

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Донецький національний університет економіки і торгівлі
імені Михайла Туган-Барановського

Кафедра технології в ресторанному господарстві
та готельної і ресторанної справи

О.О. Сімакова, В.О. Глушко

МІКРОБІОЛОГІЯ І ТОВАРОЗНАВСТВО
(частина 1 - Мікробіологія харчових продуктів)

Методичні рекомендації
до вивчення дисципліни

для студентів спеціальності 181 «Харчові технології»
денної та заочної форм навчання

Кривий Ріг

2016

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Донецький національний університет економіки і торгівлі
імені Михайла Туган-Барановського

Кафедра технології в ресторанному господарстві
та готельної і ресторанної справи

О.О. Сімакова, В.О. Глушко

МІКРОБІОЛОГІЯ І ТОВАРОЗНАВСТВО
(частина 1 - Мікробіологія харчових продуктів)

Методичні рекомендації
до вивчення дисципліни

для студентів спеціальності 181 «Харчові технології»
денної та заочної форм навчання

Затверджено на засіданні
кафедри ТРГ та ГРС
Протокол № 7
від “8” листопада 2016 р.

Схвалено навчально-методичною
радою ДонНУЕТ
Протокол № 11
від “25” листопада 2016 р.

Кривий Ріг 2016

ББК 36-1я73

С37

УДК 579.67 (076.5)

Рецензенти:

В.А. Гніцевич - докт. техн. наук, професор;

Д.П. Шапран - канд. філ. наук, доцент.

Сімакова О.О.

С 37 Мікробіологія і товарознавство [Текст]: метод. рекомендації до вивчення дисципліни для студентів спеціальності 181 «Харчові технології», ден. та заоч. форм навчання / О.О. Сімакова; М-во освіти і науки України, Донец. н. ун-т економіки і торгівлі ім. М. Туган-Барановського, каф. ТРГ та ГРС.-Кривий Ріг: ДонНУЕТ, 2016.-82 с.

В методичних рекомендаціях наведені сучасні та традиційні мікробіологічні методи дослідження, теоретичні передумови, методики і пояснення до виконання лабораторних робіт, правила оформлення і контрольні питання.

Методичні рекомендації по дисципліні «Мікробіологія і товарознавство» для студентів навчально-наукового інституту ресторанно-готельного бізнесу всіх форм навчання спеціальності 181 «Харчові технології» спеціалізації «Технології в ресторанному господарстві» розроблено відповідно робочої програми.

УДК 579.67 (076.5)

ББК 36-1Я73

© Сімакова О.О., 2016

© Донецький національний університет
економіки і торгівлі імені Михайла
Туган-Барановського, 2016

ВСТУП

Методичні рекомендації розроблені згідно з робочою програмою дисципліни «Мікробіологія і товарознавство» для студентів навчально-наукового інституту ресторанно-готельного бізнесу спеціальності 181 «Харчові технології» спеціалізації «Технології в ресторанному господарстві» денної та заочної форм навчання.

Вивчення дисципліни «Мікробіологія і товарознавство» орієнтовано на формування у майбутніх фахівців наукового світогляду, знань про різноманіття світу мікроорганізмів, широту їх розповсюдження в природних середовищах і харчових продуктах, вирішальну роль мікроорганізмів в технології продуктів харчування, а також їх значенні як потенційних збудників харчових отруєнь.

Знання мікробіології харчових продуктів є важливим аспектом для спеціалістів у сфері харчових технологій та ресторанного господарства, що дозволить їм грамотно організувати технологічні процеси при виробництві, зберіганні продовольчих товарів, сировини і напівфабрикатів та встановлювати режими, при яких розвиток мікроорганізмів буде зведений до мінімуму.

Метою лабораторних робіт є закріплення на практиці і поглиблення теоретичних знань, одержаних при прослуховуванні лекційного курсу і в процесі самостійної підготовки, а також отримання практичних навичок щодо роботи з мікроскопом, техніки приготування препаратів та мікроскопування, проведення якісного та кількісного обліку мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища і харчових продуктах.

Завданнями лабораторного практикуму є: вивчення морфології мікроорганізмів, які впливають на якість харчових продуктів при їх виготовленні, зберіганні, транспортуванні та реалізації; вивчення впливу на мікроорганізми різних факторів зовнішнього середовища з метою направленою регулювання мікробіологічних процесів при виробництві продуктів харчування та їх зберіганні; ознайомлення з основними мікробіологічними показниками якості продуктів харчування, методами їх визначення і вимогами нормативної документації щодо вмісту мікроорганізмів в харчових продуктах; ознайомлення зі змістом і основними методами санітарної мікробіології, які дозволяють визначити доброякісність продуктів харчування і санітарний стан оточуючого середовища.

Вивчення матеріалу проводиться в певній послідовності, при якій теоретичні знання закріплюються лабораторною роботою. Дані методичні вказівки містять зміст роботи, коротке теоретичне пояснення по темі, опис методик виконання робіт, контрольні питання.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Будова оптичного мікроскопу і техніка мікроскопії

Зміст роботи:

1. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії
2. Правила надання невідкладної медичної допомоги в лабораторії
3. Будова оптичного мікроскопу.
4. Техніка мікроскопії.

1. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії

Мікробіологічні дослідження здійснюються в спеціально оснащених приміщеннях - мікробіологічних лабораторіях. Більшість мікробіологічних аналізів проводяться в стерильних умовах для виключення забруднення досліджуваного матеріалу, а також попередження забруднення зовнішнього середовища і персоналу мікробами з досліджуваного матеріалу.

Правила роботи студентів в лабораторії:

1. Кожен студент має в лабораторії постійне місце роботи.
2. Забороняється входити в лабораторію у верхньому одязі, головному уборі, працювати дозволяється тільки в чистих білих халатах, волосся у студенток повинні бути підібраними і не спадати на плечі.
3. Забороняється на робоче місце класти сторонні речі (у тому числі сумок, головних уборів тощо).
4. Під час роботи менше ходити, відкривати і закривати двері, щоб не допустити забруднення досліджуваного матеріалу сторонньою мікрофлорою.
5. Категорично забороняється в лабораторії палити і приймати їжу, торкатися брудними руками обличчя.
6. Під час роботи з культурами мікроорганізмів необхідно виконувати всі правила мікробіологічної техніки. Запалювати спиртівки виключно сірниками.
7. На пробірках і чашках Петрі відзначати прізвище та ініціали, номер групи, дату і мету посіву.
8. Усі предмети, які використовувалися під час роботи з живими культурами мають бути знезаражені над полум'ям спиртівки (петлі, голки) або занурені в дезінфікуючий розчин (предметні скельця, піпетки, шпателі тощо).
9. Наприкінці заняття на робочому місці слід прибрати і обов'язково вимити руки з милом.

2. Правила надання невідкладної медичної допомоги в лабораторії

1. При пораненні склом видалити його осколки з рани; якщо їх не залишилося, змазати рану йодом і забинтувати.
2. При термічних опіках першого і другого ступеня обпалене місце промити струменем холодної води, а потім - 2%-вим розчином харчової соди або 5%-вим

розчином перманганату калію. Як примочку можна використовувати 96%-вий етиловий спирт, який дезінфікує і знеболює.

3. При опіках кислотами уражене місце промити холодною водою, а потім на обпалене місце покласти примочку з 2%-вого содового розчину.

4. При опіках лугами уражене місце промити холодною водою і на обпалене місце покласти примочку із слабкого розчину оцтової кислоти.

5. При отруєнні газом постраждалого вивести на свіже повітря і негайно викликати швидку допомогу.

3. Будова оптичного мікроскопу

Біологічний мікроскоп (рис. 1) складається з механічної і оптичної частин.

Механічна частина включає:

- штатив, який складається з основи (9) та тубусотримача (13);
- тубус (2), розташований у верхній частині тубусотримача;
- револьвер (3) - пристрій, який складається з двох пластин: нерухомої та рухомої, на якій в гніздах закріплюються об'єктиви;
- предметний столик (5) із затискувачами для закріплення препарату. У центрі столика є отвір для проходження світла. З обох боків столика знаходяться гвинти, за допомогою яких можна пересувати столик і відповідно препарат на ньому у взаємоперпендикулярних напрямках;
- макрометричний гвинт (12) знаходиться на тубусотримачі з обох боків і служить для швидкого пересування тубуса, а також для грубого фокусування, тобто знаходження зображення;
- мікрометричний гвинт (11) знаходиться на основі штатива з обох боків і служить для точного фокусування, тобто встановлення чіткості зображення. В деяких моделях мікроскопа мікрогвинт знаходиться на штативі нижче макрогвинта;
- гвинт конденсора (10) знаходиться лише справа під предметним столиком і забезпечує розташування конденсора на необхідній висоті.

Оптична частина мікроскопа включає:

- окуляр (1) - це дві лінзи в оправі, що знаходяться у верхній частині тубуса. Збільшення окуляра зазначається на оправі (найчастіше може бути $7^{\times}$, $10^{\times}$, $15^{\times}$).
- об'єktiv (4) - система лінз в оправі. Розрізняють сухі об'єктиви (лінза знаходиться на деякій відстані від препарату), які дають мале (у 8, 9, 10 разів) і середнє (у 20, 40 разів) збільшення та імерсійні (між фронтальною лінзою і препаратом знаходиться імерсійна олія), які дають велике збільшення (у 90 разів і більше). Загальне збільшення мікроскопа дорівнює множенню збільшення окуляра на збільшення об'єктива. Наприклад, $15 \times 8 = 120$ разів, $15 \times 40 = 600$ разів.

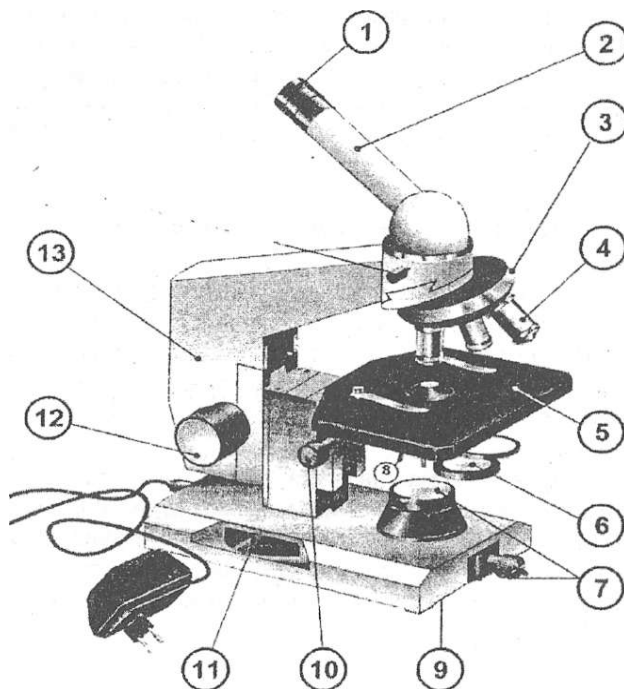


Рисунок 1 – Пристрій біологічного мікроскопу:

1 – окуляр, 2 – тубус, 3 – револьвер, 4 – об’єктив, 5 – предметний столик,
6 – конденсор, 7 – лампочка з колекторною лінзою, 8 – ірисова діафрагма,
9 – основа, 10 – гвинт конденсора, 11 – мікрометричний гвинт,
12 – макрометричний гвинт, 13 – тубусотримач

- джерело світла - лампочка, яка вмонтована в оправу з колекторною лінзою, знаходиться в основі штативу (7). В деяких моделях мікроскопів може бути двостороннє дзеркало (з одного боку воно плоске, а з іншого - вигнуте). Дзеркало легко повертається і з його допомогою промені направляються від джерела світла до конденсора;
- конденсор (6) - система лінз, яка знаходиться під предметним столиком і збирає паралельні промені, які йдуть від освітлювача або дзеркала. Конденсор оснащений ірисовою діафрагмою (8), за допомогою якої можна регулювати інтенсивність освітлення препарату. Гвинт конденсора (10) дозволяє розташовувати його на необхідній висоті.

4. Техніка мікроскопії

1. Встановлюють світло. Для цього мікроскоп вмикають в електричну мережу, конденсор підіймають вгору, відкривають діафрагму. Якщо мікроскоп не електричний, то знімають окуляр, спостерігають прямо в об’єктив і встановлюють дзеркало таким чином, щоб джерело світла було видно всередині об’єктива. За допомогою дзеркала і діафрагми конденсора встановлюють бажану ступінь освітлення.
2. На предметному столику закріплюють предметне скло з приготовленим заздалегідь препаратом.

3. Встановлюють необхідний для роботи об'єktiv на оптичну вісь з окуляром (шляхом обертання рухомої частини револьверного пристрою за годинниковою стрілкою до звуку клацання фіксатора).
4. Дивлячись збоку на об'єktiv за допомогою макрогвинта опускають тубус на певну відстань між фронтальною лінзою об'єктива і препаратом (для об. 9^x - на 1,0 см, для об. 40^x на 0,1 см, для об. 90^x - занурюють у краплю імерсійної олії, попередньо нанесену на препарат).
5. Дивляться в окуляр, повільно піднімають тубус макрогвинтом і знаходять зображення (грубе фокусування).
6. За допомогою мікрогвинта встановлюють чіткість зображення (точне фокусування).
7. Після закінчення роботи з мікроскопом вимикають шнур з електромережі, піднімають тубус до крайнього верхнього положення, знімають з предметного столика препарат і обережно протирають імерсійний об'єktiv сухою марлевою серветкою (не слід протирати лінзу ксилолом, тому що він розчиняє канадський бальзам, яким зміцнюють лінзи об'єктива). Відпрацьовані предметні скельця складають у спеціальні ванночки з дезінфікуючим розчином.

Завдання:

1. Ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії.
2. Ознайомитися з правилами надання невідкладної медичної допомоги в лабораторії.
3. Ознайомитися з будовою оптичного мікроскопу, схематично замалювати його в лабораторному аркуші.
4. Записати і вивчити етапи техніки мікроскопування препаратів

Питання для самоконтролю:

1. Які правила необхідно виконувати при роботі в мікробіологічній лабораторії?
2. З яких частин складається мікроскоп?
3. Як користуватися макро- і мікрогвинтами? Яке їх призначення?
4. Як регулюють ступінь освітлення препарату?
5. Що таке сухі і імерсійні об'єктиви?
6. Чому дорівнює загальне збільшення мікроскопа?
7. Навіщо і як використовують кедрову олію при роботі з імерсійним об'єктивом?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Техніка приготування препаратів і методи фарбування мікроорганізмів

Зміст роботи:

1. Техніка приготування препаратів для живих та неживих культур.

2. Методи фарбування мікроорганізмів.

1. Техніка приготування препаратів для живих та неживих культур

Для вивчення мікроорганізмів в живому стані використовують препарати «роздавлена крапля» і «висяча крапля», в неживому – фіксований препарат.

1.1. Підготовка препарату «роздавлена крапля»

1. На чисте предметне скло нанести краплю дистильованої води.
2. Металеву петлю прожарити в полум'ї спиртівки, охолодити на повітрі і занурити в досліджуваний настій, внести петлю з невеликою кількістю мікроорганізмів в краплю дистильованої води, обережно перемішати вміст, рівномірно розповсюдити мазок бактерій по предметному склу і накрити покривним склом. Покривне скло накладають таким чином, щоб між ним і предметним склом не було міхурців повітря. Надлишок рідини, що виступає за край покривного скла, видаляють фільтрувальним папером.
3. Розглянути препарат під мікроскопом при збільшенні 15х40. При детальнішому вивченні структури мікрооб'єкту вивчити його в імерсійному середовищі. Для цього на поверхню покривного скла нанести краплю імерсійної олії і занурити в нього об'єктив 90х. Наприкінці роботи обов'язково протерти об'єктив бавовняною серветкою.
4. Замалювати форми досліджених мікроорганізмів.

1.2. Підготовка препарату «висяча крапля»

1. Краї покривного скла акуратно змастити вазеліном.
2. Невелику краплю суспензії мікробних клітин нанести на покривне скло і обережно накласти на нього предметне скло з ямочкою так, щоб крапля вільно поміщалася в центрі поглиблення, але не зливалася з ним.
3. Препарат перевернути і розглянути під мікроскопом при збільшенні 15х40 або 15х90.
4. Вивчити рух мікроорганізмів.

1.3. Підготовка фіксованого офарбованого препарату

1. Приготування мазка. Краплю готової мікробної суспензії розмазують по поверхні середньої частини предметного скла на площі 2 см².
2. Підсушування мазка на повітрі. Щоб прискорити процес висушування препарат направляють під струмінь теплого повітря досить високо над полум'ям спиртівки, тримаючи скло мазком догори. Після сушіння мазка на поверхні скла залишається ледь примітний наліт.
3. Фіксація мазка. Через полум'я пальника проводять предметне скло 3-4 рази мазком догори. При цьому мікроби гинуть і прикріплюються до скла. Мертві клітини також краще забарвлюються фарбами.
4. Фарбування мазка. Існують *позитивний* і *негативний* способи фарбування. При позитивному способі офарбовуються клітини мікроорганізмів. При

негативному - фарба заповнює простір між клітинами, а мікроорганізми залишаються нефарбованими. Фарбування буває *простим*, коли використовується лише одна фарба протягом 1-3 хв (наприклад, метиленовий синій або фуксин), і *складним* - при використанні двох і більше фарб (наприклад, за методом Грама). Для фарбування на мазок наносять необхідну фарбу, витримують декілька хвилин (за методикою), залишок фарби змивають водою і препарат промокають фільтрувальним папером або підсушують.

2. Методи фарбування мікроорганізмів

2.1. Фарбування живих клітин мікроорганізмів

1. До краплі суспензії культури дріжджів на предметному склі додати краплю слабого розчину (1:1000) фарбника (метиленового синього або фуксину), розмішати, потім накрити покривним склом.
2. Розглянути препарат під мікроскопом при збільшенні 15х40.
3. Замалювати забарвлені клітини культури дріжджів.
4. Відпрацьовані препарати живих мікроорганізмів помістити в посуд з дезінфікуючим розчином для знешкодження.

2.2. Простий метод фарбування

1. На предметне скло нанести краплю дистильованої води, внести до неї невелику кількість досліджуваного матеріалу мікробіологічною петлею, обережно розмішати і розмазати на площі 2-3 см² тонким шаром.
2. Мазок висушити на повітрі або струмені теплого повітря над полум'ям пальника, тримаючи скло мазком вгору, потім охолоджений мазок зафіксувати в полум'ї пальника: скло з мазком, оберненим догори, провести 3-4 рази через полум'я. При цьому мікроорганізми гинуть, їх клітини прикріплюються до скла, фарбування поліпшується.
3. Фіксований препарат помістити мазком догори на мікробіологічний "місток" над кристалізатором.
4. На мазок нанести фарбник, який повинен покрити весь мазок. Фуксин витримати на препараті 1-2 хв, метиленовий синій - 3-5 хв.
5. Злити залишки фарби, а препарат промити слабким струменем води.
6. Висушити мазок на повітрі або обережно промокнути фільтрувальним папером.
7. На висušений препарат нанести краплю імерсійної олії або гліцерину і розглянути під мікроскопом при збільшенні 15х90.
8. Замалювати офарбовані клітини мікроорганізмів.

2.3. Складний метод фарбування (за Грамом)

Цей метод є однією з диференційних ознак при вивченні видової приналежності бактерій.

Суть методу полягає в послідовному фарбуванні двома фарбниками: генціан-віолетом і фуксином.

По методу Грама одні бактерії (коки, бацили, мікобактерії, клостридіальні бактерії) міцно забарвлюються генціанвіолетом в синьо-фіолетовий колір (грампозитивні бактерії, гр+). Здатність грампозитивних бактерій утримувати генціановий фіолетовий в комплексі з йодом пов'язана з властивістю багатошарового пептидоглікану (основного компоненту клітинної стінки бактерій) взаємодіяти з фарбником. Окрім цього, подальша обробка мазка бактерій спиртом викликає звуження пір в пептидоглікані і тим самим затримку фарбника в клітинній стінці. Грамнегативні бактерії (гр.-) (спірили, сальмонели, вібріони, псевдомонади, азотбактер, кишкова паличка), стінки яких містять меншу кількість пептидоглікану, після дії спиртом втрачають фарбник, обезбарвлюються і при обробці фуксином забарвлюються в червоний колір.

Етапи фарбування за Грамом:

1. Приготувати препарат і зафіксувати його (див. розділ 1.3).
2. Фіксований мазок накрити фільтрувальним папером і налити на нього невелику кількість генціан-віолету.
3. Через 2 хв фільтрувальний папір зняти пінцетом, дистильованою водою змити фарбу і на препарат нанести розчин Люголя на 1-2 хв. Залишок розчину злити.
4. Мазок занурити в розчин 96%-го спирту на 30 сек.
5. Промити мазок водою.
6. Нанести на препарат водний розчин фуксину і залишити на 1 хв.
7. Промити препарат водою, промокнути фільтрувальним папером, нанести невелику краплю імерсійної олії і розглянути під мікроскопом при збільшенні 15х90. Грампозитивні бактерії забарвлюються в синій колір, а грамнегативні - в рожевий.
8. Замалювати грампозитивні і грамнегативні бактерії.

2.4. Фарбування спор бактерій

Спора - це клітина бактерій, що покоїться, вона володіє високою стійкістю до фізико-хімічних дій. Спори деяких бактерій чіткіше можна розглянути тільки після спеціального фарбування.

1. Приготувати препарат і зафіксувати його (див. розділ 1.3).
2. На фіксований мазок, розташований на мікробіологічному "містку" нанести лужний розчин метиленового синього (по Леффлеру) і довести його до кипіння, утримуючи препарат над полум'ям пальника 15-20 хв.
3. Змити фарбу водою і дофарбувати мазок 0,5%-вим розчином нейтрального червоного - 30 хв.
4. Промити мазок водою і мікроскопувати з об'єктивом 90х. Після фарбування спори набувають блакитного або синього кольору, а цитоплазма вегетативних форм клітин - червоного кольору.
5. Замалювати клітини з виявленими забарвленими спорами.

Завдання:

1. Вивчити техніку приготування препаратів для живих та неживих культур: «роздавлена крапля», «висяча крапля», фіксованого офарбованого препарату.
2. Приготувати препарат «роздавлена крапля» з хлібопекарських дріжджів, провести мікроскопію, замалювати, зазначити загальне збільшення мікроскопу.
3. Вивчити методи фарбування мікроорганізмів: простий і складний.
4. Приготувати фіксований препарат зубного нальоту, пофарбувати його по Граму, розглянути під мікроскопом, замалювати.
5. Приготувати фіксований препарат настою ґрунту, пофарбувати спори, розглянути під мікроскопом, замалювати.

Питання для самоконтролю:

1. Який препарат готують для живих мікроорганізмів, а який для неживих?
2. Як підготувати мазок для фарбування?
3. З якою метою фіксують мазок?
4. Які існують методи фарбування бактерій?
5. Чому одні бактерії забарвлюються по Граму позитивно, а інші - негативно?
6. Як виявити наявність спор в клітині?

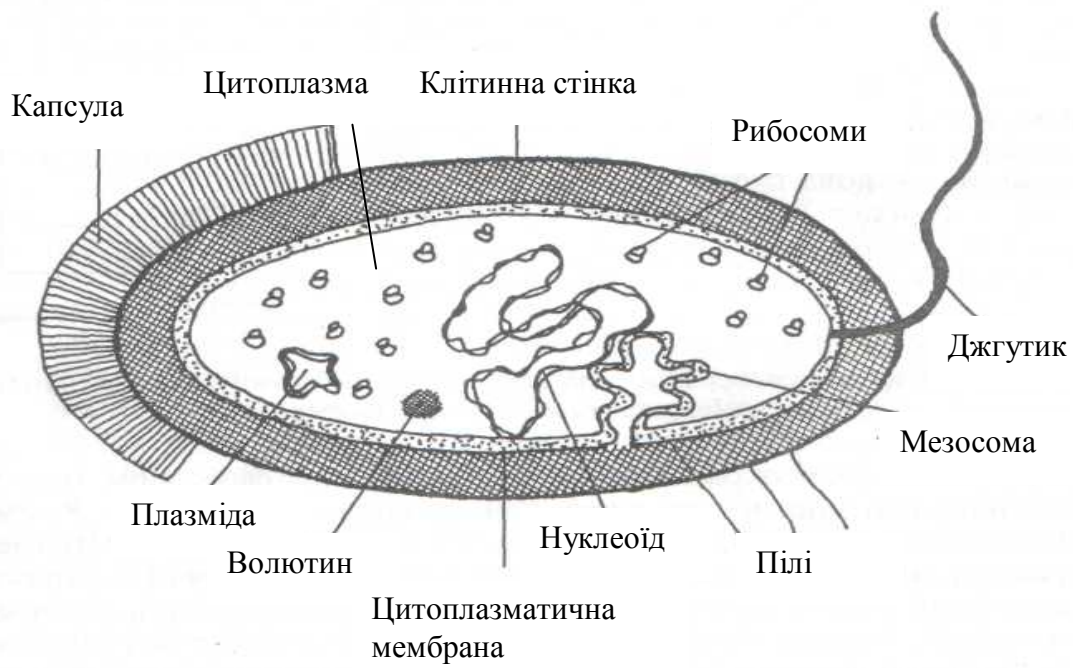
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Морфологія бактерій

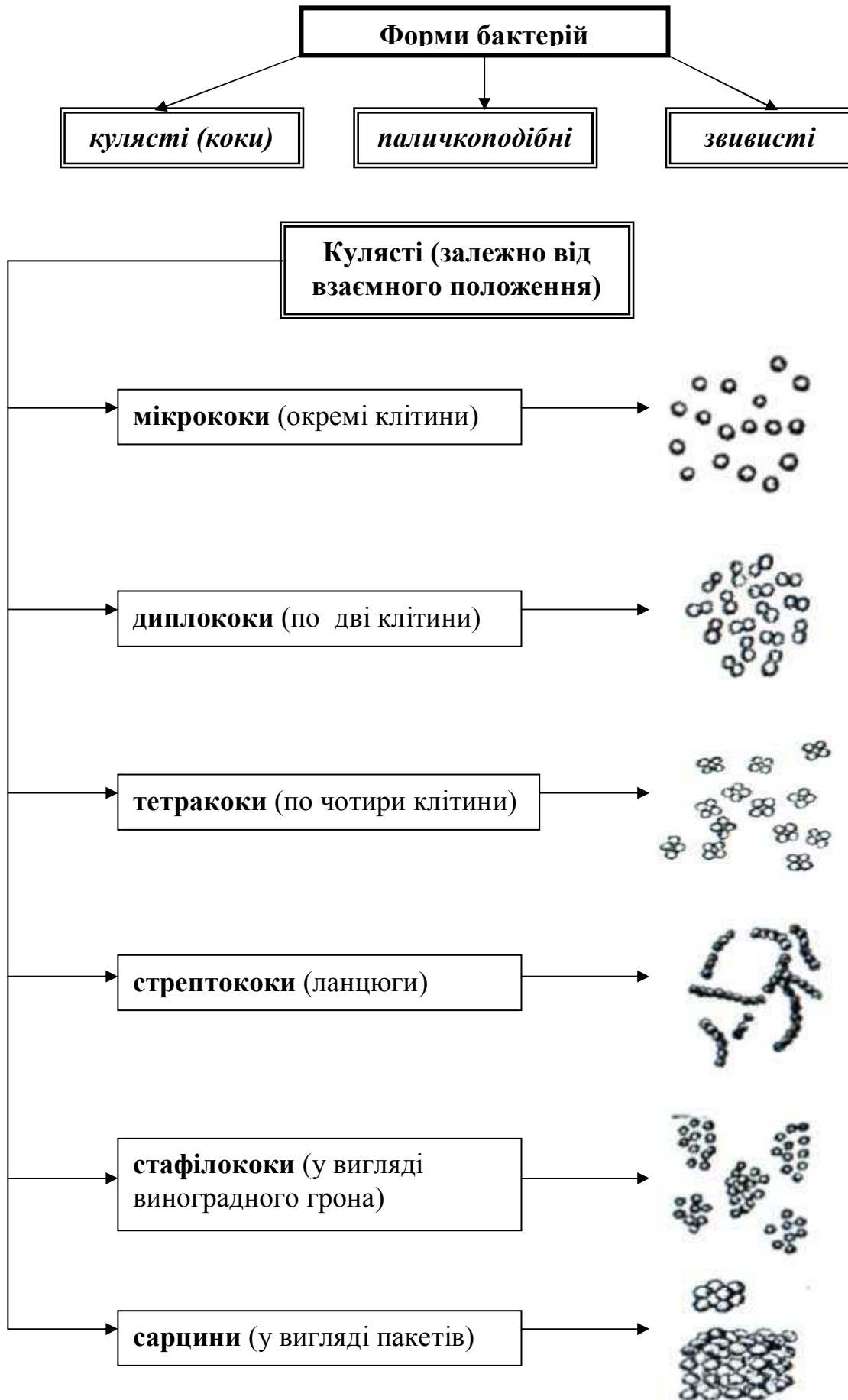
Зміст роботи:

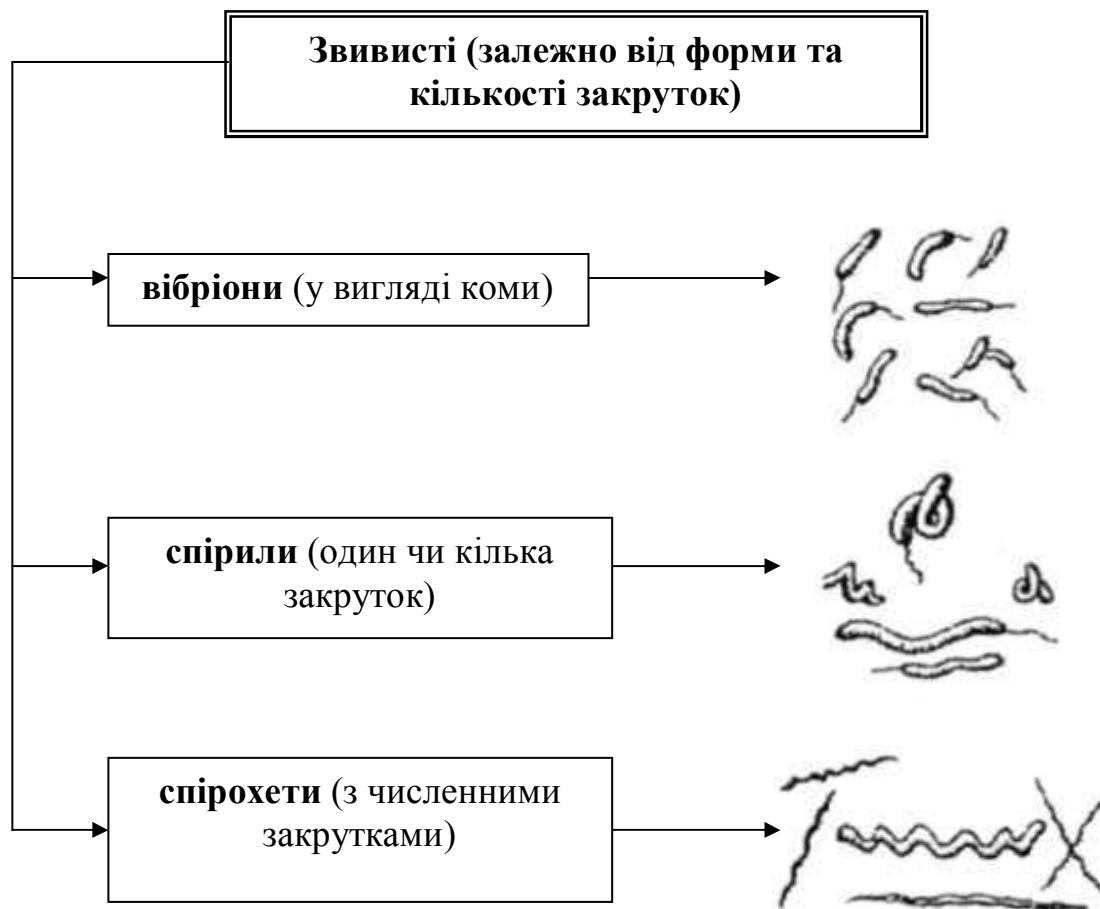
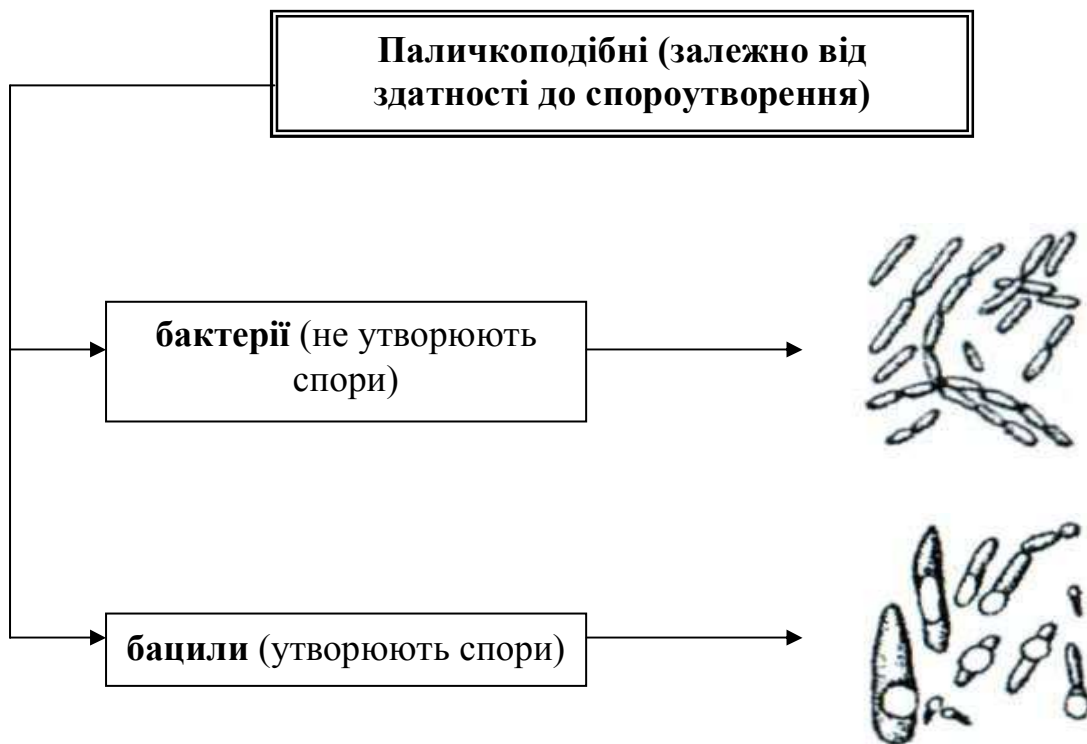
1. Будова бактеріальної клітини.
2. Основні форми бактеріальних клітин.
3. Рухливість бактерій.

1. Будова бактеріальної клітини



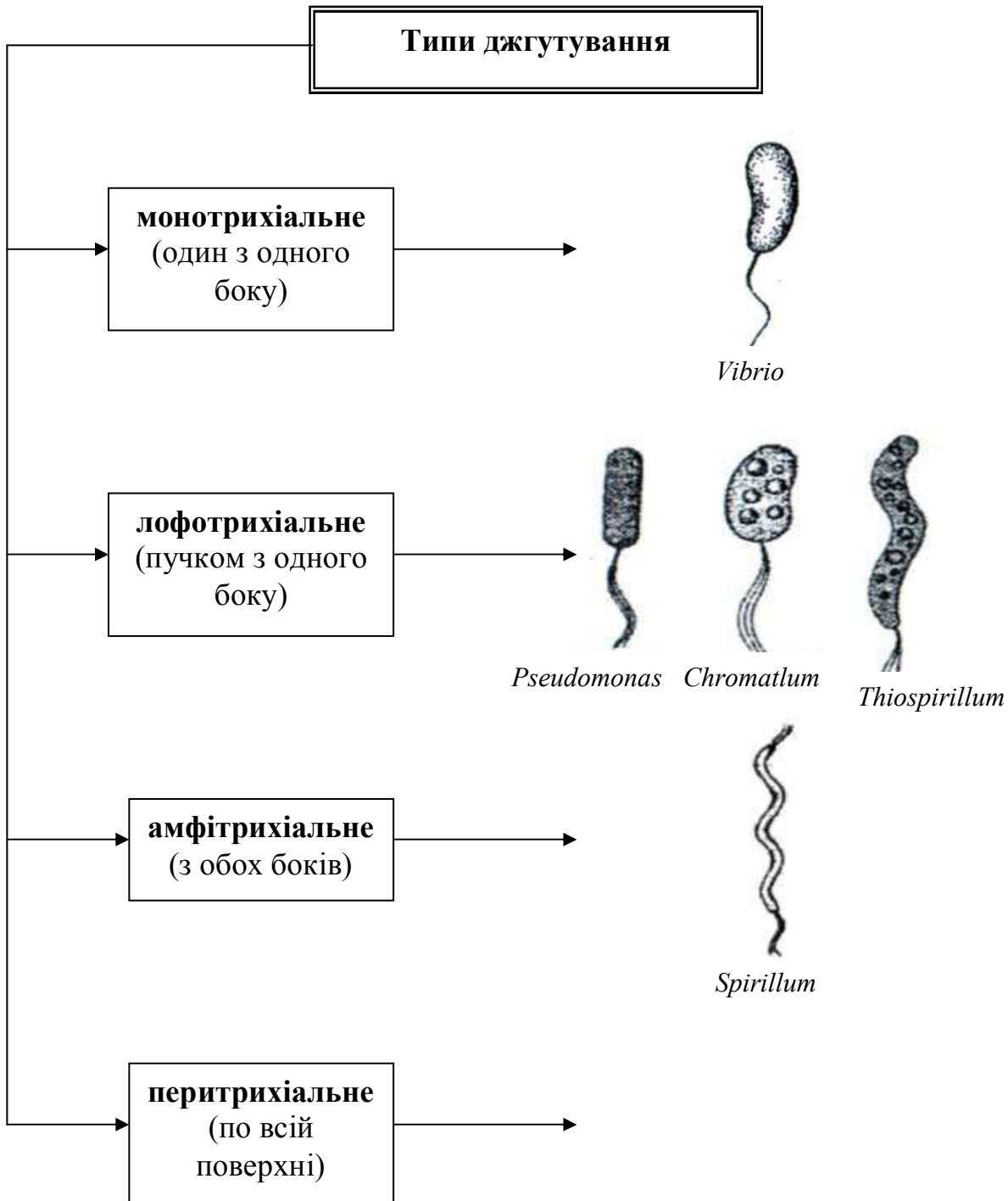
2. Основні форми бактеріальних клітин





3. Рухливість бактерій

Кулясті форми бактерій нерухливі. Паличкоподібні бактерії є рухливі і нерухливі. Звивисті бактерії рухливі. Рух бактерій відбувається за допомогою джгутиків. Джгутики мають вигляд тонких ниток, що розпочинаються від мембрани цитоплазми, мають більшу довжину, чим сама клітина. Вони складаються з білка - флагеліна, закрученого у вигляді спіралі. Наявність джгутиків, їх положення є постійною для виду ознакою і має діагностичне значення.





Завдання:

1. Вивчити будову бактеріальної клітини, зазначити функції окремих органел.
2. Замалювати основні форми бактерій, типи джгутування.
3. Приготувати фіксований препарат зубного нальоту, пофарбувати його по Граму. Розглянути препарат під мікроскопом, звертаючи увагу на форму клітин, їх угруповання, наявність спор.

Питання для самоконтролю:

1. Яку роль виконує нуклеоїд в бактеріальній клітині?
2. Опишіть основні органели бактеріальної клітини, їх функції.
3. Від яких факторів залежить відношення бактерій до фарбування за Грамом?
4. Які є різновиди бактерій по відношенню до фарбування за Грамом?
5. Опишіть основні різновиди кулястих бактерій.
6. Що таке бацили?
7. Назвіть основні форми звивистих бактерій.
8. Які є типи джгутування бактерій?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Морфологія дріжджів

Зміст роботи:

1. Будова дріжджової клітини.
2. Форми дріжджових клітин.
3. Рухливість бактерій/

1. Будова дріжджової клітини

Дріжджі є представниками грибів класу аскоміцети. Це одноклітинні нерухомі мікроорганізми, широко поширені в природі; вони зустрічаються в ґрунті, на листах, стеблах і плодах рослин, в різноманітних харчових субстратах рослинного і тваринного походження.

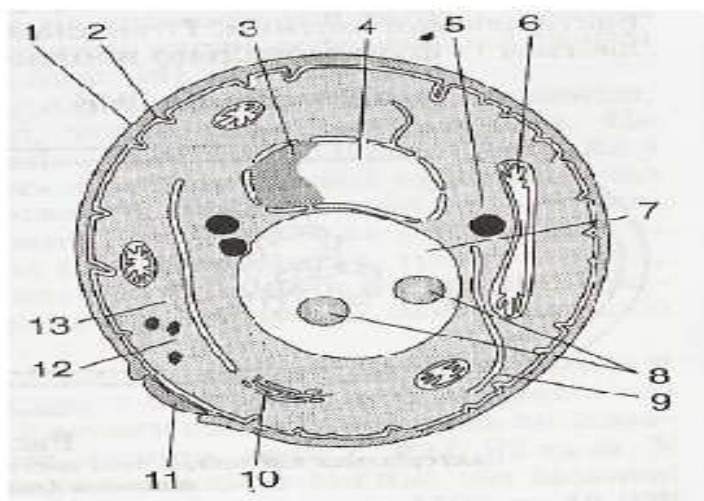
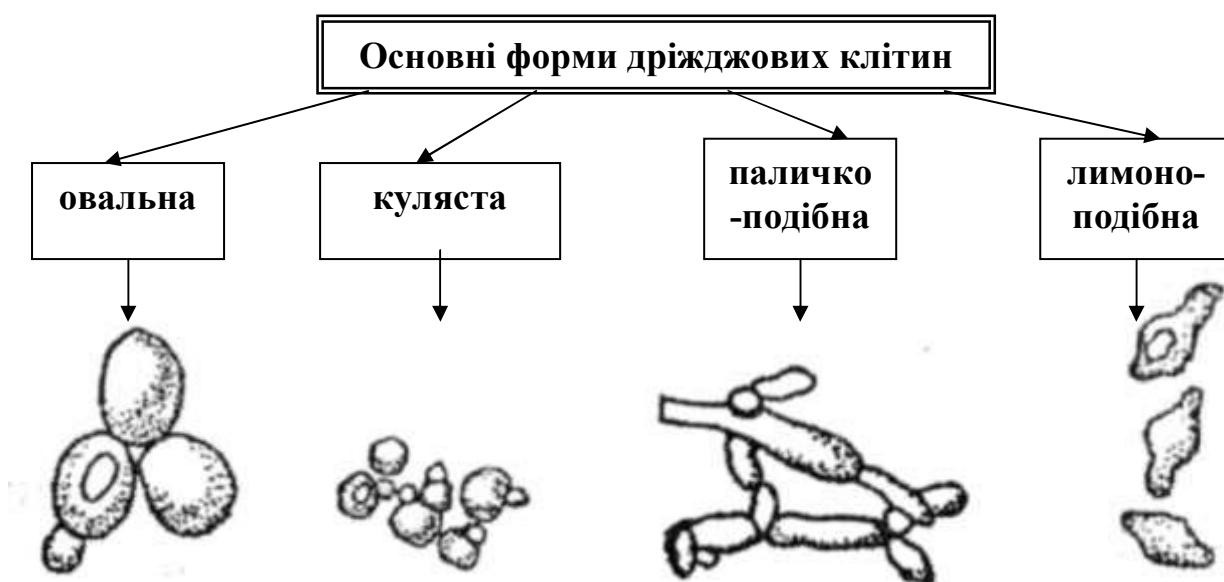


Рисунок 2 – Будова дріжджової клітини:

- 1 – клітинна оболонка;
- 2 – цитоплазматична мембрана;
- 3 – ядерце; 4 – ядро; 5 – краплі жиру;
- 6 – мітохондрії;
- 7 – вакуоль; 8 – гранули поліфосфата;
- 9 – ендоплазматична сітка; 10 – диктіосоми;
- 11 – бруньковий шрам;
- 12 – рибосоми; 13 – цитоплазма

клітин



Найбільш цікавим є рід сахароміцес (*Saccharomyces*), який об'єднує як природні види, так і культурні, що використовують в промисловості. Це два види дріжджів роду сахароміцес: церевізія і еліпсоїдеус.

Сахароміцес церевізія (*Sacch. cerevisiae*) — дріжджі кулястої або овальної форми. Застосовують їх у виробництві етилового спирту, пивоварінні, квасоварінні і хлібопеченні. **Сахароміцес еліпсоїдеус** (*Sacch. ellipsoideus* — *S. vini*) — дріжджі еліптичної форми. Їх використовують переважно у виноробстві.

Завдання:

1. Вивчити будову дріжджової клітини.
2. Замалювати основні форми дріжджових клітин.
3. Приготувати фіксований препарат дріжджів роду *Saccharomyces*, пофарбувати метиленовим синім, мікроскопувати. Замалювати препарат, визначити форми дріжджових клітин, клітин з бруньками.

Питання для самоконтролю:

1. Чим дріжджова клітина відрізняється за будовою від бактеріальної?
2. Який метод розмноження є найпоширенішим для дріжджів?
3. В яких галузях народного господарства дріжджі мають корисне значення?
4. Наведіть приклади дріжджів, які є шкідливими і викликають псування продукції.
5. Чи можуть рухатися дріжджові клітини?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Морфологія пліснявих грибів і актиноміцетів

Зміст роботи:

1. Будова грибною клітини.
2. Будова міцелію гриба.
3. Характеристика пліснявих грибів і актиноміцетів.

1. Будова грибною клітини

Плісняві гриби відносять до еукаріотів. Вони відрізняються від бактерій складнішою будовою і досконалішим способом розмноження.

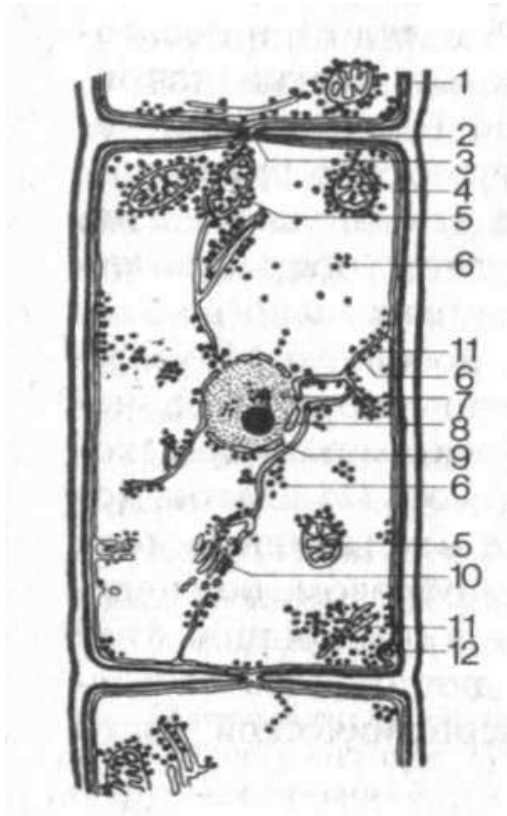


Рисунок 3 – Будова гіфи:

1 – клітинна стінка, 2 – септа,
3 – септова пора, 4 – плазмалема,
5 – мітохондрія, 6 – рибосоми,
7 – ядро, 8 – ядерце, 9 – ядерна
мембрана, 10 – апарат Гольджи,
11- ендоплазматичний
ретикулум, 12 - лomasома

2. Будова міцелію гриба

Вегетативне тіло більшості грибів є *грибницею* або *міцелієм* з ниток гіфів, що гілкуються, товщина яких коливається від 2 до 3 мкм. Такі гриби називають *міцеліальними* (ще їх називають *пліснявою*).

Міцелій починає свій розвиток із спор, що проростають при певній температурі і вологості (рисунок 4).

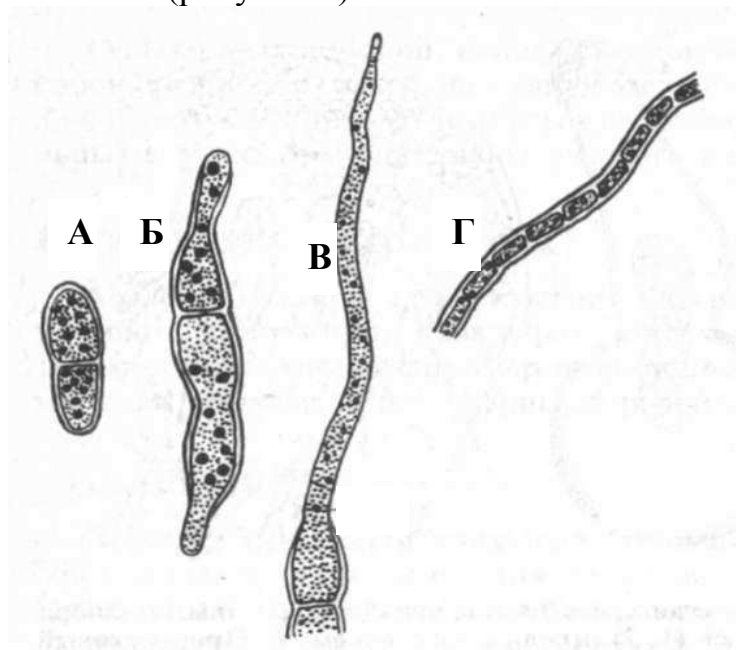


Рисунок 4 – Проростання аскоспори:

А – багатоядерна двуклітинна спора перед проростанням, Б, В - стадії проростання, Г – гіфа з багатоядерними клітинами

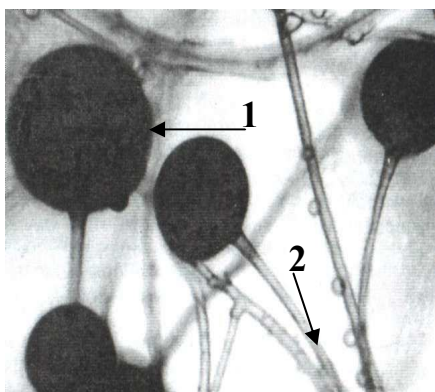
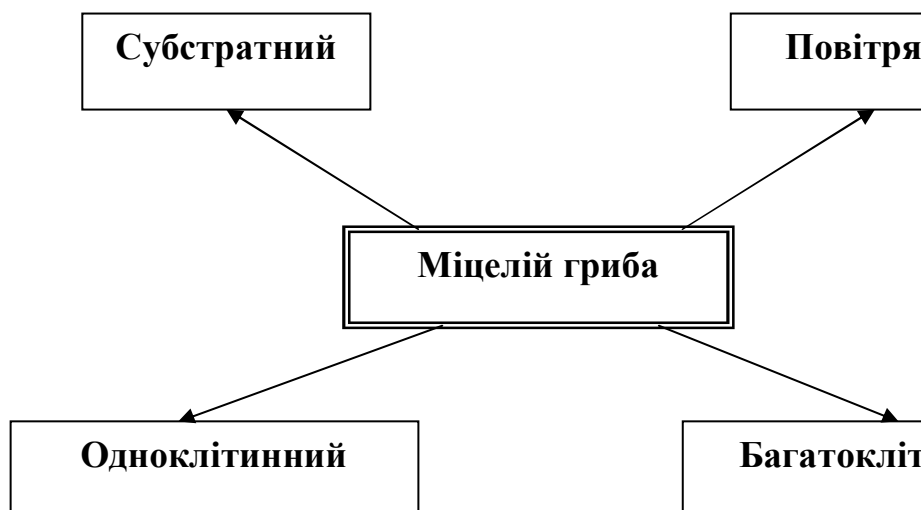


Рисунок 5 – Мукор:
спорангії (1) і
спорангієносії (2)



3. Характеристика пліснявих грибів і актиноміцетів

Серед пліснявих (цвілевих) грибів господарське і медичне значення мають пеніцилові, аспергілові і мукорові гриби.

Мукорові цвілі. До класу *Zygomycetes* відносяться досить широко поширені в природі мукорові гриби, які також називають *голівчастою цвіллю* (рис. 5), яку можна зустріти на хлібі, овочах та ін. На щільних живильних середовищах колонії мукорових грибів утворюють повстятий наліт. Їх вегетативне тіло – це розгалужений багатоядерний міцелій, що не має перегородок. Від міцелію відходять могутні плодоносні гіфи - спорангієносії із спорангіями, в яких утворюються численні спори. При дозріванні спорангій розривається, спорангієспори звільняються і розносяться повітряними потоками.

Мукорові цвілі живуть на гниючих органічних субстратах, а також на стінах сирих приміщень у вигляді сіруватого пухнастого нальоту. Багато мукорових грибів *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus* використовуються в промисловості для виробництва різних органічних кислот і спирту. *Mucor nigricans* є збудником кагатної гнилизни цукрового буряка.

Пеніцили і аспергіли. Цвілеві гриби родів *Penicillium* і *Aspergillus* відносяться до класу *Ascomycetes*. Міцелій у цих організмів не забарвлений, а спори мають різне забарвлення у різних видів, що додає відповідне забарвлення колонії гриба.

Гриби роду *Penicillium* мають сильно розгалужений септирований міцелій, від якого відходять численні плодоносні ниті – конідієносці (рис. 6). Конідієносці розвиваються з клітин міцелію. На окремих клітинах виникають утворення, які проростають у вертикальну гіфу, що дихотомічно ділиться. На кінцях такої гіфи утворюються короткі клітини-стерігми. Кожна стерігма несе на собі ланцюжок з конідій.

Іноді на стерігмах є ще коротші стерігми другого порядку, що також закінчуються конідіями з пігментами. Такі конідієносці з ланцюжком конідій нагадують пензлики або гроно руки, звідси гриби роду *Penicillium* отримали назву *гроновики*. Пеніцилових грибів в природі багато, вони складають половину всіх цвілевих грибів.

Ці цвілеві гриби широко поширені в ґрунті, кормах, особливо сирих приміщеннях, що погано провітрюються, викликають псування різних продуктів і матеріалів. Багато пеніцилів використовують в промисловості для отримання



Рисунок 6 – Пеніцилл із стерігми. Від стерігм відділяються стерігмами і конідіями

різних цінних продуктів, наприклад *P. notanum* і *P. chrysogenum* використовуються як продуценти пеніциліну, *P. vitale* – продуцент ферменту глюкозооксидази, *P. soppii* використовується для отримання ліпідів. *P. glaucum* бере участь в дозріванні деяких сортів сира (зелений сир), *P. roqueforti* – сиру Рокфора, *P. camemberti* сиру Камамбера.

Міцелій грибів роду *Aspergillus* також септирован, від нього відходять вертикальні конідієносці (рис. 7). На вершині конідієносців утворюється розширення у вигляді головки або булави, на поверхні якої зростають численні дрібні утворення –

стерігми. Від стерігм відділяються ланцюжки пігментованих конідій, які розташовуються по радіусах кулі і нагадують струмені води, що виливається з лійки, звідки і назва гриба – *ліїчна цвіль*.

Представники роду *Aspergillus* широко поширені в природі і грають важливу роль в мінералізації органічних речовин. 40% аспергилів, що виділяються з ґрунту володіють антибіотичною активністю. *A. niger* застосовується в промисловості для отримання лимонної кислоти з цукру і одночасно з міцелію цього гриба, як відходу виробництва лимонної кислоти, отримують фермент пектиназу. *A. flavus* і *A. terricola* утворюють найбільш активний комплекс протеолітичних ферментів. *A. oryzae* і *A. awamori* – кращі продуценти амілази.

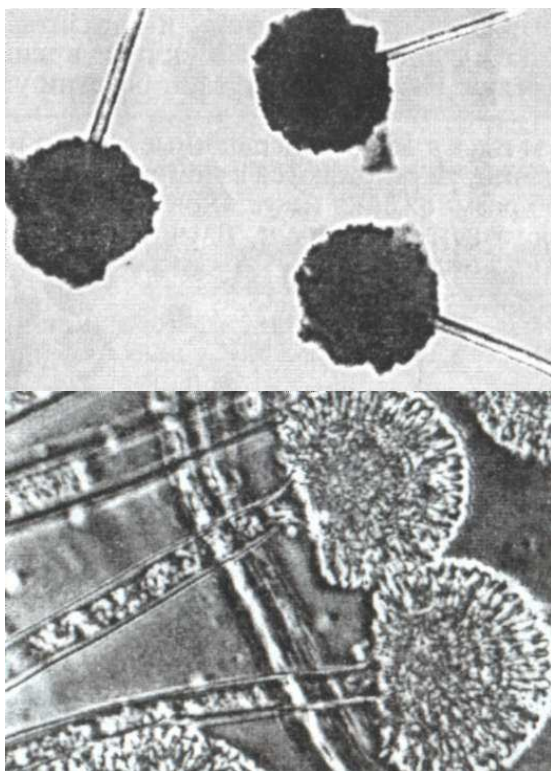


Рисунок 7 – Аспергіл:
конідієносці, їх розширення і
стерігми

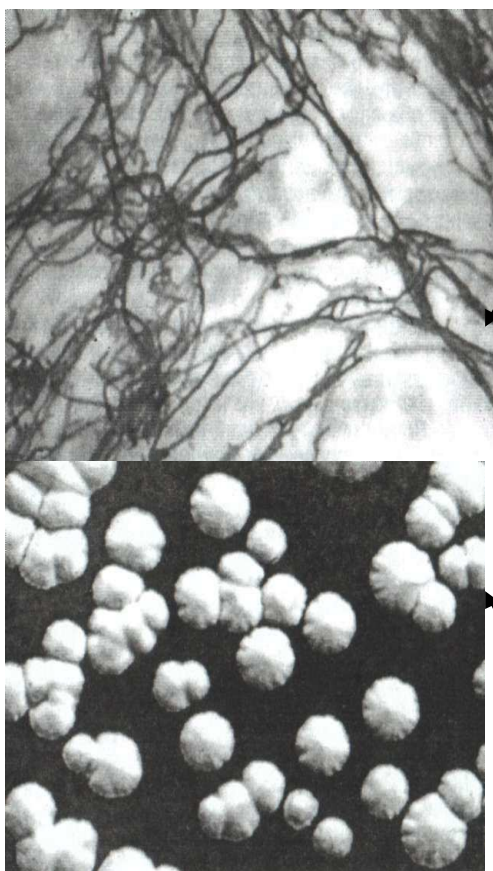


Рисунок 8 – Міцелій
актиноміцетів (1)
і їх колонія (2) на МПА

Актиноміцети. Не зважаючи на нитеподібну будову, їх відносять до бактерій.

Актиноміцети мають прокаріотичний тип клітини, в них відсутня ядерна мембрана. Актиноміцети (*Actinomyces*), або променисті гриби, мають добре виражений, дуже тонкий несептирований міцелій, що гілкується. Нитки міцелію актиноміцетів крихкі, легко розпадаються на окремі частини. Розвиваючись на щільному живильному субстраті актиноміцети утворюють щільні хрящовидні або шкірясті колонії, міцно прикріплені до субстрату численними пронизливими його нитками міцелію (рис. 8). Міцелій може бути субстратним і повітряним. Від ниток субстратного міцелію відходять гіфи, що створюють повітряний міцелій. Повітряний міцелій може покривати всю колонію або її частину пухнастим, бархатистим або борошnistим нальотом. На нитках повітряного міцелію утворюються спорангієносці - спіральні або прямі, поодинокі або зібрані в мітелки. Актиноміцети широко поширені в природі (грунті, воді, мулі), серед них багато видів патогенних, таких, що викликають захворювання тварин і людини (актиномікоз). Вони поселяються на насінні злаків, дають спори, які потрапляють в організм людини і викликають захворювання. Є види, що утворюють антибіотичні речовини. Так, *Actinomyces griseus* синтезує стрептоміцин - антибіотик, що широко використовують в боротьбі з туберкульозом.

Завдання:

1. Вивчити будову грибної клітини. Зазначити різницю і схожість щодо будови клітин пліснявих грибів з клітинами бактерій і дріжджів.
2. Розглянути в чашках Петрі колонії грибів родів *Mucor*, *Penicillium* і *Aspergillus* і

Actinomyces. Описати макроскопічні ознаки колоній грибів: загальну топографію (форму, профіль, край, структуру), консистенцію колоній (порошкоподібна, бархатиста, ворсиста) (рис. 9, 10), тип міцелію (субстратний, повітряний). Результати занести в таблицю:

Колонія	Розмір	Колір	Форма	Профіль	Край	Структура	Тип міцелію

3. Розглянути плоди і овочі, уражені пліснявими грибами. Визначити тип хвороби, користуючись довідниками.
4. Приготувати препарат «роздавлена крапля» в суміші спирту і гліцерину пліснявих грибів і актиноміцетів. Мікроскопувати препарат при збільшенні 15х40. Замалювати гіфи, конідієносці і спорангієносці пліснявих грибів і актиноміцетів.

Питання для самоконтролю:

1. Охарактеризуйте особливості будови еукаріотичної (грибної) клітини.
2. Типи міцелію грибів.
3. Охарактеризуйте класи грибів (зигоміцетів, аскоміцетів, базидіоміцетів і дейтероміцетів) по наступній схемі: будова міцелію, способи розмноження, представники.
4. Особливості морфології пліснявих грибів родів *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*.
5. В яких галузях господарства використовують плісняві гриби?
6. Особливості морфології актиноміцетів. Чому актиноміцети не відносяться до грибів? Їх значення.
7. Які плісняві гриби є збудниками: сірої гнилі плодів; плодової гнилі яблук; парши груш?
8. Які плісняві гриби є збудниками: раку картоплі; шийкової гнилі цибулі; сухої гнилі овочів?
9. Які плісняві гриби є збудниками: чорної гнилі коренеплодів; білої гнилі мокви; серцевинної гнилі буряка?
10. Який пліснявий гриб є збудником псування квашених і кисломолочних продуктів?

Форма

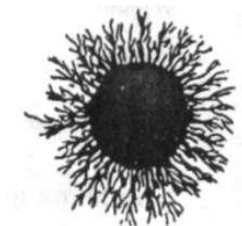


округла

округла з
нерівним краєм

округла з
валиком по
краю

ризойдна



з ризойдним
краєм

амебоподібна

нитеподібна

складчаста



неправильна

концентрична

складна

Профіль



ізогнутий

кратероподібний

горбистий

врастаючий
в субстрат



плаский

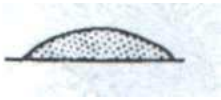
опуклий

краплеподібний

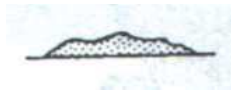
конусоподібний

Рисунок 9 – Культуральні ознаки колоній: форма і профіль

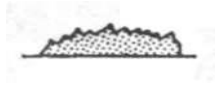
Край



гладкий



хвилястий



зубчастий



лопасний



неправильний



війчастий



нитчатий



ворсинчастий

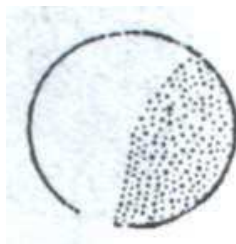


гіллястий

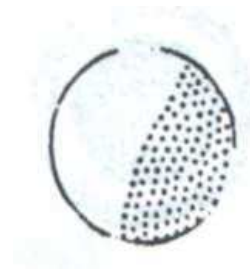
Структура



однорідна



дрібнозерниста



крупнозерниста



струминна



волокниста

Рисунок 10 – Культуральні ознаки колоній: край і структура

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Поживні середовища. Стерилізація поживних середовищ и посуду

Зміст роботи:

1. Поживні середовища.
2. Стерилізація поживних середовищ и посуду.

1. Поживні середовища

Ріст мікроорганізмів можливий при наявності в оточуючому середовищі усіх необхідних поживних речовин для здійснення конструктивних та енергетичних процесів клітини, джерела вуглецю, азоту, зольних елементів і мікроелементів.

В мікробіологічній практиці для вирощування мікроорганізмів використовують різні поживні середовища, які **за складом** розділяють на природні, полусинтетичні і синтетичні.

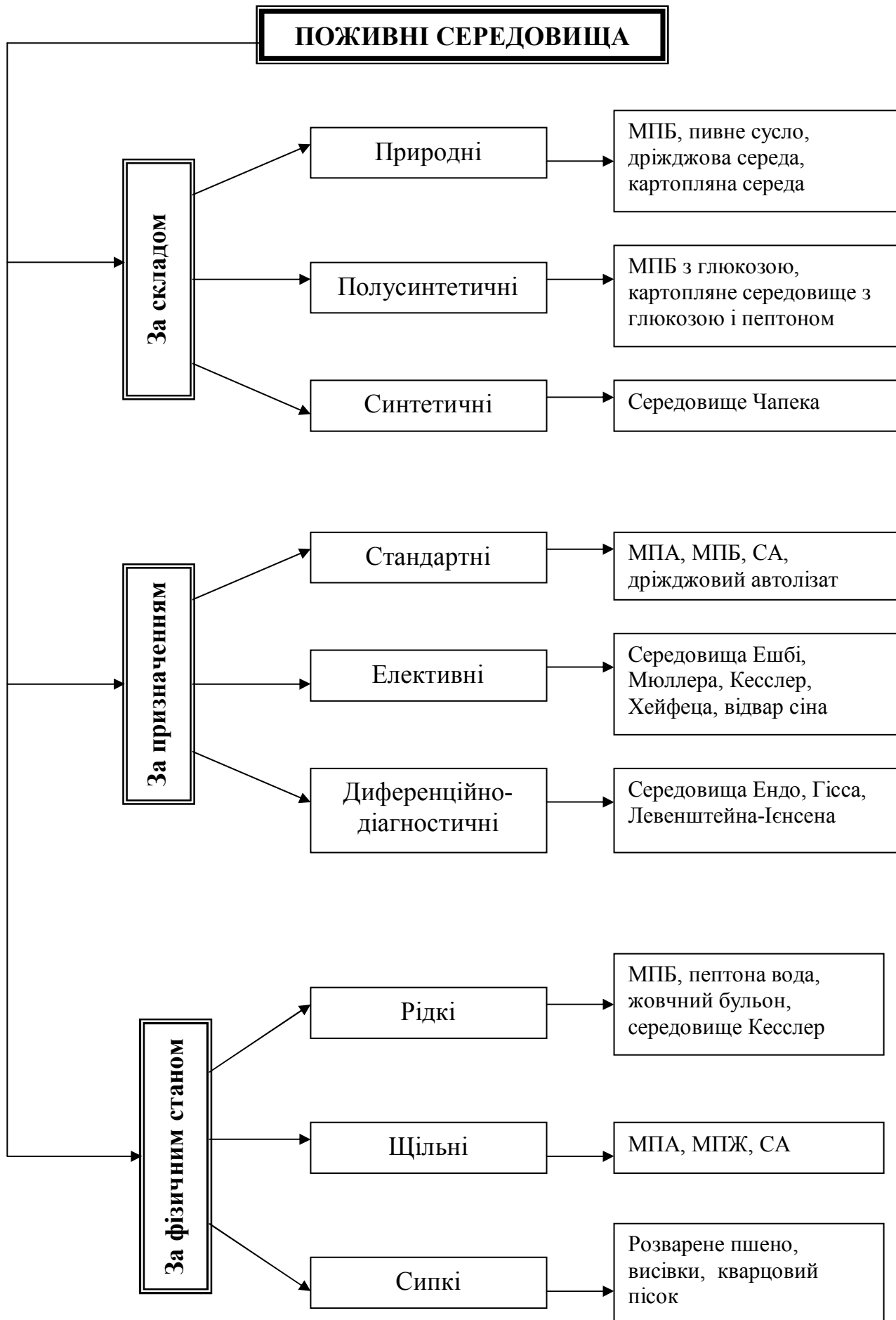
Природні середовища складаються з продуктів тваринного та рослинного походження – м'яса, молока, картоплі, моркви і т.і. На природних середовищах гарно розвивається багато мікроорганізмів, тому що в таких середовищах є, як правило, усі компоненти, необхідні для їх розвитку. Природними середовищами є:

- ✓ М'ясо-пептонний бульйон (МПБ), який складається з екстракту м'яса (500 г м'яса на 1 л води), 0,5% NaCl і 1% пептону (продукту неповного гідролізу білка);
- ✓ Незхмілене пивне сусло, що готується на основі солоду (проросле несіння ячменя), який гідролізується до цукрів;
- ✓ Дріжджова середа, яка складається з екстракту дріжджів (7-10 г сухих дріжджів на 1 л води), до якого додаються вуглеводи (1-2%), мінеральні солі K_2HPO_4 (0,1%) і NaCl (0,5%);
- ✓ Картопляна середа, яка готується шляхом відвару картоплі (200 г картоплі на 1 л води) та ін.

Полусинтетичні середовища в своєму складі разом із сполуками відомої хімічної природи містять речовини невідомого складу. До полусинтетичних середовищ відносять м'ясо-пептонний бульйон з глюкозою і фосфорнокислим калієм, картопляне середовище з глюкозою і пептоном, також середовища з відомого складу з додаванням різних факторів росту (гідролізату казеїну, дріжджового автолізату, кукурудзяного екстракту тощо).

Синтетичні середовища – це середовища, до складу яких входять відомі хімічні сполуки в певних концентраціях. Наприклад, середовище Чапека для культивування грибів: глюкоза – 30 г, азотнокислий натрій – 2 г, фосфорнокислий калій – 1 г, сірчистокислий магній – 0,5 г., хлористий калій – 0,5 г, сірчистокисле залізо – 0,01 г, вода – 1000 мл.

По призначенню середовища є стандартні, елективні і диференціально-діагностичні.



Стандартні середовища використовують для розвитку багатьох видів мікроорганізмів. До них відносяться м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний желатин, бобово-пептонний агар (БПА), сусло-агар (СА), крохмально-аміачний агар (КАА) та інше.

Елективні (вибіркові) забезпечують в основному розвиток одного виду чи групи організмів і менш придатні або зовсім не придатні для розвитку інших (відвар сіна, середовища Мюллера, Ешбі, Кесслер, Хейфеца).

Диференційно-діагностичні (індикаторні) – дозволяють швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших (середовище Левенштейна-Іенсена – для виділення збудника туберкульозу, середовище Ендо – для виділення бактерій групи кишкової палички). Склад цих середовищ підбирають таким чином, щоб він дозволив чітко виявити найбільш характерні властивості певного виду.

За фізичним станом розрізняють рідкі, щільні й сипкі середовища.

Рідкі середовища застосовують для з'ясування фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів, для накопичення біомаси або продуктів метаболізму, а також для підтримки і зберігання багатьох мікроорганізмів, що погано розвиваються на щільних середовищах.

Сипкі середовища застосовують в промисловій мікробіології. До них відносяться, наприклад, розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, просочені поживним розчином.

Щільні середовища використовують для виділення чистих культур (отримання ізольованих колоній), в діагностичних цілях (встановлення морфології колоній, особливостей зростання на скошеному агарі та ін.), для зберігання культур, кількісного обліку мікроорганізмів, визначення їх антагоністичних властивостей і у ряді інших випадків.

Ущільнення середовищ здійснюють за допомогою агар-агару, желатину або кремнекислого гелю (силикагелю).

Найчастіше в мікробіологічній практиці для ущільнення середовищ використовується **агар-агар**. Це складний полісахарид, отриманий з морських водоростей. Більшість мікроорганізмів не використовують його як живильний субстрат.

У воді агар-агар утворює гелі, що плавкі при 100°C, твердіють при температурі біля 40°C. Найчастіше агар-агар додають до середовищ в кількості 1,5-2%. Середовище з внесеним агаром нагрівають на киплячій водяній лазні до повного розплавлення агару.

Менш широко використовується **желатин** - білок, отриманий при виварюванні кісток і хрящів тварин. Желатин додають до рідких середовищ в кількості 10-15%. Желатиновий гель плавиться при 23-26° С.

При спеціальних дослідженнях використовується **кремнекислий гель** (силикагель) - речовина неорганічної природи. Його використовують як тверду основу для синтетичних середовищ.

Після розливу поживних середовищ у хімічну посуду (чашки Петрі, пробірки, колби) їх стерилізують. Зберігають поживні середовища в сухих, прохолодних приміщеннях, захищених від світла.

2. Стерилізація поживних середовищ и посуду

Стерилізація - один з важливих і необхідних прийомів в мікробіологічній техніці. Під стерилізацією (від лат. «*sterilis*» - знепліднення) в мікробіології розуміють загибель всіх живих мікроорганізмів. У мікробіологічній практиці стерилізують поживні середовища, посуд, інструмент та інші необхідні матеріали з метою уникнення розвитку сторонньої мікрофлори.

Існують різні методи стерилізації: *фізичний, механічний і хімічний*. Доцільність застосування кожного з них визначається особливостями матеріалу, предмета стерилізації, його фізичними властивостями, хімічним складом, метою дослідження.

Фізичний метод стерилізації (стерилізація нагріванням) найчастіше застосовується в мікробіологічній практиці.

Стерилізація пропалюванням над полум'ям пальника. Цим способом стерилізують дрібні лабораторні інструменти, препарувальні голки, бактеріологічні петлі, скляні палички, пінцети тощо.



Стерилізація сухим жаром проводиться в електросушильній шафі. Сухим жаром стерилізують скляний посуд - піпетки, чашки Петрі, пробірки, шпателі, загорнуті в паперові серветки. Стерилізація в сушильних шафах здійснюється при 165-180°C протягом 2 г.

Стерилізація автоклавуванням застосовується, головним чином, для стерилізації живильних середовищ. Цей спосіб оснований на обробці насиченою парою під тиском, вищим за атмосферний, тобто при температурі понад 100°C. Використовують додатковий до атмосферного тиск у 0,5, 1 і 2 атм (кПа), при цьому температура пари підвищується відповідно до 112, 121 і 134°C. Сумісна дія високої температури і пари забезпечує знищення як вегетативних, так і спорових форм мікроорганізмів за достатньо короткий термін.

Стерилізація здійснюється в спеціальних апаратах - **автоклавах**. Автоклав це металевий двостінний котел, який здатний витримувати високий тиск. Між стінками, тобто у водопарову камеру, через лійку заливають воду до необхідного рівня. Ця камера має кран для виходу повітря і пари. Внутрішня частина котла — це стерилізаційна камера, куди поміщають матеріал для стерилізації. Кришка автоклава герметично закривається гвинтами (рис. 11).

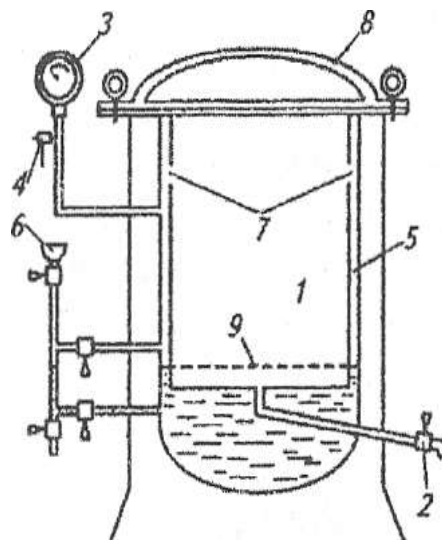


Рисунок 11 - Схема автоклава:

1 - стерилізаційна камера; 2 - кран для виходу повітря; 3 – манометр; 4 – запобіжний клапан; 5 - водопарова камера; 6 - лійка; 7 - отвори для надходження пари до стерилізаційної камери; 8 - кришка автоклава; 9 - підставка для розміщення матеріалів, які стерилізуються

Після розміщення матеріалів у стерилізаційній камері і герметичного закривання кришки автоклав вмикають в електричну мережу. Нагрівач підігріває воду, доводить її до кипіння і пара, яка утворилася, витісняє повітря зі стерилізаційної камери. Коли все повітря витіснено перекривають кран і пара починає піднімати тиск до заданого. Коли стрілка манометру досягає потрібного тиску, фіксують час початку стерилізації. В сучасних конструкціях автоклавів підтримка заданого тиску відбувається автоматично. По закінченні терміну

стерилізації (найчастіше 30 хв) нагрівання припиняють (вимикають з електромережі) і чекають поки не спаде тиск (стрілка манометра падає до 0). Після цього відкривають кран, випускають пару, а після повного охолодження автоклаву відкривають кришку.

Режим автоклавування (температура і термін стерилізації) визначається складом поживного середовища. Наприклад, середовища, які містять цукри, вітаміни (пивне сусло), деякі білкові середовища (желатинове молоко) автоклавують при додатковому тиску 0,5 кПа (112°C) протягом 20-30 хв, м'ясо-пептонні середовища - при 1 кПа (121°C) 20-30 хв.

Стерилізація плинною парою застосовується для середовищ, що містять речовини, які змінюються під дією температури вище 100°C. Таку стерилізацію проводять в автоклаві з кришкою, що не загвинтили, при відкритому крані для випуску пари або спеціальному апараті.

Плинною парою проводять роздрібнену стерилізацію, яка проводиться при 100°C протягом 3-х днів по 30-40 хв щодня. В проміжках між стерилізацією поживні середовища залишають при 18-20°C або витримують в термостаті для того, щоб спори, що залишилися після кип'ятіння, могли прорости у вегетативні клітки, які гинуть при наступному нагріванні.

Плинною парою проводять також пастеризацію і тиндалізацію. **Пастеризація** – ще неповна стерилізація, проводиться нагріванням до 50-60°C 15-30 мін або до 70-80°C 5-10 мін з подальшим охолодженням до 10-11°C. Застосовується для інактивації вегетативних клітин мікроорганізмів в рідинах, що не витримують високу температуру: (молоко, пиво, соки і т. п.). Оскільки при пастеризації спорові форми виживають, для того, щоб спори не проросли, пастеризовані продукти зберігаються на холоді.

Тиндалізація - подрібнена пастеризація, яка здійснюється декілька разів (6-7 днів) з перервою в 24 г, коли матеріал, що стерилізується, витримують при 18-20°C для проростання спор у вегетативні клітини, які знищуються при подальшій пастеризації.

Стерилізація ультрафіолетовим опромінюванням. Дія ультрафіолетових променів знаходить широке використання для стерилізації повітря в лабораторних приміщеннях, в цехах промислових підприємств. Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. У зв'язку з можливою несприятливою дією ультрафіолетових променів на організм людини бактерицидні лампи вмикають тільки при відсутності людей в приміщенні.

Хімічний метод стерилізації застосовують при дезинфекції. Дезинфекція - це спосіб знищення мікроорганізмів за допомогою сильнодіючих речовин або так званих антисептиків.

До групи антисептиків відносяться неорганічні та органічні речовини. Із неорганічних антисептиків широко використовуються неорганічні кислоти, луги та солі (0,1-0,2% розчини сулеми), хлорне вапно 10-20%, йод. Із органічних речовин застосовують етиловий і бутиловий спирти, альдегіди, органічні кислоти та розчинники (3-5% розчин фенолу, 0,2-0,5% розчин хлораміну і 1-4% розчин формаліну). В лабораторній практиці методи дезинфекції використовують для знезараження поверхні робочого столу, рук, боксів для посіву.

Механічний метод стерилізації застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни та ін.).

Стерилізація фільтруванням за допомогою мембранних фільтрів. Мембранні фільтри виготовляють з коллодію, ацетату целюлози та інших матеріалів у вигляді дисків товщиною біля 0,1мм, діаметром 35 мм. Залежно від розміру пор (0,35, 0,5, 0,7, 0,9 і 1,2 мкм) вони позначаються відповідно № 1, 2, 3, 4 і 5. Для стерилізації необхідно використовувати фільтр № 1.

Стерилізація фільтруванням за допомогою фільтра Зейтца. (тверді диски, виготовлені з азбесту з целюлозою). Рідина, яка стерилізується - всмоктується через стерильний фільтр у стерильну колбу, в якій за допомогою насоса утворюється вакуум. Мікроорганізми осідають у порах фільтру.

Завдання:

1. Вивчити класифікацію поживних середовищ. Визначити фактори, за якими відбувається вибір поживного середовища залежно від мети дослідження.
2. Ознайомитися з методами і режимами стерилізації поживних середовищ і посуду. Вивчити будову і принцип дії автоклава в мікробіологічній лабораторії.
3. Приготувати МПА: до 1 л м'ясної води (або бульйону) додати 5 г кухонної солі, 10 г пептону і 20 г агар-агару, розплавити на електроплиті, розлити в чашки Петрі, простерилізувати.

Питання для самоконтролю:

1. Які умови необхідні для розвитку мікроорганізмів?
2. Як класифікують поживні середовища?
2. Чим відрізняються природні поживні середовища від синтетичних?
4. Що таке елективні середовища?
5. Чим відрізняються елективні середовища від диференційно-діагностичних?
6. Як класифікують поживні середовища за фізичним станом?
7. Яке стандартне поживне середовище використовують для визначення кількості МАФАМ?
8. Які елективні поживні середовища застосовують для виявлення бактерій групи кишкової палички (БГКП)?
9. Які середовища використовують для вирощування дріжджів та плісневих грибів?
10. Яку речовину найчастіше додають до рідких середовищ, щоб утворились тверді і чому?
11. Що являє собою агар-агар?
12. Що являє собою желатин?
13. Що таке стерилізація?
14. Які є методи стерилізації?
15. Які Ви знаєте фізичні методи стерилізації?
16. Який режим стерилізації застосовується для посуду?

17. Який метод стерилізації застосовують для дрібних металевих предметів: бактеріологічні петлі, препарувальні голки, трафарети тощо?
18. Чи вважається об'єкт стерильним, якщо всі вегетативні клітини знищені, а спори залишились?
19. Яким чином стерилізують поживні середовища плинною парою в автоклаві?
20. Що таке пастеризація і тиндалізація?
21. Які Ви знаєте органічні та неорганічні антисептики?
22. Що таке механічна стерилізація?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Найважливіші біохімічні процеси, збудниками яких є мікроорганізми, та їх промислове використання

Зміст роботи:

1. Бродіння анаеробного типу.
 - 1.1 Спиртове бродіння.
 - 1.2. Молочнокисле бродіння.
 - 1.3. Маслянокисле бродіння.
2. Бродіння аеробного типу.
 - 2.1. Оцтовокисле бродіння.

1. Бродіння анаеробного типу

1.1. Спиртове бродіння

Спиртове бродіння – процес розкладу цукру на спирт і вуглекислий газ в результаті життєдіяльності мікроорганізмів:



Збудники бродіння – дріжджі *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces cerevisia* (*S. vini*) (сімейство *Sacharomycetacea*, під *Sacharomyces*), бактерії *Sarcina ventriculi*, мукові гриби.

Спиртове бродіння протікає в анаеробних умовах, тоді як розмноження дріжджів відбувається при широкому доступі кисню. Оптимальні температурні умови для спиртового бродіння 28-30°C. Спирт, що утворюється, шкідливий для дріжджів і при його накопиченні процес бродіння припиняється. Проте при високій концентрації цукру в розчині дріжджі можуть залишатися живими в середовищі, яке містить до 15% спирту.

Умови протікання спиртового бродіння:

- концентрація цукру в субстраті – близько 15%;
- реакція середовища (pH) у межах 4-5;
- температура близько 30°C;

- відсутність кисню.

За оптимальною температурою бродіння поділяють на:

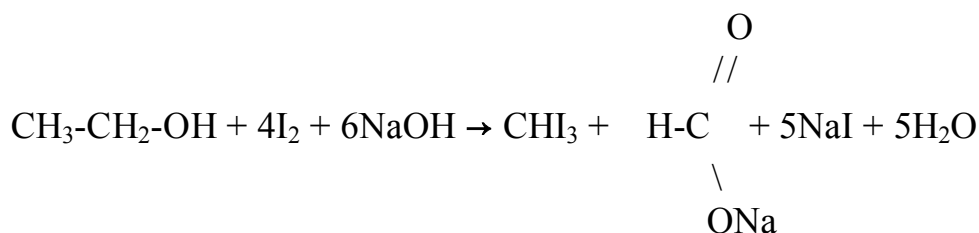
- верхове – для виробництва спирту і вина, у хлібопеченні;
- низове – для отримання пива.



Методика отримання накопичувальних культур збудників спиртового бродіння

1. За 30 хвилин до заняття пресовані дріжджі розвести в 10%-м розчині сахарози. У широкодонну колбу об'ємом 200-250 мл налити 50 мл 10%-го розчину сахарози і 10 мл суспензії дріжджів.
2. Колбу закрити пробкою з газовідвідною трубкою. Для збирання газу нижній зігнутий кінець трубки занурити в кристалізатор з водою і надіти на нього пробірку, наповнену водою. Колбу занурити у водяну лазню з температурою 30-35°C.
3. Впродовж всього експерименту така температура підтримується за допомогою спиртного або газового пальника. Через 30-40 хвилин, коли все повітря з колби буде витіснено вуглекислим газом, останній зібрати в нову пробірку, яка також має бути заповнена водою.
4. Для виявлення вуглекислого газу підлити в пробірку невелику кількість бариту або вапняної води, яка від CO₂ каламутніє, або пробірку з вуглекислим газом помістити в чашку з 10%-м розчином луку: через 20-30 хвилин в результаті взаємодії вуглекислого газу з лугом рівень рідини в пробірці піднімається.
5. Для виявлення спирту відлити в пробірку 10 мл рідини, що бродить, підлити до неї 1-2 мл луку і підігріти до 60°C. Потім кинути декілька кристалів металевого йоду і продовжувати нагрівати. У присутності спирту випадає жовтий осад йодоформу, який можна визначити по запаху.

Сумарне рівняння реакції отримання йодоформу:



1.2. Молочнокисле бродіння

Молочнокисле бродіння – це процес перетворення цукру в молочну кислоту у результаті життєдіяльності молочнокислих бактерій в анаеробних умовах.



Сумарне рівняння молочнокислого бродіння

Типове: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHONCOOH$

Нетипове:



Збудники першого типу бродіння зброджують вуглеводи з утворенням молочної кислоти.

Другий тип бродіння викликається кишковою паличкою (*Escherichia coli*), він складніший, тому при бродінні вуглеводів тут утворюються й інші сполуки: оцтова і янтарна кислоти, етиловий спирт, вуглекислота і водень. Це пов'язано з тим, що бактерії цього типу мають у складі клітин фермент карбоксилазу, а у гомоферментативних бактерій він відсутній.

Збудниками молочнокислого бродіння є усі молочнокислі бактерії – кулясті й паличкоподібні нерухомі, спор не утворюють, грампозитивні:

– *Streptococcus lactis* (молочний стрептокок) – для виробництва кислого молока (*acillus acidophilus*);

- *Streptococcus cremoris* – для виробництва сметани;
- *Bact. bulgaricum* (болгарська паличка) – для виробництва йогуртів
- *Bact. casei* (сирна паличка) – для виробництва кисломолочних сирів;
- *Bact. acidophilum* (ацидофільна паличка) – для виробництва ацидофільного молока, біопрепаратів у профілактиці і лікуванні шлунково-кишкових захворювань;
- *Bact. Delbrueckii* (дельбрюківська паличка) – для отримання молочної кислоти з цукру;
- *Bact. cucumeris fermentati* та *Bact. plantarum* – для виготовлення житнього хліба. Вони є збудниками хвороб плодів і овочів.

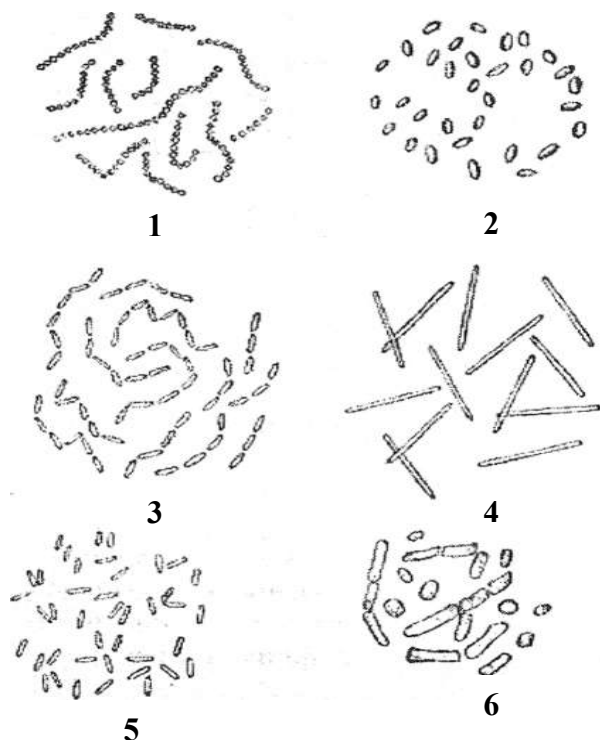


Рисунок 12 – Молочнокислі бактерії:

- 1, 2 – молочний стрептокок (*Streptococcus lactis*),
 3 – бактерії капустиного розсолу (*Lactobacillus cucumeris*),
 4 – болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*),
 5 – кишкова паличка (*Escherichia coli*),
 6 – молочна цвіль (*Oidium lactis*)

Методика отримання накопичувальних культур молочнокислих бактерій:

1. Свіже молоко розлити в пробірки, наповнюючи їх на 2/3 об'єму і закрити пробками (при використанні стерильного молока до нього додати кислого молока).
2. Пробірки помістити в термостат з температурою 30-35°C.
3. Після утворення в молоці твердого згустку можна починати дослідження і визначення молочної кислоти.
4. Для дослідження приготувати тимчасові або постійні препарати. У останньому випадку препарат висушити, зафіксувати на спиртівці або сумішшю спирту з ефіром (1:1) і пофарбувати метиленовою синню або карболовим фуксином.
5. Препарат розглянути при великому збільшенні 15x40 або 15x90.
6. Замалювати молочнокислі бактерії: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lact. plantarum*, *Lact. fermentum* і молочний гриб *Oidium lactis*.
7. Визначити молочну кислоту в кислому молоці якісною реакцією - отриманням оцтового альдегіду: кисле молоко відфільтрувати через паперовий фільтр. До

10 мл фільтрату додати 1 мл 10%-го розчину сірчаної кислоти. Нагрівати до кипіння і додати по краплях 20%-ий розчин марганцевокислого калію. Молочна кислота майже вся переходить в оцтовий альдегід, який виявляється на паперовому фільтрі, змоченому аміачним розчином азотнокислого срібла. При нагріванні колби оцтовий альдегід випаровується, і при взаємодії з аміачним розчином срібла, викликає почорніння фільтрувального паперу.

1.3. Маслянокисле бродіння

Маслянокисле бродіння – це процес розкладу цукру на масляну кислоту, вуглекислий газ та водень у результаті життєдіяльності маслянокислих бактерій.

Маслянокисле бродіння вуглеводів є одним з етапів кругообігу вуглецю в природі. В анаеробних умовах здійснюється ферментативне розщеплювання вуглецьвмісних органічних сполук з утворенням масляної кислоти і АТФ.

Встановлено, що масляна кислота в невеликих концентраціях, разом з іншими органічними кислотами, що часто утворюються в ґрунті мікроорганізмами, є фізіологічно активною сполукою, яка стимулює ріст рослин.

Деякі види маслянокислих бактерій є азотфіксаторами, які поліпшують азотний режим ґрунтів. Інші використовуються в силосуванні кормів. Якщо в силосі накопичується велика кількість масляної кислоти при неправильній упаковці силосної маси, це призводить до зміни смакових якостей силосу і порушення травлення у тварин.

Збудники бродіння – маслянокислі бактерії – строгі (облігатні) анаероби, спорогенні, термофіли, рухливі, грампозитивні представники роду *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pectinovorum* (рисунок 13). Характерними фізіологічними властивостями маслянокислих бактерій є здатність розкладати крохмаль до глюкози і відкладати в своїх клітинах гранульозу.



1

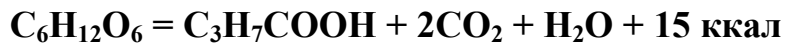


2

Рисунок 13 – Збудник маслянокислого бродіння *Clostridium pasteurianum*:

1 – вегетативні клітини, 2 - спорові клітини

Сумарне рівняння маслянокислого бродіння:



У харчовій промисловості не використовують масляну кислоту, а замість її – **ефіри масляної кислоти**, які мають різні приємні запахи:



Методика отримання накопичувальних культур маслянокислих бактерій:

1. Дрібно нарізати неочищену картоплю і заповнити їй 2/3 об'єму пробірки.
2. Залити картоплю водопровідною водою.
3. Додати трохи крейди на кінчику скальпеля для нейтралізації кислот, які виділятимуться при гідролізі крохмалю.
4. На етикетці написати прізвище, ім'я і групу. Пробкою з етикеткою закрити пробірку і поставити в штатив. Пробірки витримувати в термостаті при температурі 25-27°C 3-5 днів.
5. Для дослідження краплю розчину з пробірки нанести на предметне скло і додати краплю розчину Люголя. Гранулеза дає з йодом синє забарвлення.
6. Розглянути препарат під мікроскопом і замалювати мікроорганізми, що беруть участь в маслянокислому бродінні.
7. Провести реакції на масляну кислоту. Масляна кислота має запах кислого молока. При взаємодії із спиртами вона утворює ефіри з приємним запахом.
 - а) отримання масляно етилового ефіру (ананасної есенції). До 4-5 мл отриманого настою маслянокислих бактерій додати 0,5 мл 96% етилового спирту і 1-2 мл концентрованої сірчаної кислоти. При нагріванні на спиртівці з'являється характерний запах ефіру;
 - б) реакція з FeCl_3 . У окрему пробірку налити приблизно 5 мл рідини і додати 2 мл 5%-ного розчину FeCl_3 . Нагрівати і відзначити коричневий колір маслянокислого заліза.

2. Бродіння аеробного типу

2.1. Оцтовокисле бродіння

Оцтовокисле бродіння – це процес перетворення етилового спирту в оцтову кислоту в результаті життєдіяльності мікроорганізмів. В результаті цього процесу утворюється оцтова кислота і вода.

Збудники бродіння – оцтові бактерії – нерухомі, аспорогенні, грампозитивні, строгі аероби, паличкоподібної форми, які зустрічаються у вигляді довгих кольорових паличок, що утворюють один ряд клітин (рисунок 14).

Найчастіше зустрічаються наступні оцтовокислі бактерії:

Acetobacter aceti – коротка паличка, утворює ланцюжки, що забарвлюються йодом в жовтий колір, витримує високі концентрації спирту (до 11%). Частіше вона розвивається на пиві та під час окислення спирту накопичує в середовищі до 6% оцтової кислоти. Оптимальна температура розвитку близько 34°C. Утворюють гладку слизисту плівку, яка не піднімається на стінки пробірки.

A. pasteurianum подібна до *A. aceti*, але йодом забарвлюється в синій колір, а на поверхні субстрату утворює суху зморщену плівку. В середовищі накопичує 6–8% оцтової кислоти.

A. xylinum – утворює щільну слизову плівку, яка згодом ще більш ущільнюється і потовщується. Йодом забарвлюється в синій колір. Ці бактерії разом з дріжджовими грибами утворюють чайний гриб і використовуються для приготування чайного квасу. В середовищі накопичує не більше 2% оцтової кислоти.

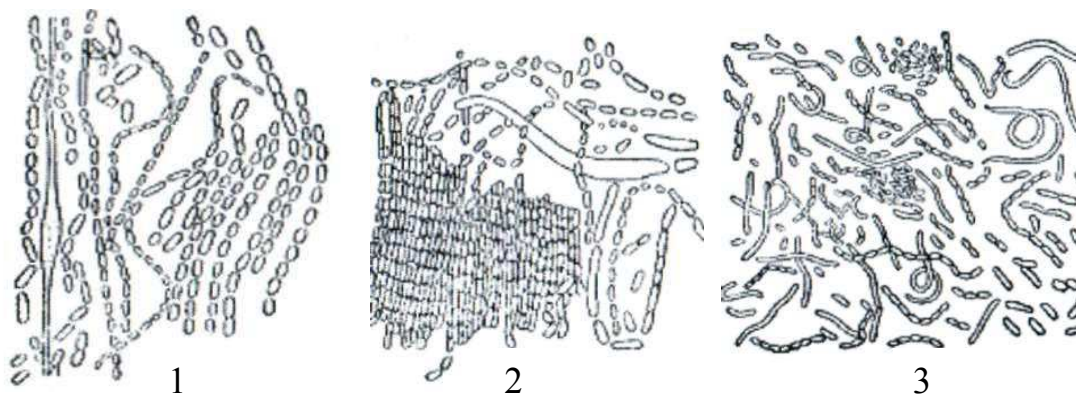
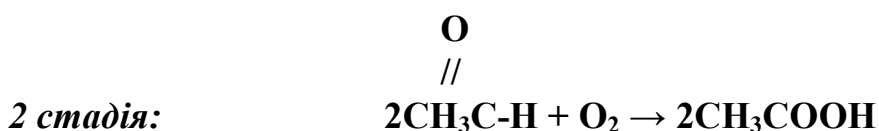
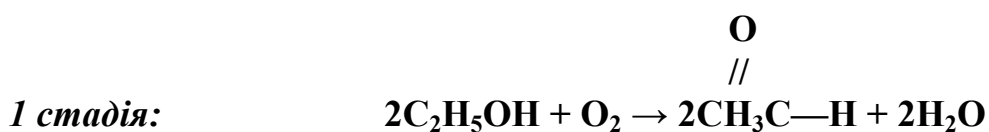


Рисунок 14 – Оцтовокислі бактерії:
1 - *Acetobacter pasteurianum*, 2 – *A. aceti*, 3 – *A. xylinum*

Рівняння оцтовокислого бродіння:



Методика отримання накопичувальних культур оцтовокислих бактерій:

1. Свіже пиво налити в колбу шаром завтовшки 2 см і підкислити декількома краплями оцтової кислоти (винним спиртом).

2. Закрити колбу пробкою і поставити в термостат для пророщування при температурі 30-35°C на 5 діб.
3. Білувато-сіру плівку, що з'явилася на поверхні, узяти металевою петлею або скляною паличкою, нанести на предметне скло, крапнути 1-2 краплі йоду або розчину Люголю, накрити покривним склом і розглянути під мікроскопом.
4. За кольором розрізнити мікроорганізми. У *A. aceti* клітини забарвлюються йодом в жовтий колір, у *A. pasteurianum* - в синій, а плівка має сухий зморщений вигляд. За наявності *A. xylinum* клітини також забарвлюються в синій колір, але в бродячій рідині утворюється шарувата плівка, що опускається на дно колби.
5. Замалювати оцтовокислі бактерії і позначити їх колір.

Завдання:

1. Визначити збудників спиртового бродіння за зазначеною методикою. Провести мікроскопування, замалювати в зошит.
2. Приготувати препарат молочнокислих бактерій, розглянути його при великому збільшенні мікроскопу, замалювати.
3. Визначити молочну кислоту в кислому молоці якісною реакцією.
4. Приготувати препарат маслянокислих бактерій. Розглянути його під мікроскопом і замалювати мікроорганізми, що беруть участь в маслянокислому бродінні.
5. Провести реакції на масляну кислоту.
6. Приготувати препарат збудників оцтовокислого бродіння за зазначеною методикою. Замалювати оцтовокислі бактерії і за кольором їх розрізнити.

Питання для самоконтролю:

1. Що таке спиртове бродіння?
2. назвіть збудників спиртового бродіння.
3. Які оптимальні умови для проведення спиртового бродіння (температура, концентрація цукру, рН середовища)?
4. Які побічні продукти спиртового бродіння?
5. Значення спиртового бродіння в народному господарстві.
6. Яке бродіння називають молочнокислим?
7. Назвіть збудників гомоферментативного і гетероферментативного молочнокислого бродіння.
8. Які бактерії викликають квашення овочів?
9. Яке значення молочнокислого бродіння в харчовій промисловості
10. Що таке маслянокисле бродіння?
11. Які продукти утворюються в результаті маслянокислого бродіння?
12. Назвіть мікроорганізми, що викликають маслянокисле бродіння.
13. Значення маслянокислого бродіння в природі.
14. Яке бродіння називають оцтовокислим?
15. Назвіть збудників оцтовокислого бродіння.
16. Значення оцтовокислого бродіння в харчовій промисловості.

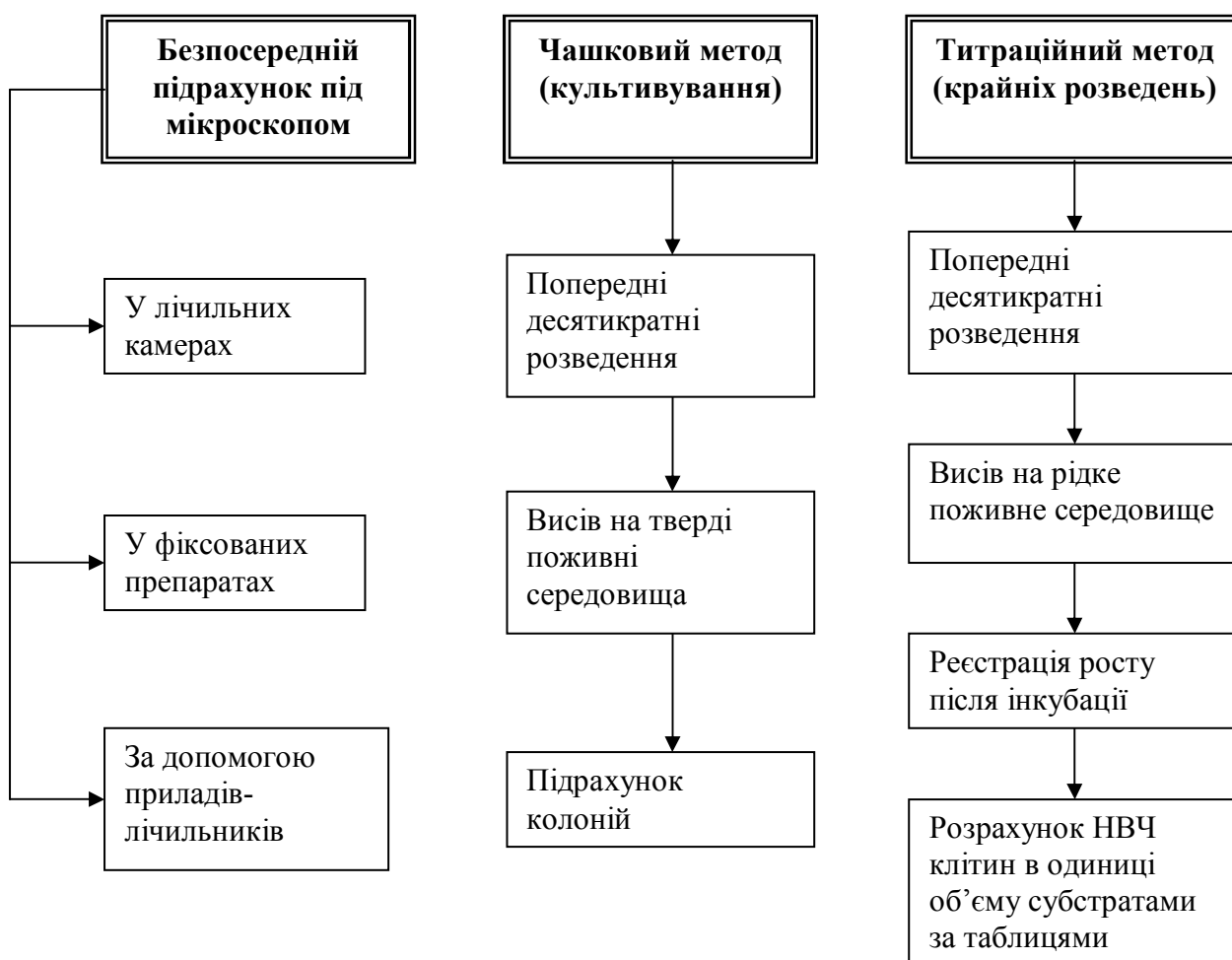
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Методи кількісного визначення мікрофлори

Зміст роботи:

1. Методи прямого підрахунку мікроорганізмів у лічильних камерах.
2. Метод культивування мікроорганізмів (чашковий).
3. Метод крайніх розведень (титраційний метод обліку мікроорганізмів).

Розрізняють три групи методів щодо кількісного обліку мікрофлори.



1. Методи прямого підрахунку мікроорганізмів у лічильних камерах

Лічильні камери застосовують для підрахунку достатньо великих об'єктів - дріжджів, одноклітинних водоростей, спор грибів та деяких відносно великих бактерій. Принцип роботи всіх відомих камер однаковий (Горяєва, Фукс-Розенталя, Тома-Цейса та ін.)

Лічильна камера - це товсте предметне скло, середня частина якого розділена поперечною борозною. На кожній половинці середньої частини скла нанесена сітка для підрахунку мікроорганізмів. Площа сітки розділена на великі та малі

квадрати. Існують камери, на предметному склі якої знаходиться не дві, а чотири сітки.

У камері Горяєва, яка найбільш часто використовується для підрахунку мікроорганізмів (рис. 15), площа малого квадрата (ABCD), заштрихованого на рисунку, дорівнює $1/400 \text{ мм}^2$, площа великого квадрата (ABCD) - $1/25 \text{ мм}^2$ ($0,04 \text{ мм}^2$) і складається з 16 малих квадратів. Частина скла, на яку нанесена сітка, знаходиться нижче рівня бокових сторін на $0,1 \text{ мм}$ (глибина камери зазначається на склі).

Для підрахунку мікробних клітин суспензію, яка містить мікроорганізми, вносять у заглиблення камери і накривають покривним скельцем. Таким чином, є можливість підрахувати мікроорганізми у відомому об'ємі, який визначається глибиною камери (h) і площею квадрата (S). За формулою можна вирахувати кількість мікробів у вихідному матеріалі.

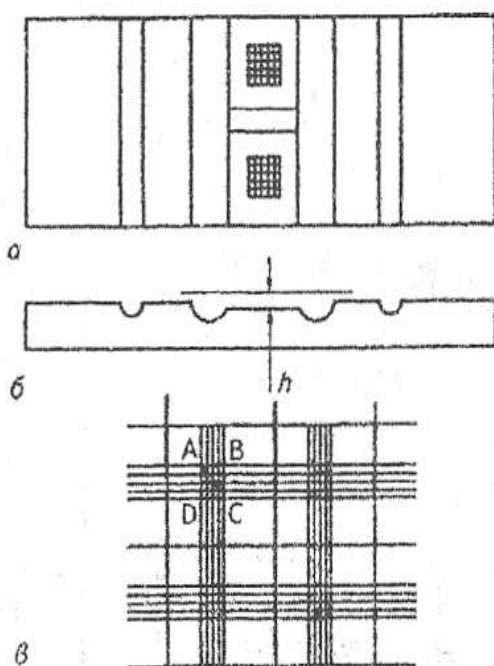


Рисунок 15 – Лічильна камера Горяєва:

a – вид зверху; $б$ – вид збоку; $в$ – поділ камери на квадрати; h – глибина камери

Переваги методу наступні: швидкість; відсутність методичних труднощів; цінний у виробничих умовах (наприклад, для контролю накопичення дріжджових клітин), при санітарній оцінці зовнішнього середовища.

Недоліки методу: підраховуються як живі, так і неживі клітини; при дослідженні субстрату з невеликою кількістю мікробних клітин можливі помилки.

Методика підрахунку мікроорганізмів в камерах Горяєва:

1. Приготувати суспензію (наприклад, дріжджову) $0,1\%$ концентрації ($0,1 \text{ г}$ розвести в 100 мл стерильної води).

2. Невелику краплю дріжджової суспензії нанести скляною паличкою на поверхню лічильної камери (на сітку).
3. Накрити покривним скельцем, притерти великими пальцями до бокових стінок камери, щоб розрахункове значення об'єму камери відповідало об'єму суспензії.
4. Камеру розташувати на предметному столику мікроскопа, встановити об'єктив 8х і знайти зображення.
5. За допомогою гвинтиків предметного столика знайти будь-який кутовий квадрат сітки. Почати підрахунок клітин дріжджів у 10 великих квадратах, просуваючись по діагоналі. Підрахунок клітин вести всередині квадрата плюс ті, що знаходяться на верхній і правій сторонах.
6. Розрахувати середнє арифметичне значення кількості клітин в квадраті.
7. Кількість клітин в 1 мл суспензії вирахувати за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S},$$

де М - кількість клітин в 1 мл суспензії;
 а — середнє значення кількості клітин в квадраті;
 h - глибина камери в мм;
 S - площа великого квадрата сітки в мм²;
 1000 мм³ = 1мл.

8. Кількість дріжджових клітин в 1 г сухих (або пресованих) дріжджів розрахувати за формулою:

$$X = \frac{M \cdot 100}{0,1},$$

де Х - кількість дріжджових клітин в 1 г сухих (або пресованих) дріжджів;
 М - кількість клітин в 1 мл суспензії;
 100 мл - об'єм мірної колби;
 0,1 г - наважка сухих (пресованих) дріжджів.

Приклад розрахунку. В десяти квадратах відповідно було підраховано клітин дріжджів: 31, 28, 44, 27, 30, 32, 35, 40, 29, 34. Середнє арифметичне значення - 330:10=33. Вираховуємо за формулою $M = (33 \times 1000) : (0,1 \times 0,04) = 33000 : 0,004 = 8250000 = 8,25 \times 10^6$ клітин в 1 мл суспензії. $X = 8,25 \times 10^6 \times 100 : 0,1 = 8,25 \times 10^9$ клітин в 1 г сухих (пресованих) дріжджів.

2. Метод культивування мікроорганізмів (чашковий).

Визначення кількості мікроорганізмів методом культивування проводиться за такими етапами:

1. Підготовка матеріалу для дослідження.

2. Методика приготування десятикратних розведень матеріалу.
3. Висів у чашки Петрі й культивування посівів.
4. Облік вирощених колоній й розрахунок кількості мікроорганізмів (в 1 г або в 1 см³ продукту, на 1 см² поверхні, на рука, посуду тощо).

1. 1. Підготовка матеріалу для дослідження

Характер підготовки матеріалу для мікробіологічного дослідження залежить від його природи, консистенції та інших властивостей.

- ✓ *Тверді продукти не розчинні у воді* (хліб, сир, печиво та ін.) За чинним стандартом відбирають середню пробу для аналізу. З середньої проби на стерильний папір або скло відбирають наважку. Розмір наважки визначається гаданим ступенем забрудненості продукту. Наважку переносять у стерильну ступку, заливають 1-2 см³ стерильної води і ретельно перемішують стерильним макогончиком. Отриману масу переносять у стерильну колбу з визначеним об'ємом стерильної води. Залежно від розміру наважки і кількості води отримують вихідну суспензію або розведення. Наприклад, наважку ковбаси у 10 г перенесли у колбу і долили стерильною водою до позначки 100 см³. Таким чином отримали розведення 1:10. Якби цю ж наважку у 10 г перенесли у пробірку і долили води до об'єму 10 см³, то отримали б вихідну суспензію або так зване пряме розведення.
- ✓ *Тверді продукти розчинні у воді* (сіль, цукор тощо). Із середньої проби беруть наважку і розчиняють у визначеній кількості стерильної води, щоб отримати розведення 1:10 або 1:100.
- ✓ *Рідкі продукти* (сік, молоко, вода тощо). Такий матеріал є готовою вихідною суспензією.
- ✓ *Поверхні обладнання, посуду, інвентарю* (Л/р 11, с. 55).
- ✓ *Повітря* (Л/р 9, с. 46).

2.2. Методика приготування десятикратних розведень матеріалів

Часто буває неможливим підрахувати колонії на чашці Петрі при прямому висіві об'єкта. Щоб зменшити кількість мікроорганізмів при висіві, вихідну суспензію розводять стерильною водою.

1. До пробірок наливають по 10 см³ води і стерилізують в автоклаві (після стерилізації у кожній пробірці залишається 9 см³ води).
2. Стерильною піпеткою беруть 1 см³ підготовленої вихідної суспензії та вносять до пробірки з 9 см³ стерильної води. Таким чином отримують перше розведення суспензії 1:10.
3. Далі новою стерильною піпеткою беруть із першого розведення 1 см³ і вносять таким же чином в наступну пробірку з 9 см³ стерильної води, тобто готують друге розведення 1:100.
4. Аналогічним чином готують третє, четверте і наступні розведення (номер розведення співпадає з кількістю нулів у знаменнику) (рис. 16).

2.3. Висів у чашки Петрі й культивування посівів

1. Підписують чашки Петрі (обов'язково зазначають розведення та інші необхідні дані) і висівають в них стерильною піпеткою по 1 см³ відповідного розведення матеріалу, починаючи з найбільшого, тобто з того, де є найменша кількість мікроорганізмів.
2. Посіви заливають стерильним розплавленим і охолодженим до температури 48-50°C поживним середовищем та перемішують круговими рухами, не відриваючи чашку від столу.
3. Після застигання агару чашки перевертають догори дном і ставлять у термостат для культивування мікроорганізмів. Для вирощування МАФАМ використовують МПА (температура 30°C, час – 72 год), для дріжджів і пліснявих грибів використовують сусло-агар (температура 24°C, час – 5 діб).

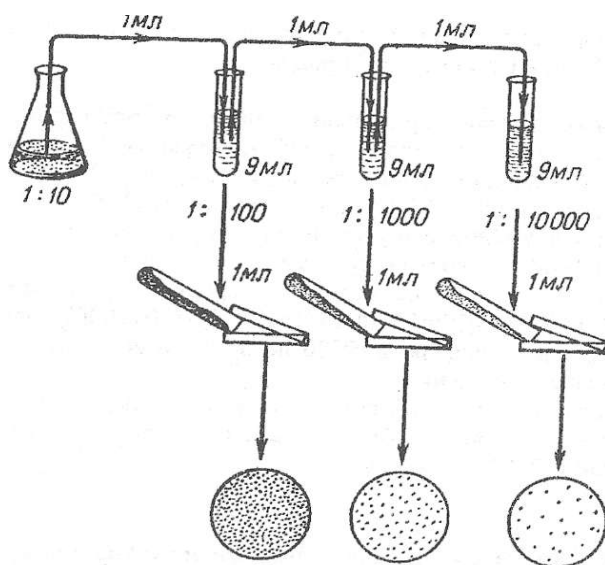


Рисунок 16 - Схема розведення і висіву дослідного матеріалу при визначенні мікробного числа чашковим методом

2.4. Облік вирощених колоній і розрахунок кількості мікроорганізмів

Найкращими для підрахунку вважаються чашки, на яких виросло від 15 до 300 колоній (ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов). В інших джерелах наводяться інші числа: від 50 до 100 [Лерина, Педенко, 1980] і від 50 до 150 [Градова и др., 2001]. Зазвичай висівають по дві паралельні чашки кожного розведення. Кількість підрахованих колоній помножують на відповідне розведення, беруть середнє арифметичне двох паралельних чашок, потім загальне середнє арифметичне всіх підрахованих чашок і, таким чином, отримують остаточний результат, тобто вміст мікроорганізмів в 1 см³ вихідної суспензії. Знаючи об'єм суспензії та масу наважки, взятої для її приготування, вираховують кількість мікроорганізмів в 1 г або в 1 см³ продукту.

Приклад. На двох паралельних чашках при розведенні 1:10 виросла велика кількість колоній, які неможливо підрахувати. На чашках із розведенням 1:100

виросло відповідно 270 і 230 колоній, при розведенні 1:1000 - 15 і 20, при розведенні 1:10 000 - 2 і 5 колоній. У цьому випадку відбираємо для підрахунку чашки з розведеннями 1:100 і 1:1000. Підраховану кількість колоній множимо на розведення і беремо середнє арифметичне:
 $[(270 \times 100) + (230 \times 100)] : 2 = 25000$ і $[(15 \times 1000) + (20 \times 1000)] : 2 = 17500$.

Чашки з розведенням 1:10000 не враховуємо, тому що на них виросло менше 15 колоній.

Визначаємо кількість мікроорганізмів як середнє арифметичне усіх чашок, які були взяті для підрахунку: $(25000 + 17500) : 2 = 21250 = 2,13 \times 10^4$.

Кількісний облік мікроорганізмів за допомогою пластини Лафара і камери Вольфюгеля:

Пластина Лафара - це кругла скляна пластина, розподілена на сегменти та сектори (їх 6), діаметр кола дорівнює діаметру чашки Петрі (10 см). Пластину накладають на чашку Петрі так, щоб її центр співпадав з центром чашки Петрі.

При рівномірному розподілі мікроорганізмів підраховують їх кількість в одному секторі та помножують на 6. Якщо колоній багато і вони на чашці Петрі розташовані нерівномірно, то підраховують колонії у 3-4 секторах, а потім перераховують на всю площу чашки Петрі та визначають їх кількість.

Камера Вольфюгеля складається з 144 квадратів ($S=1 \text{ см}^2$), по діагоналі кожен квадрат розподілений на 9 малих квадратів. За допомогою лупи підраховують кількість колоній у 12 квадратах: 4 - в центрі та 8 - периферійних і записують число колоній у кожному квадраті. Отриману суму поділяють на число підрахованих квадратів і знаходять кількість мікроорганізмів у 1 см^2 . Наприклад, якщо всього в 12 квадратах підраховано 232 колонії, то середня кількість колоній на 1 см^2 буде складати приблизно 19 ($232:12$). Для визначення числа колоній по всій чашці Петрі треба кількість колоній в 1 см^2 помножити на площу чашки Петрі, яка дорівнює $78,6 \text{ см}^2$. Таким чином, загальне число колоній в чашці Петрі буде дорівнювати 1520 ($19 \times 78,6$).

3. Метод крайніх розведень (титраційний метод обліку мікроорганізмів)

Кількісний облік мікрофлори титраційним методом заключається у визначенні крайнього розведення дослідного матеріалу, яке містить життєздатні мікроорганізми. Для проведення аналізу в пробірки (колби) з рідким середовищем вносять точно виміряні об'єми з різних розведень матеріалу і після інкубації визначають, у якій найменшій кількості посівного матеріалу виявляються мікроорганізми. Найменша кількість дослідного матеріалу (виражена одиницями об'єму або маси), в якому можна виявити мікроорганізми, називається *титром мікроорганізмів*.

Титраційний метод кількісного обліку мікрофлори застосовується для підрахунку мікроорганізмів, які не розвиваються або погано розвиваються на твердих середовищах, а також для виявлення мікробів певних фізіологічних груп (анаеробних мікроорганізмів, молочнокислих бактерій, кишкових паличок та ін.). Для виявлення мікроорганізмів певних фізіологічних груп зазвичай користуються елективними або диференційно-діагностичними середовищами,

наприклад, для визначення титру молочнокислих бактерій використовують молочні відвійки (знежирене молоко).

Титраційний метод включає наступні етапи:

1. Приготування розведень.
2. Посіви в рідкі поживні середовища.
3. Реєстрацію росту після інкубації (встановлення мінімального об'єму посівного матеріалу, який містить мікроорганізми, або титру).
4. Розрахунок найбільш імовірного числа клітин в одиниці об'єму вихідного субстрату (за спеціальними таблицями, розробленими на основі методів варіаційної статистики).

Цей метод докладно буде вивчатися на наступних заняттях (Л/р 12, с. 57)

Завдання:

1. Ознайомитись з методами кількісного обліку мікрофлори.
2. Підрахувати кількість клітин в 1 мл 0,1% дріжджової суспензії методом прямого підрахунку в камері Горяєва.
3. Розрахувати кількість клітин в 1 г сухих (пресованих) дріжджів.
4. Ознайомитись з чашковим методом культивування мікроорганізмів і титраційний метод обліку мікроорганізмів.

Питання для самоконтролю:

1. Як підраховувати клітини дріжджів у камері Горяєва, які знаходяться на сторонах квадрата, а не в середині нього?
2. З якими об'єктивними можна працювати з камерами Горяєва? Навести приклади застосування прямого підрахунку мікроорганізмів у камерах Горяєва в мікробіологічній практиці.
3. Які етапи включає метод культивування мікроорганізмів?
4. Які особливості щодо підготовки різних матеріалів для визначення кількості МАФМ чашковим методом?
5. З якою метою проводять десятикратні розведення матеріалу перед висівом на чашки Петрі
6. Скільки стерильних піпеток необхідно використати, щоб зробити три розведення рідкого продукту?
7. Де і за якими режимами проводять інкубацію посівів на визначення кількості МАФМ?
8. За якими режимами проводять інкубацію посівів на визначення кількості дріжджів і пліснявих грибів?
9. Методика підрахунку колоній на чашках Петрі.
10. Яким чином проводиться підрахунок мікроорганізмів за допомогою пластини Лафара і камери Вольфюгеля?
11. У чому полягає сутність методу крайніх розведень?
12. У яких випадках необхідне застосування титраційного методу?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Санітарно-бактеріологічне дослідження мікрофлори повітря

Зміст роботи:

1. Визначення мікрофлори повітря аспіраційним методом (на апараті Кротова).
2. Визначення мікрофлори повітря седиментаційним методом.

Повітря є несприятливим середовищем для життєдіяльності мікроорганізмів. Однак, як правило, у повітрі закритих приміщень знаходяться ґрунтові сапрофіти, а також мікроорганізми, які виділяються слизовими оболонками дихальних шляхів людини, тобто повітря є транзитним середовищем. Мікрофлора може бути представлена патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами, які довгий час зберігають інфекційну активність у повітрі.

Санітарно-бактеріологічний стан повітря закритих приміщень визначається:

- загальною кількістю мікробів, які знаходяться в 1 м³ повітря (мікробне число);
- кількістю санітарно-показових мікробів (гемолітичних стрептококів і патогенних стафілококів) в 1 м³ повітря.

По їх концентрації визначають ступінь забрудненості повітряного середовища.

Вимоги до якості повітря не вентилюваних приміщень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 - Оцінка якості повітря не вентилюваних приміщень по загальній кількості МАФАМ

Повітря	Кількість мікроорганізмів в 1 м ³ (МАФАМ)	
	Літній режим	Зимовий режим
Чисте	1500 бактерій 16 стрептококів	4500 бактерій
Забруднене	2500 бактерій 38 стрептококів	7000 бактерій

Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря підрозділяються на:

- седиментаційні, засновані на принципі механічного осідання мікробів (метод осідання Коха);
- аспіраційні, засновані на активному просмоктуванні повітря за допомогою різних приладів (Речменського, Кротова, Киктенко та ін.), які дають можливість визначити не тільки якісний склад, але й кількісний вміст бактерій в певному середовищі. Метод осадження може бути використаний для кількісного підрахунку мікрофлори повітря закритих приміщень, але ніяк не атмосферного повітря, де має місце коливання швидкості руху повітря.

1. Визначення мікрофлори повітря аспіраційним методом (на апараті Кротова)

Аспіраційні методи основані на уловлюванні бактерій рідиною. Серед приборів для дослідження повітря приміщень найпоширенішим є прибор Кротова. Механізм уловлювання мікрофлори засновується на ударно-прибивної дії струменя повітря, який проходить крізь клиноподібну щілину і з великою швидкістю зіштовхується з вологою поверхнею поживного середовища.

Основними елементами апарату Кротова (рис. 17) є збудник аспірації (електромотор з відцентровим вентилятором), прибор для визначення об'єму протягнутого повітря (мікроманометр) та диск, який обертається, і на який встановлюється відкрита чашка Петрі з твердим поживним середовищем. Корпус прибору герметично закривається кришкою, центральна частина якої є прозорий диск із плексигласу з клиноподібною щілиною (ширина 0,1 мм біля центру).

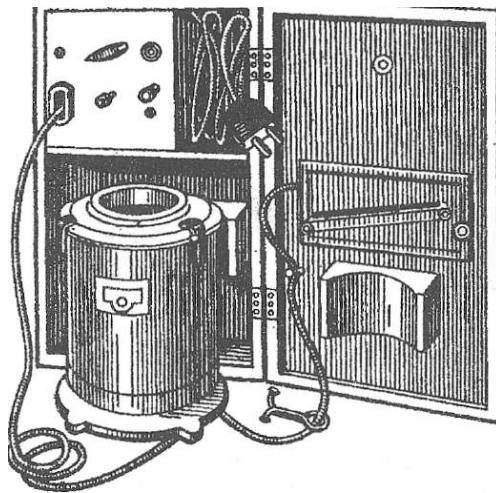


Рисунок 17 – Апарат Кротова

Під час відбору проби повітря відкрита чашка Петрі обертається разом з диском апарату, завдяки чому досягається рівномірне засівання поверхні агару мікрофлорою повітря.

Апарат дозволяє пропускати від 20 до 40 л (дм³) повітря за хвилину. Загальний об'єм пропущеного через апарат повітря для аналізу різний і залежить від виду приміщення.

Проби повітря необхідно відбирати на рівні людини, яка сидить або стоїть.

Методика визначення мікрофлори повітря на апараті Кротова:

1. Підписати дві чашки Петрі.
2. Відкрити кришку апарату і закріпити на диску відкриту чашку Петрі із застиглим МПА.
3. Закрити кришку прибору, включити апарат в електромережу, встановити швидкість просочування повітря 25 л/хв і відмітити початковий час аспірації.
4. Провести забір 100 л повітря (час роботи апарата — 4 хв).

5. Аналогічно провести дослід з паралельною чашкою.
6. Інкубацію посівів провести в термостаті при температурі 37°C упродовж 24-48 год.
7. Підрахувати кількість колоній на кожній з двох чашок Петрі.
8. Вирахувати середнє арифметичне кількості колоній на двох паралельних чашках.
9. Визначити мікробне число (X) повітря даного приміщення за формулою:

$$X = a \cdot 10,$$

де а - середнє арифметичне кількості колоній в 100 л повітря,
10 - коефіцієнт перерахунку на 1 м³ (1 м³=1000 л).

2. Визначення мікрофлори повітря седиментаційним методом.

За допомогою методів осадження (седиментації) можна отримати загальну уяву про мікрофлору повітря.

Методика визначення мікрофлори повітря седиментаційним методом:

1. Чашку із застиглим м'ясо-пептонним агаром переносять у досліджуване приміщення і розміщують на розгорнутому папері, в якому вона стерилізувалась. Під час аналізу слідкують за тим, щоб не було руху повітря.
2. Не перевертаючи чашки, здвигають кришку на край таким чином, щоб вся поверхня чашки з МПА була повністю відкрита, витримують 5 хв і закривають кришкою.
3. Підписують на папері прізвище, ім'я, групу, дату і місце взяття проби повітря.
4. Чашку ставлять у термостат при температурі 37°C на 24-48 год для культивування мікроорганізмів.
5. Після культивування вивчають культуральні ознаки (особливості росту на поживних середовищах) різних колоній (ізольоване скупчення клітин одного виду, що виросло з однієї клітини) (с.23-24), які виросли на чашці Петрі, й описують їх в зошиті за схемою:

Колонія	Розмір	Колір	Форма	Профіль	Край	Структура

6. Мікроскопують описані колонії, приготував фіксовані фарбовані за Грамом препарати, замальовують і визначають морфологічні ознаки.

Для підрахування мікробного числа повітря закритих приміщень користуються формулою В.Л. Омелянського, згідно з якою на поверхню 100 см² осідає за 5 хв стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л (дм³) повітря:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot t},$$

де X — кількість мікробів в 1 м^3 повітря;

a — кількість колоній, що вирости на чашці Петрі;

b - площа чашки Петрі ($3,14 \times 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$);

t - час експозиції в досліді, хв;

5 - час експозиції за Омелянським, хв;

10 — об'єм повітря, з якого відбувається осадження за 5 хв, за Омелянським, л (дм^3);

100 - площа, на яку відбувається осадження мікробів за Омелянським, см^2 ;

1000 - перерахунок на 1 м^3 повітря.

Після скорочення формула виглядає наступним чином, якщо експозиція чашки під час дослідів дорівнювала 5 хв:

$$X = (a \cdot 100 \cdot 100) : b$$

Завдання:

1. Провести мікробіологічне дослідження повітря методом осадження в мікробіологічній лабораторії, в буфеті, столовій, аудиторії і коридорі університету.
2. Провести дослідження мікрофлори повітря мікробіологічної лабораторії аспіраційним методом за допомогою апарата Кротова.
3. Визначити мікробне число повітря досліджених приміщень, проведене обома методами. Порівняти результати.
4. Провести кількісний облік мікроорганізмів за допомогою пластини Лафара або камери Вольфюгеля.
5. Описати культуральні ознаки колоній, які вирости на чашках Петрі. Дані занести до таблиці.
6. Підготувати мазки та офарбувати їх за Грамом, провести мікроскопію описаних колоній, замалювати, встановивши їх морфологічні ознаки.

Питання для самоконтролю:

1. Чому повітря є несприятливим середовищем для життєдіяльності мікроорганізмів?
2. З якою метою і за допомогою яких методів проводиться кількісний аналіз мікрофлори повітря?
3. В чому сутність методу Коха?
4. Методика визначення мікрофлори повітря на апараті Кротова.
5. Що означає мікробне число повітря?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

Мікробіологічні методи дослідження води

Зміст роботи:

1. Кількісний аналіз бактерій в воді.
2. Санітарно-мікробіологічне дослідження питної води бродильним методом.

Водні екосистеми є місцем існування мікроорганізмів. Мікрофлора води найчастіше відображає мікробний пейзаж ґрунту біля водоймища, постійно міняється і оновлюється, що пов'язане з попаданням різних бактерій з дощовими, стічними, талими водами, з пилом, з організму риб, гниючих рослин.

Мікрофлора в прісних і солоних водоймищах різна. У прісних водоймищах (озерах, річках) виявляються коки (*Micrococcus roseus* і ін.) і паличкоподібні бактерії (*Pseudomonas fluorescens*) Анаеробів у воді мало; в основному вони розмножуються в мулі на дні водоймищ, беручи участь в біохімічних процесах очищення. Сапрофітні мікроорганізми виконують роль сміттярів, розщеплюючи органічні відходи, роблячи їх придатними для метаболічних процесів інших живих істот.

Із зливовими, талими і стічними водами в річки і озера потрапляють мікроорганізми – представники нормальної флори кишечника людини і тварин, наприклад, кишкова паличка, ентерококи, різні клостридії. Разом з ними можуть потрапити і патогенні мікроорганізми (черевнотифозні, дизентерійні бактерії, холерні вібріони, віруси поліомієліту, гепатиту), які зберігаються від декількох днів до тижнів. Саме тому водний шлях передачі є одним з можливих чинників розповсюдження кишкових інфекцій. По наявності у воді *E. coli* судять про її забрудненість фекаліями.

Ступінь обсіменіння води мікроорганізмами виражають **сапробністю** - сукупністю живих організмів, які живуть у водах і містять значну кількість тваринних або рослинних залишків. Виділяють 4 зони сапробності: полісапробну, мезосапробну, олігосапробну і катасапробну.

Полісапробна зона містить до декількох мільйонів мікробів в 1 см³ води і велику кількість легкозасвоюваних органічних сполук. Вода в цій зоні дуже забруднена. Мікробіологічні процеси відбуваються майже в анаеробних умовах і супроводжуються виділенням метану, меркаптанів, аміаку, сірководню. Вода в цій зоні містить багато кишкової палички і анаеробні бактерії, які зумовлюють процеси гниття і бродіння.

У **мезосапробній зоні** менший вміст органічних речовин. Це зона помірного забруднення. В ній відбуваються процеси мінералізації, а також окислення і нитрифікації. Загальна чисельність мікроорганізмів в 1 см³ води цієї зони не перевищує декілька сотень клітин.

Олігосапробна зона характерна для чистої води. У цій зоні відсутня кишкова паличка, загальна кількість мікроорганізмів складає від 10 до 1000 мікробних клітин в 1 см³ води. У воді олігосапробної зони відбуваються процеси окислення нітриту і заліза.

Катасапробна зона - це зона дуже чистої води (особливо в осінньо-зимовий період), розташована далеко від населених пунктів і берегів.

Ступінь забруднення, зокрема хвороботворними мікробами, може бути перешкодою для використання води. Тому будь-яке водне джерело необхідно піддавати санітарно-мікробіологічній оцінці.

Для оцінки санітарно-гігієнічного стану водоймищ застосовують ряд показників, зокрема:

- **мікробне число** - кількість колоній (МАФАМ), які зростають на чашці Петрі з МПА з 1 см³ води при температурі 37°C протягом 24 годин;

- **індекс ЛКП (лактозопозитивні кишкові палички)** – показник ступеню фекального забруднення води водоймищ, якій визначає кількість клітин кишкової палички в 1 л (дм³) води.

Під час дослідження мікробіологічних показників водопровідної питної води в її пробах визначають загальне мікробне число, загальні коліформи, *E.coli*, ентерококи.

Згідно новим Державним Санітарним Нормам і Правилам «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною» (ДСанПіН 2.2.4-171-10), що затверджені Наказом Міністерства охорони здоров'я України 12.05.2010 N 400, у воді, що подається у водопровідну мережу загальна кількість мікроорганізмів (МАФАМ) в 1 см³ нерозбавленої води не повинна перевищувати 100 клітин, колі-форми, *E.coli* і ентерококи повинні бути відсутні (Додаток А).

Відбір проб води:

Залежно від мети дослідження визначають місце і час відбору проби.

Для дослідження води відкритих водоймищ, а також колодязів відбирають проби води на глибині 10-15 см від поверхні в стерильні флакони.

Для відбору проб водопровідної води використовують стерильні склянки місткістю 500 мл з ватяно-марлевими пробками. Бактеріологічне дослідження відібраних проб повинне проводитися не пізніше 2 год з моменту відбору або не пізніше 6 год при зберіганні проби при 1-5° С.

1. Кількісний аналіз бактерій в воді

В 1 мл досліджуваної води визначають вміст мезофільних аеробів і факультативних анаеробів, здатних при 37°C протягом доби на МПА утворювати колонії, видимі неозброєним оком або при збільшенні в 2-5 разів. З кожної проби роблять посів не менше двох різних об'ємів, вибраних з таким розрахунком, щоб число колоній, що вирости, на чашці коливалося від 30 до 300.

Методика визначення мікробного числа:

1. При дослідженні мікробного числа водопровідної води розведення можна не робити. При посіві води відкритих водоймищ необхідно зробити попереднє розведення (Л/р 8, с. 39). До пробірок наливають по 10 см³ води і стерилізують в автоклаві (після стерилізації у кожній пробірці залишається 9 см³ води). Стерильною піпеткою беруть 1 см³ підготовленої вихідної суспензії та вносять до пробірки з 9 см³ стерильної води. Таким чином

отримують перше розведення суспензії 1:10. Далі новою стерильною піпеткою беруть із першого розведення 1 см³ і вносять таким же чином в наступну пробірку з 9 см³ стерильної води, тобто готують друге розведення 1:100. Аналогічним чином готують третє, четверте і наступні розведення (номер розведення співпадає з кількістю нулів у знаменнику).

2. Підписують чашки Петрі (обов'язково зазначають розведення та інші необхідні дані) і висівають в них стерильною піпеткою по 1 см³ відповідного розведення матеріалу, починаючи з найбільшого, тобто з того, де є найменша кількість мікроорганізмів. Зазвичай одне розведення вносять у дві чашки Петрі (2-кратна повторність).
3. Посіви заливають стерильним розплавленим і охолодженим до температури 48-50°C поживним середовищем (МПА або СА) та перемішують круговими рухами, не відриваючи чашку від столу.
4. Після посіву чашки залишають для культивування у термостаті при температурі 37°C на 24 год.
5. Після інкубації чашки виймають і підраховують кількість колоній прямим або непрямым методами за допомогою пластин Лафара і камер Вольфюгеля (с. 45). У разі великої кількості колоній і рівномірному їх розподілі, дно чашки Петрі ділять на чотири або більше число секторів, підраховують кількість колоній в секторі (не менше чим на 1/3 поверхні чашки), знаходять середнє арифметичне число колоній і множать на число секторів. Загальну кількість бактерій в 1 см³ (X) підраховують по формулі:

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

де n - кількість колоній, підрахованих в чашці Петрі;

m - число десятикратних розведень.

За остаточний результат аналізу приймають середнє арифметичне, отримане по всіх чашках.

2. Санітарно-мікробіологічне дослідження питної води бродильним методом

Санітарно-мікробіологічне дослідження питної води бродильним методом полягає у визначенні загальних коліформ.

Загальні коліформи – це представники бактерій групи кишкових паличок, які ферментують лактозу з утворенням кислоти і газу.

Методика визначення загальних коліформ:

1. У колбу на 150 мл з 10 мл концентрованого стерильного середовища ЛПС (лактозо-пептонне середовище) додають 100 мл водопровідної води.
2. Ємкості з посівами маркують, вказавши дату посіву, прізвище, курс і групу виконавця.
3. Посіви інкубують в термостаті при температурі 37°C протягом 24-48 годин;
4. після інкубації посіви розглядають і, якщо має місце зміна середовища (помутніння, утворення газу і кислоти, зміна кольору, бульбашки), проводять посів вмісту флаконів, що заграли, на середовище Ендо

(штрихом за допомогою бактеріологічної петлі). Посіви інкубують в термостаті 16-18 годин при температурі 37°C.

5. При виявленні росту на середовищі Ендо після закінчення терміну інкубації колонії мікроскопують; за відсутності росту або зростання у вигляді шорстких, плівчастих, грубих, з нерівними краями і інших нехарактерних для кишкових паличок колоній формують негативну відповідь; при виявленні темно-червоних колоній з блиском і без нього, характерних для кишкової палички – препарати, забарвлені по Граму, мікроскопують.

Результати аналізу виражають у вигляді: загальні колі форми відсутні, або присутні у 100 мл водопровідної води.

Завдання:

1. Визначити кількість мікроорганізмів (мікробне число) в водопровідній воді і в забруднених водах.
2. Провести посів води на середовище ЛПС і залишити для інкубації.
3. Провести посів на середовище Ендо проб, що забродили. Мікроскопувати колонії, що вирости (з фарбуванням). Замалювати виявлені мікроорганізми.
4. Визначити загальні коліформи.

Питання для самоконтролю:

1. Чому мікрофлора води не є постійною?
2. Про що говорить наявність у воді бактерій групи кишкової палички?
3. Що таке сапробність? Назвіть зони сапробності.
4. Дайте визначення поняттям «мікробне число», «загальні коліформи».
5. Яким бактеріологічним показником повинна відповідати вода, що подається у водопровідну мережу?
6. Як повинен проводитися відбір проб води для бактеріологічних досліджень?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

Мікробіологічні дослідження твердих поверхонь методом змивів

Зміст роботи:

1. Санітарно-мікробіологічне дослідження поверхні робочого столу, інвентарю та посуду.
2. Санітарно-мікробіологічне дослідження змиву з рук персоналу.

У харчовій промисловості, на підприємствах громадського харчування і торгівлі, поверхні, що використовують при виробництві, зберіганні і реалізації харчових продуктів і кулінарних виробів, підлягають санітарно-бактеріологічному контролю. Бактеріологічний аналіз поверхонь обладнання,

виробничого інвентарю, посуду, одягу, рушників, а також рук персоналу є обов'язковим розділом комплексних санітарних досліджень. Основним методом відбору проб для даних досліджень твердих поверхонь є *метод змивів*. Про мікробну забрудненість предметів судять по загальній кількості мікроорганізмів на одиниці поверхні (зазвичай на 1 см²), а також по наявності кишкових паличок, як показників фекального забруднення. В окремих виробничих приміщеннях досліджують наявність умовно-патогенних бактерій (стафілококів, сальмонел).

Важливою умовою санітарно-бактеріологічного контролю є правильний вибір часу забору проб (так, змиви з рук, санітарного одягу і рушників беруть до початку роботи, в перервах і після неї, а в цехах обробки сирової продукції - тільки до роботи).

У досліджуваних змивах не повинно бути кишкових паличок, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, їх присутність свідчить про грубе порушення санітарних правил і вимагає проведення термінових профілактичних заходів.

1. Санітарно-мікробіологічне дослідження поверхні робочого столу, інвентарю та посуду

Для визначення загального мікробного забруднення провести змив з поверхні столу (халата, обладнання тощо):

1. Стерильним пінцетом беруть з чашки Петрі стерильний тампон, змочений у 10 см³ стерильної води (фізіологічному розчині) і обмежують їм певну поверхню столу, наприклад, 25 см². Змивають цю поверхню.
2. Повторити дії п. 1 ще у трьох місцях столу, щоб загальна площа змитої поверхні склала 100 см².
3. Занурити тампон у пробірку з водою і струшувати вручну упродовж 3 хв.
4. В умовах стерильності відібрати стерильною піпеткою 1 мл суспензії та внести на дно стерильної попередньо підписаної чашки Петрі.
5. Залити в чашку Петрі розплавлений і охолоджений до температури 48...50°C МПА, перемішати середовище і суспензію круговими обертами, не відривая від столу.
6. Після застигання агару перевернути чашку догори дном і поставити у термостат для культивування мікроорганізмів при температурі 37°C на 24-48 год.
7. Підрахувати кількість колоній, які вирости на чашці з МПА.
8. Вирахувати мікробне число за формулою:

$$M = \frac{n \cdot 10}{S},$$

де М - мікробне число;

n — кількість колоній на чашці;

10 - вихідне розведення змиву;

S - площа змиву, см².

9. Описати культуральні ознаки колоній за вищезазначеною схемою (с. 23-24, с. 49).

10. Провести мікроскопію описаних колоній бактерій, визначити їх форму, спороутворюючу здатність і фарбування за Грамом.

Для оцінки санітарного стану поверхні обладнання та інвентарю користуються наступною шкалою:

Оцінка чистоти	Кількість мікроорганізмів на 1 см ² поверхні (МАФAM, КУО)
Добре	0 - 100
Задовільно	101-1000
Незадовільно	Понад 1000

З метою дотримання чистоти *інвентарю* та *посуду* здійснюють змиви з усієї поверхні, яка торкається продукту. Методика проведення дослідження аналогічна змиву з поверхні, але кількість МАФAM визначають на одній тарілці, на одному стакані, на виделці тощо, тобто підраховану кількість колоній на чашці помножують на 10 (на вихідне розведення змиву).

2. Санітарно-мікробіологічне дослідження змиву з рук персоналу

Недотримання правил особистої гігієни на підприємствах харчової промисловості, торгівлі та ресторанного бізнесу може призвести до повторного забруднення харчових продуктів при їх обробці і реалізації як сапрофітною, так і патогенною мікрофлорою. Санітарно-бактеріологічним контролем дотримання персоналом особистої гігієни є дослідження чистоти рук методом змиву.

Змиви з рук проводять за аналогічною методикою, протираючи стерильним тампоном спочатку тильні сторони кисті обох рук, потім долоні, місця між пальцями та нігтеві ложа. Окрім загальної кількості мікроорганізмів (МАФAM) у змивах з рук визначають наявність або відсутність бактерій групи кишкових паличок, для чого частину змивів переносять у бродильну пробірку з середовищем Кесслера (Л/р № 12).

Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 см³ змиву (при відсутності бактерій групи кишкових паличок):

Оцінка чистоти	Кількість мікроорганізмів в 1 см ³ змиву з рук (МАФAM, КУО)
Відмінно	1 000
Добре	1 000-5 000
Задовільно	5 000-10 000
Незадовільно	Понад 10 000

Завдання:

1. Провести змив з поверхні столу, халата, обладнання, посуду, рук.
2. Провести розрахунки кількості МАФAM у змивах. Визначити санітарний стан поверхні досліджуваних об'єктів.

3. Описати культуральні ознаки колоній, які вирости на чашках Петрі за вищезазначеною методикою (с.23-24). Дані занести до таблиці (с.49).
4. Провести мікроскопію описаних колоній, замалювати, встановивши їх морфологічні ознаки і фарбування за Грамом.
5. Визначити наявність або відсутність бактерій групи кишкової палички у змивах з рук.

Питання для самоконтролю:

1. Для чого і в який час проводять змиви з твердих поверхонь?
2. Як проводять змиви з поверхні столу, посуду тощо?
3. Методика проведення змиву з рук.
4. Які мікробіологічні показники визначають при санітарно-бактеріологічному контролі рук персоналу?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12
Санітарно-бактеріологічне дослідження молока та молочних продуктів

Зміст роботи:

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів в молоці та молочних продуктах.
2. Визначення БГКП (бактерій групи кишкових паличок) у молоці.

Молоко і молочні продукти є сприятливим середовищем для розвитку та розмноження мікроорганізмів. При виготовленні деяких молочних продуктів (сиру, кефіру, простокваші, ряжанки та ін.) використовують спеціальну мікрофлору, наприклад, молочнокислі стрептококи, молочнокислі ацидофільні палички тощо. Така мікрофлора є специфічною і не враховується при аналізі. Неспецифічною мікрофлорою, що зустрічається в молоці та молочних продуктах, є аеробні бактерії: бактерії групи кишкової палички, стафілококи та ін. З молоком можуть також передаватися збудники туберкульозу, бруцельозу, сальмонельозу, сибірки, вірус поліомієліту, аеробні бацили і т.п.

Зараження молока і молочних виробів неспецифічною мікрофлорою може відбутися в момент удою, транспортування, зберігання, від персоналу молокозаводів і так далі.

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів в молоці та молочних продуктах

Мікробіологічне дослідження продукту повинне проводитися не пізніше, ніж через 4 години з моменту відбору проби. При транспортуванні температура не повинна перевищувати 6 °С.

Проби рідких і напіврідких продуктів після ретельного їх перемішування відібрати у кількості 50-100 мл в стерильні колби. Проби вершкового масла та сиру, відібрати за допомогою стерильного шупа з глибини продукту.

Методика визначення мікробного числа:

1. З молока й інших продуктів приготувати десятиразове розведення. З проб молока, вершків, масла, морозива відібрати стерильною піпеткою 10 мл рідини і внести до 90 мл стерильних розчинів хлористого натрію. Отримують розведення 1:10.

До наважки 10 г сиру, сухих молочних продуктів додати 90 мл стерильного розчину хлористого натрію, підігрітого до 40- 45°C і збовтати протягом 3-5 хв для повного емульгування. Отримують розведення 1:10.

З першого розведення готують наступні 1:100 і так далі (табл. 3)

Таблиця 3 - Розведення молока і молочних продуктів

Найменування продукту	Розведення, що засіваються		
	1 : 10 000	1 : 100 000	1 : 1000 000
Молоко та вершки сирі	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
Молоко та вершки пастеризовані	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
Масло	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000
Морозиво	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
Молоко сгущене, какао, кава	1 : 10	1 : 100	1 : 1000

2. По 1 мл кожного розведення внести до стерильних чашок Петрі і залити 12-15 мл розплавленого і охолодженого до 45°C поживного агару. Заздалегідь чашки маркують. Відразу після заливки вміст чашки перемішують (шляхом легкого обертального похитування) для рівномірного розподілу посіяного матеріалу. Чашки перевернути і поставити в термостат при 30°C на 72 год.
3. Після закінчення терміну інкубації чашки вийняти і підрахувати число колоній прямим або непрямим методом (Л/р 8, с. 39).
4. Порівняти отримані результати з нормативною документацією (Додаток В).

2. Визначення БГКП у молоці

До бактерій групи кишкових паличок відносять грампозитивні, що не утворюють спор, палички, які зброджують лактозу з утворенням кислоти та газу при 37°C протягом 24 годин.

Визначення БГКП в молоці відбувається в три етапи:

1. Висів молока в елективне для кишкової палички середовище.
2. Облік бродильної проби.
3. Ідентифікація БГКП.

Висів молока в елективне для кишкової палички середовище:

1. Приготувати розведення молока 1:10. Для посіву приготувати пробірки зі стерильним середовищем Кесслер, до складу якого входять пептон (1%), лактоза (0,25%), жовч (5%). Після стерилізації та встановлення відповідного рН (7,4-7,6) додають генціан-віолет, розливають середовище у пробірки, опускають в них поплавки (маленькі пробірки) і повторно стерилізують. Готове поживне середовище має темно-фіолетовий колір, поплавки повністю заповнені середовищем).
2. У пробірки внести по 1 мл молока, розведеного 1:10.
3. Термостатувати при 37°C протягом 24 год.

Облік бродильної проби:

1. Оглянути пробірки з посівами молока на середовищі Кесслер. Відмітити наявність або відсутність бродильних пробірок (помутніння середовища, поява пухирців повітря у поплавку). При відсутності ознак бродіння продукт вважають незабрудненим кишковою паличкою.
2. При наявності ознак бродіння необхідно провести ідентифікацію культури, яка виросла, оскільки деякі види бактерій можуть визвати аналогічне бродіння. Для ідентифікації кишкової палички провести посів із бродильної пробірки на тверде елективне середовище Ендо.
3. Інкубацію посівів у термостаті проводити при 37°C протягом 24 год.

Ідентифікація кишкової палички:

1. Проаналізувати посіви культури на середовищі Ендо. Відмітити наявність або відсутність колоній, типових для кишкових паличок: бордових з металевим блиском або без нього, темно-червоних и рожевих з темним центром або прозорих незабарвлених.
2. Приготувати фіксований фарбований за Грамом препарат з бордових колоній. При виявленні грамнегативних коротких безспорових паличок дати позитивну відповідь на наявність бактерій групи кишкової палички в 0,1 мл.

Завдання:

1. Відібрати проби продуктів для дослідження.
2. Визначити загальну кількість мікроорганізмів в молоці та молочних продуктах: зробити відповідні розведення, засіяти та культивувати в термостаті при 30°C протягом 72 год.
3. Підрахувати число колоній прямим або непрямим методом та порівняти отримані результати з нормативною документацією.
4. Висіяти молоко із розведенням 1:10 на середовище Кесслер.
5. Виявити бродильні проби і висіяти їх на середовище Ендо.
6. З колоній типових для кишкових паличок зробити фіксовані фарбовані за Грамом препарати і мікроскопувати. Ідентифікувати кишкову паличку.

Отримані дані порівняти з нормами в стандарті й зробити відповідний висновок (Додаток В).

Питання для самоконтролю:

1. Що є специфічною та неспецифічною мікрофлорою деяких молочних продуктів?
2. При яких умовах повинно проводитися мікробіологічне дослідження молока та молочних продуктів?
3. В чому полягає методика визначення мікробного числа продукту?
4. Надати визначення БГКП?
5. Етапи визначення БГКП в молоці.
6. Як відбувається висів молока в елективне для кишкової палички середовище?
7. Зазначте етапи обліку бродильної проби.
8. В чому полягає ідентифікація кишкової палички?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

Санітарно-бактеріологічне дослідження м'яса та ковбасних виробів

Зміст роботи:

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів в м'ясі та продуктах його переробки.
2. Визначення свіжості м'яса бактеріоскопічним методом.

М'ясо та м'ясні продукти можуть бути обсіменені різними мікроорганізмами. Існує багато шляхів інфікування м'яса:

- первинне обсіменіння (прижиттєве) унаслідок ослаблення організму тварини, тобто при стані, коли порушуються бар'єрні функції кишечника, і мікроби з нього потрапляють в органи і кров;
- розповсюдження мікробів по організму при захворюванні тварини (сальмонельоз);
- попадання мікробів при забої тварин і обробленні туш (найбільш частий спосіб);
- попадання мікробів при неправильному зберіганні м'яса і м'ясних продуктів.

М'ясо, ковбасні вироби і готові вироби з рубленого м'яса вимагають суворої санітарної оцінки. Ковбасні вироби і продукти з м'яса промислового виробництва досліджують у відповідності, яку регламентує нормативна документація за такими показниками:

- загальне число бактерій в 1 г продукту;
- присутність бактерій групи кишкової палички в 1 г;
- сальмонели в 25 г продукту;
- бактерії групи протей;

- сульфїтредукуючі клостридїї (сульфїт-відновлювачі);
- коагулазопозитивні стафілококи;
- *Listeria monocytogenes*.

Відповідно до санітарних вимог і рекомендацій, в ковбасних виробках мікробне число не повинно перевищувати 1000/г.

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів в м'ясі та продуктах його переробки

Від кожної партії ковбасних виробів відбирають не менше двох проб з різних місць, з яких далі складають загальну пробу для досліджень. Загальні проби кожного продукту упаковують окремо в стерильний пергамент та наносять етикетку з такими даними: назва продукту, місце відбирання проби, час відбирання (дата, година), мета дослідження, підпис особи, що відбирала пробу.

Проби зберігають при температурі 6-8°C. Аналіз проводять не пізніше, ніж через 4 г з моменту відбору проб.

Під час підготовки проб поверхню твердих продуктів (батона ковбаси) протирають тампоном, змоченим спиртом і обпалюють. Батон розрізають і стерильним ножом відбирають пробу з різних місць. З інших м'ясних виробів вирізають ділянки переважно ближче до кістки.

З виробів без оболонки спочатку беруть змиви з поверхні зволженим тампоном і засівають на визначення бактерій групи кишкової палички. Потім з внутрішньої частини виробу вирізають шматочки масою 20 г.

З об'єднаної проби беруть наважку в 20 г і в стерильній фарфоровій ступці гомогенізують з 2-3 г стерильного піску, поступово додаючи 80 мл стерильного фізіологічного розчину. Отриманий гомогенат настоюють при кімнатній температурі 15 хв.

Методика визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 г продукту:

Сутність методу полягає у здатності мезофільних аеробів і факультативних анаеробів рости на поживному агарі при температурі 30°C з утворенням колоній, видимих при збільшенні x5.

З кожної проби має бути зроблено не менше двох посівів, різних за об'ємом. При цьому на одну чашку Петрі проводять посів 0,1 г продукту, а на іншу – 0,01 г продукту.

Для посіву 0,1 г продукту готують перше десятиразове розведення досліджуваної суспензії: стерильною піпеткою відбирають 5 мл суспензії і переносять в пробірку з 5 мл стерильного фізіологічного розчину або пептонної води. Кінець піпетки має бути занурений нижче за поверхню розчину, не торкаючись до стінок пробірки, щоб уникнути змивання бактерій з зовнішнього боку. 1 мл отриманого розчину містить 0,1 г дослідного продукту.

Іншою стерильною піпеткою ретельно перемішують вміст пробірки продуванням за допомогою гумової груші, відбирають 1 мл і переносять в

стерильну чашку Петрі, при цьому кришку повністю не відкривають, а злегка піднімають.

Для посіву 0,01 г продукту готують розведення: стерильною піпеткою відбирають 1 мл розчину, що містить 0,1 грама продукту і переносять в пробірку з 9 мл стерильного фізіологічного розчину. 1 мл випробовуваного розчину вторинного розведення містить 0,01 грама продукту. 1 мл даного розчину стерильною піпеткою переносять в стерильну чашку Петрі.

Після внесення розведень суспензії до чашки Петрі заливають 12-15 мл розплавленого і охолодженого поживного агару, швидко змішують з м'ясо-пептонним агаром обережно нахилиючи і обертаючи чашку по своїй осі.

Після застигання агару чашки Петрі загортають, етикують та термостатують при 30°C протягом 72 год. Через 72 год підраховують загальну кількість колоній бактерій, що вирости на чашках з урахуванням зроблених розведень. Визначене число бактерій в 1 г продукту порівнюють з нормативними даними (Додаток Б).

2. Визначення свіжості м'яса бактеріоскопічним методом

При санітарно-гігієнічній експертизі м'яса згідно з ГОСТ 23392-78 проводять бактеріоскопічне дослідження, яке дозволяє швидко встановити ступінь його свіжості шляхом мікроскопування фарбованих за Грамом мазків-відбитків. Метод ґрунтується на визначенні кількості бактерій і ступеня розкладу м'язової тканини.

Методика проведення бактеріоскопії м'яса:

1. За допомогою обпаленого над полум'ям спиртівки скальпелю і пінцету вирізують невеликі шматочки м'яса з різної глибини. Зрізаними сторонами прикладають шматочки до стерильного предметного скла. Отримані мазки-відбитки підсушують на повітрі, фіксують над полум'ям і фарбують за методом Грама.
2. Підготовлений препарат мікроскопують, при цьому відмічають:
 - наявність грамнегативних бактерій;
 - співвідношення кокової та паличкоподібної мікрофлори, що є показником ступеня розвитку гнильних процесів;
 - підраховують кількість бактерій у полі зору мікроскопа (середнє з 10 полів зору);
 - обробку результатів провести згідно з нормам чинного стандарту (Додаток Б).

М'ясо вважають **свіжим**, якщо в мазках-відбитках не знайдено мікроорганізмів або в полі зору препарату видно поодинокі (до 10 клітин) кулясті та паличкоподібні бактерії та відсутні сліди розкладу м'язової тканини.

М'ясо **сумнівної свіжості** в полі зору мазка-відбитку з поверхневого шару м'язів містить до 10 мікроорганізмів, а з глибоких шарів – до 20-30 мікробів (переважно кулясті) і в ньому виявлені сліди розкладу м'язової тканини.

М'ясо вважають *несвіжим*, якщо в полі зору мазка-відбитку знайдено понад 30 мікроорганізмів (переважно паличкоподібні) та спостерігається значний розклад м'язової тканини.

Завдання:

1. Відібрати проби продуктів для дослідження.
2. Визначити загальну кількість мікроорганізмів в м'ясі та ковбасних výroбах: зробити відповідні розведення, засіяти та культивувати в термостаті при 30°C протягом 72 год.
3. Підрахувати число колоній прямим або непрямим методом та порівняти отримані результати з нормативною документацією.
4. Провести бактеріоскопію м'яса та визначити ступіть свіжості дослідного зразка.

Питання для самоконтролю:

1. Які існують шляхи обсіменіння мікроорганізмами м'яса та ковбасних виробів?
2. За якими показниками досліджують ковбасні вироби та продукти з м'яса промислового виробництва?
3. В чому полягає методика визначення загальної кількості мікробів в 1 г продукту?
4. Як здійснюється оцінка свіжості м'яса бактеріоскопічним методом? Яке м'ясо вважається свіжим, сумнівної свіжості та несвіжим?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14

Мікробіологічне дослідження харчових продуктів

Зміст роботи:

1. Визначення мікробіологічних показників в рідинних харчових продуктах згідно з нормами чинних стандартів.
2. Визначення мікробіологічних показників щільних харчових продуктів згідно з нормами чинних стандартів.

Завданням мікробіологічного контролю харчових продуктів є визначення їх доброякісності та санітарного стану за мікробіологічними показниками.

Як відомо, небажані зміни властивостей харчових продуктів (їх псування) при зберіганні у більшості випадків обумовлена розмноженням в них мікроорганізмів. Цінність мікробіологічного аналізу полягає в тому, що він дозволяє встановити початкові стадії псування на вигляд доброякісного продукту по накопиченню та зміні складу мікрофлори, визначити збудника мікробного псування і джерела забруднення.

Для ряду харчових продуктів встановлені норми мікробної забрудненості, які визначають придатність продуктів до споживання.

Основними показниками якості харчових продуктів, які нормуються чинними стандартами, є кількість МАФАМ (мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів), пліснявих грибів, дріжджів

(одиниця виміру — КУО (колонієутворюючі одиниці) в 1 г або в 1 см³ харчового продукту).

Також для деяких продуктів нормується кількість санітарно-показових мікроорганізмів (наприклад, БГКП – бактерії групи кишкових паличок). При санітарно-бактеріологічному контролі ряду харчових продуктів додатково до показника БГКП проводять диференційоване визначення з групи кишкових паличок роду *Escherichia coli*. Пояснюється це санітарною характеристикою роду. Так, рід *E. coli* (бактерії групи кишкових паличок) є типовим представником кишечника теплокровних тварин та людей і, отже, надійним індикатором фекального забруднення. Регламент на допустимий вміст *E. coli* в харчових продуктах визначають так, як і БГКП, – альтернативним методом: *E. coli* не допускається в певній масі продукту (як правило, – це 0,1 або 1,0 г (мл) досліджуваного продукту).

Санітарно-бактеріологічний аналіз деяких харчових продуктів передбачає обов'язкове дослідження на наявність інших умовно-патогенних бактерій, найбільш характерних для цього продукту (стафілококів – при дослідженні кондитерських кремових виробів, практично всіх кулінарних виробів та страв масового харчування, консервів м'ясних та рибних, кисломолочних продуктів, морозива тощо; сальмонел – при дослідженні яєчних продуктів, масла, сирів, морозива, молока, молочних консервів, кисломолочних продуктів та ін.)

1. Визначення мікробіологічних показників в рідинних харчових продуктах згідно з нормами чинних стандартів

Посів мікрофлори рідинних харчових продуктів, таких як безалкогольні напої та мінеральна вода, соки, пиво, квас та ін. передбачає наступні етапи:

1. Відбір проб.
2. Підготовка необхідних розведень згідно вимог методики до дослідженого продукту. Так, для пива рекомендовано робити розведення 1:1000, розсолу квашених овочів – 1:10000. Розведення готують таким чином: набирають стерильною піпеткою 1 мл рідинного продукту та вносять у 99 мл стерильної води. З отриманого розчину готують інші розведення та здійснюють посіви 1 мл в чашки Петрі, які потім заливають поживним середовищем і термостатують при 30 °С протягом 72 год.
3. Дослідження кількісного та якісного складу мікрофлори.

2. Визначення мікробіологічних показників щільних харчових продуктів згідно з нормами чинних стандартів

Посів мікрофлори щільних харчових продуктів здійснюється за наступними етапами:

1. Відбір проб.
2. Підготовка проб, яка передбачає гомогенізацію (розтирання до однорідної маси) дослідженого продукту (цукор-пісок, сіль, масло вершкове, хлібобулочні вироби, кондитерські вироби та ін.). Наважка розтирається у

стерильній фарфоровій ступці макогінчиком на протязі 3 хвилин з невеликою кількістю стерильної води, взятої з ковбочки, в якій знаходилось 99 мл стерильної води.

3. Підготовка необхідних розведень. Гомогенізована маса продукту переноситься до колби зі стерильною водою і старанно перемішується протягом 3 хв. (отримають розведення 1:100). З отриманого розчину готують інші розведення та здійснюють посіви 1 мл в чашки Петрі, які надалі заливають поживним середовищем і терmostатують при 30 °С протягом 72 год.
4. Дослідження кількісного та якісного складу мікрофлори.

Завдання:

1. Відібрати проби продуктів для дослідження та підготувати розведення.
2. Зробити посіви та культивувати в терmostаті при 30°C протягом 72 год.
3. Підрахувати число колоній прямим або непрямим методом та порівняти отримані результати з нормативною документацією.

Перелік харчових продуктів, які можуть бути представлені студентам для мікробіологічних досліджень: цукор-пісок, молоко, кисломолочні продукти, м'ясо, молочні консерви, морозиво, масло, маргарин, майонез, кондитерські вироби (шоколад, пастила, карамель, ірис, цукерки, печиво, пряники тощо), квас, пиво, плодово-ягідні соки та ін.

Запитання для самоконтролю:

1. Чому основним мікробіологічним показником для більшості харчових продуктів є загальна кількість МАФАМ?
2. Якими одиницями вимірюється кількість МАФАМ?
3. Для яких харчових продуктів нормується стандартами кількість пліснявих грибів і дріжджів?
4. У чому полягає сутність поняття «санітарно-показові мікроорганізми»?
5. Які санітарно-показові мікроорганізми найчастіше нормуються стандартами?
6. Які мікроорганізми є показником фекального забруднення?
7. Які санітарно-показові мікроорганізми є показником забруднення виділеннями дихальних шляхів?

Список літератури

1. Дементьева, М.И., Выгонский, М.И. Болезни плодов, овощей и картофеля при хранении [Альбом] / М.И. Дементьева, М.И. Выгонский. - М.: ВО «Агропромиздат», 1988. – 231 с.: ил. – ISBN 5-10-000095-3
2. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии [Текст] / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова. - 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: ДеЛи принт, 2004. – 144 с.
3. Лысак, В.В. Микробиология [Текст]: учеб. пособие / В.В. Лысак. – Мн.: БГУ, 2005. – 261 с.: ил.
4. Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу «Микробиология с основами вирусологии» [Текст] / Сост. Липницкая Г.П. [и др.]. – Донецк: ДНУ, 2002. – 56 с.
5. Мікробіологія. Лабораторний практикум для студентів за напрямом підготовки 0503 «Торгівля» [Текст] (навчально-методичне видання) / Г.Б. Рудавська, В.І. Мандрика, КНТЕУ. – Київ: ЦІНМВ КНТЕУ, 2008. – 82 с.
6. Микробиология [Текст]: (учебник) / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова. - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.: ил. – ISBN 5-225-04411-5
7. Промышленная микробиология [Текст]: учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др. Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.: ил. – ISBN 5-06-001482-7
8. Рабинович, Г.Ю., Сульман Э.М. Санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды и пищевых продуктов с основами общей микробиологии [Текст]: учеб. пособие / Г.Ю. Рабинович, Э.М. Сульман. - 1-е изд. - Тверь: ТГТУ, 2005. - 220 с. - ISBN 5-7995-0306-6
9. Рудавська, Г.Б. Мікробіологія [Текст]: підручник / Г.Б. Рудавська, Л.І. Демкевич. – 2-ге вид., переробл. та допов. – К.: Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2005. – 407 с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст]: учеб. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. - 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1995 – 224 с.: ил. – ISBN 5-211-03358-2
11. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии [Текст]: учеб. пособие / Под ред. Н.П. Елинова. – М.: Медицина, 1988. – 208 с.: ил. – ISBN 5-225-00009-6
12. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии [Текст] / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. - 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1993. – 175 с.: ил. – ISBN 5-10-002834-3
13. Шильникова, В.К. Микробиология: учебное пособие для вузов / В.К. Шильникова, А.А. Ванькова, Г.В. Годова. – М.: Рофа, 2006. – 268 с.
14. ДСанПіН 2.2.4-171-10 "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною"
15. СанПиН 42-123-5774-91 Санитарные правила для предприятий общественного питания

ЗМІСТ

	стор.
Вступ	4
<i>Лабораторна робота № 1</i>	Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Будова оптичного мікроскопу і техніка мікроскопії 5
<i>Лабораторна робота № 2</i>	Техніка приготування препаратів і методи фарбування мікроорганізмів 8
<i>Лабораторна робота № 3</i>	Морфологія бактерій 12
<i>Лабораторна робота № 4</i>	Морфологія дріжджів 16
<i>Лабораторна робота № 5</i>	Морфологія пліснявих грибів і актиноміцетів 18
<i>Лабораторна робота № 6</i>	Поживні середовища. Стерилізація поживних середовищ и посуду 25
<i>Лабораторна робота № 7</i>	Найважливіші біохімічні процеси, збудниками яких є мікроорганізми, та їх промислове використання 32
<i>Лабораторна робота № 8</i>	Методи кількісного визначення мікрофлори 39
<i>Лабораторна робота № 9</i>	Санітарно-бактеріологічне дослідження мікрофлори повітря 46
<i>Лабораторна робота № 10</i>	Мікробіологічні методи дослідження води 50
<i>Лабораторна робота № 11</i>	Мікробіологічні дослідження твердих поверхонь методом змивів 54
<i>Лабораторна робота № 12</i>	Санітарно-бактеріологічне дослідження молока та молочних продуктів 57
<i>Лабораторна робота № 13</i>	Санітарно-бактеріологічне дослідження м'яса та ковбасних виробів 60
<i>Лабораторна робота № 14</i>	Мікробіологічне дослідження харчових продуктів 63
Список літератури	66

ДОДАТКИ

Додаток А

Показники епідемічної безпеки питної води (ДСанПіН 2.2.4-171-10)

N з/п	Найменування показників	Одиниці виміру	Нормативи для питної води			Методики визначення згідно з додатком 5
			водопровідно ї, з пунктів розливу та бюветів	з колодязів та каптажів джерел	фасованої	
1. Мікробіологічні показники						
1	Загальне мікробне число при t 37 °С - 24 год*	КУО/см ³	≤ 100 (≤ 50)**	не визначається	≤ 20*****	пп. 48, 57
2	Загальне мікробне число при t 22 °С - 72 год	КУО/см ³	не визначається	не визначається	≤ 100*****	
3	Загальні коліформи***	КУО/ 100 см ³	відсутність	≤ 1	відсутність	пп. 48, 56
4	E.coli***	КУО/ 100 см ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 48
5	Ентерококи***	КУО/ 100 см ³	відсутність	не визначається	відсутність	п. 58
6	Синьогнійна паличка (Pseudomonas aeruginosa)	КУО/ 100 см ³	не визначається	не визначається	відсутність	п. 52
7	Патогенні ентеробактерії	наявність в 1 дм ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 48
8	Коліфаги****	БУО/дм ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 48
9	Ентеровіруси, аденовіруси, антигени ротавірусів, реовірусів, вірусу гепатиту А та інші	наявність в 10 дм ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 47
2. Паразитологічні показники						
10	Патогенні кишкові найпростіші: ооцисти криптоспоридій, ізоспор, цисти лямблій, дизентерійних амеб, балантидія кишкового та інші	клітини, цисти в 50 дм ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 49
11	Кишкові гельмінти	клітини, яйця, личинки в 50 дм ³	відсутність	відсутність	відсутність	п. 49

* Для 95 % проб води, відібраних з водопровідної мережі, що досліджувались протягом року.

** Через 10 років з часу набрання чинності Санітарними нормами.

*** Для 98 % проб води, відібраних з водопровідної мережі, що досліджувались протягом року.

**** Визначають додатково у питній воді з поверхневих вододжерел у місцях її надходження з очисних споруд в розподільну мережу, а також в ґрунтових водах.

***** Визначають під час виробничого контролю перед розливом питної води у тару.

Примітка.

Дослідження питної води з поверхневих вододжерел чи ґрунтової води за показниками, передбаченими пунктами 7 та 9, проводяться у разі виявлення в двох послідовно відібраних пробах води загальних коліформ, E.coli, ентерококів чи коліфагів (пп. 3, 4, 5 та 8), а дослідження питної води з підземних артезіанських і міжшарових безнапірних водоносних шарів за показниками, передбаченими пп. 7, 8 та 9, проводяться у разі виявлення в двох послідовно відібраних пробах води загальних коліформ, E.coli чи ентерококів (пп. 3, 4, 5). При цьому дослідження води на вміст збудників інфекційних хвороб вірусної етіології проводяться у разі виявлення в її пробах коліфагів, а на вміст збудників бактеріальної етіології – у разі виявлення в її пробах загальних коліформ, E.coli чи ентерококів.

Мікробіологічні нормативи якості м'яса, м'ясних продуктів та риби

Мікробіологічні нормативи якості м'яса

Вид м'яса і м'ясопродуктів	МАФАМ, КУО, г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються	
		БГКП (коліформи)	Патогенні, в т.ч. сальмонели та <i>Listeria monocytogenes</i>
М'ясо свіже (всі види забійних тварин):			
– свіже (ще тепле) у відрубках (півтуші, четвертини)	10	1,0	25
– охолоджене і переохолоджене у відрубках	1 x 10 ³	0,1	25
М'ясо заморожене (всі види забійних тварин):			
– м'ясо у відрубках (півтуші, четвертини)	1 x 10 ⁴	0,01	25
Фарш яловичий	5 x 10 ⁶	0,0001	25

Мікробіологічні показники якості м'ясних продуктів

Назва продуктів	МАФАМ, КУО, г, не більше	БГКП (колі- форми)	Маса продукту (г), в якій не допускаються		
			Сульфит- редуючі кlostридії	Staph, aureus	Патогенні, у т.ч. сальмо- нели та L. mono- cytogenes
Ковбаси сирокочені та сирокочені з м'яса забійних тварин	–	1,0	0,01	1,0	25
Ковбаси напівкочені	–	1,0	0,01	1,0	25
Ковбаси варено-кочені	–	1,0	0,01	1,0	25
Ковбасні вироби варені (ковбаси, сосиски, сардельки, хлібці м'ясні)					
– вищого і першого сорту	1×10^3	1,0	0,01	1,0	25
– другого сорту	$2,5 \times 10^3$	1,0	0,01	1,0	25
Ковбаси кров'яні	$2,0 \times 10^3$	1,0	0,01	–	25
Ковбаси ліверні					
– вищого і першого сорту	$2,0 \times 10^3$	1,0	0,01	–	25
– третього сорту (ліверна рослинна)	$5,0 \times 10^3$	0,1	0,01	–	25

Ковбасні вироби нарізні та упаковані під вакуумом у полімерні плівки					
– сирокоччені, варено-коччені, напівкоччені	–	1,0	0,1	1,0	25
– ковбасні вироби варені вищого і першого сорту	1×10^3	1,0	1,0	1,0	25
М'ясні варені продукти					
– шинки, рулети із свинини і яловичини, свинина і яловичина в оболонці	1×10^3	1,0	0,1	1,0	25
М'ясні продукти копчено-варені із свинини і яловичини					
– шинка, рулети, корейка, грудинка, шийка, балик свинячий і в оболонці	1×10^3	1,0	0,1	1,0	25
М'ясні продукти копчено-запечені	1×10^3	1,0	0,1	1,0	25
Сальтисони	2×10^3	1,0	0,1	–	25
Паштети з печінки					
– вищий сорт	1×10^3	1,0	0,1	0,1	25
– ваговий в целофані	2×10^3	0,1	0,1	0,1	25
Паштети курячі	2×10^3	1,0	0,1	1,0	25
Студні					
– вищого сорту	2×10^3	0,1	0,1	0,1	25
– другого сорту	5×10^3	0,1	0,1	0,1	25

Мікробіологічні нормативи якості риби

Вид риби	МАФАМ, КУО, г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються		
		БГКП (колі-форми)	Staph, aureus	Патогенні, в т.ч. сальмонели та L. monocytogenes
Свіжа	5×10^4	0,01	0,01	25
Охолоджена і морожена	1×10^5	0,001	0,01	25
Вялена і сушена*	1×10^4	1,0	–	25
Гарячого копчення	5×10^3	10,0	1,0	25
Холодного копчення**	3×10^4	1,0	1,0	25
Солона, пряна, маринувана	1×10^5	0,1	–	25

* – плісняві гриби – не більше ніж 50 КУО/г; дріжджі не більше – 100 КУО/г.

** – сульфитредукувальні клостридії не допускаються в 0,1 г продукту

Мікробіологічні нормативи якості молока та молочних продуктів**Мікробіологічні показники якості молока**

Назва	МАФАМ, КУО/г, не більше	Маса продукту (г, см ³), в якій не допускаються		Примітки
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмо- нели	
Молоко сире				
– вищий сорт	3 x 10 ⁵	–	25	Соматичні клітини не більше 400 тис. в 1 см ³
– перший сорт	5 x 10 ⁵	–	25	Соматичні клітини не більше 600 тис. в 1 см ³
– другий сорт	3 x 10 ⁶	–	25	Соматичні клітини не більше 800 тис. в 1 см ³
Молоко пастеризоване				
– група А	5 x 10 ⁴	1,0	25	S.aureus в 1 см ³ не допускається
– група В: – в спожитковій тарі	1 x 10 ⁵	0,1	25	S.aureus в 0,1 см ³ не допускається
– у флягах і цистернах	2 x 10 ⁵	0,1	25	
Молоко топлене	2,5 x 10 ⁵	1,0	25	

Мікробіологічні показники якості кисломолочних продуктів

Назва	Кількість життєздатних молочнокисл их бактерій, КУО в 1 г, не менше ніж	Маса продукту (г, см ³), в якій не допускаються		
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмонел и	Staph. aureus
Кисломолочні напої	1×10^7	0,1	25	В 1 см ³ не допускає ться
Ряжанка	1×10^7	0,1	25	
Сметана всіх видів	1×10^7	0,001	25	
Сметана з термічною обробкою	1×10^7	0,01	25	
Сир, сир домашній, сирні вироби, виготовлені без термообробки	1×10^6	0,001	25	0,01
Сирні вироби, виготовлені з термообробкою	1×10^6	0,01	25	0,01

Мікробіологічні показники якості молочних консервів

Назва	МАФАМ, КУО/г, не більше	Маса продукту (г, см ³), в якій не допускаються	
		БГКП (колі-форми)	Патогенні, в т.ч. сальмонели
Молоко коров'яче сухе незбиране			
– вищий сорт	5 x 10 ⁴	0,1	25
– перший сорт	7 x 10 ⁴	0,1	25
Молоко сухе знежирене			
– в транспортній тарі	5 x 10 ⁴	0,1	25
– в спожитковій тарі	1 x 10 ⁵	0,1	25
Напої сухі молочні	1 x 10 ⁵	0,1	25
Молоко згущене стерилізоване у банках	Повинне задовольняти вимогам промислової стерилізації		
Молоко згущене з цукром (незбиране і нежирне)			
– в транспортній тарі	2,5 x 10 ⁴	0,3	25
– в спожитковій тарі	2,5 x 10 ⁴	1,0	25
Какао, кава натуральна зі згущеним молоком і цукром, вершки згущені	3,5 x 10 ⁴	1,0	25

Мікробіологічні показники якості морозива

Назва	МАФАМ, КУО/г, не більше	Маса продукту (г, см ³), в якій не допускаються		
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмонели та L. monocytogenes	Staph, aureus
Морозиво: – на молочній основі – з сушеними фруктами та горіхами	1 x 10 ⁵	0,1 0,01	25	1,0
Морозиво м'яке з рідких сумішей	1 x 10 ⁵	0,1	25	1,0
Морозиво м'яке із сухих сумішей	1 x 10 ⁵	0,1	25	1,0

Мікробіологічні показники якості масла і сирів

Назва	МАФАМ, КУО/г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються		Примітки
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмонели та <i>L. mono- cytogenes</i>	
Масло солодко- вершкове, солоне любительське і селянське	1×10^5	0,01	25	<i>S. aureus</i> не допускається в 1,0 г продукту; плісені та дріжджі не більше 100 КУО/г в сумі
Масло кисло- вершкове любительське і селянське	—	0,01	25	<i>S. aureus</i> не допускається в 0,1 г продукту; плісені та дріжджі не більше 100 КУО/г в сумі
Масло шоколадне	1×10^3	0,01	25	
Масло бутербродне	5×10^5	0,001	25	<i>S. aureus</i> не допускається в 0,1 г продукту; плісені та дріжджі не більше 100 КУО/г в сумі
Масло топлене	1×10^3	1,0	25	Дріжджі не більше 200 КУО/г
Сири сичужні тверді і м'які	—	0,001	25	<i>S. aureus</i> не більше 5×10^2 КУО/г
Сир Російський	—	0,001	25	<i>S. aureus</i> не більше 5×10^2 КУО/г
Сири плавлені без наповнювачів	5×10^4	0,01	25	<i>S. aureus</i> не допускається в 1,0 г продукту, плісені та дріжджі не більше 100 КУО/г в сумі
3 наповнювачами (гриби, овочі та ін.)	1×10^4	0,1	25	Плісені не більше 100 КУО/г; дріжджі не більше 100 КУО/г

Мікробіологічні показники безпеки яєчних товарів

Назва продуктів	МАФАМ, КУО в 1 г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються			
		БГКП (колі- форми)	Staph. aureus	Протей	Патогенні, в т.ч. сальмонели
Яйця курячі дієтичні	5×10^3	0,1	—	—	5 x25 (аналіз проводять у жовтках)
Яйця курячі столові	5×10^5	0,01	—	—	25 (аналіз проводять у жовтках)
Меланж яєчний морожений	5×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Жовтки і білки яєчні морожені	5×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Меланж морожений з сіллю і цукром	5×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Яєчний порошок для продуктів з тепловою обробкою	1×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Жовток і білок сухий яєчний	1×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Сухі суміші яєчні для омлету	1×10^5	0,1	1,0	1,0	25
Яйцепродукти сублімаційної сушки (порошок)					
– жовток	5×10^4	0,01	1,0	—	25
– білок	1×10^4	0,1	1,0	—	25
Яєчний порошок для продуктів ентерального харчування	5×10^4	0,1	1,0	1,0	25

Мікробіологічні нормативи жирових продуктів

Назва продуктів	МАФАМ, КУО в 1г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються		Дріжджі КУО в 1 г, не більше	Плісєніві гриби, КУО в 1 г, не більше
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. саль- монели		
Олія соняшникова рафінована дезодорована	500	1,0	25	Не допус- каються	1×10^2
Олія кукурудзяна рафінована дезодорована	100	1,0	25	Не допус- каються	20
Маргарини столові, бутербродні (вживають без термічної обробки)	5×10^4	0,01	25	1×10^3	1×10^2
Майонез (у споживчій тарі)	—	0,01	25	1×10^3	10
Кулінарні і кондитерські жири	—	0,001	5	1×10^3	1×10^2

Примітка:

В олії соняшниковій рафінованій дезодорованій нормується присутність коагулазопозитивного стафілококу, який не допускається в 1г.

Мікробіологічні нормативи якості кондитерських виробів та цукру***Мікробіологічні показники якості деяких кондитерських виробів***

Назва	МАФАМ, КУО/г, не більше	Маса продукту (г), в якій не допускаються		Дріжджі, КУО/г, не більше	Плісені, КУО/г, не більше
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмо- нели		
Карамель льодяникова	5×10^2	1,0	25	50	50
Карамель з начинкою					
– помадною, лікерною, фруктово-ягідною, збивною	5×10^2	0,1	25	–	50
– горіховою, шоколадно- горіховою	5×10^3	0,1	25	–	50
Ірис (всіх найменувань)	1×10^3	0,1	25	50	50
Драже (всіх найменувань)	1×10^4	0,1	25	50	50
Цукерки неглазуровані					
– помадні, молочні	5×10^2	0,1	25	–	–
– на основі праліне, типу праліне	1×10^3	0,01	25	50	100
Цукерки глазуровані з корпусами					
– помадними, фруктовими, марципановими, грил'яжними	1×10^4	1,0	25	50	50
– молочними, збивними	5×10^4	0,01	25	–	50
– кремовими, на основі праліне, типу праліне	5×10^4	0,01	25	–	100
Халва					
– глазурована	1×10^4	0,01	25	50	50
– неглазурована	5×10^4	0,01	25	50	50
Пастила, зефір					
– глазуровані	5×10^3	0,1	25	–	100
– неглазуровані	1×10^3	0,1	25	–	100

Мармелад глазурований	5×10^3	0,1	25	—	50
Шоколад звичайний і десертний					
– без добавок	1×10^4	0,1	25	—	50
– з добавками	5×10^4	0,1	25	50	50
– начинками	5×10^3	0,01	25	50	100

Мікробіологічні показники якості цукру

Показник	Цукор-пісок	Цукор-рафінад
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г, не більше	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
Плісеневі гриби, КУО в 1 г, не більше	$1,0 \times 10$	$1,0 \times 10$
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше	$1,0 \times 10$	$1,0 \times 10$
Бактерії групи кишкових паличок (колі-форми) в 1 г	не допускаються	не допускаються
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду Сальмонелла, в 25 г	не допускаються	не допускаються

Мікробіологічні показники якості слабоалкогольних напоїв

Назва	МАФАМ, КУО/см ³ , не більше	Об'єм або маса продукту (см ³ , г), в якій не допускається		Дріжджі та плісені, КУО/г (см ³), не більше
		БГКП (колі- форми)	Патогенні, в т.ч. сальмонели	
Пиво розливне	—	1,0	25	—
Пиво непастеризоване у пляшках, сорти з екстрактивного сусла				
– 12% і більше	—	10,0	25	—
– від 8 до 11%	—	3,0	25	—
Пиво пастеризоване у пляшках та інших видах споживчої тари	500	10,0	25	—
Хлібний квас на чистих культурах	—	10,0	25	—
Хлібний квас на хлібопекарських дріжджах	—	1,0	25	—

Навчальне видання

**Сімакова Ольга Олександрівна
Глушко Вікторія Олексіївна**

Кафедра технології в ресторанному господарстві
та готельної і ресторанної справи

МІКРОБІОЛОГІЯ І ТОВАРОЗНАВСТВО

**Методичні рекомендації
до вивчення дисципліни
для студентів спеціальності 181 “Харчові технології”
денної та заочної форм навчання**

Донецький національний університет економіки і торгівлі
імені Михайла Туган-Барановського

50005, Дніпропетровська обл.,
м. Кривий Ріг, вул. Трамвайна, 16