриби;
 - Дріжді;
 - Актиноміцети;
 - Базидіоміцети.
31. До складу поживних середовищ повинні входити:
- органогенні елементи;
 - зольні мікроелементи;
 - деякі мікроелементи (марганець, мідь, натрій, хлор та ін.);
 - всі відповіді вірні.
32. За складом поживні середовища поділяють на:
- Природні та штучні;
 - Хімічні та фізичні;
 - Біологічні та біохімічні;
 - Всі відповіді вірні.
33. До натуральних(природних) середовищ відносять:
- М'ясо-пептонний бульйон та амінокислоти;
 - Мінеральні солі та амінокислоти;
 - Агар та вітаміни;
 - Агар, м'ясо-пептонний бульйон.
34. За призначенням розрізняють поживні середовища:

- універсальні;
 - елективні;
 - диференціально-діагностичні середовища;
 - Всі відповіді вірні.
34. Яке середовище використовують для диференціювання видів мікроорганізмів та ідентифікації чистих культур на основі вивчення біохімічних властивостей:
- Елективне середовище;
 - Диференціально-діагностичне середовище.
 - Універсальні середовища;
 - Жодне з цих.
35. За консистенцією поживні середовища бувають:
- Рідкими;
 - Щільними;
 - Сипучими;
 - Всі вірні.
36. Щільні поживні середовища використовують для:
- аналізу мікрофлори, виділення чистих культур мікроорганізмів;
 - зберігання видів мікроорганізмів та їх спор;
 - приготування посівного матеріалу;
 - накопичення біомаси, зберігання.
37. При якій температурі застигає агар:
- 40 °С;
 - 50 °С;
 - 30 °С;
 - 25 °С.
38. Температура плавлення желатину становить:
- 5-10°С;
 - 8-9 °С;
 - 22- 26,5 °С;
 - 40-45 °С;
39. У який розчин занурюють посуд перед використанням для приготування поживних середовищ:
- в 1-2 %-вий розчин соляної або сірчаної кислоти;
 - 9% - вий розчин оцтової кислоти;
 - В кип'ячену воду;
 - Не занурюють.
40. Повне знищення вегетативних клітин мікроорганізмів та їх спор – це:
- Автоклавування;
 - Стерилізація;
 - Кип'ятіння;
 - Пастеризація.

41. Поживні середовища стерилізують в автоклавах насиченим паром під тиском:
- 1- 1,5 МПа;
 - 0,05-0,2 МПа;
 - 2-2,5 Мпа;
 - 4-5 МПа.
42. Посів на рідке середовище проводять за допомогою:
- Щупа;
 - Шпателя;
 - Руками;
 - Петлею або піпеткою.
43. Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається:
- Культивуванням;
 - Пересівом;
 - Посівом;
 - Вирощуванням.
44. Культивування анаеробів здійснюється:
- Хімічним методом;
 - Фізичним методом;
 - Біологічним методом;
 - Всі методи вірні.
45. Головна відміна прокариотних організмів від еукаріотів:
- Відмін немає;
 - Відсутність ядра;
 - Відсутність ДНК;
 - Відсутність клітинної мембрани.
46. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до:
- 5 копій хромосом;
 - 9 копій хромосом;
 - 15 копій хромосом;
 - 40 копій хромосом.
47. Елементарна одиниця спадковості, що контролює синтез специфічного поліпептидного ланцюга – це
- Геном;
 - Ген;
 - Генотип;
 - Фенотип.
48. Плазмідні – кільцеві молекули ДНК молекулярною масою до:
- $10^{-6} - 10^8$;
 - $9^{-5} - 10^{-7}$;
 - $10^{-2} - 10^{-3}$;
 - 10^{-9} ;

49. Морфологічні зміни у старих мікробних клітин спостерігав:
- М.Ф. Гамалія;
50. Існуючі в одному біотопі популяції мікробів не стимулюють і не пригнічують один одного –це:
- Мутуалізм;
 - Нейтралізм;
 - Коменсалізм;
 - Антагонізм.
51. Форма симбіозу, коли мікроби живляться залишками їжі хазяїна, злущеним епітелієм кишечника тощо, але не завдають йому шкоди – це:
- Мутуалізм;
 - Нейтралізм;
 - Коменсалізм;
 - Антагонізм.
52. Пригнічення однієї популяції іншою – це:
- Паратизм;
 - Нейтралізм;
 - Коменсалізм;
 - Антагонізм.
53. До бактерицидних речовин належать:
- Органічні кислоти;
 - Спирти;
 - Антибіотики;
 - Всі відповіді вірні.
54. Які бактерії в процесі гідролізу сечовини сприяють накопиченню аміаку:
- Оцтовокислі бактерії;
 - Уролітичні бактерії;
 - Туберкульозних бактерій;
 - Паразитичні бактерії;
55. Антогонізм існує:
- Пасивний;
 - Активний;
 - Не поділяється;
 - Пасивний та активний.
56. Здатність двох або декількох видів бактерій здійснювати сумісно такий процес, який жодний з них не здатен здійснити самостійно – це:
- Синтрофія;
 - Консорціум;
 - Синергізм;
 - Паразитизм.
57. На субстраті при температурі 2°C найшвидше розвивається:
- *Spirillum* sp.;

- *Pseudomonas* sp.;
 - *Vampirovibrio chlorellavorus*;
 - *Chlorella*.
58. Взаємовідносини (співіснування) різних видів мікроорганізмів між собою, а також із іншими формами життя називають:
- Нейтралізм;
 - Паразитизм;
 - Симбіозом;
 - Коменсаліз.
59. Висока концентрація оцтової кислоти:
- запобігає розвитку інших мікроорганізмів;
 - запобігає утворенню високої кількості аміаку;
 - Не запобігає;
 - Прискорює розвиток інших мікроорганізмів.
60. Несприятливе середовище для розвитку патогенних мікроорганізмів – це:
- Грунт;
 - Повітря;
 - Вода;
 - Всі відповіді вірні.
61. Присутність у ґрунті певної кількості клітин *E. coli* та *Streptococcus faecalis* вказують на:
- Несвіже забруднення;
 - Давнє забруднення;
 - Свіже фекальне забруднення;
 - Не вказує на жодне з показників.
62. Пробу ґрунту відбирають:
- Бактеріологічною петлею;
 - Щупом або шпателем;
 - Руками;
 - Піпеткою.
63. Із якої глибини відбирають пробу ґрунту:
- 0-5 см.;
 - 5-10 см.;
 - 10-15 см.;
 - 15-20 см.
64. Пробу ґрунту зберігають при температурі 4-5 °С:
- Не більше 1 год.;
 - Не більше 12 год.;
 - Не більше 24 год.;
 - Не більше 3 год.
65. В процесі дослідження проби ґрунту визначають:
- мікробне число;

- колі-титр;
 - перфрінгенс-титр;
 - всі відповіді вірні.
66. Для визначення мікробного числа беруть пробу ґрунту масою:
- 5 г.;
 - 10г.;
 - 30 г.;
 - 100 г.
67. Колі-титр ґрунту найчастіше визначають на середовищі:
- Кесслер-Свенертона;
 - Агар;
 - М'ясо-пептонний бульйон;
 - Кремнекислий гель
68. Мікробне число чистої проби ґрунту становить:
- Не більше 10 000;
 - 100000-900000;
 - 10000;
 - 1000 000 і більше.
69. Для визначення кількості бацил використовують розведення ґрунтової суспензії в концентрації з:
- 10^{-1} до 10^{-3} ;
 - 9^{-2} до 9^{-5} ;
 - 10^{-6} до 10^{-8} ;
 - 10^6 до 10^9 ;
70. Для визначення колі-індексу ґрунту пробу ґрунту висівають на:
- Середовищі Вільсона-Блер;
 - На агарі;
 - На м'ясо-пептонному більйоні;
 - Кесслер-Свенертона;
71. Вода підлягає аналізу не пізніше:
- 3 год.;
 - 4 год.;
 - 2 год.;
 - 5 год.
72. Артезіанська вода повинна містити в 1 мл не більше:
- 300 бактерій;
 - 100 бактерій;
 - 250 бактерій;
 - 500 бактерій.
73. Мікробіологічний контроль повітря проводиться:
- Седиментаційний та аспераційний метод;
 - Біологічний метод;
 - Хімічний метод;

- Фізичний метод.
74. Час експозиції становить:
- 2,3 або 5 хв.;
 - 5,10 або 15 хв.;
 - 15, 20 або 25 хв.;
 - 25,30 або 35 хв.
75. Нормальна мікрофлора людини і тварини поділяється:
- Не поділяється;
 - Постійна та тимчасова;
 - Непостійна;
 - Загальна.
76. Кількість мікроорганізмів, які населяють шкіру становить:
- від 100/см² до 2,5 млн./см²;
 - до 3 млн./см²;
 - до 4 млн./см²;
 - до 10 млн./см².
77. Стафілококи, стрептококи, мікрококії, коринебактерії складають мікрофлору:
- Ротової порожнини;
 - Вимені;
 - Шлунку;
 - Дихальних шляхів.
78. Кількісні та якісні порушення екологічного балансу між мікробними популяціями в складі мікрофлори – це:
- Резистентність;
 - Дисбактеріоз;
 - Гнотобіологія;
 - Монобіоти.
79. Повністю безмікробні тварини – це:
- Дибіоти;
 - Полібіоти;
 - Монобіоти;
 - ентеро-бактерії.
80. У верхньому відділі 12- палої кишки виявляють бактерії:
- Біфідобактерії;
 - Лактобактерії;
 - Ентерококи;
 - Всі відповіді вірні.
81. У кон'юнктиві людини і тварини можуть міститись:
- Нейсерії;
 - гемофільні бактерії;
 - коринебактерії;
 - всі відповіді вірні.

82. Стійкість до заселення даного біотопу патогенними чи умовно-патогенними мікроорганізмами – це:
- Колонізаційна резистентність;
 - Дисбактеріоз;
 - Гнотобіологія;
 - Монобіоти.
83. Бактерії, які синтезують практично всі вітаміни групи В, вітаміни К, Е, пантотенову і фолієву кислоти:
- Коринебактерії;
 - Ентеробактерії;
 - Гемофільні бактерії;
 - Стафілококи.
84. Індивідуальна постійна мікрофлора формується:
- З 2-3 доби;
 - З 5-10 доби;
 - З 10-12 доби;
 - З 15 доби.
85. Порушення нормальних екологічних взаємозв'язків між мікробіопенезами і макроорганізмом, значні зміни у самих біоценозах призводять до розвитку:
- Резистентності;
 - Дисбактеріозу;
 - Гнотобіології;
 - Монобіоту.

Рекомендована література

Основна

1. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв. Вінниця. 2020. 288 с.
2. Капрельянц Л. В. Технічна мікробіологія. Одеса. 2006. 308 с.
3. Коваленко В.О., Цихановська І.В., Лазарева Т.А. Технічна мікробіологія Харків. 2013. 217 с.
4. Власенко В.В., Скибіцький В.Г., Власенко І. Г., Ібатулліна Ф.Ж., Козловська Г.В. Мікробіологія м'яса та м'ясопродуктів. Вінниця. 2008. 132 с.

Допоміжна

5. . Капрельянц Л.В., Л.М. Пилипенко, А.В. Єгорова та ін. Технічна мікробіологія. Одеса. 2006. 308 с.
6. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р., Поводзинський В.М., Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв. Вінниця. 2007. 464 с.
7. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. Київ. 2004. 471 с.
8. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія. Львів. 2009. 360 с.
9. Малигіна В.Д. Мікробіологія та фізіологія харчування. Київ. 2009. 242 с.
10. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. Київ. 2004. 392 с.