

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



**МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ В ТЕХНОЛОГІЇ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ВИКОНАННЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ**

для підготовки здобувачів вищої освіти
факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва

Рівень вищої освіти другий (магістерський)
Галузь знань 18 «Виробництво та технології»
Спеціальність 181 «Харчові технології»
Освітньо-професійна програма «Харчові технології»

Вінниця 2023

Соломон А.М. «Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів». Методичні вказівки до виконання практичних занять для підготовки здобувачів вищої освіти факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, галузі знань 18 «Виробництво та технології», спеціальності 181 «Харчові технології» другого (магістерського) освітнього рівня денної форми навчання. Вінниця. ВНАУ, 2023. 73 с.

Методичні вказівки призначені для виконання практичних занять з дисципліни **«Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів»** для здобувачів вищої освіти спеціальністю 181 «Харчові технології». Опрацювання представлених тем, допоможе здобувачам вищої освіти краще засвоїти теоретичний матеріал.

Рецензенти: Разанова О. П. - кандидат с.-г. наук, доцент кафедри технології виробництва та переробки продукції тваринництва ВНАУ.

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

Затверджено до видання науково-методичною комісією ВНАУ
(протокол № 4 від 28 листопада 2023 року)

За поданням навчально-методичної комісії факультету технології
виробництва продукції тваринництва
(протокол № 4 від 20 листопада 2023 року)

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
ТЕРМІНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК	8
ПРАВИЛА РОБОТИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	9
Практичне заняття №1. Організація роботи мікробіологічної лабораторії. Правила і техніка безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії. Мікроскоп та особливості користування ним у мікробіології.	13
Практичне заняття №2. Загальні методики виготовлення та фарбування препаратів Приготування, фіксація та фарбування мазків різними методами.	18
Практичне заняття №3. Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей дріжджів і плісневих грибів.	22
Практичне заняття №4. Санітарно-мікробіологічний контроль об'єктів зовнішнього середовища.	25
Практичне заняття № 5. Методи посіву, приготування поживних середовищ та культивування різних груп мікрофлори.	28
Практичне заняття №6. Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей спиртових, молочнокислих, оцтовокислих та пропіоновокислих бактерій.	33
Практичне заняття №7. Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей маслянокислих бактерій.	39
Практичне заняття № 8. Визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині молочних продуктах).	45
Практичне заняття № 9. Визначення інгібувальних речовин у молоці.	47
Практичне заняття № 10. Мікробіологічне дослідження основних продуктів харчування (м'яса, ковбасних виробів).	50
Практичне заняття № 11. Мікробіологічне дослідження у хлібопеченні та кондитерських виробках.	56
Практичне заняття 12. Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко та молочні продукти.	61
Практичне заняття 13. Вивчення основних біологічних властивостей збудників харчових токсикоінфекцій та токсикозів.	66
Практичне заняття 14. Мікробіологічний контроль матеріал виробництва.	70
РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ	73

ПЕРЕДМОВА

Сучасний рівень розвитку харчової промисловості потребує від фахівців кожної галузі глибоких теоретичних знань і практичних навичок як у сфері технології та устаткування, так і в області мікробіологічного контролю виробництва протягом усього технологічного процесу.

Мікробіологія харчових виробництв - одна з дисциплін фахової підготовки спеціалістів із технологій харчових виробництв, оскільки в цих технологіях виробництв властивості мікроорганізмів та їхня життєдіяльність мають велике значення.

Харчова сировина та продукти є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів. Знання характеру мікробіоти продуктів харчування та мікробіологічних процесів, які в них відбуваються, необхідні фахівцям із харчових технологій для організації правильного зберігання, обробки сировини, виготовлення продукції та її реалізації.

Теоретичні знання та практичні навички, набуті під час вивчення дисципліни «Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів» дозволять фахівцю самостійно вирішувати технологічні задачі у виробничій, науково-дослідній та проектній діяльності для відпрацювання мікробіологічних параметрів виробництва молочних, м'ясних продуктів; прогнозування виходу продукту, його фізико-хімічних та органолептичних властивостей.

Гармонізація вітчизняної нормативної бази України, яка нині відбувається, свідчить, що більшість чинних стандартів у харчовій та переробній промисловості приведена у відповідність із європейськими. Найбільш адаптованою є система управління якістю НАССР (Hazard Analysis and Critical Control Points). Вона стає обов'язковою для всіх підприємств, які займаються виробництвом харчових продуктів.

При виконанні практичних занять з дисципліни «Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів» здобувач вищої освіти опановує та вчиться практично застосовувати мікробіологічні процеси в продуктах сучасного асортименту.



Мета вивчення навчальної дисципліни

Сучасний рівень розвитку харчової промисловості потребує від фахівців кожної галузі глибоких теоретичних знань і практичних навичок як у сфері технології та устаткування, так і в області мікробіологічного контролю виробництва протягом усього технологічного процесу.

Харчова сировина та продукти є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів. Знання характеру мікробіоти продуктів харчування та мікробіологічних процесів, які в них відбуваються, необхідні фахівцям із харчових технологій для організації правильного зберігання, обробки сировини, виготовлення продукції та її реалізації.

Метою викладання навчальної дисципліни «**Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів**» приділено висвітленню загальноприйнятих методів мікробіологічного аналізу та характеристиці й значенню кожного з показників мікробіологічної безпеки харчових продуктів, у тому числі санітарно-показових мікроорганізмів, а також надані характеристика та методи контролю деяких допоміжних матеріалів.

Основними **завданнями** вивчення дисципліни «**Мікробіологічні процеси в технології харчових продуктів**» є отримання знань, умінь та навичок методів мікробіологічного контролю.

Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні:

знати:

- ✓ поліпшення якості харчових продуктів, правильно проведений мікробіологічний контроль;
- ✓ збудників мікробного псування сировини та готової продукції;
- ✓ захворювання і харчових отруєнь, спричинених недоброякісними продуктами.

вміти:

- ✓ аналізувати мікробіоти, характерні для даної галузі, її походження, роль у технологічних процесах;
- ✓ вибирати указані вади продукції, спричинені шкідливими мікроорганізмами;

- ✓ використовувати висвітлені питання санітарно-гігієнічного режиму виробництва ;
- ✓ застосовувати сучасні прийоми та методики для вирішення конкретних технологічних завдань харчової промисловості;
- ✓ прогнозувати одержання продуктів стандартної якості;
- ✓ приймати самостійні рішення в подальшій професійній діяльності.

Компетентності та результати навчання

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

Загальні компетентності:

Інтегральні компетентності (ІК): Здатність розв'язувати задачі дослідницького або інноваційного характеру у сфері харчових технологій.

Загальні компетентності (ЗК):

ЗК2. Здатність проводити дослідження на відповідному рівні.

ЗК4. Здатність діяти соціально відповідально та свідомо.

Спеціальні (фахові предметні) компетентності (СК):

СК1. Здатність обирати та застосовувати спеціалізоване лабораторне і технологічне обладнання та прилади, науково-обґрунтовані методи та програмне забезпечення для проведення наукових досліджень у сфері харчових технологій.

СК6. Здатність забезпечувати якість та безпечність харчових продуктів під час впровадження технологічних інновацій на підприємствах галузі.

Програмні результати:

ПРН 1. Відшукувати систематизувати та аналізувати науково-технічну інформацію з різних джерел для вирішення професійних та наукових завдань у сфері харчових технологій.

ПРН 2. Приймати ефективні рішення, оцінювати і порівнювати альтернативи у сфері харчових технологій, у тому числі у невизначених ситуаціях та за наявності ризиків, а також в міждисциплінарних контекстах.

ПРН11. Оцінювати та усувати ризики і невизначеності при прийнятті технологічних та організаційних рішень у виробничих умовах для забезпечення якості та безпечності харчових продуктів.

Вивчення даної дисципліни формує у здобувачів освіти соціальні навички (soft skills): комунікативність (реалізується через: метод роботи в групах, робота з інформаційними джерелами), робота в команді (реалізується через: метод проєктів), лідерські навички (реалізується через: робота в групах, метод проєктів).

ПРАВИЛА РОБОТИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.

Під час роботи у мікробіологічній лабораторії необхідно дотримуватись таких правил:

1. Не заходити до лабораторії у верхньому одязі, працювати тільки в халаті.

2. Перед початком роботи переконатися в тому, що робочий стіл не захаращений різними предметами.

3. Під час роботи уникати метушні, не відчиняти і не зачиняти двері й вікна, оскільки це спричиняє переміщення повітря і зміну температури у різних частинах приміщення.

4. Дотримуватися чистоти і порядку в лабораторії: не палити, не їсти, не торкатися обличчя немитими руками, не кидати нічого на підлогу. Реактиви слід здавати черговому лаборанту.

5. Після закінчення заняття прибрати своє робоче місце і ретельно вимити руки.

6. Студенти і викладачі повинні зробити запис у спеціальному журналі про проведення інструктажу та ознайомлення з режимом роботи в лабораторії.

ТЕРМІНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК

Антибіотики – біологічно активні речовини, які утворюються мікроорганізмами, рослинами та іншими живими організмами.

Бактеріальний концентрат; бактерійний концентрат – заквашувальний препарат із вмістом життєздатних клітин не меншим 10^{10} КУО/г.

Бактеріальний препарат прямого внесення; бактерійний препарат прямого внесення – заквашувальний препарат, призначений для безпосереднього внесення у молоко або молочну суміш.

БКП – бактерії групи кишкових паличок.

Гетероферментативні бактерії – це бактерії, які поряд з молочною кислотою утворюють значну кількість газу та ароматичні речовини.

Гомоферментативні бактерії – це ті бактерії, які при розщепленні відповідних вуглеводів молока дають головним чином молочну кислоту із залишками інших продуктів розпаду.

Дріжджі (дріжджові гриби, аскоміцети) – це одноклітинні, нерухливі мікроорганізми, що мають різну форму (округлу овальну, еліпсоподібну, рідше циліндричну та лимоноподібну).

Закваска; заквашувальний препарат – одно- або багатокомпонентні комбінації мікроорганізмів, що їх використовують під час виробництва кисломолочних продуктів. Уміст бактеріальних клітин не менший 10^7 КУО/мл (г) для рідких різновидів та не менших 10^8 КУО/г – для сухих.

Індекс – це кількість патогенних мікроорганізмів, яка встановлена в певному об'ємі чи кількості молока та молочних продуктах. Для молока та рідких молочних продуктів в 1 літрі, в інших молочних продуктах – в 1 г.

КМАФАнМ – кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

КУО (кількість колонієутворюючих одиниць) – це одиниця виміру кількості мікроорганізмів, яку визначають за кількістю колоній, що утворилися на певному середовищі за відповідних умов.

Мікробіологічна лабораторія – лабораторія, де проводять мікробіологічні дослідження.

Мікробне забруднення молока – це забруднення молока мікроорганізмами, що потрапили туди випадково.

Мікроскоп – це оптичний прилад для вивчення мікроскопічних об'єктів.

Плісняві гриби (нитчасті гриби) – це безхлорофільні мікроорганізми, які живуть на поверхні субстратів, основою вегетативного тіла яких є гіфи, сплетіння яких утворюють міцелій.

Об'єднана проба – це проба, що складається з декількох точкових проб.

Проба для контролювання – визначена кількість продукту, що відібрана для контролювання.

Титр – це найменший об'єм (в мілілітрах) чи маса (в грамах) молока чи молочних продуктів в якому встановлена хоча б одна одиниця патогенного мікроорганізму.

Точкова проба – це проба, яку відбирають одноразово з визначеної частини продукту.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.

У мікробіологічній лабораторії необхідно підтримувати певний режим і дотримуватися таких застережних заходів:

1. Працювати у білих халатах і шапочках або хустинках.
2. Пробірки та колби з культурами мікроорганізмів чітко підписувати чорнилом по склу. На склянках або крапельницях з реактивами і розчинами мають бути етикетки.
3. Під час роботи зі спиртівками слід остерігатися займання парів спирту. Не можна запалювати спиртівку від іншої палаючої спиртівки. Запалювати спиртівку можна лише сірниками, гасити полум'я спеціальними ковпачками.
4. У разі займання ватних пробок на них не можна дмухати, оскільки це посилює горіння. Палаючі ватні пробки треба ввести у пробірки, колби або накрити зверху рушником (тканиною).
5. Мікробна маса не має забруднювати руки, стіл і оточуючі предмети. Петлі та голки після кожного контакту з мікроорганізмами слід прожарювати у полум'ї спиртівки або газового пальника і ставити у спеціальний штатив. Пролиту мікробну завесь необхідно знешкодити за допомогою дезінфікувальних засобів.
6. Предметні й покривні скельця, піпетки після роботи помістити у дезінфікувальний розчин, потім ретельно промити у проточній воді. Піпетки

після цього простерилізувати.

7. Поверхню щільних середовищ з мікробами у пробірках і чашках Петрі залити дезінфікувальними розчинами, через добу середовище викинути, а посуд промити і простерилізувати. Посуд мити лише в гумових рукавицях.

8. Суворо дотримуватися правил роботи з апаратами, що працюють під тиском, напругою або при високій температурі.

9. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторного приміщення.

10. Необхідно дотримуватися особистої гігієни: ретельно дезінфікувати і мити руки з милом перед вживанням їжі та після закінчення роботи, для цього можна використовувати 1 %-й розчин дегміну або 70 %-й розчин етилового спирту.

Мікробіологічна лабораторія та її обладнання

Залежно від призначення мікробіологічна лабораторія (навчальна, виробнича, науково-дослідна) складається з кількох приміщень: кімнати для мікроскопічних робіт, біохімічної лабораторії, стерилізаційної, мийної та термостатної кімнат.

Усі приміщення мають бути сухі, добре освітлені, оснащені вентиляцією, мати підведення газу, гарячої та холодної води.

Приміщення мікробіологічної лабораторії має виходити вікнами на північ або північний захід, оскільки для мікроскопії потрібне рівне розсіяне світло. Природна освітленість робочого приміщення має відповідати коефіцієнту 1:5. Стіну фарбують олійною фарбою світлих кольорів, підлогу покривають лінолеумом або кахельною плиткою, які легко миються. Стіл для мікроскопа розміщують так, щоб світло падало зліва чи спереду. Поверхню стола покривають пластиком або лінолеумом, що полегшує його миття та дезінфекцію.

У мікробіологічній лабораторії двічі на день проводять вологе прибирання. Підлогу, стіни й меблі періодично пилососять і протирають дезінфікувальними розчинами: 2-3 %-м розчином соди (двовуглекислого

натрію), 3-5 %-м розчином фенолу, 0,5- 3 %-м розчином дегміну, 3-6 %-м розчином пероксиду водню з додаванням 0,5 %-го мийного засобу та ін. Двічі на місяць рекомендується приміщення опромінювати бактерицидними переносними лампами (ОБПс-415) - від 30 хв до кількох годин.

Деякі роботи з мікроорганізмами (пересіви чистих культур, виділення мікроорганізмів та ін.) виконують у спеціальному ізолюваному приміщенні - боксі площею 3-5 м². Його поділяють на дві частини: робоче приміщення й передбоксік, що виключає різку циркуляцію повітря та занесення мікроорганізмів ззовні. У боксі встановлюють стіл, стільці, газові пальники, підвішують або прикріплюють на висувному кронштейні бактерицидні лампи. Приміщення боксу періодично миють і дезінфікують, перед початком роботи протягом 30-60 хв опромінюють бактерицидними лампами. Бокси доцільно обладнувати системою припливної вентиляції повітря. Перш ніж потрапити у бокс повітря проходить через систему фільтрів для вилучення мікроорганізмів. У приміщеннях кратність обміну повітря становить 5-15 об'ємів повітря за годину, а максимальна концентрація життєздатних мікроорганізмів 100-500 КУО у 1 м³. За відсутності ізолюваного боксу можливе використання ламінарних боксів, обладнаних системами постачання стерильного повітря.

Мікробіологічну лабораторію обладнують хімічними столами, витяжними шафами, технічними та аналітичними вагами, фотоелектроколориметрами, рН-метрами та іншими необхідними приладами, холодильниками, шафами для посуду та хімічних реактивів. У препаративній кімнаті встановлюють робочі столи, шафи для інструментарію, стерильного посуду, центрифуги, холодильники для зберігання чистих культур, термостати.

В окремій стерилізаційній кімнаті розміщують автоклави для стерилізації поживних середовищ і посуду, сушильні шафи, стерилізатори інструментів. Мийну кімнату обладнують зручними раковинами з підведенням гарячої та холодної води, стелажми та шафами для сушіння

посуду, плитами для приготування поживних середовищ, вагами, дистилляторами води. У термостатній кімнаті розміщують стелажі для встановлення засіяних колб і пробірок, на спеціальних фундаментах - ротаційні качалки.

У мікробіологічній лабораторії мають бути такі прилади, посуд, матеріали та інвентар: термостати сухоповітряні або водяні для вирощування мікроорганізмів при постійній заданій температурі; автоклави для стерилізації посуду, поживних середовищ та інших матеріалів насиченою парою під тиском; сушильні шафи з терморегулятором для сушіння і стерилізації лабораторного посуду, для висушування різних матеріалів до постійної маси; холодильники для зберігання музейних і робочих культур мікроорганізмів, поживних середовищ, реактивів і розчинів.

Центрифуги, рН-метри, рефрактометри, фотоелектроколориметри, спектрофотометри, фільтри, скляний посуд (пробірки біологічні, чашки Петрі, колби Ерленмейера, плоскодонні, конічні, мірні; піпетки градуйовані, піпетки, пастерівські піпетки з відтягнутим капіляром, крапельниці, бюретки, лійки, циліндри, бюкси, склянки), інвентар (бактеріологічні петлі та голки, пінцети, ножиці, свердла для пробок, металічні циліндри для піпеток, штативи, вата, марля для виконання різних мікробіологічних робіт).



Практичне заняття № 1

Організація роботи мікробіологічної лабораторії. Правила і техніка безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії. Мікроскоп та особливості користування ним у мікробіології.

Мета: ознайомитися з організацією роботи мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості.

Завдання:

1. Визначити основні завдання, структуру мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості.
2. Ознайомитися з лабораторним посудом, інвентарем та обладнанням.
3. Повторити будову мікроскопу та правила користування ним.

Ознайомитися з особливостями роботи з імерсійною системою.

Обладнання та матеріали.

Лабораторний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі, ступки, мензурки, колби, циліндри, ступки фарфорові, скляні бюкси, предметні та покривні скельця); лабораторний інвентар (штативи для пробірок, бактеріологічні петлі, редуказник, пісковий годинник, термометри набори фарб для фарбування мазків для мікроскопії, спиртівки, марлеві серветки, фільтрувальний папір, імерсійне масло, настільне освітлення, вата медична); лабораторне обладнання (термостат, автоклав, сушильна шафа, стерилізатори, центрифуги, холодильники, мікроскопи, водяна баня, лабораторні ваги).

Світлові мікроскопи. Схеми будови електронного мікроскопу. Довідковий матеріал Основним завданням мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості є проведення мікробіологічного контролю продукції та санітарно-гігієнчного стану підприємства.

Мікробіологічний контроль цих об'єктів дозволяє оцінити санітарно-гігієнічний стан виробництва та дотримання санітарних норм і правил особистої гігієни робітниками підприємства. При організації мікробіологічного контролю керуються «Інструкцією по мікробіологічному контролю виробництва на підприємствах молочної промисловості», санітарними правилами та нормами «СанПиН 2.3.4. 551 - 96» а також державними, галузевими стандартами та технічними умовами щодо різних молочних продуктів. Так готова продукція (молоко, вершки, кисломолочні напої) повинні контролюватися мікробіологічною лабораторією підприємства не рідше ніж один раз в 5 днів, сметана та кисломолочний сир – не рідше ніж один раз на 3 дні; якість санітарної обробки обладнання має оцінюватися за кожною одиницею обладнання не рідше ніж один раз на 10 днів. Чистоту рук працівників слід контролювати не рідше три разів на місяць. Для проведення мікробіологічних досліджень у лабораторіях на підприємствах молочної промисловості повинен бути обладнаний бокс, який складається з двох відділень – передбоксу та власне боксу. У боксі мають бути встановлені бактерицидні лампи, кількість яких визначають із

розрахунку 2,5 Вт/м² . Крім того, лабораторія повинна мати наступне обладнання: термостати, автоклав, сушильну шафу, мікроскопи, стерилізатори, центрифугу, холодильники, водяну баню, лабораторні ваги, тощо.

Лабораторії заводів повинні бути акредитовані відповідними органами в сфері акредитації на право проведення досліджень, які характеризують гігієнічні показники безпечності молочної продукції, що випускається на підприємстві. За відсутності мікробіологічної лабораторії на підприємстві зазначений вище контроль може здійснюватися згідно госпдоговором з акредитованими лабораторіями для проведення мікробіологічних досліджень.

Лабораторний посуд, інвентар та обладнання.

Лабораторний посуд – це пробірки, піпетки, чашки Петрі, ступки, мензурки, колби, циліндри, ступки фарфорові, скляні бюкси, предметні та покривні скельця.

Лабораторний інвентар – це штативи для пробірок, бактеріологічні петлі, редуказник, пісковий годинник, термометри, набори фарб для фарбування мазків для мікроскопії, спиртівки, марлеві серветки, фільтрувальний папір, імерсійне масло, настільне освітлення, вата медична.

Лабораторне обладнання – це термостати (для культивування мікроорганізмів за відповідних температур), автоклав (для стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду та інструментів), сушильна шафа (для сушіння чи стерилізації лабораторного посуду), мікроскопи (оптичні прилади для вивчення мікроскопічних об'єктів), стерилізатори, центрифуга, холодильники, водяна баня, лабораторні ваги.

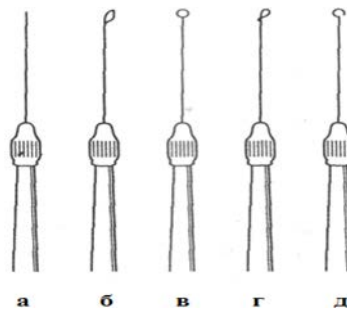


Рис. 1. Бактеріологічні голка, шпатель та петлі: а – голка; б – шпатель; в-д – петлі (в – правильно зроблені; г, д – неправильно зроблені)

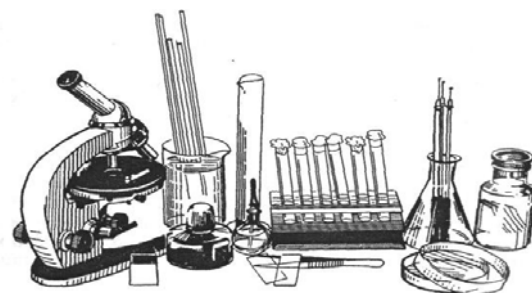
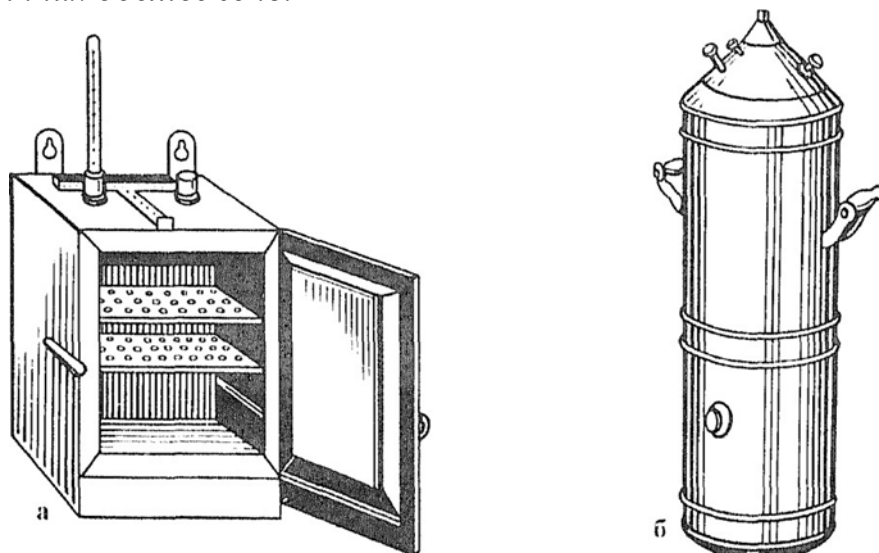


Рис. 2. Лабораторний посуд та інвентар необхідний для проведення

мікробіологічних досліджень.



*Рис.3 Обладнання для стерилізації: а- ніч Пастера, б – автоклав.
Будова мікроскопу.*

Мікроскопи – оптичні прилади для вивчення мікроскопічних об'єктів. Найбільш часто в мікробіологічних лабораторіях використовують світлові мікроскопи «Біолам Р-2», МБР-1, МБР-3 та інші.

Звичайний світловий мікроскоп складається з двох частин: механічної та оптичної (рис.4). Механічна частина складається із штатива, предметного столика, трубки (тубуса) з обертовим диском у нижній частині (“револьвером”), макрота мікрометричних гвинтів для пересування тубусу угору та вниз. У центрі предметного столика є отвір для проходження світла. Бокові гвинти предметного столика забезпечують його пересування вліво-вправо, а клейми слугують для закріплення предметного скла (препарату). Тубус закріплено попереду верхньої частини колонки штативу та системою гвинтів за допомогою зубчатки (крамальєри) може пересуватись угору-вниз: макрометричним гвинтом робиться пересування, яке можна побачити неозброєним оком; мікрометричним гвинтом – пересування тубусу на дуже малу відстань, яку видно лише при мікроскопії. Повний оберт мікрометричного гвинта пересуває тубус на 0,1 мм.

Оптична частина мікроскопа містить освітлювальний апарат, об'єктиви та окуляр (рис. 4, 5).

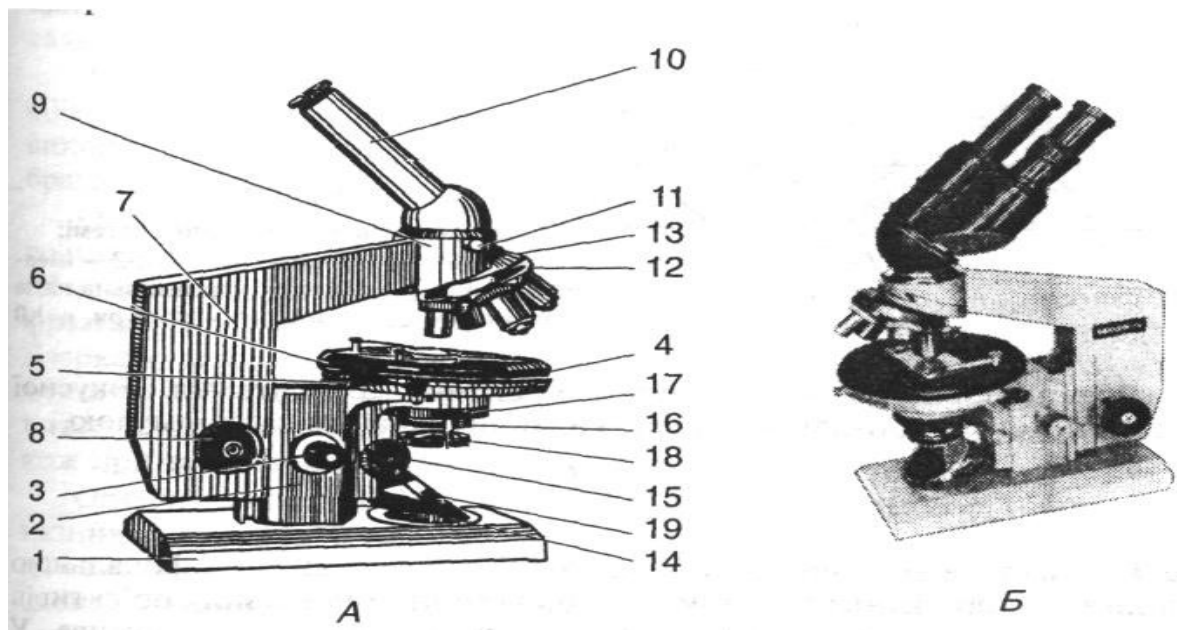


Рис. 4. Будова світлового мікроскопа:

А – складові частини мікроскопа: 1 – основа; 2 – коробка з механізмом мікрометричного фокосування; 3 – рукоятка мікрогвинта; 4 – предметний столик; 5 – гвинт для фіксування диска предметного столика; 6 – регулювальні гвинти; 7 – тубусотримач; 8 – рукоятка мікрогвинта; 9 – головка; 10 – насадка; 11 – гвинт для закріплення насадки; 12 – револьвер; 13 – гвинт фіксування револьвера; 14 – кронштейн конденсора; 15 – рукоятка конденсора; 16 – циліндрична гільза конденсора; 17 – гвинт; 18 – додаткова лінза (відкидна); 19 – дзеркало;

Б – зовнішній вигляд мікроскопа.

Освітлювальний апарат знаходиться під предметним столиком, складається із дзеркала, яке дає напрямок світловим променням, конденсора з діафрагмою. Дзеркало закріплено рухливо, має дві поверхні – плоску та вигнуту. При денному освітленні користуються плоскою поверхнею, при штучному світлі – вигнутою. Конденсор, що збирає світлові промені, складається з двох лінз: верхньої плоско-опуклої та нижньої двояко-опуклої. Світлові промені, які відбиває дзеркало, збираються конденсором в фокусі на рівні поля зору препарату, що розглядається. Для зменшення освітленості поля зору конденсор опускають, для збільшення доступу світла – піднімають. Для регулювання освітленості поля зору використовують також “ірис”-діафрагму, прикріплену до нижньої частини конденсора. Складається вона з напівкруглих металевих пластинок, які заходять одна за одну. За допомогою спеціального важеля ці пластинки розсуваються та зсуваються, збільшуючи або зменшуючи доступ світла.

Об’єктив – один із важливих елементів мікроскопа, оскільки забезпечує збільшення досліджуваного предмету і розташована у нижній частині тубусу в отворі “револьверу”. Зазвичай у мікроскопах використовують такі об’єктиви $\times 8$ ($\times 10$) $\times 40$ та $\times 90$. Об’єктив складається з кількох лінз, закріплених у металевий футляр. Головна лінза є фронтальною, яка

направлена на препарат, вона забезпечує необхідне збільшення зображуваного об'єкта. Крім фронтальної лінзи, у металевій оправі розташовані ще кілька корекційних лінз (від 3–4 до 10–12), які забезпечують чіткість зображення. Об'єктиви є сухі та заглиблені – імерсійні (водні та масляні). У разі користування сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктива та препаратом є прошарок повітря. Фронтальні лінзи імерсійних об'єктивів збільшують у 80, 90, 100, 120 разів, тобто, у них коротка фокусна відстань і діаметр їх малий. Щоб створити необхідну освітленість, слід попередити розсіювання променя світла: на препарат, який мікроскопують, поміщають краплю імерсійної рідини, яка має коефіцієнт заломлення світла скла препарату. У каплю цієї рідини під контролем ока (дивитися збоку!) занурюють фронтальну лінзу імерсійного об'єктива, утворюється оптично однорідне середовище, світлові промені не розсіюються, добре освітлюючи поле зору. Як імерсійну рідину використовують кедрову олію (інколи вазелінову). Окуляр знаходиться в верхній частині тубуса, складається з верхньої очної та нижньої збиральних лінз, які знаходяться у металевій циліндричній оправі. Окуляр лише збільшує зображення, що подається об'єктивом. Збільшення окулярів позначають як $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Мікроскопи бувають монокулярні (один окуляр), вони дають плоске зображення, та бінокулярні (два окуляра), які утворюють оптичне, стереоскопічне зображення об'єкта. Для визначення загального збільшення мікроскопу, необхідно помножити збільшення об'єктива на збільшення окуляра.



Рис.5. Сучасні світлові мікроскопи

Правила користування мікроскопом: - працюють з мікроскопом лише сидячи; - мікроскоп має бути розташований від краю стола на відстані 10 – 15 см, при цьому зошит та інші необхідні предмети розміщують праворуч від мікроскопу; - повністю відкривають діафрагму мікроскопа, піднімають у верхнє положення конденсору; - роботу на мікроскопі розпочинають з малого збільшення; - за допомогою дзеркала виставляють максимальне та рівномірне освітлення поля зору; - кладуть досліджуваний препарат

покривним скельцем уверх, фіксують його клемами; - спостерігаючи з боку (!), опускають об'єктив за допомогою макрогвинта, так щоб відстань між лінзою об'єктива та препаратом дорівнювала приблизно 5 мм. Неприпустимо одночасно дивитися в окуляр, опускати об'єктив, оскільки існує ймовірність роздавити препарат та пошкодити лінзу об'єктиву (!); - дивлячись в окуляр і переміщуючи макрогвинт, повільно піднімають об'єктив до появи чіткого зображення; - спочатку оглядають досліджуваний препарат при малому збільшенні; ділянку досліджуваного препарату, що потребує детального вивчення, поміщають у центр поля зору й повертають револьвер на об'єктив х40 чи х90, тобто переводять на велике збільшення; - за допомогою мікрогвинта, виставляють чітке зображення; - після закінчення роботи встановлюють мале збільшення і приймають досліджуваний препарат; - мікроскоп переносять обома руками. Під час мікроскопії визначають морфологічні особливості мікроорганізмів, їх тинкторіальні властивості (реакцію на різні барвники), розміри, наявність спеціальних структурних елементів клітини (спора, капсула), встановлюють рухливість. Порядок виконання роботи.

Завдання 1. Визначити основні завдання та особливості організації роботи в мікробіологічній лабораторії на підприємствах молочної промисловості. Коротко законспектувати в зошити основні моменти.

Завдання 2. Повторити будову світлового мікроскопу. Звернути увагу на оптичну його частину та призначення його основних механізмів.

Завдання 3. Занести в робочі зошити та самостійно.

Питання для самоконтролю.

1. У чому полягають основні завдання мікробіологічної лабораторії на підприємстві молочної промисловості? Яка її структура?

2. З чого складається світловий мікроскоп?

Які правила користування ним? Як перейти з маленького збільшення на велике?

3. У чому особливості роботи з імерсійною системою?

4. Назвіть лабораторне обладнання, інвентар та посуд.

5. Що є об'єктом досліджень мікробіологічної лабораторії.

Практичне заняття № 2

Загальні методики виготовлення та фарбування препаратів Приготування, фіксація та фарбування мазків різними методами.

Мета: навчитися готувати препарати мікроорганізмів для мікроскопії та ознайомитися з методами їх фарбування.

Завдання:

Навчитися готувати предметні скельця для виготовлення мазків для мікроскопії

Виготовити препарат для мікроскопії з агарової та бульйонної культур мікроорганізмів.

Пофарбувати мазки простим та складним методом.

Ознайомитись з методами фарбування спор та капсул.

Обладнання та матеріали

Предметні скельця, бактеріологічні петлі та пастерівські піпетки, розчин кристалічного фіолетового для фарбування мікроорганізмів, розчин метиленового синього для фарбування мікроорганізмів, набір фарб для фарбування за Грамом, набори фарб для фарбування спор та капсул, мікроскоп, імерсійне масло, фізіологічний розчин натрію хлориду, агарові та бульйонні культури мікроорганізмів.

Довідковий матеріал

Перш ніж розпочати виготовлення препаратів для мікроскопії, необхідно підготувати предметні скельця. Вони мають бути сухими та знежиреними. Доказом знежирення є рівномірний розподіл краплі води на поверхні скла.

Нові скельця спочатку миють у мильному розчині, зполіскують в теплій воді, знежирюють у розчині спирт-ефіру. Використані скельця спочатку витримують в розчині сірчаної кислоти, а потім кип'ятять в розчині соди та мильної води, після чого ополіскують у воді та висушують в сушильній шафі.

Оброблені в такий спосіб скельця зберігають в скляній банці сухими або в розчині спирт-ефіру. Скельця беруть пінцетом, оскільки пальці залишають жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчині спирт-ефіру, то їх протирають фільтрувальним папером чи бавовняною тканиною.

Порядок проведення робіт складається з таких етапів.

1. Виготовлення препарату для мікроскопії. Препарат готують за допомогою бактеріологічної петлі (з платини) чи пастерівських піпеток із агарової та бульйонної культури мікроорганізмів.

Виготовлення мазка з агарової культури:

- на знежиреному предметному склі позначають місце мазка, номер пробірки, назву культури (олівцем-маркером);
- стерилізують (фламбують) бакпетлю, остужують на повітрі, наносять краплю фізіологічного розчину натрію хлориду;
- стерилізують (фламбують) бакпетлю, відкривають чашку Петрі, охолоджують бакпетлю доторкуючись до внутрішньої стінки чашки;
- беруть третину ізольованої колонії, чашку закривають;
- вносять зібраний матеріал у краплю розчину натрію хлориду та розтирають її у вигляді монети (круговими рухами) на позначеному місці предметного скельця;
- мазок висушують на повітрі.

Виготовлення мазка з бульйонної культури:

- фламбують та остужують бакпетлю;
- занурюють у пробірку з бактеріальною бульйонною культурою;
- наносять бакпетлею краплю на знежирене предметне скло;
- розтирають на предметному склі круговими рухами;

- мазок висушують на повітрі.

2. Висушування препарата-мазка. Здійснюють на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не потрібно, оскільки за швидкої втрати вологи відбувається груба коагуляція (згортання) білків і клітина втрачає свою природню форму.

Фіксацію висушеного препарату. Здійснюють фізичним або хімічним способом Фізичний спосіб. Для цього треба тричі провести скельце з мазком над поверхнею полум'я спиртівки (протягом 6 с).

Хімічний спосіб. Для цього мазок обробляють розчинами: метилового (5 хв) або етилового спирту (10 хв) чи сумішшю спирту та ефіру.

Зафіксований мазок називається мікробіологічним препаратом для мікроскопії.

3. Фарбування препарату. Здійснюють простими чи складними методами.

Прості методи фарбування - застосовують один барвник (наприклад, фуксин Пфейффера або метиленовий синій). Наносять на фіксований препарат фуксин Пфейффера (на 2 хв) або метиленовий синій (на 3–5 хв); промивають водою; висушують фільтрувальним папером.

Складні методи фарбування дозволяють відрізнити мікроорганізми один від одного або виявити особливості їх структури (наявність спор та капсул). До них відносять фарбування за Грамом (виявляють грампозитивні або грамнегативні мікроорганізми), за Романовським – Гімзою (виявляють спірохети) та методи фарбування для виявлення спор та капсул.

Метод фарбування за Грамом

Суть методу: Здатність чи нездатність мікроорганізмів фарбуватись за Грамом залежить від хімічного складу бактеріальної стінки. У грамнегативних мікроорганізмів проста будова бактеріальної стінки (невелика кількість полісахаридів (пептидоглікан) – близько 10 % або один шар), яка легко вимивається спиртом та знебарвлюється. У грампозитивних – складна бактеріальна стінка (близьк 80 % полісахариду, кілька шарів) під час обробки спиртом вона не вимивається та зберігає інтенсивність забарвлення.

Техніка методу:

- на мазок наносять барвник кристалічний фіолетовий на 2 хв;
- наносять розчин Люголя на 1 хв;
- наносять 96 % етиловий спирт (на 20–30 с);
- промивають водою;
- наносять фуксин Пфейффера (на 2 хв), добре промивають водою висушують фільтрувальним папером.

Кокоформи в більшості випадків фарбуються грампозитивно

(фіолетовий чи синій колір). Звивсті форми – грамнегативно (червоний колір).

Серед палчковидних форм трапляються як грампозитивні так і грамнегативні мікроорганізми.

Методи фарбування для виявлення капсул

Для виявлення у мікроорганізмів капсул застосовують метод Ольта та метод Міхіна.

Метод Ольта. Фіксований мазок фарбують 2–3 % розчином сафраніна, фарбу готують перед використанням, розчиняючи її в гарячій дистильованій воді. При цьому, капсули мають світло-жовте забарвлення, а мікробна клітина – цегляно-червоного забарвлення.

Метод Міхіна. Фіксований мазок фарбують розчином метиленового синього (блакитного) протягом 2–3 хв., підігріваючи його до появи парів. Потім фарбу швидко змивають водою, мазок просушують фільтрувальним папером. При цьому, капсули мають світло-рожевий колір, мікробна клітина – темно- синій колір.

Методи фарбування для виявлення спор

Для фарбування спор здебільшого використовують метод Златогорова. Готують мазок звичайним способом, висушують на повітрі. Для фіксації мазка, а також для розм'якшення оболонки спори предметне скельце проводять над полум'ям спиртівки біля 10 разів. На мазок кладуть фільтрувальний папір, на який наносять карболовий фуксин Циля, підігрівають мазок протягом 8–10 хв до появи пару (в результаті спори та вегетативні форми фарбуються в червоний колір). Потім фільтрувальний папір знімають і протягом 6–10 с знебарвлюють розчином сірчаної кислоти (спори залишаються червоними). Після цього мазок промивають водою, просушують фільтрувальним папером і мікроскопують під імерсійною системою мікроскопу. Після застосування цього методу фарбування вегетативні форми набувають синього кольору, спори – червоного. Виготовлення препаратів для мікроскопії грибів та дріжджів

За допомогою бактеріальної петлі знімають поверхневий (повітряний) міцелій гриба з субстрату та обережно вносять його у краплю води (або фізрозчину), яка заздалегідь була нанесена на предметне скельце. Краплю води з міцелієм гриба накривають покривним скельцем та злегка придавлюють, щоб видалити пухирці повітря. При цьому визначають, одноклітинну чи багатоклітинну будову міцелію, звертають на форму спорангіїв та спорангієносіїв. Крім того, в препараті завжди спостерігають велику кількість вільно розміщених спор, що висипалися із спорангіїв, які лопнули.

Для мікроскопічного дослідження дріжджів на предметне скло наносять

краплю дріжджів у фізрозчині та накривають покривним скельцем (роздавлена крапля). Розглядають під мікроскопом в затемненому полі зору, для чого звужують діафрагму конденсора. Звертають на форму та розмір дріжджових клітин та на наявність форм, що розмножуються брунькуванням.

Порядок виконання роботи:

Завдання 1. Приготувати предметні скельця для мікроскопії.

Завдання 2. Виготовити препарат для мікроскопії з агарової та бульйонної культур мікроорганізмів, грибів або плісені.

Завдання 3. Пофарбувати приготовлені препарати для мікроскопії простим методом (метиленовим синім) та методом за Грамом.

Завдання 4. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Методи фарбування препаратів для мікроскопії

Прості методи фарбування	Складні методи фарбування	Методи фарбування Для виявлення капсул	Методи фарбування для виявлення спор

Питання для самоконтролю:

1. Як готують предметні скельця для виготовлення препарату для мікроскопії?

2. Які методи використовують для фарбування препаратів для мікроскопії.

3. Яка методика виготовлення препарату для мікроскопії з агарової та бульйонної культури?

4. У чому суть методу фарбування за Грамом.

Практичне заняття № 3

Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей дріжджів і плісневих грибів.

Мета: ознайомитись з генетичним апаратом бактеріальної клітини.

Завдання:

1. Вивчити генетичний матеріал у бактерій.

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

Довідковий матеріал

Як відомо, головна відміна прокариотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК. Структура, яка у прокариот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із

замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокариот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазмідні – невеликі, замкнені в кільце, ділянки ДНК. Плазміди, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про додаткові властивості організму та при діленні бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

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

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

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

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

У цитоплазмі мікробних клітин, так же, як і в еукаріотів, є особливі нуклеїнові кислоти, які називаються транспортними РНК (тРНК). На одному з кінців вони мають триплет нуклеотидів (антикодон), а на іншому - місце для з'єднання з відповідною амінокислотою (кодон). Вони доставляють необхідну амінокислоту до рибосоми з іРНК, де розпочинається синтез та відбувається елонгація (*elongatio* - подовження) поліпептидного ланцюга. Після завершення синтезу білкової молекули, вона за допомогою ферменту звільняється та піддається певній модифікації (посттрансляційні перетворення білкових молекул).

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

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

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

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

Фенотип - індивідуальний вияв генотипу в конкретних умовах існування.

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

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

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

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

Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза.

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

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

2. Зафіксувати мазок у рідині Карнуа протягом 15 хв.

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

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

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

6. Зробити схематичний малюнок з позначенням ядерного матеріалу.

Питання для самоконтролю:

1. Ген і його значення.

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

Практичне заняття № 4

Санітарно-мікробіологічний контроль об'єктів зовнішнього середовища.

Мета: вивчити розповсюдження мікроорганізмів у зовнішньому середовищі.

Завдання:

1. Вивчити взаємовідносини (співіснування) різних видів мікроорганізмів.

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

Довідковий матеріал

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

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

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

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

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

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

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

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

При *пасивному антагонізмі* спостерігають витіснення одного мікроорганізму іншим, якщо збільшення чисельності обох видів лімітовано одним і тим самим життєво важливим ресурсом, кількість та (або) доступність якого обмежені. Так, при вирощуванні на штучному поживному середовищі туберкульозних бактерій та сапрофітної мікрофлори переважно

розвиваються сапрофіти через значно більшу швидкість їх росту та розмноження. Експериментально було доведено, що при зміні умов досліду можна змінити кінцевий результат конкурентних взаємовідносин симбіонтів. Так, при сумісному культивуванні *Spirillumsp.* та *Pseudomonas sp.* за температури 16° С і вище перевага була за *Spirillumsp.*, тоді як за зниження температури до 2° С на тому самому субстраті швидше розвивались *Pseudomonas sp.*

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

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

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

Інший вібріон (*Bdellovibrio*) може розглядатись як справжній хижак. Клітини бделовібріона можуть прикріплюватися до клітин інших бактерій і проникати в них. Після проникнення хижак росте, використовуючи вміст клітини-жертви як поживний субстрат, і ділиться. З часом клітина-жертва лізується, а хижак знаходить нову жертву. Коло можливих жертв досить широке, але найчастіше це представники кишкових бактерій.

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

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

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

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

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

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

Питання для самоконтролю:

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

Практичне заняття № 5

Методи посіву, приготування поживних середовищ та культивування різних груп мікрофлори.

Мета: ознайомитися та набути навиків з приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів. Освоїти техніку посіву на живильні середовища.

Завдання:

1. Ознайомитися з класифікацією та вимогами до живильних середовищ, які використовуються для дослідження молока й молочних продуктів на визначення кількості показників мікрофлори.
2. Навчитися готувати живильні середовища для виявлення різних груп мікроорганізмів з молока та молочних продуктів.
3. Вивчити загальні методики посівів на щільне та рідке живильні середовища.

Обладнання та матеріали

МПБ в колбах та пробірках, МПА, середовище Ендо, Кітта-Тароці, Сабуро (та інші середовища) в чашках Петрі, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, лабораторні ваги з наважками, фільтрувальний папір, електричні плитки, спиртівки.

Довідковий матеріал

Отримання чистої культури мікроорганізмів, вивчення їх біологічних властивостей з метою встановлення виду мікроорганізмів та отримання біомаси в лабораторії можливе лише за певних умов. Для цього використовують штучні поживні середовища.

Середовища, які використовуються для культивування мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам:

- мати певний набір азотистих та вуглеводних речовин
- мати вітаміни та необхідні концентрації солей;
- мати необхідне рН середовища;
- мати достатню кількість вологи;
- бути стерильними (до початку посіву не містити мікроорганізмів).

Класифікація середовищ

За походженням сировини:

натуральні (молоко, яйця, кров, сироватка, овочі, фрукти);
синтетичні (суміш хімічно чистих органічних і мінеральних речовин).

За консистенцією:

Рідкі (бульйони), *щільні* (агари) та *напівщільні* (агаризовані).

За складом:

прості: м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА);

складні (до простих додають вуглеводи, кров, сироватку, молоко та ін.). **За призначенням:**

універсальні – для культивування різних груп мікроорганізмів;

середовища накопичення – рідкі середовища для накопичення та виявлення певних груп мікроорганізмів;

елективні – забезпечують сприятливі умови для росту одних мікроорганізмів і несприятливі – для інших;

диференціально-діагностичні – для визначення видової належності мікроорганізмів;

консервувальні – використовують для первинного росту та транспортування досліджуваного матеріалу.

Як універсальні живильні середовища використовують рідкі (МПБ) та щільні (МПА) середовища.

Середовища накопичення мають рідку консистенцію і використовуються для виявлення мікроорганізмів, вміст яких в продукті незначний. Середовища накопичення використовують для виявлення бактерій групи кишкових паличок

– БГКП (середовище Кесслер) та сальмонел (середовище Кауфмана, селенітове середовище). За наявності росту бактерій на середовищах накопичення в подальшому, як правило, здійснюють посів на щільні диференційно-діагностичні середовища, які використовують для ідентифікації мікроорганізмів, що вирости на середовищах накопичення. Так в якості диференційно-діагностичного середовища для виявлення БГКП використовують середовище Ендо.

Елективні живильні середовища мають щільну консистенцію. Прикладом такого середовища може бути молочно-солевий агар, який використовується для виявлення в молочних продуктах золотистого стафілококу.

Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів із окремих компонентів.

Середовища для культивування молочнокислих бактерій

Знежирене молоко. Молоко відокремлюють від вершків, розливають в пробірки чи колби, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують в автоклаві під тиском 0,05 МПа. Середовище використовують для вивчення фізіологічних властивостей та підрахунку кількості молочнокислих бактерій. Це середовище також використовують для отримання лабораторної закваски з рідких і сухих заквасок та бактеріальних концентратів.

Агар з гідролізованим молоком. Спочатку готують гідролізоване молоко,

шляхом гідролізу стерильного знежиреного молока за допомогою ензиму панкреатину за температури 45 °С протягом 3-х діб за наявності хлороформа. Отриманий гідролізат розводять водою у співвідношенні 1:2. Потім додають 1,5 – 2 % агару мікробіологічного і 2–3 % крейди у вигляді порошку. Середовище стерилізують. Агар з гідролізованим молоком використовують для кількісного підрахунку молочнокислих бактерій у молочних продуктах.

Середовище для культивування гнилісних бактерій

Молочний агар готують шляхом внесення 20 % горячого стерильного знежиреного молока в стерильних розплавлений 2 % водний розчин агару. Використовується це середовище для кількісного обліку протеолітичних та пептонізуючих бактерій (мікрококів).

Середовища для культивування дріжджів та мікроскопічних грибів

Для культивування дріжджів та пліснявих грибів застосовують середовище Сабуро та сусло-агар, які можна вготувати в лабораторних умовах чи придбати готові у сухому порошкоподібному вигляді.

Середовища для виявлення коагулазно-позитивних стафілококів

Основа – солевий агар: до МПА (рН = 7,2–7,4) додають 2 % агару мікробіологічного і 6,5 % хлористого натрію, розплавляють на водяній бані, за необхідності фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають мірним циліндром по 100 см³ в колби ємністю 250 см³ і стерилізують за температури 121 °С протягом 20 хвилин. Отримують солевий агар. Замість МПБ можна використовувати сухий поживний агар, додавши до нього 6,5 % хлористого натрію.

Жовтково-солевий агар. До розплавленого та охолодженого до 45 °С солевого агару (основа) додають 20 см³ емульсії яєчного жовтка. Після повного розмішування жовтково-солевий агар розливають у стерильні чашки Петрі по 20 см³ та зберігають в холодильнику 5 – 7 діб.

Для приготування емульсії яєчного жовтка на дно стерильної чашки Петрі поміщають курине яйце, яке ретельно протирають ватою, змоченою етиловим спиртом. Стерильним пінцетом пробивають з двох протилежних сторін два отвори. Через один із цих отворів із яйця видаляють білок, а потім, через дещо збільшений отвір, вилвають жовток в стерильну колбу, ємністю 200 см³. Жовток змішують з чотирма об'ємами стерильного фізрозчину, потім вміст ретельно перемішують до отримання гомогенної маси.

Молочно-солевий агар. До 100 см³ розплавленого і охолодженого до 45 °С солевого агару вносять 10 см³ знежиреного стерильного молока, ретельно перемішують та розливають тонким шаром в стерильні чашки Петрі.

Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів із

промислово випущених сухих середовищ полягає в розчиненні певної кількості порошку в воді, доведенні отриманої суміші до кипіння, кипятінні протягом 5 хвилин. Далі (за необхідності) фільтрування через ватно-марлевий фільтр та розлив в пробірки чи колби, які закриваються ватно-марлевими корками. Далі живильні середовища стерилізують в автоклаві. Зі сухих середовищ готують МПБ, МПА, середовище Сабуро, середовище Кесслер та ін..

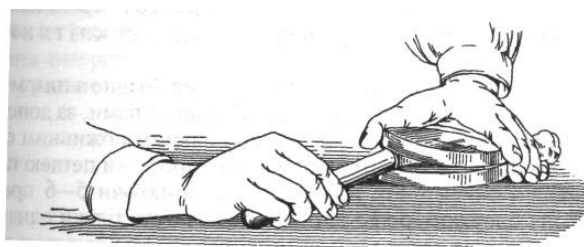


Рис. 1. Розлив поживного середовища в чашки Петрі

Прості середовища зберігають у шафах за кімнатної температури, складні

- у холодильнику. Перед посівом середовища підігрівають у термостаті до 20–37 °С.

Техніка посіву на живильні середовища

Увага! Посів проводити в асептичних умовах (швидко, не розмовляти, не робити зайвих рухів, посіви тримати біля полум'я спиртівки на відстані до 10 см). Дотримуватися правил техніки безпеки! Посів досліджуваного матеріалу проводять бактеріальною петлею, шпателем, піпеткою.

Техніка посіву на щільне середовище в пробірці бакпетлею (рис. 2 а):

- беруть пробірку з культурою в ліву руку та нахиляють її вправо;
- фламбують бакпетлю у полум'ї спиртівки (необхідно тримати її як авторучку);

- знімають пробку з пробірки мізинцем правої руки;
- фламбують край пробірки в полум'ї спиртівки;
- вводять петлю в пробірку та охолоджують її, доторкуючись до внутрішньої стінки пробірки;

- беруть досліджуваний матеріал бакпетлею;
- фламбують край пробірки, закривають її корком і ставлять у штатив;
- пробірку з посівом ставлять в термостат.

Техніка посіву на щільне середовище в чашці Петрі бакпетлею (рис. 2 б):

- відкривають (трохи) чашку Петрі лівою рукою проводять посів матеріалу штрихами по поверхні щільного живильного середовища;

- закривають чашку Петрі, на її дні пишуть дату та назву культури, на кришці – назву середовища;
- фламбувають бакпетлю;
- ставлять бакпетлю в штатив;
- чашку з посівом ставлять в термостат доверху дном, установлюють відповідний температурний режим.



Рис. 2. Техніка посіву на рідке середовище бакпетлюю:

а- в пробірці; б – в чашці Петрі

Техніка посіву на рідке середовище в пробірці бакпетлюю:

1. У ліву руку беруть пробірку з рідким середовищем, нахилиють її вправо;
2. Знімають мізинцем правої руки корок, фламбують краї пробірки;
3. Вводять петлю з матеріалом у пробірку (не торкаючись поверхні пробірки);
4. Змивають його живильним середовищем;
5. Фламбують край пробірки і корок, закривають пробірку;
6. Фламбують бакпетлю і ставлять її в штатив;
7. Пишуть номер на пробірці, назву середовища;
8. Ставлять пробірку у термостат.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомитися з класифікацією та рецептурою живильних середовищ (МПА, МПБ, Ендо, Сабуро). Законспектувати в робочі зошити.

Завдання 2. Ознайомитись з методами приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів та відпрацювати навички їх приготування *Завдання 3.* Вивчити схему проведення посіву. Провести посіви на рідкі та щільні живильні середовища з дотриманням техніки посіву.

Завдання 5. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Середовища, які застосовуються для виділення різних груп мікроорганізмів

№ п/п	Середовища	Мікроорганізми

Питання для самоконтролю:

1. Як класифікуються живильні середовища? Яким вимогам повинні відповідати живильні середовища?
2. Яка техніка посіву на щільне та рідке живильні середовища?
3. Які середовища застосовують для культивування молочнокислих бактерій та пліснявих грибів?
4. Які середовища використовують для культивування дріжджів та пліснявих грибів.

Практичне заняття № 6

Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей спиртових, молочнокислих, оцтовокислих та пропіоновокислих бактерій.

Мета: вивчити морфологічну будову та основні властивості молочнокислих бактерій (лактококів та лактобактерій).

Завдання:

1. Виготовити препарати для мікроскопії молочнокислих бактерій, пофарбувати їх та провести мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів молочнокислих бактерій).
2. Зарисувати побачене.
3. Вивчити основні властивості молочнокислих бактерій (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, здатність зброджувати молоко, утворювати CO₂ та ароматичні речовини, тощо)

Обладнання та матеріали

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

Довідковий матеріал

Молочнокислі бактерії – це специфічна група мікроорганізмів, що обумовлюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів (цукрів) до молочної кислоти. Крім основного продукту бродіння – молочнокислої кислоти утворюються побічні продукти: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, етиловий спирт і ін.

До молочнокислих бактерій відносять молочнокислі стрептококи

(лактококи та лейконостоки) та молочнокислі палички (лактобактерії)

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

- *гомоферментативні бактерії* – бактерії, які під час розщеплення відповідних вуглеводів молока утворюють як основний продукт молочну кислоту і незначну кількість інших продуктів:



глюкоза молочна кислота

- *гетероферментативні бактерії* – бактерії, які поряд з молочною кислотою утворюють значну кількість газу та ароматичні речовини.



глюкоза молочна кислота янтарна кислота



оцтова кислота етиловий спирт

До гомоферментативних лактококів належать молочнокислий стрептокок

Lactococcus lactis і вершковий стрептокок *Lactococcus cremoris*.

До гетероферментативних лактококів належать *Lactococcus diacetyllactis*

та *Lactococcus acetoinicus*.

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

До гомоферментативних лактобактерій відносять мікроорганізми родів *Thermobacterium* (*Lactovacillus helveticus*, *Lactovacillus acidophilus*, *Lactovacillus bulgaricus*, *Lactovacillus lactis*) та *Streptobacterium* (*Lactovacillus plantarum* і *Lactovacillus rhamnosus (casei)*), а до гетероферментативних лактобактерій – мікроорганізми роду мікроорганізми *Betabacterium* (*Lactovacillus brevis*, *Lactovacillus buchneri*, *Lactovacillus fermentum*).

За температурним режимом культивування молочнокислі бактерії поділяються на мезофільні, для яких оптимальна температура росту складає від 20 до 30° С, і термофільні – оптимальна температура росту яких 40–45°С (див. табл. 1).

Таблиця 1

Мезофільні і термофільні молочнокислі мікроорганізми

Мезофільні молочнокислі мікроорганізми	Термофільні молочнокислі мікроорганізми
--	---

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

Природним місцем існування молочнокислих мікроорганізмів є рослини, шлунково-кишковий тракт, молоко й молочні продукти.

Молочнокислі стрептококи (лактококи та лейконостоки)

Морфологія. Клітини *Lactococcus lactis* (молочний стрептокок) овальної форми, які у молодих культур розміщені у вигляді коротких ланцюжків (від двох до шести), а у старих – попарно. *Lactococcus cremoris* (вершковий стрептокок) на відміну від молочного стрептококу утворює довгі ланцюжки з округлих клітин (рис. 1). Клітини гетероферментативних стрептококів *Lactococcus diacetylactis* та *Lactococcus acetoinicus* мають округлу форму, проте за розмірами дещо менші від *Lactococcus lactis* і розміщені в ланцюжках. Клітини термофільного стрептококу *Streptococcus thermophilus* найбільші серед клітин інших молочнокислих стрептококів і розміщуються в довгих ланцюжках.

Усі лактококи нерухливі, спор і капсул не утворюють, за Грамом фарбуються позитивно.

Культуральні властивості. Лактококи – факультативні анаероби, тобто ростуть не тільки в анаеробних умовах (безкисневих), а й за наявності молекулярного кисню. Оптимальна температура для їх росту становить 25–30°C, крім стрептококу *Streptococcus thermophilus* (40–45 °C). Не ростуть на звичайних живильних середовищах МПА. Молочнокислі стрептококи культивують на знежиреному стерильному молоці або на щільних і рідких штучних живильних середовищах з використанням гідролізованого молока, молочної сироватки та інших живильних речовин, отриманих з молока.

На щільних живильних середовищах мікроорганізми утворюють округлі та гронаподібні колонії. Округлі росинчасті колонії з рівним краєм утворюються на поверхні середовища, а гронаподібні або човникоподібні колонії – врастають в агар.

Lactococcus lactis (рис. 1a) є активним кислотоутворювачем, тому

молоко сквашується протягом 6–10 год, з кислотністю 120 °Т. Сквашене молоко має рівний щільний згусток, приємний кислуватий запах і смак. Деякі штами молочного стрептококу утворюють згусток в'язкої, тягучої консистенції, тому непридатні для виробництва кисломолочних продуктів.

Lactococcus cremoris (рис. 1б) сквашує молоко протягом 8–12 год, з кислотністю 110–115 °Т. При сквашуванні молока згусток має сметаноподібну консистенцію й кислуватий запах і смак, тому його використовують у складі заквасок при виробництві тих продуктів, де необхідно досягти в'язкої консистенції та помірного кислотоутворення (сметана, кисломолочний сир, тощо). При розмноженні вершкового стрептокока в молоці утворюється слиз.

Lactococcus diacetylactis сквашує молоко від 10 год до 2 діб (з кислотністю 70–100°Т і при цьому утворює велику кількість летючих кислот (оцтову, пропіонову) та ароматичних речовин (діацетилу та ефірів). При сквашуванні молока згусток має рівну, щільну консистенцію з незначною кількістю пухирців газу. Запах і смак його слабкі, приємно кислуваті. Саме тому він має промислове значення та належить до складу заквасок для кисломолочного сиру, сметани, кислого молока, масла й сирів.

Streptococcus thermophilus (рис. 1в) за оптимальної температури (40–45°С) згортає молоко за 3,5–6 год з граничною кислотністю 110–120 °Т, утворюючи рівний щільний згусток сметаноподібної чи в'язкої тягучої консистенції з приємним кисломолочним смаком і запахом. Деякі штами цього мікроорганізму виділяють діацетил.

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

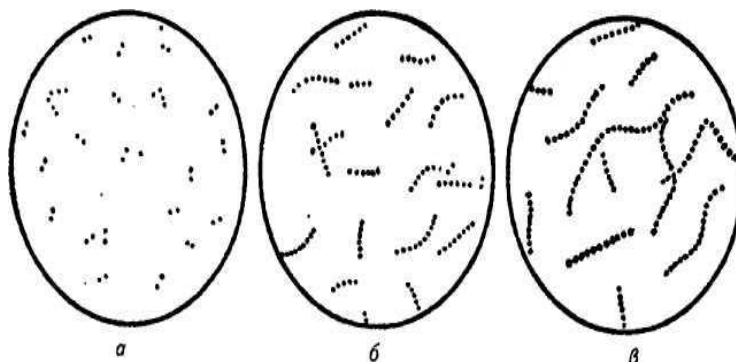


Рис. 1. Молочнокислі стрептококи:

а - *Lactococcus lactis*, б - *Lactococcus cremoris*, в - *Streptococcus thermophilus*

Представники роду *Leuconostoc* морфологічно подібні до лактококів: мають сферичну форму, грампозитивні, неспороутворюючі, нерухливі мікроорганізми, які з'єднуються попарно чи в ланцюжки, які переплітаються. Більшість представників цього роду утворюють капсули, тому під час їх розвитку на живильних середовищах утворюється слиз.

Лейконостоки – факультативні анаероби, вони ростуть на середовищах за температури 20–30 °С. Порівнянно з лактококами, лейконостоки є більш вибагливими до живильних середовищ і потребують додавання до них чи до молока в якому вони розвиваються, стимуляторів росту (амінокислот, біотину, дріжджового екстракту).

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

Із роду *Leuconostoc* тільки *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* і *Leuconostoc dextranicum* використовуються в молочній промисловості для ароматоутворення при виробництві кисловершкового масла, сирів, рідше кисломолочних напоїв, сметани, кисломолочного сиру, оскільки ці організми розщеплюють лимонну кислоту з утворенням діацетилу, що надає продуктам приємного смаку та аромату.

Молочнокислі палички (лактобактерії)

Молочнокислі палички належать до родни *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, який має три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бета-бактерії).

До термобактерій належать вісім видів паличок, серед яких найбільше застосовують *Lactovacillus helveticum*, *Lactovacillus acidophilus* (рис. 2б), *Lactovacillus bulgaricus* (рис. 2а), *Lactovacillus lactis*. Підрід стрептобактерій містить сім видів, серед яких у молочній промисловості використовують *Lactovacillus plantarum* і *Lactovacillus rhamnosus (casei)*. До підроду бета-бактерій належать 11 видів паличок, найбільш вивченими серед них є *Lactovacillus brevis*, *Lactovacillus buchneri*, *Lactovacillus fermentum* та ін.

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

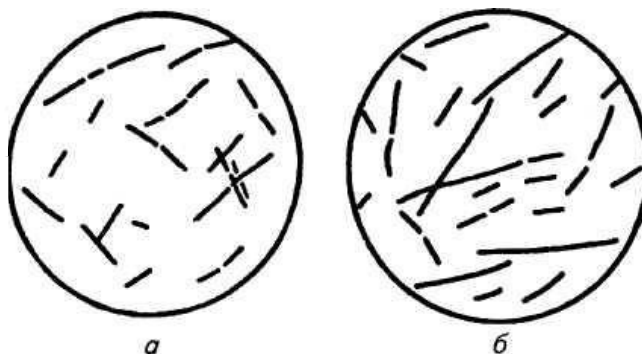


Рис. 2. Молочнокислі палички:
а – болгарская палочка; б –ацидофильная паличка

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

Молочнокислі палички зброджують молоко за 6–12 годин з утворенням щільного згустку, який має приємний кисломолочний смак і запах.

Більшість видів молочнокислих паличок використовують у молочній промисловості для виробництва кисломолочних напоїв, кисломолочного масла, сирів. Крім того, лактобактерії вводять до складу різних лікувальних та профілактичних препаратів, біодобавок для покращення діяльності шлунково- кишкового тракту людей і тварин.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії зарисувати в робочих зошитах основних представників лактококів та лактобактерій.

Завдання 2. Спостерігати за ростом на живильних середовищах у чашках Петрі молочнокислих стрептококів та паличок; спостерігати пробірки за пробірками зі сквашеним молоком та визначити його органолептичні показники.

Завдання 3. Результати отриманих спостережень занести в табл. 2.

Загальна характеристика молочнокислих стрептококів

Показники	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Розміщення клітин				
Форма та величина колоній				
Температура росту: - оптимальна - гранична				
Кислотність				
Утворення ароматичних речовин				
Сквашування молока: - час сквашування - характер згустку - консистенція				

Питання для самоконтролю:

1. Які бактерії належать до молочнокислих? Які молочнокислі бактерії називають гомоферментативними та гетероферментативними? Наведіть представників кожної групи.

2. Назвіть представників лактококів. Які їх основні характеристики?

3. Назвіть представників лактобактерій. Які їх основні характеристики?

4. Наведіть приклади використання молочнокислих бактерій у молочній та інших галузях промисловості.

5. Яка роль моліль молочнокислих бактерій у формуванні якості молочних продуктів

Практичне заняття № 7

Вивчення основних морфологічних і біологічних властивостей маслянокислих бактерій.

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

Завдання:

1. Виготовити препарати для мікроскопії із культур збудників псування молока й молочних продуктів, отриманих на живильних середовищах,

пофарбувати їх за Грамом та виконати їх мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів).

2. Зарисувати результати спостереження.

3. Ознайомитися з основними властивостями мікроорганізмів, що викликають псування молока й молочних продуктів (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, відношення до O₂, здатність зброджувати молоко, тощо).

Обладнання та матеріали

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

Довідковий матеріал

До мікроорганізмів, які викликають псування чи вади молока й молочних продуктів, належать: маслянокислі бактерії, гнилісні бактерії, деякі види дріжджів та плісняві гриби (заняття №2), бактеріофаги (заняття № 14).

За характером дії на складові частини молока шкідливі мікроорганізми умовно поділяються на три підгрупи:

1) ті, що діють переважно на молочний цукор і солі молочної кислоти (маслянокислі бактерії) ті, що викликають розщеплення білків (гнильні бактерії);

2) ті, що розщеплюють молочний жир (гнилісні пігментоутворюючі бактерії).

Маслянокислі бактерії належать до роду *Clostridium*. Технічно небажаними в молочній промисловості є *Clostridium perfringens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*, оскільки вони спричиняють маслянокисле бродіння, унаслідок чого молочний цукор і солі молочної кислоти (лактати) розщеплюються з утворенням масляної та інших кислот і спиртів:



глюкоза масляна кислота

Маслянокислі бактерії – це ґрунтові мікроорганізми, тому потрапляють в молоко з частинками ґрунту, гною та кормів. У результаті надмірного газоутворення спричиняють здуття сиру у другій половині дозрівання. Маслянокисле бродіння іноді відбувається в молоці й інших молочних продуктах, причому ці продукти набувають прогірклого смаку й неприємного запаху. Результатом розвитку маслянокислих бактерій є також бомбаж жерстянобанкових консервів.

Морфологія. Маслянокислі бактерії це грампозитивні великі палички

циліндричної форми, розміром 5–2 на 0,5–1,5 мкм, рухливі до моменту спороутворення. Капсул не утворюють, завдяки наявності спор, які розміщені термінально та субтермінально, клітини мають вигляд веретина, булави, тенісної ракетки або ложки.

Культурально-біохімічні властивості. Маслянокислі бактерії є чітко вираженими анаеробами: ростуть і розмножуються лише без доступу кисню. Оптимальна температура розвитку становить 30–35 °С, але температурні межі росту 8–45 °С. На рідкому середовищі Кітта-Тароцці викликають помутніння з утворенням великої кількості газу та запахом масляної кислоти. Спори витримують кип'ятіння протягом 2–3 хв, а під час пастеризації не гинуть.

Гнилісні (протеолітичні) бактерії є основними збудниками псування молочних продуктів, оскільки викликають глибокий розпад білків. Спочатку ці мікроорганізми згортають молоко, завдяки продукуванню сичужного ферменту, а потім розщеплюють його до пептонів та поліпептидів. У молоці й молочних продуктах викликають вади кольору (темні плями на поверхні сирів), смаку (гіркий, прогірклий, нечистий).

Гнилісні бактерії досить поширені й трапляються в ґрунті, воді, повітрі, кишечнику людини і тварини на харчових продуктах.

За відношенням до кисню гнилісні бактерії поділяють на три підгрупи:

- 1) аероби;
- 2) факультативні;
- 3) чітко виражені анаероби.

Крім того, розрізняють спороутворюючі та безспорові гнильні мікроорганізми .

Спороутворюючі гнилісні аероби

У молоці й молочних продуктах здебільшого трапляються *Bacillus subtilis* (сінна паличка) (рис. 1а), *Bacillus megatherium* (капустяна паличка) (рис. 1б), *Bacillus mycoides* (грибоподібна паличка) (рис. 1в), *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка) і *Bacillus cereus* (рис. 1г). Спороутворюючі гнилісні аеробні мікроорганізми викликають вади молочних продуктів (прогірклий та гіркий смак) і передчасне згортання молока без підвищення кислотності.

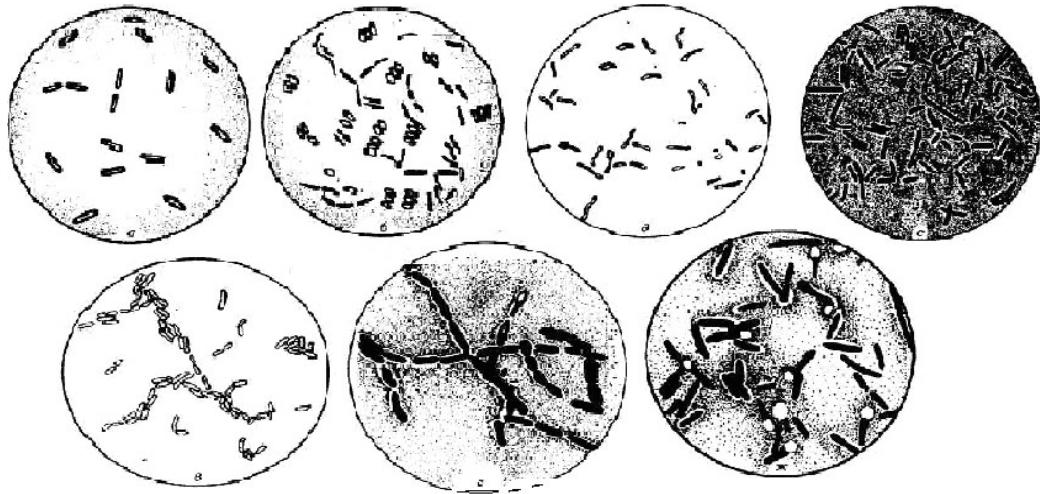


Рис. 1. Спороутворюючі гнільні аероби та анаероби:

а – *Bac. subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. mycoides*; г –
Bac. cereus; д – *Cl. putrificum*; е – *Cl. perfringens*; ж – *Cl.*
sporogenes

Морфологія. Це грампозитивні, рухливі палички із заокругленими кінцями, що утворюють термостійкі спори. Залежно від виду розміщуються поодинокі, попарно чи в ланцюжках *Культуральні властивості.* Аероби, тому добре ростуть на звичайних живильних середовищах (МПА, МПБ).

На поверхні МПБ *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus* формують білового кольору зморшкувату плівку, бульйон залишається прозорим. Інші представники аеробних гнільсних бактерій викликають помутніння бульйону різного ступеня та незначний осад.

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

Неспороутворюючі гнільсні аероби

Ця група гнільсних мікроорганізмів представлена родиною *Enterobacteriaceae* родами *Proteus* (*Proteus vulgaris* і *Proteus mirabilis*) та *Escherichia* (*Escherichia coli*) (рис. 2).

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

Культуральні властивості. Оптимальна температура для росту мікроорганізмів 25–37 °С. Під час росту мікроорганізмів роду *Proteus* на щільних живильних середовищах відбувається їх характерний повзучий ріст,

унаслідок чого поверхня середовищ повністю покривається тонкою прозорою плівкою. У МПБ викликають рясне помутніння бульйону та появу плівки. *Escherichia coli* на МПА утворює росинчасті напівпрозорі колонії, у МПБ – росте у вигляді помутніння середовища.

Неспороутворюючі гнильні пігментоутворюючі мікроорганізми (рис.2).

Це бактерії видів *Pseudomonas fluorescens* (флюоресцююча паличка), *Pseudomonas aeruginosa* (синегнійна паличка), *Serratia marcescens* (чудова паличка). Викликають вади кольору, консистенції, запаху та смаку молочних продуктів, що зумовлене розщепленням жиру в разі їх довготривалого зберігання в охолодженому стані (у холодильнику, холодильних камерах). У молоко здебільшого попадають із залишками води.

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

Культуральні властивості. Викликають помутніння МПБ з утворенням пігменту, характерного для кожного виду: флюоресцююча паличка зафарбовує середовище в зеленувато-жовтий колір, синегнійна паличка – в синьо-зелений, а чудова паличка – у червоний. На МПА формують округлі колонії з рівними краями.

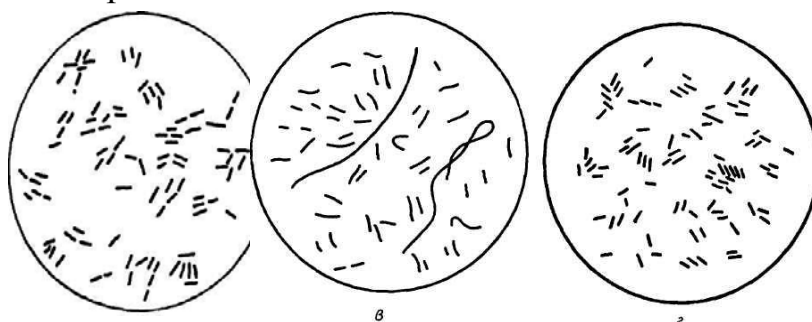


Рис. 2. Неспороутворюючі гнильні аероби:

а – *Pseudomonas fluorescens*; б – *Ps. aeruginosa*; в – *Proteus vulgaris*;

г – *Escherichia coli*

Спороутворюючі гнильні анаероби

Представлені мікроорганізмами роду *Clostridium* (*Clostridium perfringens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*), які також викликають маслянокисле бродіння (рис. 1д, е, ж).

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

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії зарисувати в робочих зошитах мікроорганізми, що викликають псування молока й молочних продуктів

Завдання 2. Спостерігати на живильних середовищах у чашках Петрі ріст мікроорганізмів, що викликають псування молока й молочних продуктів.

Завдання 3. Використовуючи отримані результати спостереження та дані літературних джерел, заповніть таблицю 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика мікроорганізмів, що спричиняють псування молока й молочних продуктів

Показники	Маслянокислі бактерії	Гнилісні бактерії					
		спороутворюючі аероби		неспороутворюючі аероби		спороутворюючі анаероби	
		<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. ycoides</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Cl. putrificus</i>	<i>Cl. sporogenes</i>
Морфологічна будова мікробних клітин							
Наявність спор капсул джгутиків							
Ріст на середовищах МПА МПБ							
Оптимальна температура культивування							
Які складові молока розщеплюють							

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть мікроорганізми, що спричиняють псування молока й молочних продуктів.
2. Які існують шляхи потрапляння в молоко мікроорганізмів, що призводять до його псування.
3. Які морфологічні та культуральні властивості характерні для маслянокислих бактерій?
4. Які морфологічні та культуральні властивості мають гнильні бактерії?

5. Яку роль молочнокислі бактерії відіграють у формуванні якості молочних продуктів?

Практичне заняття № 8

Визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині молочних продуктах).

Мета: ознайомитися з методиками визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині.

Завдання:

1. Визначити наявність у дослідних пробах молока-сировини бактерій групи кишкових паличок.

2. Установити колі-титр.

3. Ознайомитися з методикою визначення сальмонел у молоці-сировині.

Обладнання та матеріали

Проби молока-сировини, пробірки, піпетки, мірні циліндри на 100 та 200 мл, середовище Кеслера, Ендо, Плоскірева, Козера, Мюлера, Олькеницького.

Довідковий матеріал

1. Визначення бактерій групи кишкової палички

Метод базується на здатності бактерій групи кишкових паличок зброджувати в середовищі Кеслер лактозу з утворенням кислоти і газу. Дослідний матеріал засівають по 1 см³ відповідного розведення в пробірки з 5 см³ середовища Кеслер і ставлять у термостат за температури 37 °С на 18–24 год. Після цього пробірки перевіряють на наявність чи відсутність газоутворення. Якщо газоутворення відсутнє, то вважають, що продукт не забруднений бактеріями групи кишкових паличок. Якщо в дослідному матеріалі виявлено бактерії групи кишкових паличок, проводять подальшу їх ідентифікацію. Із пробірок, у яких спостерігається бродіння, бактеріологічною петлею проводять пересів із кожної пробірки на окремий сектор чашки із середовищем Ендо з таким розрахунком, щоб отримати окремі колонії. Посіви культивують за температури 37 °С протягом 18–24 год.

У разі наявності колоній бактерій групи кишкових паличок їх вивчають: проводять мікроскопію мазків, виготовлених із цієї колонії, і петлею пересівають на середовище Козера та на середовище з глюкозою. Посіви на середовищі Козера культивують за температури 37 °С, а на середовищі з глюкозою – за температури 43 °С протягом 18–24 год.

Наявність кислоти та газу на середовищі із глюкозою і відсутність росту на цитратному середовищі Козера вказує на наявність бактерій групи ешерихій.

Зміна оливково-зеленого кольору середовища Козера на волошковий (синій) свідчить про наявність ешерихій, які належать до цитратпозитивних

різновидів ешерихій, що не викликають бродіння з утворенням газу на середовищі із глюкозою за культивування за температури 43 °С.

1. Визначення колі-титра молока

Колі-титр молока визначають на середовищі Кеслер, до складу якого входять речовини, що пригнічують ріст молочнокислих та інших грампозитивних мікробів.

Молоко й молочні продукти спочатку розводять 1:10, 1:100, 1:1000. Потім беруть шість пробірок з середовищем: у три з них вносять по 1 см³, в інші три – по 0,1 см³ кожного розведення. Засіяні пробірки ставлять на 24 години в термостат за температури 37 °С. Відсутність газоутворення у всіх шести пробірках свідчить чистоту продукту, а його колі-титр вважають вище 3 см³. У разі газоутворення в одній пробірці, яка засіяна 1 см³ дослідного продукту, колі-титр дорівнює 3 см³. Якщо газ утворився більше, ніж в одній пробірці з 0,1 см³ колі-титр вважають рівним 0,3 см³. Наявність газу в шести або п'яти пробірках указує на те, що колі-титр менше, ніж 0,3 см³. Таке молоко непридатне до використання.

2. Визначення сальмонел

Підготовлені проби сирого молока висівають у 25 см³ середовища збагачення подвійної концентрації (селенітовий бульйон, магнієве середовище, середовище Мюллера, Кауфмана). Посіви культивують за температури 37 °С протягом 18–24 год.

Із середовищ збагачення пересівають на середовище Ендо, Плоскірева та ін. і культивують за температури 37 °С протягом 18–20 год.

За наявності підозрілих колоній проводять посів 3–5 колоній у пробірки з комбінованим середовищем (трицукровий агар з сечовиною Олькеницького, Клігера). Посів здійснюють спочатку штрихом по скошеній поверхні середовища, а потім уколом у стовпчик і культивують за температури 37 °С протягом 18–20 год.

Із вирощених колоній готують мазки, проводять їх мікроскопію. Якщо в мазках виявлено грамнегативні палички, а культура не ферментує лактозу, не розщеплює сечовину, але ферментує глюкозу її піддають дослідженню на біохімічні і антигенні властивості.

Мікробіологічні критерії для сирого коров'ячого молока визначені в ДСТУ 3662-2018, а молока питного у ДСТУ 2661:2010.

Вимоги до мікробіологічних показників питного молока і кисломолочних продуктів наведені нижче.

Згідно діючих в Україні вимог щодо мікробіологічних показників у пастерізованому молоці для дитячого харчування загальна кількість мікроорганізмів (КМАФАнМ), КУО в 1 мл повинна бути не більше 5×10^4 , а

для молока пастеризованого групи В – 1×10^5 , для молока пастеризовано у флягаг та цистернах 2×10^5 .

Маса продукту (г), у якому не допускаються БГКП (колі-форми): молоко пастеризоване для дитячого харчування та молоко групи А – 1,0; для інших видів пастеризованого молока – 0,1.

Сальмонели та інші патогенні мікроорганізми недопускаються в 50 г пастеризованого молока для дитячого харчування, а для всіх інших видів пастеризованого молока та кисломолочних продуктів – у 25 г.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Приготувати дослідні проби сирого молока до дослідження. Провести посів приготовленого дослідного матеріалу на середовище Кеслер. Визначити колі-титр в дослідних пробах сирого молока.

Завдання 2. Заповнити табл. 1. Зробити висновок, порівнюючи отримані дані з даними нормативних документів.

Завдання 3. Вивчити послідовність визначення сальмонел у молоці.

Таблиця 1

Результати визначення в дослідних пробах сирого молока бактерій групи кишкової палички

№ проби сирого молока	Наявність газу в пробірках	Зміна кольору середовища в пробірках	Колі-титр
1			
2			
3			

Питання для самоконтролю:

1. Що таке колі-титр молока? Як його визначають?
2. Як визначають наявність у сирому молоці бактерії роду сальмонела?
3. Які вимоги нормативних документів до кількості бактерій групи кишкових паличок та сальмонел у молоці питному.

Практичне заняття № 9

Визначення інгібувальних речовин у молоці

Мета: вивчити методику (мікробіологічну) визначення інгібіторів у молоці.

Завдання:

1. Установити, як антибіотики, дезінфікуючі речовини та інші чинники, що є в молоці впливають на хід реакції на інгібітори.

Обладнання та матеріали

Проби сирого молока, пробірки скляні (висота 150 і діаметр 16 мм), штатив для пробірок, колби мірні на 200 мл; піпетки, редуктазник або водяна баня, що забезпечують регулювання температури від 30 до 50°C термометри, мірні циліндри на 100 та 200 мл, тест-культура колекційна (штам В – 2095 або штам К, *Streptococcus thermophilus*), вода дистильована, антибіотики (пеніцилін (бензилпеніциліну калієва або натрієва сіль), сода.

Для визначення інгібувальних речовин у сирому молоці з резазурином: основний розчин резазурину, препарат сухий для контролю визначення інгібувальних речовин у молоці (СКІР).

Для визначення інгібувальних речовин у сирому молоці з метиленовим синім: пептон сухий ферментативний для бактеріологічних цілей та приготовлену з нього суміші для визначення інгібувальних речовин в молоці з метиленовим синім.

Приготування всіх необхідних робочих розчинів та тест-культур наведено в додатку А.

Довідковий матеріал

Антибіотики потрапляють у молоко, в основному при лікуванні маститу (запалення молочної залози) у корів. Це становить небезпеку для здоров'я людей, і в першу чергу для дітей. Так, постійне вживання молока, що містить антибіотики, може викликати нечутливість мікробіоти наявної в шлунково-кишковому тракті людського організму до лікувального препарату та призвести до утворення в організмі людини стійких до антибіотиків патогенних бактерій, а також спричинити зміни в складі кишкової мікрофлори.

Дезінфікуючі речовини потрапляють у молоко із продезінфікованого та погано ополісненого після дезінфекції молочного обладнання.

У технологічному плані антибіотики і дезінфікуючі речовини в молоці є небажаними, оскільки вони впливають на перебіг молочнокислого бродіння і тим самим погіршують якість молока як сировини для виробництва молочних та кисломолочних продуктів.

Визначення інгібувальних речовин у сирому молоці проводять експрес-методами (БРТ-тест, Дельво-тест) та у разі їх відсутності можна класичними методами з індикаторами резазурином і метиленовим синім.

Для проведення аналізу відбирають 50 см³ молока середньої проби, яку можна зберігати у холодильнику за температури 6–8 °С не більше доби.

Метод визначення інгібуючих речовин з індикатором резазурином

Сутність методу. Метод базується на відновленні резазурину в результаті розвитку в молоці чутливих до інгібувальних речовин

мікроорганізмів роду *St. thermophilus* (термофільний стрептокок). Чутливість методу дозволяє визначити в молоці наявність антибіотиків і залишків дезінфікуючих речовин.

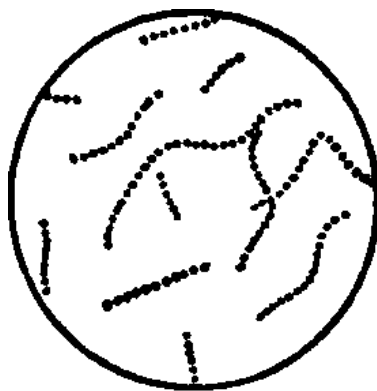


Рис. 1. *St. thermophilus* (термофільний стрептокок)

Проведення аналізу. У чисті пробірки наливають по 10 см³ молока і закривають стерильними гумовими корками. Решту проби зберігають до кінця аналізу у холодильнику за температури 6–8 °С. Одночасно здійснюють контрольний аналіз. Для цього у пробірку наливають 10 см³ відновленого препарату (СКІР), одержаного розчиненням сухого препарату у флаконі з 10 см³ дистильованої води за температури 50°С.

Пробірки з дослідним молоком і контрольною пробєю нагрівають на водяній бані до температури 85–90 °С. Потім охолоджують до 43–45 °С і стерильною піпеткою у пробірки додають 0,3 см³ робочої тест-культури. Вміст пробірки перемішують триразовим перевертанням і витримують протягом 2 год у редуктазнику або на водяній бані за температури 42–43 °С.

У пробірки з молоком контрольної проби додають по 1 см³ 0,05%-ного розчину резазурину за температури 18–20° С. Вміст пробірок перемішують дворазовим перевертанням. Пробірки витримують у редуктазнику або на водяній бані протягом 15 хв за температури 42–43 °С.

Обробка результатів. За відсутності інгібувальних речовин досліджуване молоко буде рожевим або білим. За наявності інгібуючих речовин молоко буде мати синьо-стальне, синьо-фіолетове або фіолетове забарвлення.

Цей метод дає змогу виявити в молоці вміст пеніциліну більше 0,01 МО/см³; стрептоміцину – від 30 до 50 мкг/см³; тетрацикліну, окситетрацикліну – 1 МО/см³; олеандоміцину – 10 МО/см³; масову частку пероксиду водню – 0,01 %; масову частку формаліну – 0,003 %..

Метод визначення інгібуючих речовин з метиленовим синім

Сутність методу. Метод базується на знебарвленні метиленового синього в результаті розвитку в молоці чутливих до інгібувальних речовин

мікроорганізмів роду *St. thermophilus* (термофільний стрептокок).

Проведення аналізу. У чисті пробірки наливають 10 см³ досліджуваного молока і закривають (нешільно) гумовими корками. Пробірки з досліджуваним молоком нагрівають на водяній бані до 87±2 °С з витриманням до 10 хв і охолоджують до 43±2 °С. Після цього у пробірки стерильною піпеткою додають по 2 см³ приготовленої суміші для визначення інгібувальних речовин в молоці з метиленовим синім, перемішують триразовим перевертанням і витримують на водяній бані від 1 год 40 хв до 2 год 20 хв за температури 41–42 °С. *Обробка результатів.* За відсутності у молоці інгібувальних речовин вміст пробірок буде мати білий колір. Синє кільце, що утворюється в пробірці на поверхні молока висотою 1 см, до уваги не беруть.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Дослідити проби сирого молока на наявність чи відсутність у них інгібувальних речовин.

Після проведення аналізу результати занести в табл. 1.

Таблиця 1

Результати виявлення інгібувальних речовин у сирому молоці

№ проби	Колір вмісту пробірок на початку реакції	Колір вмісту пробірок на кінець реакції	Інгібуючі речовини	
			відсутні	наявні

Питання для самоконтролю:

1. Що відносять до інгібувальних речовин у молоці?
2. Як вони впливають на якість молока?
3. В чому сутність методу визначення інгібувальних речовин з індикатором резазурином?
4. Чому антибіотики та інші невластиві для молока хімічні сполуки в молоці називають інгібіторами?

Практичне заняття № 10

Мікробіологічне дослідження основних продуктів харчування (м'яса, ковбасних виробів).

Мета: ознайомитися з методами визначення ступеня свіжості м'яса, ковбасних виробів.

Завдання:

1. Ознайомитися з показниками контролю які визначають ступень

свіжості м'яса.

2. Підготувати зразки м'яса та відбитки препаратів забарвлених за Грамом.

3. Підрахувати кількість бактерій і встановити ступінь розпаду м'язової тканини.

Обладнання та матеріали: мікроскопи, предметне скло, кристалізатори, спиртівки, мікробіологічні петлі, фільтрувальний папір, м'ясо, імерсійна олія, набір барвників для забарвлення за Грамом. Довідковий матеріал. М'ясо забійних тварин є сприятливим поживним середовищем для розвитку багатьох мікроорганізмів. Розрізняють прижиттєве і післязабійне забруднення м'яса. У здорових тварин прижиттєве забруднення окремих органів відбувається за умов ослаблення природного імунітету під впливом різних несприятливих факторів (втома, голодування, переохолодження, перегрівання, травм.) з кишечника через лімфатичні і кровоносні судини. Після забою на м'ясні туші й органи тварин мікроорганізми потрапляють з повітря, води, обладнання, транспортних засобів, інструментів, рук, одягу та взуття робітників, а також зі шкіри тварин, шлунково – кишкового тракту, при недотриманні правил перев'язки стравоходу, зачистці. На свіжому м'ясі, яке отримують при забої здорових, не виснажених тварин, з дотриманням відповідних технологічних інструкцій і санітарно – гігієнічних вимог виробництва, мікроорганізми знаходяться тільки на поверхні у кількості 10^3 - 10^6 клітин, інколи більше.

У більш глибоких шарах м'язової тканини мікроорганізми виявляють тільки у м'ясі, отриманому від тварин хворих, виснажених, недостатньо вгодованих. Видовий склад свіжого м'яса дуже різноманітний. Це переважно аеробні та факультативно - анаеробні мікроорганізми: стафілококи, мікрококи, бактерії групи кишкової палички і протею, клостридії, коринеформні і молочнокислі бактерії, дріжджі, актиноміцети та гриби.

М'ясо може бути інфіковане і патогенними мікроорганізмами, такими як *Cladosporium perfringens*, *Bacillus cereus*, сальмонелами, ентерококами та ін. При сприятливих умовах мікроорганізми швидко розмножуються на поверхні м'яса, поступово проникають у середину тканин і викликають псування. Основні чинники псування м'яса: температура, відносна вологість повітря, термін зберігання, початкова мікробна забрудненість м'яса. Зниження температури зберігання затримує розмноження бактерій. Охолоджене м'ясо має температуру у товщі м'язів від 0 до 40 °С. В цих умовах розвиваються психрофільні мікроорганізми: не спорові бактерії роду псевдомонас і ахромобактер, плісеневі гриби, аеробні дріжджі. При

заморожуванні м'яса кількість мікроорганізмів зменшується, але повного їх відмирання не відбувається. Більшість плісневих грибів і дріжджів на замороженому м'ясі не гине при – 180 впродовж трьох років, а на протязі 6-9 місяців зберігаються стафілококи, сальмонели, бактерії кишкової палички. Порушення умов і термінів зберігання м'яса сприяє розвитку мікроорганізмів і є однією з причин його псування: ослизнення, гниття, кислого бродіння, пігментації, пліснявіння та ін. Ослизнення м'яса виникає переважно на початку зберігання найчастіше під впливом аеробних психрофільних грамнегативних бактерій, та аеробних дріжджів. М'ясо з ознаками ослизнення має липку поверхню, сіро – білого або сіро-зеленого кольорі, із слизуватим нальотом, неприємний кислувато – затхлий запах. Гниття розвивається на м'ясі як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Збудниками процесу гниття в аеробних умовах є психрофільні бактерії роду псевдомонас, чудесна, сінна, та картопляна палички та ін., в анаеробних – клостридії спорогенез, путріфікум і перфрінгенс. М'ясо з ознаками гниття має сірий, сіро-зелений, зелений або синьо – червоний кольори, в'ялу консистенцію, неприємний гнильний запах, містить ряд отруйних речовин і непридатне для споживання. Кислотне бродіння (закисання) м'яса супроводжується появою неприємного запаху, зміною забарвлення на сірий, сіро – зелений колір, розм'якшення м'язової тканини. Збудниками закисання м'яса є психрофільні лактобацили, клостридії, дріжджі, що здатні розвиватися в глибині м'язової тканини. Пліснявіння м'яса пов'язане з розвитком на його поверхні плісневих грибів у вигляді павутинистого або порошистого нальоту різного кольору (сірі, білі, зелені, жовті, чорні та ін.), нальоту різного кольору. На м'ясі найчастіше розвиваються гриби родів *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*. Деякі гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, пліснява *Cladosporium herbarum* виділяють мікотоксини, які небезпечні для здоров'я людини, а деякі з них є канцерогенними. Пліснявіння м'яса супроводжується гідролізом білків з утворенням продуктів лужного характеру, змінами у жирах. М'ясо набуває затхлого запаху. При пліснявінні м'яса з ураженням тільки поверхневих шарів його зачищають і негайно направляють на промислову переробку. При ураженні глибоких шарів зі зміною органолептичних показників м'ясо направляють на утилізацію. М'ясо, яке потрапляє в торгову мережу, або на переробку з метою отримання м'ясних продуктів, підлягає контролю на ступінь свіжості а також мікробіологічне дослідження. При надходженні у торгову мережу м'ясо всіх видів і категорій вгодваності повинно бути свіжим, правильно обробленим, мати відповідне маркування. Згідно зі стандартом бактеріологічним дослідженням можна швидко визначити

ступінь свіжості м'яса: свіже, сумнівної свіжості та несвіже. Для цього у мазках – відбитках, забарвлених за Грамом, підраховують кількість бактерій і встановлюють ступінь розпаду м'язової тканини.

М'ясо вважається свіжим, якщо у мазках – відбитках не знайдено мікроорганізмів або у полі зору видно поодинокі (до 10 клітин) кулясті та відсутні сліди розкладу м'язової тканини; сумнівної свіжості, якщо у полі зору мазка – відбитка знайдено не більше кулястих та паличкоподібних бактерій і сліди розкладу м'язової тканини. Несвіжим вважають м'ясо, якщо у полу зору мазка – відбитка знайдено більше кулястих та паличкоподібних бактерій і виявлено ознаки значного розкладу м'язової тканини.

Консистенція. Доброякісне м'ясо еластичне. Після натиснення пальцем ямкашвидко вирівнюється. Несвіже м'ясо м'яке. Ямка заповнюється повільно. Запах. Кожний вид м'яса має свій характерний запах. Але несвіжому м'ясу притаманний неприємний, гнильний відтінок.

Характеристика бульйону. Під час варіння свіжого м'яса отримують прозорий, приємний бульйон. Несвіже м'ясо дає мутний, слизький бульйон, що має неприємний, гнильний запах. Ці ознаки зумовлені утворенням продуктів розкладу білків, зокрема поліпептидів. Жир свіжого м'яса в залежності від виду та віку тварин буває білим,жовтуватим, жовтим або блідо – рожевим,твердої консистенції, з характерним запахом. Несвіжий жир – сірий, м'який, з неприємним запахом. Кістковий мозок свіжого продукту заповнює всю порожнину трубчастої кістки, пружний, жовтого кольору, на зламі блискучий. Сухожилля пружні,цільні. Поверхня суглобів гладенька, блискуча, рідина в них прозора.

Бактеріоскопічне дослідження. Його здійснюють за допомогою отримання препаратів – відбитків на предметних стеклах. Дослідження мікрофлора, яка знаходиться на поверхні м'яса. Для того, щоб визначити кількість поверхневої мікрофлори на 1 см² м'яса, проводять вибір проби методом зрізу. Гострим стерильним скальпелем, зрізають тонку пластинку м'яса, товщиною 2-3 мм і поміщають у (раніше зважену) стерильну порцелянову чашку з кришкою. Визначають масу досліджуваної проби, потім розтирають з стерильним піском, отриману кашу заливають у колбу з відомим об'ємом стерильної води, збовтують протягом 5 хвилин і роблять посів 1 мг змивної води у чашки Петрі з м'ясопептонним агаром. Після вирощування у термостаті підраховують колонії, які вирости. Прийнято вважати, що 1 г зрізу відповідає 1,5 см² поверхні м'яса. Виходячи з цього, визначають кількість мікробів на 1 см² продукту. Щоб підрахувати кількість спор у досліджуваному матеріалі його занурюють у рідкі середовища і прогрівають при 80 °С протягом 20 хвилин; частину пробірок залишають не

прогрітими. Вирощують в аеробних умовах при температурі 37°C протягом 24-28 годин. Печінковий бульйон для виділення анаеробів витримують у термостаті 8-10 діб. При наявності росту проводять мікроскопічне дослідження. У свіжому м'ясі кількість аеробних мікроорганізмів на 1 см² поверхні м'яса не повинно перевищувати 10-100 тис. Спороутворюючих аеробів в 1 г продукту - не більше 10-100 мікробних клітин. У середовищах з посівами піддають прогріванню, в 1 г не повинно бути спор. Загальна кількість мікробних клітин в 1 г сирого м'яса не повинна перевищувати 100 тис. клітин. Визначення загальної кількості бактерій в м'ясі. 100-150г досліджуваного м'яса занурюють на 1-2 хвилини у киплячу воду, щоб вбити мікроби на поверхні. Після цього стерильним ножом з глибини вирізають шматочок м'яса масою 1-2 г, занурюють у стерильну ступку і зважують для визначення його чистої маси. Розтирають з 5 г стерильного піску, поступово підливаючи стерильну воду до розведення 1:10. З верхнього шару рідини беруть піпеткою 0,1 мл або 1 мл, виливають в стерильну чашку Петрі і заливають розплавленим МПА (температура 50 °С). Посів обережно змішують і після застигання поміщають на 20-24 години в термостат при температурі 37 °С. Потім підраховують колонії, які виростили і для визначення мікробів в 1 г м'яса множать число колоній на розведення. Резазурінова проба для визначення загальної кількості мікробів в 1 г м'яса. 1г проби(взятий з точністю до 0.01 г) подрібнюють ножицями розтирають в стерильній ступці і вносять в пробірки з 10 мл стерильного МПБ і додають по 1 мл 0,01 %-ого розчину резазуріна. Пробірки поміщають у термостаті і спостерігають за реакцією. Для контролю кольору реактиву беруть 9 мл МПБ без м'яса, додають 1 мл розчину резазуріна і витримують аналогічним способом. Санітарну оцінку м'яса проводять з урахуванням часу відновленого кольору резазуріна від синього через фіолетовий до рожевого. Якщо в пробірках з пробою охолодженого м'яса рожеве забарвлення з'являється, через 4-6 г, це відповідає 8-10 мікробним клітинам у 1 г м'яса; через 2-3 г - 1,6 тис; через 45-60 хв - до 20 млн; через 15-30 хв - більше 20 млн. клітин.

Відбір і підготовка проб. Під час підготовки проб до аналізу ковбасні виробни звільняють від оболонки, а зі солоного бекону і продуктів із свинини, вироблених зі шкірою, знімають шкіру. Зразки двічі подрібнюють через м'ясорубку з діаметром отворів решітки 3÷4,5 мм, ретельно перемішують. Пробу сирокочених ковбас двічі подрібнюють через м'ясорубку з діаметром отворів решітки 3÷4,5 мм або нарізають гострим ножом на кругові шматки товщиною не більше 1 мм, потім – на смужки так, щоб розміри шматків не перевищували 1 мм, ретельно перемішують. Зразки паштетів, студнів,

зельців подрібнюють через м'ясорубку один раз, ретельно перемішують. Подрібнену пробу поміщають у скляну банку з притертою пробкою і зберігають на холоді до завершення досліджень.

Методика визначення У хімічній склянці зважують $5 \pm 0,01$ г подрібненої усередненої проби досліджуваного продукту й додають 100 см^3 дистильованої води. Періодично перемішуючи скляною паличкою, настоюють 40 хв. Потім водний витяг фільтрують через паперовий фільтр. У конічну колбу за допомогою піпетки переносять 10 см^3 отриманого фільтрату і титрують розчином AgNO_3 з концентрацією $0,05$ моль/дм³ за наявності індикатора калій хромату ($0,5 \text{ см}^3$ розчину) до появи оранжевого забарвлення. Наважку напів копчених, варено-копчених, копчених ковбас, солоного бекону, продуктів зі свинини, баранини та яловичини (сирокопчених, копчено-варених, копчено запечених, запечених, смажених) у хімічній термостійкій склянці нагрівають на водяній бані до $40 \text{ }^\circ\text{C}$, витримують за цієї температури протягом 45 хв, періодично перемішуючи скляною паличкою. Фільтрують через паперовий фільтр. Охолоджений до кімнатної температури фільтрат об'ємом 10 см^3 титрують розчином AgNO_3 з концентрацією $0,05$ моль/дм³ за наявності індикатора калій хромату ($0,5 \text{ см}^3$ розчину) до появи оранжевого забарвлення. Масову частку натрій хлориду (X, %) обчислюють за формулою:

$$100\% \cdot 0,00292 \cdot 100 \cdot 1 \cdot = V \cdot m \cdot K \cdot V \cdot X ,$$

де $0,00292$ – кількість NaCl , еквівалентна 1 см^3 розчину AgNO_3 з концентрацією $0,05$ моль/дм³, г; K – поправковий коефіцієнт до концентрації $0,05$ моль/дм³ розчину AgNO_3 ; V – об'єм розчину AgNO_3 з концентрацією $0,05$ моль/дм³, який витрачено на титрування, см³; V_1 – об'єм водного витягу, взятого для титрування, см³; m – наважка проби, г. Розбіжність між результатами паралельних визначень не повинна перевищувати $0,1 \%$. За остаточний результат приймають середнє арифметичне значення результатів двох паралельних визначень.

Питання для самоконтролю:

1. Як здійснюють дослідження мікрофлори, яка знаходиться на поверхні м'яса.
2. Як проводять відбір та підготовку проб на бактеріоскопічне дослідження.
3. Визначення загальної кількості бактерій в м'ясі.
4. Назвіть види псування мяса. Дайте їх характеристику.
5. Наведіть показники якості мяса. Дайте їх характеристику.

Практичне заняття № 11

Мікробіологічне дослідження у хлібопеченні та кондитерських виробках.

Мета: ознайомитись з основними методами мікробіологічного дослідження кондитерських виробів

Завдання:

1. Виявлення зовнішнього забруднення хліба.
2. Приготувати середню пробу крему.
3. Обчислити колі-титр по 1-й бродильній пробі.

Методика визначення.

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

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

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

Оптимальні умови розвитку даної хвороби хліба є висока вологість середовища (виробів), температура в межах 25-30°С, відносна вологість повітря від 70 до 80 %, рН 5-6. Особливо швидко пліснявіє хліб, нарізаний скибочками. Небезпека пліснявіння збільшується при пакуванні недостатньо охолодженого хліба. Зараження хліба спорами міцеліальних грибів може відбуватися через і забруднене повітря, транспортні і пакувальні засоби, руки і одяг працюючих. Міцелій грибів розповсюджується спочатку по поверхні хліба, після цього по тріщинам і порам проникає всередину м'якушки. Пліснявіння хліба викликають гриби роду *Aspergillns* що утворюють пухнасті

покриття, пофарбовані в різні кольори: жовто-зелений – *Asp. flavus*, сіро-блакитний - *Asp. fumigatus*, сіро-зелений - *Asp. glaucus*, чорний *Asp. niger*, світло-коричневий *Asp. nidulans*, жовто-оранжевий *Asp. ochraceus*, блідо-жовтий – *Asp. Candidus*; роду *Penicillium*: сіро-зелений *P. crustosum*, жовто-зелений *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. Stoloniferum*; роду *Mucor*: жовтувато-сірий - *M. mucedo*, сірий - *M. pusillus*, сірувато-чорний – *M. plumbeus*, білий з чорними головками - *Rhizopus nigricans*, білий *Geotrichum candidum*. Ферменти міцеліальних грибів гідролізують вуглеводи, білки і жир і несприятливо впливають на якість хліба внаслідок появи затхлого запаху і неприємного смаку. Деякі види грибів утворюють в хлібі мікотоксин (афлатоксини, патулін, охра-токсин, рубратоксин) не тільки шкідливі, але і канцерогенні для людей

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

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

Почервоніння м'якушки хліба. При високій вологості повітря на випечених хлібобулочних виробках бактерії *Serratia marcescens* (чудова паличка) утворюють колонії червоного кольору, продукуючи при цьому червоний пігмент продигіозін. Ферменти *Serratia marcescens* зацукрують крохмаль і розпушують клейковину. Хліб з м'якушкою, що почервоніла втрачає товарний вигляд і є непридатним до вживання. На хлібі можуть розвиватися і інші бактерії, що утворюють пігменти жовтого, синього,

фіолетового кольору. Деякі представники дріжджів роду *Rhodotorula* утворюють барвні речовини і викликають появу на хлібі жовтих, рожевих або яскраво-червоних слизистих плям.

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

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

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

Креми є сприятливим поживним середовищем для розвитку мікроорганізмів. При порушенні санітарного режиму виготовлення, зберігання і реалізації в кремевих виробках можуть виявлятися мікроорганізми - сапрофіти (кишкова, сінна палички, молочнокислі бактерії, плісняві гриби, дріжджі та ін.); можливий також вміст умовно-патогенної та патогенної флори. З патогенних мікроорганізмів, здатних активно розвиватися в кремах, особливої уваги заслуговує золотистий стафілокок. Деякі штами його утворюють ентеротоксин і можуть стати причиною важких

харчових отруєнь. Джерелом зараження виробів з крему стафілококами є, як правило, люди, хворі гнійними і простудними захворюваннями, пил неприбраних приміщень, забруднена сировина (молоко, яйця).

В кремі можуть також розмножуватись сальмонели.

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

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

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

Завдання 1.

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

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

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

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

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

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

Завдання 2.

1. Для визначення колі-титру крему врахувати бродильну пробу (поява бульбашки газу у поплавку). В навчальних цілях дослідження закінчити. Обчислити колі-титр по 1-й бродильній пробі (табл. 1). Відзначити в протоколі, що в бактеріологічних лабораторіях дослідження продовжується

за звичайною схемою ідентифікації бактерій групи кишкових паличок (посів на середовище Ендо, мікроскопія мазків, порушення 2-ї бродильної проби).

2. На середовищі Чистовича (виявлення патогенних стафілококів) відзначити підозрілі колонії, що містять золотистий пігмент і оточені зоною просвітлення (розщеплення лецитину за рахунок лецитинізації активності штамму). Визначити за кількістю колоній число стафілококів в 1 г продукту (число колоній помножити на 10 у відповідності з кількістю взятого матеріалу).

2. Демонстрація:

а) ознайомитись з особливостями патогенного стафілококу переглянути посіви на кров'яному агарі і відзначити зону гемолізу навколо колоній;

б) переглянути посів стафілококу в плазму крові і відзначити коагулювання плазми.

Результати аналізу записати:

Таблиця 1

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

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

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

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

Причиною є виділення газів при зброджуванні цукрів осмофільними дріжджами і газоутворюючими видами бактерій.

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

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

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

Питання для самоконтролю:

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

Практичне заняття № 12

Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко та молочні продукти.

Мета: ознайомитися з морфологічними та культуральними властивостями збудників токсикоінфекцій.

Завдання:

1. Чітко визначити шляхи надходження збудників токсикоінфекцій у молоко й молочні продукти.
2. Вивчити морфологічні властивості збудників токсикоінфекцій методом мікроскопії готових препаратів.
3. Вивчити культуральні властивості збудників токсикоінфекцій.
4. Вивчити стійкість збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти до фізичних та хімічних факторів.

Обладнання та матеріали

Готові фіксовані препарати збудників харчових токсикоінфекцій для мікроскопії, мікроскопи, імерсійне масло. Демонстраційні схеми та фото культур збудників токсикоінфекцій на різних середовищах.

Довідковий матеріал

Харчові токсикоінфекції гострі кишкові захворювання, які виникають у результаті вживання харчових продуктів, що містять велику кількість живих

бактерій специфічного збудника та їхніх токсинів.

Збудниками токсикоінфекцій є бактерії родів сальмонела (*Salmonella*), ешерихія (*Escherichia*), лістерія (*Listeria*), протей (*Proteus*), клостридіум (*Clostridium (Cl. perfringens)*).

Бактерії роду сальмонела (*Salmonella*) – це палички із заокругленими кінцями, іноді овальної форми, довжиною 2–4 мкм, завширшки 0,5 мкм. Іноді бактерії утворюють нитки, це аероби або факультативні анаероби. Усі вони, за винятком *S. gallinarum*, *S. pullorum*, рухливі. Сальмонели грамнегативні, не утворюють спор та капсул. Оптимальна реакція середовища для росту слабколужна (рН 7,2–7,4), температура 37 °С, хоча вони добре ростуть за кімнатної температури. Більшість сальмонел добре росте на звичайних живильних середовищах. На простому агарі гладкі форми бактерій утворюють круглі, окреслені, напівпрозорі, випуклі, вологі колонії з блакитним відтінком. Шорсткуваті форми ростуть у вигляді нерівно округлених, шорсткуватих, каламутних (тьмяних) і сухих колоній. Під час росту у бульйоні вони викликають рівномірне помутніння середовища, за винятком шорсткуватих форм, які у рідких середовищах дають осад з прозорою надосадовою рідиною.

Стійкість сальмонел до дії деяких фізичних та хімічних факторів є досить високою. Вони порівняно легко переносять високі й низькі температури, значною мірою стійкі до впливу навколишнього середовища: можуть тривалий час виживати у пилу, гноївці, сухому калі, ґрунті, воді та тваринних кормах, зберігаючи вірулентність.

Життєздатність сальмонел у молочних продуктах залежить від виду останніх. Так, у сирому молоці за температури +18...20 °С та кислотності 26 °Т виживають 11 діб, а за +5...+8 °С до 20 діб; у вершковому маслі, що зберігається за кімнатної температури, сальмонели життєздатні від 52 до 128 діб; у кисломолочному сирі – 16 діб, а за температури 4 °С – 91 та 64 діб, відповідно, у молочньо-шоколадній масі – близько 15–19 міс; у кисляку з кислотністю 85 °Т – 48 год, а з кислотністю 130–135 °Т вони втрачають життєздатність через 24 год.

Бактерії роду ешерихія (*Escherichia*) бактерії групи кишкових паличок) мають фекальне походження і як постійні мешканці кишечника людини та тварин досить поширені у навколишньому середовищі. Серед бактерій кишкових паличок поряд з непатогенними (сапрофітними) штамами трапляються ентеропатогенні, здатні викликати шлунково-кишкові захворювання людей і тварин. Ентеропатогенність *E. coli* визначається її токсиноутворенням і здатністю розмножуватися у тонких кишках.

Рід *Escherichia* представлений делількома видами, які містять велику

кількість різних біохімічних та серологічних варіантів. Ці бактерії мають своєрідну антигенну структуру, за якою проводять диференціацію патогенних кишкових паличок від патогенних. За морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями між ентеропатогенними та банальними сапрофітними штамами кишкових паличок особливих розбіжностей не встановлено. Не спостерігаються також різкі розбіжності між вказаними штамами та їх стійкістю до дії несприятливих факторів довкілля (високі й низькі температури, реакція середовища, висушування, кухонна сіль, ультрафіолетове випромінювання та ін.), а також і виживанні в різних середовищах (молоко, вода, ґрунт).

Ешеріхії можна виділити з молока, сметани, молочнокислих продуктів, сиру. Якщо ці продукти були виготовлені у промислових умовах, то основною причиною знаходження вказаних мікроорганізмів є порушення встановлених санітарно-гігієнічних вимог до виробництва.

У молоці при кімнатній температурі *E. coli* зберігається 10–30 діб, за температури +3...+5 °С близько 30–50 діб, у стерилізованому молоці 9–10 міс., а у дитячій поживній суміші – 92 діб.

Морфологія. Ешеріхії – це дрібні короткі палички, рухливі, грам негативні, спор та капсул не утворюють. Є факультативними анаеробами і культивуються на простих живильних середовищах за рН 7,2–7,4 та оптимальної температури 37 °С. На МПА бактерій формують опуклі колонії округлої форми з рівними краями, напівпрозорі, зі сіро-голубим відтінком. У МПБ бактерії викликають помутніння бульйону зі сіро-білуватим осадом.

Стійкість бактерій *E. coli* до дії високих температур невелика: за температури 50 °С гинуть через 1 год, за 60 °С – 15 хв, за 100 °С – миттєво. Дотримання технологічних режимів теплової обробки молочних продуктів з доведенням температури до 68–72 °С забезпечує загибель ешеріхії колі.

Бактерії роду *E. coli* можуть місяцями знаходитися у ґрунті, воді, випорожненнях, на предметах побуту. Добре витримують висушування. Дезінфікуючі речовини, що використовуються у прийнятних концентраціях, надійно знищують ешеріхій у короткі строки.

При вживанні сирого молока можуть виникати гострі шлунково-кишкові захворювання, які викликаються ентеропатогенними видами кишкової палички. Ці бактерії можуть знаходитись в молоці у великих кількостях у літні місяці. Бактерії групи кишкових паличок викликають зміни смаку і запаху молока, а деякі різновиди – його ослизнення. Вони гинуть здебільшого під час пастеризації, і їх наявність у пастеризованому молоці вище встановленої норми вказує на незадовільну пастеризацію або вторинне забруднення після пастеризації.

Джерелом забруднення молока патогенними штамми кишкових паличок є хворі тварини й люди, які працюють на фермі та переобному підприємстві й порушують санітарно-гігієнічний режим під час технології виробництва продуктів.

Протягом останніх 10 років значна увага учених і практиків була спрямована на інші мікроорганізми, які прийнято вважати етіологічним фактором харчових токсикоінфекцій, так звані «нові тапогени» або маловивчені збудники родів *Campylobacter*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafhia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*. Для розгляду пропонується мікроорганізми родів *Campylobacter*, *Yersinia*.

Лістерії (*Listeria monocytogenes*). Джерелами надходження цих мікроорганізмів у молоко й молочні продукти є повітря, вода, обладнання, корма (особливо силос низької якості), персонал, конденсат з стелі, а також хворі на лістеріоз тварини та інші носії лістерій тощо. Лістерії ростуть як за наявності кисню, так і без нього, але оптимальним є середовище з невисокою концентрацією кисню. Ростуть ці бактерії за температури від $-0,4$ °C до $+45$ °C, концентрації NaCl – до 10 %, рН 4,3–9,4. Лістерії гинуть за температури 100 °C за 1–2 сек, а за температури 70–75 °C за 10–15 хв.

Лістерії є небезпечними мікроорганізмами для здоров'я людей. Інкубаційний період перебігу лістеріозу в людей становить від 2 діб до декількох місяців. Субклінічний перебіг – ураження геніталій, у вагітних можливі аборти. Клінічної перебіг – головний біль (менінгіт), підвищення температури, блювота. Особливо небезпечними ці мікроорганізми є для новонароджених дітей, у яких можуть розвиватися менінгіти. Летальність серед новонароджених може сягати до 30–40 %. Смертність серед дорослого населення становить 3–10 %.

Кампілобактерії. Джерело надходження цих мікроорганізмів у молоко – фекальна контамінація. Ріст кампілобактерій відбувається за пониженої концентрації кисню, за температури 36,5–37 °C, виживають за 0–4 °C, але не ростуть за цієї температури. Не ростуть у кислому середовищі. Гинуть за температури 65–70 °C за 5–10 хв. Симптоми та перебіг захворювання такі: інкубаційний період становить від 12 годин до 7 діб після вживання продукту, який містить *Campylobacter*. В окремих випадках цей період може бути до 1,5 місяця. Клінічні ознаки характеризуються діареєю, головними болями, підвищеною температурою. Перебіг – від однієї доби до одного тижня. Смертельні випадки зареєстровані в 0,5–2 % хворих.

Єрсинії (*Yersinia enterocolitica*). Основним джерелом *Y. enterocolitica* є тварини (свині, корови, гризуни, собаки, кішки). Людина також може бути джерелом контамінації продукту (працівники молочної промисловості тощо).

Найбільше інфіковані ієрсиніями свині. Основний шлях передачі *Y. enterocolitica* – харчовий. Захворювання здебільшого виникає після споживання забруднених молочних продуктів, свинини, яловичини, баранини, дичини, свіжих заморожених фруктів та овочів. *Y. enterocolitica* не тільки виживають, але й розмножуються за умови низьких температур, що слід ураховувати при виникненні спалахів ієрсиніозу.

Ієрсиніоз частіше реєструють у холодну пору року. Клініка поліморфна; переважає гастроентероколітна форма. Можливі також септичні, суглобові форми. Інкубаційний період становить 1–2 доби, іноді від 4 годин до 4 діб. Захворювання починається з ознобу, підвищення температури до 38–39 °С, головний біль, загальна слабкість, біль у м'язах, суглобах, нудота. Через 1–2 год. виникає переймоподібний біль у животі і пронос, іноді з домішками слизу і крові. Тривалість захворювання до 7 діб, у разі важкого перебігу подовжується до 20–28 діб. Для підтвердження діагнозу проводять бактеріологічні й серологічні дослідження

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми й готові препарати для мікроскопії, зарисувати в робочих зошитах збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 2. Провести спостереження за ростом на живильних середовищах в чашках Петрі збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 3. Використовуючи отримані спостережень та дані літературних джерел, заповніть табл. 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика збудників харчових токсикозів та токсикоінфекцій

Показники	Бактерії роду сальмонела	Бактерії роду кишкової палички
Форма бактеріальних клітин		
Фарбування за Грамом		
Рухливість		
Наявність спор		
Наявність капсули		
Відношення до кисню		
Температура культивування		
Стійкість до фізичних та хімічних факторів: - високі температури - низькі температури - висушування - рН середовища - наявність солей		

Джерела потрапляння в молоко й молочні продукти		
Основні симптоми (клінічні ознаки)		
Шляхи попередження		

Питання для самоконтролю:

1. Що таке токсикоінфекції? Які мікроорганізми викликають токсикоінфекції через молока й молочні продукти?
2. Які морфологічні особливості основних збудників токсикоінфекцій?
3. Які культуральні особливості збудників токсикоінфекцій?
4. Охарактеризуйте умови вживання збудників токсикоінфекцій в молоці й молочних продуктах.
5. Які збудники токсикоінфекцій відносять до «нових патогенів»? Дайте їх коротку характеристику.

Практичне заняття № 13

Вивчення основних біологічних властивостей збудників харчових токсикоінфекцій та токсикозів.

Мета: ознайомитись з морфологічними та культуральними властивостями основних збудників токсикозів.

Завдання:

1. Чітко визначити шляхи потрапляння збудників харчових токсикозів в молоко й молочні продукти.
2. Вивчити морфологічні властивості основних збудників токсикозів методом мікроскопії готових препаратів.
3. Вивчити культуральні властивості основних збудників токсикозів.
4. Вивчити стійкість збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти, до фізичних та хімічних факторів.

Обладнання та матеріали

Готові фіксовані препарати збудників харчових токсикозів для мікроскопії, мікроскопи, імерсійне масло. Демонстраційні схеми та фото культур збудників харчових токсикозів на різних середовищах.

Довідковий матеріал

Токсикози захворювання людей, що виникають унаслідок споживання продуктів, які містять токсини бактеріального походження. До збудників, що викликають харчові токсикози (інтоксикації), відносять патогенні стафілококи та стрептококи і збудник ботулізму (*Clostridium botulinum*).

Патогенні стафілококи. Стафілококові інтоксикації вважаються найтипівішими бактеріальними токсикозами.

Стафілококи здатні виробляти різні отруйні речовини (летальний токсин, дермонекротоксин, ентеротоксин), ферменти, що беруть участь в

обміні речовин (протеазу, ліпазу, фосфатазу), і ферменти мікробного самозахисту та агресії (коагулазу, фібринолізин, лецитиназу). Порівняно з іншими коками патогенні стафілококи більш стійкі до дії бактерицидних речовин, особливо стійкішими є їхні токсини. Найбільш шкідливим є золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*), але його небезпека для людини не залежить від здатності виділяти пігмент. Причиною токсикозу можуть бути стафілококи як з наявністю пігменту (золотисто-жовтий, лимонно-жовтий), так і без нього (білого кольору). Пігменти, нерозчинні у воді, забарвлюють тільки культуру і не дифундують у живильне середовище. Джерелами і носіями стафілококів є тварини та люди (кишечник, осередки ураження шкіри вим'я, печінки, слизових оболонок та ін.). Молоко й молочні продукти є сприятливим середовищем для продукування стафілококом токсину. Фактично молоко завжди містить певну кількість патогенних мікроорганізмів і є джерелом постійної загрози виникнення стафілококових токсикозів. Джерелом потрапляння стафілококів у молоко й молочні продукти є тварини, хворі на мастит (запалення молочної залози), і люди з гнійничковими ураженнями шкіри.

Морфологія. Стафілококи – це округлої форми мікроорганізми, що розміщуються у вигляді грона винограду, діаметром 0,5–1,5 мкм. Грампозитивні. Вони не мають джгутиків, не утворюють спор. Деякі штами, утворюють капсулу або мікрокапсулу. Це аероби та факультативні анаероби, не вибагливі до живильних середовищ, культивуються за температури 32 – 37 °С, рН середовища 7,2–7,6. На МПА через 12–24 год з'являються округлі колонії білого, лимонно-жовтого або помаранчевого кольору. Стафілококи гинуть при дії теплових режимів, що застосовуються у виробництві молочних продуктів, проте токсини є термостійкими, особливо ентеротоксин, що спричиняє токсикоз.

Патогенні стрептококи досить поширені в природі й швидко та інтенсивно розмножуються в найрізноманітніших харчових продуктах як за кімнатної температури, так і за температури 37 °С, досягаючи максимальної концентрації протягом 24 год.

Морфологія. Ці нерухомі бактерії овальної, сферичної, ланцетоподібної форм, їх діаметр становить 0,5–1,25 мкм, капсул і спор не утворюють. У мазках з харчових продуктів (молочних, м'ясних), уражених органів мають вигляд розташованих попарно коків або складених з них ланцюжків різної довжини, у мазках із культур створюють переважно короткі ланцюжки.

На МПА стрептококи ростуть у вигляді сірувато-білих колоній, у МПБ – ріст виявляється у вигляді пластівців, що осідають на дно пробірки.

Ентерококи відрізняються від інших стрептококів більшою стійкістю: вони здатні рости за температури 10–45 °С, тривалий час переносять низькі температури (–20 °С), стійкі до висихання, мають виражену солестійкість (розмножуються в середовищі з вмістом 17 % кухонної солі і рН 3,0–12,0), витримують нагрівання до 60 °С упродовж 30 хв. Під час нагрівання до 85 °С вони гинуть упродовж 10 хв.

Джерелами зараження харчових продуктів є хворі тварини та люди. Особливу небезпеку представляють корови, уражені маститом. Хвора людина або бактеріоносій, у яких стрептококи можуть знаходитись у носоглотці, або така, яка має розлади шлунково-кишкового тракту, є небезпечним джерелом зараження харчових продуктів.

Клінічні прояви харчового захворювання, спричиненого патогенними стрептококами, малохарактерні, а інкубаційний період триває від 3 до 24 годин. Тривалість захворювання – від кількох годин до 1 доби, рідко – до 3 діб. Ознаки хвороби: нудота, блювання, біль у животі по ходу кишечника, головний біль, температура часто не підвищується, пронос. Одужування настає через 36–40 год. Летальних випадків не зафіксовано.

Збудник ботулізму – це анаеробний споровий мікроорганізм із роду клостридій – *Cl. botulinum*. За токсичністю ботуліністичний токсин перевищує токсин усіх відомих мікробів. Це типовий ґрунтовий анаероб.

Морфологія. *Clostridium botulinum* – це велика паличка, рухлива, має овальну спору, яка своїми розмірами перевищує діаметр бактеріальної клітини (клітина має вид тенісної ракетки), капсулу не утворює, грампозитивна. Збудник ботулізму – чітко виражений анаероб, оптимальна температура росту 28–35 °С при рН середовища 7,2–7,4 од. Добре росте на середовищі Кітта–Тароцці у вигляді помутніння середовища з подальшим випадінням осаду на дно пробірки. Пептонізує молоко. Температурний оптимум для токсиноутворення знаходиться в межах 22–37 °С, за температури нижче 14 °С продукування токсину зупиняється. Оптимальне середовище нейтральне.

Збудник ботулізму досить стійкий до впливу зовнішніх факторів. Спори цих бактерій витримують кип'ятіння упродовж 6 год; за температури 105 °С витримують до 70 хв, 110 °С – 15 хв., 115 °С – 7 хв, і 120 °С – 2 хв; автоклавування руйнує їх через 20 хв; 10 % соляна кислота – через 1 год, 50 % розчин формаліну – через 24 год. Вегетативні форми збудника малостійкі у зовнішньому середовищі і гинуть у разі нагрівання до 80 °С упродовж 15–30 хв.

Однак найхарактернішою ознакою збудника ботулізму є його здатність виробляти в анаеробних умовах токсини великої сили. На протипагу іншим

токсинам, ботуліністичний токсин не руйнується травними ферментами. Температурний оптимум для токсинування становить 21–37 °С, однак є дані, що воно можливе за температури 10 °С. Оптимум рН для утворення токсину 7,0. Нагрівання до 80 °С руйнує різні типи токсинів через 30 хв. (до 60 хв), кип'ятіння – через 10–15 хв. У харчових продуктах, зокрема у консервах, нагрівання до 100 °С іноді не повністю руйнує токсин протягом зазначеного часу, тільки послаблює його дію.

Зовнішній вигляд продуктів, у яких утворився ботуліновий токсин може змінюватися. У них порушується структура тканин, вони розм'якшуються, з'являється неприємний запах, утворюється газ. У герметично закритій тарі виникає бомбаж. Однак відзначаються випадки, коли незважаючи на наявність мікробів ботулізму та їхніх токсинів харчові продукти виглядають доброякісними і бомбаж консервів не спостерігається.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії, зарисувати в робочих зошитах збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 2. Провести спостереження за ростом на живильних середовищах в чашках Петрі збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти
Завдання 3. Використовуючи результати отриманих спостережень та дані літературних джерел, заповніть табл. 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика збудників харчових токсикозів та токсикоінфекцій

	Патогенні стрептококи	Патогенні стафілококи	Збудник ботулізму
Форма бактеріальних клітин			
Фарбування за Грамом			
Рухливість			
Наявність спор			
Наявність капсули			
Відношення до кисню			
Температура культивування			
Стійкість до фізичних та хімічних факторів - високі температури - низькі температури - висушування - рН середовища - наявність солей			
Джерела потрапляння в молоко й молочні продукти			
Основні симптоми (клінічні ознаки)			

Питання для самоконтролю

1. Що таке токсикози? Які мікроорганізми викликають токсикози через молоко й молочні продукти?
2. Які морфологічні особливості основних збудників токсикозів?
3. Які культуральні властивості основних збудників токсикозів?
4. Які харчові токсикози виникають у результаті вживання недоброякісних молочних продуктів?
5. Охарактеризуйте заходи щодо попередження харчових токсикозів.

Практичне заняття № 14**Мікробіологічний контроль матеріалів виробництва.**

Мета: ознайомитись з методами мікробіологічного контролю апаратів та обладнання.

Завдання:

1. Ознайомитись з методами мікробіологічного контролю матеріалів виробництва.

Обладнання та матеріали

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

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

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

Перед тим, як взяти проби, трафарет замочують спиртом, обпалюють і накладають на досліджувану поверхню. Обмежену площу промивають змоченим тампоном, після чого тампон опускають у ту ж пробірку, опускають у воду, що залишилася або в фізіологічний розчин і добре перемішують. Висівають 1 мл змиву на м'ясопептоний агар. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування при 37°C протягом 48 год. Змив можна використати для визначення слизоутворюючих бактерій (лейконостока) висівом на спеціальні середовища. Залишок змивної рідини разом з тампоном висівають в пробірки з поплавками і 5 мл середовища Кесслера, витримують в термостаті при 43 °C протягом 18-24 год.

Використовуючи індикаторний папір, аналіз реєструють через 12 год при 43 °С.

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

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

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

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

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

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

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

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

Цеховий інвентар. Для оцінки миття цехового інвентарю про би

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

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

Питання для самоконтролю:

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

РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

Основні

1. Капрельянц Л. В., Пилипенко Л. М., Єгорова А. В. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. 478 с.
2. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р. Мікробіологія харчових виробництв авчальний посібник. Вінниця: Нова Книга, 2007. 464 с.
3. Приліпко Т.М., Коваль Т.В., Букалова Н.В. Біохімічний і мікробіологічний контроль якості харчових продуктів. Навчальний посібник. Кам'янець-Подільський: Подільський державний аграрно-технічний університет, 2020. 575 с.
4. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: підручник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. 322 с.

Додаткові

5. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р., Поводзинський В.М., Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв. За ред. Т. П. Пирог. Навчальний посібник. Вінниця: Нова книга, 2007. 464 с.
6. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. К.: НУХТ, 2004. 471 с.
7. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. 2009. 360 с.
8. Малигіна В.Д. Мікробіологія та фізіологія харчування. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів I-IV рівня акредитації. К.: Кондор, 2009. 242 с.
9. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. К.: Укрмедкнига. 2004. 392 с.