

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний університет «Чернігівська політехніка»

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт
для здобувачів першого рівня вищої освіти
спеціальності 181 Харчові технології
освітньо-професійної програми «Харчові технології та інженерія»
денної і заочної форм навчання

ЗАТВЕРДЖЕНО
на засіданні кафедри
харчових технологій
протокол № 9 від 22.02.2021 р.

НУ «Чернігівська політехніка» 2021

Технічна мікробіологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для здобувачів першого рівня вищої освіти спеціальності 181 Харчові технології освітньо-професійної програми «Харчові технології та інженерія» денної і заочної форм навчання / Укладачі: І.О. Сероштан, О.Б. Хребтань – Чернігів: НУ «Чернігівська політехніка», 2021. – 104 с.

Укладачі: **Сероштан Ірина Олексіївна**, кандидат ветеринарних наук, старший викладач

Хребтань Олена Борисівна, завідувач кафедри харчових технологій, кандидат технічних наук, доцент

Відповідальний за видання: **Хребтань Олена Борисівна**, завідувач кафедри харчових технологій, кандидат технічних наук, доцент

Рецензент: **Селінний Михайло Михайлович** зав. кафедри аграрних технологій та лісового господарства, кандидат економічних наук, доцент Національного університету «Чернігівська політехніка»

Зміст

Вступ.....	4
План проведення лабораторних занять з курсу з застосуванням модульно-рейтингової системи оцінки знань	5
Лабораторна робота № 1	8
Лабораторна робота № 2	12
Лабораторна робота № 3	20
Лабораторна робота № 4	24
Лабораторна робота № 5	30.
Лабораторна робота № 6	36
Лабораторна робота № 7	48
Лабораторна робота № 8	53
Лабораторна робота № 9	60
Лабораторна робота № 10	74
Лабораторна робота № 11	83
Тестові завдання для підготовки до екзамену з дисципліни «Технічна мікробіологія»	
Рекомендована література.....	101
Додаток А	104

ВСТУП

Метою дисципліни «Технічна мікробіологія» є формування науково-професійного світогляду шляхом оволодіння теоретичними та практичними основами загальної і спеціальної мікробіології, формування наукового світогляду про різноманіття світу мікроорганізмів, їх ролі в природі і господарській діяльності людини; опанування практичних навичок мікробіологічного контролю виробництва харчової галузі та технікою роботи з мікроорганізмами, як технічними так і збудниками аліментарних інфекцій.

Для вірного проведення мікробіологічного контролю на підприємствах харчової галузі здобувачам вищої освіти необхідно освоїти спеціальну методичку досліджень. Це досягається поєднанням теоретичного курсу та лабораторного практикуму, що дозволить краще засвоїти матеріал та ознайомитись з фактичним матеріалом на практиці.

Структура Методичних вказівок з курсу «Технічна мікробіологія» складається з вступу; плану проведення лабораторних робіт з застосуванням модульно-рейтингової системи оцінки знань ЗВО; одинадцяти лабораторних робіт; переліку питань до екзамену; рекомендованої літератури та додатку.

Після оформлення результатів виконання лабораторних робіт, ЗВО захищають ці роботи, отримуючи відповідну кількість балів (критерії оцінювання наведені

Критерієм успішного проходження ЗВО підсумкового оцінювання – екзамену – є досягнення ним мінімальних порогових рівнів оцінок за кожним запланованим результатом навчання з курсу «Технічна мікробіологія».

Мінімальний пороговий рівень оцінки визначено за допомогою якісних критеріїв і трансформовано в мінімальну позитивну оцінку використовуваної числової (рейтингової шкали і дорівнює 60 балам.

Результати поточного контролю за відповідний модуль оприлюднюються викладачем на наступному аудиторному занятті. Бали, які набрані ЗВО під час модульних контролів, складають оцінку поточного контролю.

З тими ЗВО, які до проведення підсумкового семестрового контролю не встигли виконати всі обов'язкові види робіт та мають підсумкову оцінку від 0 до 19 балів (за шкалою оцінювання), проводяться додаткові індивідуальні заняття, за результатами яких визначається, наскільки глибоко засвоєний матеріал, та чи необхідне повторне вивчення дисципліни.

Засобами оцінювання та методами демонстрування результатів навчання з курсу «Технічна мікробіологія» є:

- захист лабораторних робіт;
- реферати;

- презентації результатів лабораторних робіт;
- виконання самостійних завдань на лабораторному обладнанні;
- виконання модульних контрольних робіт.

За результатами захисту лабораторних та контрольних робіт виставляються модульні оцінки. Бали, які набрав ЗВО під час поточного контролю, дораховуються до модульних оцінок. Підсумкові оцінки поточного контролю доводяться до відома студентів до початку сесії.

План проведення лабораторних робіт з курсу «Технічна мікробіологія» з застосуванням модульно-рейтингової системи оцінки знань

Модуль	Теми лабораторних робіт	Вид контролю	Кількість балів	
			За МРС*	Фактично одержана
1	Лабораторна робота № 1 Мікробіологічна лабораторія. Правила поведження і техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії	Захист лаб. роб.	3	
	Лабораторна робота № 2 Будова мікроскопа. Види мікроскопії	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 3 Виготовлення мікроскопічних препаратів. Методи фарбування бактерій. Фарбування бактерій за ГРАМОМ	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 4 Морфологія бактерій. Ознайомлення з формами бактерій. Фарбування капсул, джгутиків, спор	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 5 Дезінфекція. Види, методи та засоби дезінфекції	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 6 Стерилізація. Методи стерилізації. Модульний контроль № 1	Захист лаб. роб.	4 9	
	Лабораторна робота № 7 Органолептика молока і молочних продуктів	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 8 Мікробіологічний аналіз молока і кисломолочних продуктів	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 9 Вивчення біотехнологічних характеристик і методів культивування молочнокислих мікроорганізмів	Захист лаб. роб.	4	
	Лабораторна робота № 10 Поживні середовища для	Захист лаб. роб.	4	

	культивування мікроорганізмів. Методи культивування мікроорганізмів			
2	Лабораторна робота № 11 Дослідження мікрофлори м'яса та м'ясних продуктів бактеріоскопічним методом. Модульний контроль № 2	Захист лаб. роб.	4 8	
	Всього		60	
	Екзамен		40	
	Разом		100	

*МРС - модульно-рейтингова система оцінки знань ЗВО

1 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Тема: МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ. ПРАВИЛА ПОВОДЖЕННЯ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета: вивчити правила поведження у мікробіологічній лабораторії, техніку безпеки, особливості облаштування лабораторії

Матеріали і реактиви: халати, ковпачки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, мікроскопи, імерсійна олія, мікропрепарати, інструкції, Правила поведження у лабораторіях, Правила з техніки безпеки при роботі з електроприладами, хімічними речовинами, мікробіологічними об'єктами.

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- які є види мікробіологічних лабораторій за їх призначенням;
- основні виробничі та допоміжні приміщення для діагностичної мікробіологічної лабораторії;
- правила безпечного поведження у мікробіологічній лабораторії;

Уміти:

- правильно одіти лабораторний спецодяг;
- організувати своє робоче місце;

Хід заняття:

1. Опитування та оцінка засвоєння студентами, відповідного теми лабораторного заняття, лекційного матеріалу.
2. Коротке роз'яснення матеріалу з теми лабораторної роботи.
3. Практичне проведення лабораторної роботи. Ознайомлення із організацією роботи та облаштуванням навчально-дослідної мікробіологічної лабораторії.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ

Мікробіологічна лабораторія – це спеціальна науково-дослідницька або виробничо-діагностична установа, в якій проводять бактеріологічні, вірусологічні, імунологічні, молекулярно-генетичні і біологічні дослідження.

Їх організовують як окремі діагностичні установи або при клінічних лікарнях, туберкульозних диспансерах, санітарно-епідеміологічних станціях, фіто-карантинній службі, а тепер при Державній службі з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів.

Мікробіологічні лабораторії лікувально-профілактичних установ проводять дослідження з метою ранньої діагностики інфекційних хвороб, встановлення чутливості виділених збудників до антибіотиків,

визначення стерильності в операційних кімнатах і встановлення термінів виписки пацієнтів із лікувального закладу тощо. В залежності від призначення мікробіологічні лабораторії поділяють на:

- учбово-дослідні;
- діагностичні (клінічні, санітарно-епідеміологічні, ветеринарні, фіто-карантинні тощо);
- науково-дослідні (лабораторії НД інститутів, закритих об'єктів);
- виробничо-контрольні (біофабрик, фармзаводів, підприємств з випуску біологічної та продовольчої продукції).

Сучасна мікробіологічна лабораторія - це комплекс приміщень, обладнання та приладів, які забезпечують роботу з культурами мікроорганізмів. До її складу входять основні виробничі кімнати, зокрема:

1. **Кімната підготовки проб**, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів.

2. Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – **бокс**. Іноді такий бокс може замінювати ламінарний бокс – сучасний прилад, що забезпечує стерильні умови для роботи з чистими культурами

3. **Автоклавна** – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та живильних середовищ у спеціальних приладах – автоклавах. На один автоклав повинно бути 7,5 м² площі автоклавної кімнати.

4. **Мийна кімната**, в якій крім мийки повинна бути сушка для вимитого посуду, сушильна шафа для стерилізації посуду сухим жаром, шафи для зберігання стерильного посуду.

5. **Додаткові приміщення**, якими може бути облаштована мікробіологічна лабораторія, включатимуть:

- **складські приміщення, віварій** – приміщення для утримання лабораторних піддослідних тварин (білі миші, білі щури, морські свинки, кролі та ін.);
- **ізолятор** – приміщення для утримання лабораторних тварин, на яких проводяться досліди.

Усі приміщення мають бути добре освітлені та вентилязовані; стіни на висоті до 170см від підлоги - пофарбовані олійною фарбою або викладені плиткою (для вологого прибирання із застосуванням дезінфікуючих розчинів).

Лабораторне приміщення обладнане шафами, де зберігаються апаратура і реактиви, термостатом для вирощування мікроорганізмів і лабораторними столами, покритими термо- і хімічно стійким матеріалом, лабораторними стільцями.

На лабораторних столах до кожного робочого місця має бути підведено електроенергію, газ і встановлені спеціальні газові пальники або спиртівки.

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного

функціонування лабораторії мікробіологічного профілю:

- **автоклав** (прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів);
- **сухо-жарова шафа** (прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду);
- **термостат** (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу);
- **мікроанаеростат** (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів);
- **ламінарний бокс** (прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів);
- **водяна баня**;
- **люміностантна камера** для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів;
- **терези**;
- **електричні шейкери**;
- **лабораторний посуд**: мікробіологічні пробірки, колби, циліндри різної форми й об'єму, піпетки різного об'єму, чашки Петрі, скляні лійки, предметні скельця з лункою та без - весь цей посуд повинен бути виготовлений з термостійкого скла, оскільки він підлягає нагріванню;
- **лабораторне приладдя**: бактеріальні петлі, голки, шпателі металеві і скляні; ватно-марлеві та гумові пробки; засоби для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо). Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

У мікробіологічній лабораторії навчального закладу заборонено працювати з патогенними мікроорганізмами I—III класів патогенності, робота з якими вимагає відповідної кваліфікації і дотримання строгих правил безпеки. Такі роботи виконуються у спеціалізованих мікробіологічних лабораторіях різного профілю. Однак під час виконання більшості лабораторних робіт студенти працюють з живими мікроорганізмами, виділеними з об'єктів довкілля, або з музейними культурами. Робота з ними теж вимагає дотримання строгих правил безпеки поводження з культурами мікроорганізмів.

ЗАВДАННЯ 1 ПРАВИЛА ПОВОДЖЕННЯ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. У лабораторію заборонено входити у верхньому одязі та класти на лабораторні столи сумки й інші особисті речі, які можуть заважати роботі.

2. У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.
3. У лабораторії категорично заборонено споживати їжу, пити воду, палити.
4. **Будь-який матеріал, що потрапляє у лабораторію розглядається як потенційно інфікований.**
5. Робоче місце має бути обладнане всім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок з культурами, бактеріологічною петлею тощо. **За справність приладів несе відповідальність ЗВО.**
6. Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет, пастерівські піпетки (пастерки), необхідно фламбувати або поміщати у дезінфекційну рідину.
7. У разі потрапляння досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл необхідно негайно повідомити про це викладача і під його контролем провести дезінфекцію.
8. Усі живі мікропрепарати після мікроскопування, а також піпетки і шпателі, якими користувалися, необхідно занурити у склянку з дезінфекційною рідиною (2%-ний розчин хлораміну або ін.).
9. Після закінчення роботи засіяні чашки та пробірки поставити в термостат, культури мікробів і залишки дослідного матеріалу ставлять у холодильник або знешкоджують. Всі використані матеріали (інфіковані рослини, труп тварин, використані культури мікробів та ін.) спалюють або знешкоджують стерилізацією в автоклаві. Цю роботу проводять співробітники лабораторії.
10. Проводити вологе прибирання і періодичну дезінфекцію робочих приміщень, стерилізацію обладнання.
11. Після закінчення занять необхідно навести порядок на робочому місці.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання:

1. Як можна охарактеризувати сучасну мікробіологічну лабораторію?
2. Як поділяються мікробіологічні лабораторії за призначенням?
3. З яких основних виробничих кімнат складається діагностична мікробіологічна лабораторія?
4. Яке призначення кімнати пробо підготовки?
5. Яке призначення боксу у мікробіологічній лабораторії?
6. Які операції проводять в автоклавній?
7. Для чого призначений віварій?
8. Для чого призначений ізолятор?
9. Як повинні бути об лаштовані основні виробничі кімнати

- мікробіологічних лабораторій?
10. Назвіть порядок одягання спецодягу і притуплення до роботи.
 11. Що категорично заборонено робити у мікробіологічній лабораторії?
 12. Як слід поступити із живими мікропрепаратами?
 13. Перелічіть основні правила поведження у мікробіологічних лабораторіях.
 14. Як поступають із інструментами, які використовувалися для роботи із живими культурами?
 15. Назвіть основні прилади та обладнання мікробіологічної лабораторії.

2 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Тема: БУДОВА МІКРОСКОПА. ВИДИ МІКРОСКОПІЇ

Мета: вивчити будову мікроскопа, його основні вузли та деталі, навчитися характеризувати види мікроскопії.

Матеріали і реактиви: халати, ковпачки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, мікроскопи, імерсійна олія, мікропрепарати, інструкції, мікроскопи марки «Біолам», «Біолар», люмінесцентний мікроскоп марки МЛ-3, мікроскопи із конденсором темного поля і фазово-контрастним пристроєм.

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- будову мікроскопа;
- основні види мікроскопії.

Уміти:

- вміти налаштувати мікроскоп для мікроскопії препаратів.

Хід заняття:

1. Опитування та оцінка засвоєння студентами матеріалу попередньої лабораторної роботи.
2. Коротке роз'яснення матеріалу по темі лабораторної роботи.
3. Практичне проведення лабораторної роботи.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1. БУДОВА МІКРОСКОПА

Серед різноманітних приладів, що використовуються в практиці мікробіологічних досліджень, найважливіше місце належить мікроскопу.

Мікроскоп – це прилад з певним розташуванням лінз у ньому, за

допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні й тисячі разів. Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об'єкти у світлі, що проходить через лінзи, називаються світловими або біологічними (рисунок 2.1).

Мікроскоп має механічну та оптичну системи. У механічній системі основними частинами є прямокутна основа (штатив), коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик, тубус тримач з макро- і мікро гвинтом, тубус, револьвер з отворами для об'єктивів

Оптична система, складається з об'єктивів, окулярів та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач). Основною частиною оптичної системи є об'єктив, що характеризує основні якості мікроскопа: власне збільшення, роздільну здатність і чіткість зображення. Об'єктив - це система лінз у металевій оправі. Передня, найголовніша лінза об'єктива, називається фронтальною. Вона дає зображення об'єкта, що розглядається, із сферичною хроматичною аберациями. Останні усуваються розміщеними вище в об'єктиві корегуючими лінзами. В об'єктивах планахроматах і планapoхроматах сферична і хроматична аберация є виправленими.

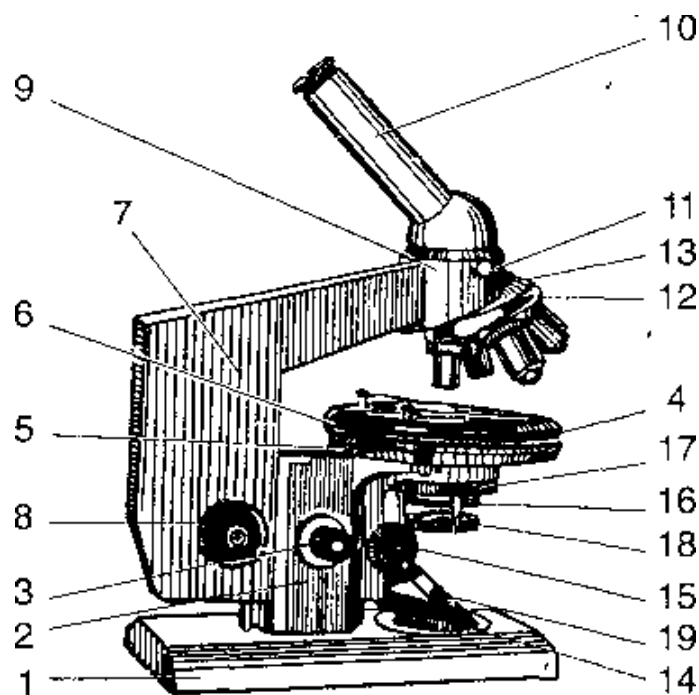


Рисунок 2.1 – Будова біологічного мікроскопу серії «БИОЛАМ»
(А - МБР-1; Б - МБР-3):

7. основа; 2. коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3. рукоятка мікрогвинта; 4. предметний столик; 5. гвинт для фіксування диска предметного столика; 6. регулювальні гвинти; 7. тубусотримач; 8.

рукоятка макрогвинта; 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

Розрізняють сухі та імерсійні об'єктиви. У сухому об'єктиві між фронтальною лінзою і об'єктом міститься повітря. Найчастіше користуються сухими об'єктивами при збільшенні досліджуваного об'єкта від 56 до 600 разів. Імерсійні (ОИ-90 або МИ-90) об'єктиви застосовують при вивченні дуже дрібних об'єктів (бактерій, грибів тощо). В імерсійних об'єктивах між фронтальною лінзою і досліджуваним об'єктом міститься крапля імерсійної олії, найчастіше кедрової. У цій однорідній системі промені світла не заломлюються, а потрапляють в об'єктив, не змінюючи свого напрямку, оскільки показники заломлення скла і кедрової олії майже однакові: 1,52 і 1,51 відповідно.

До оптичної системи мікроскопа також належить окуляр, який складається з двох плоско-опуклих лінз: верхньої очної і нижньої - збірної. Очна лінза збільшує дійсне зображення, одержане об'єктивом, подібно до звичайної лупи. Цифри на металевій оправі окуляра ($\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$, $\times 20$) вказують на його власне збільшення.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива помноженому на збільшення окуляра. Наприклад, при використанні окуляра $\times 15$ і об'єктива $\times 90$ матимемо збільшення зображення у 1350 разів.

Основними складовими частинами освітлювального пристрою, розміщеного під предметним столиком, є конденсор і дзеркало. Конденсор складається з двох лінз у металевій оправі та ірисової діафрагми. Він призначений для збирання пучка світла від дзеркала. Дзеркало має плоску і вгнуту поверхні. Воно спрямовує пучок променів на об'єкт, що досліджується. При денному освітленні користуються плоскою стороною дзеркала, при штучному освітленні (а також при відсутності конденсора) - вгнутою.

Оптичні якості мікроскопа визначаються такими основними показниками: власним збільшенням, роздільною здатністю і чіткістю зображення. Власне збільшення мікроскопа перебуває в оберненій залежності від фокусної відстані фронтальної лінзи об'єктива: чим більшою є фокусна відстань, тим меншим є збільшення фронтальної лінзи.

Роздільна здатність мікроскопа - це здатність об'єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих на препараті точок. Іншими словами це та мінімальна відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об'єкт можна побачити. Роздільна здатність мікроскопа є тим більшою, чим вищою є нумерична апертура об'єктива.

Чіткість зображення об'єкта під мікроскопом утворюється при

загальному збільшенні об'єктива та окуляра, яке не перевищує нумеричну апертуру більш ніж у 500 разів. Чіткість зображення залежить від ступеня усунення в об'єктиві явищ сферичної і хроматичної аберацій. З цією метою використовують планахроматичні і планapoхроматичні об'єктиви.

ЗАВДАННЯ 1 ВИВЧЕННЯ ВИДІВ МІКРОСКОПІЇ

Сьогодні існують такі види мікроскопії:

1. Світлова.
2. В темному полі зору.
3. Фазово-контрастна.
4. Люмінесцентна.
5. Електронна.

1. СВІТЛОВА МІКРОСКОПІЯ була розглянута в теоретичній частині лабораторної роботи.

2. МІКРОСКОПІЯ В ТЕМНОМУ ПОЛІ ЗОРУ

Цей метод застосовують для дослідження частинок, які є невидимі або погано розрізняються при спостереженні у світлому полі. В основі методу лежить явище Тіндаля - освітлення об'єкта косими променями світла. При вивченні живих мікроорганізмів у темному полі зору препарат розміщують на предметному столику і фокусують об'єктивом $\times 10$. Потім звичайний конденсор замінюють на темнопольний.

Наступна операція - регулювання освітлення. Для цього встановлюють освітлювач ОИ-19 на відстані 25 см від дзеркала перпендикулярно до його площини і закривають діафрагму. Повертаючи дзеркало, спрямовують світло на лінзу конденсора. При правильному освітленні на поверхні лінзи конденсора утворюється світле кільце. Після цього препарат відсувають убік і наносять на верхню лінзу конденсора краплю води або імерсійної олії, яка заповнює простір між конденсором і предметним склом. Злегка опускають конденсор і повертають препарат на попереднє місце. Піднімають конденсор угору до стикання краплі води (олії) з предметним склом. Дивлячись в окуляр, додатково центрують конденсор, тобто переводять темну пляму на препараті в центр поля зору. Обережно піднімають або опускають конденсор доти, поки не зникне темна пляма.

Після цього переводять револьвер мікроскопа на середнє збільшення і вивчають досліджуваний об'єкт. Цей метод особливо придатний для вивчення функціонально-морфологічних властивостей великих мікробів типу дріжджів, лептоспир тощо.

3. ФАЗОВО-КОПТРАСТНА МІКРОСКОПІЯ (ФКМ)

Клітини мікроорганізмів мало відрізняються за своїм забарвленням і прозорістю від навколишнього середовища. Тому, щоб дістати чітке

зображення прозорих і безбарвних об'єктів, у мікробіологічній практиці найчастіше застосовують метод фазово-контрастної мікроскопії.

Суть його полягає в тому, що за допомогою спеціальних пристроїв фазові коливання, які виникають при проходженні променів через ділянки об'єкта з різною оптичною щільністю, штучно перетворюються на амплітудні, внаслідок чого фазові ділянки стають контрастними і видимими. Можна застосовувати звичайний біологічний мікроскоп з фазово-контрастним пристроєм (КФ-4), що складається з набору спеціальних фазових об'єктивів і конденсорів з кільцевими діафрагмами та допоміжного мікроскопа - оптичного пристрою, який розміщують у тубусі мікроскопа замість окуляра для фазового контрастування.

Оправу фазових об'єктивів помічено буквою «Ф». Техніка ФКМ така:

1. Замість-звичайного об'єктива в револьвер укручують фазово-контрастний (×40 Ф).

2. Замінюють звичайний конденсор на фазово-контрастний. Диск револьвера конденсора встановлюють у положенні «0», при цьому діафрагма конденсора має бути відкритою.

3. На предметному столику розміщують досліджуваний мікропрепарат.

4. Настроюють освітлення за Келлером, користуючись об'єктивом малого збільшення ×10 Ф.

5. Замінюють окуляр на допоміжний мікроскоп і, переміщуючи його тубус, фокусують фазове кільце об'єктива.

6. Обертаючи диск револьвера конденсора, відкривають діафрагму, що відповідає об'єктиву ×40 Ф. При спостереженні через допоміжний мікроскоп у полі зору має бути видно два кільця (темне і світле). Темне кільце - проекція фазової пластинки, світле - кільцевої діафрагми.

7. За допомогою центрувальних гвинтів конденсора поєднують зображення обох кілець.

8. Виймають допоміжний мікроскоп, а на його місце вставляють окуляр. Препарат фокусують і вивчають.

Фазово-контрастну мікроскопію найчастіше застосовують для дослідження живих клітин мікроорганізмів, контрастність яких досягається оптичним шляхом без втручання у фізіологічні процеси досліджуваних об'єктів.

4. ЛЮМІНЕСЦЕНТНА МІКРОСКОПІЯ

Цей метод набув широкого застосування в науково-дослідних і навчальних мікробіологічних лабораторіях, оскільки він дає змогу вивчати морфологію живих і мертвих клітин мікробів як у поживних середовищах, так і в тканинах тварин. У разі використання люмінесцентної мікроскопії виявляти і досліджувати клітинні мікроструктури вдається завдяки

вибірковому поглинанню ними різних флуорохромів. Перевагою цього методу перед звичайною мікроскопією є й те, що зображення водночас є контрастним і кольоровим.

Суть методу стане ясною, коли згадати, що таке флуоресценція. Відомо, що окремі речовини мають здатність світитися під впливом променів світла, які падають на них. Це явище дістало назву люмінесценції або флуоресценції. Пояснюється воно тим, що частина енергії променів, які потрапляють на об'єкт, поглинається, а випромінювані об'єктом промені мають більшу довжину хвилі.

Люмінесценція буває первинною і вторинною.

Первинна зумовлена речовинами самою об'єкта, які здатні при освітленні короткохвильовими променями відсвічувати. У цьому випадку клітини відсвічують жовто-зеленим або оранжевим світлом.

Вторинна флуоресценція виникає внаслідок спеціальної обробки об'єктів речовинами, які мають здатність випромінювати. Ці речовини називаються **флуорохромами** (акредин жовтий і оранжевий, аурамінон, примулін, тіофлавін, хінон та інші).

У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують люмінесцентні мікроскопи марки МЛ-2, МЛ-3 або більш сучасні (рисунок 2.2).

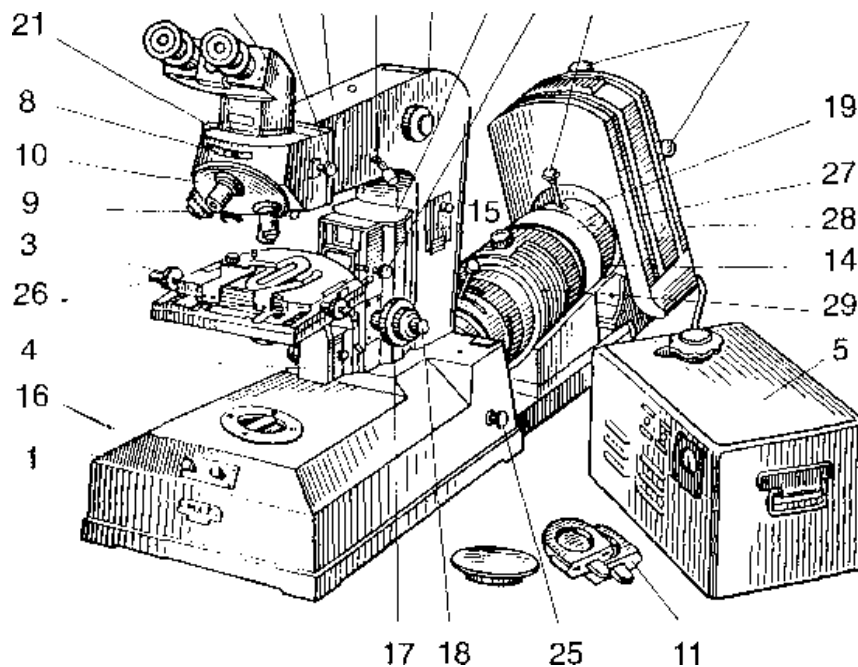


Рисунок 2.2 – Будова люмінесцентного мікроскопу МЛ-2

1. основа мікроскопа; 2. тубусотримач; 3. предметний столик; 4. кронштейн із конденсором; 5. електропульт ПРЛ-5; 6. рукоятка польової діафрагми; 7. рукоятка для перемикання освітлення; 8. револьверний диск із «запираючими» світлофільтрами; 9. рукоятка вмикання ахроматичної лінзи; 10. револьвер об'єктивів; 11. світлофільтри в оправках; 12. гвинти для центрування лампи; 13. рукоятка для переміщення колектора; 14. рукоятка польової діафрагми; 15. кришка гнізда світлофільтрів; 16. гвинти

для центрування польової діафрагми; 17. макрометричний гвинт; 18. мікрометричний гвинт; 19. оправа колектора; 20. коробка з механізмами грубого і тонкого переміщення препарату; 21. гвинт для закріплення насадки; 22. гвинти для центрування польової діафрагми; 23. біноклярна насадка; 24. рукоятка гальмування грубого руху; 25. рукоятка для перемикання освітлення; 26. рукоятка для переміщення препарату в горизонтальній площині; 27. захисна втулка; 28. корпус ртутної лампи; 29. кювета з дистильованою водою.

Техніка роботи з мікроскопами марки МЛ-2 і 3

1. Підключають блок живлення мікроскопа до електричної мережі.
2. Повертаючи за годинниковою стрілкою, встановлюють рукоятку регулятора напруги біля червоної крапки.
3. Тумблер на лицевому боці блоку живлення переводять у положення «ВКЛ» і вмикають кнопкою лампу мікроскопа. Якщо лампа не ввімкнеться, необхідно повернути рукоятку регулятора напруги на кілька міліметрів за годинниковою стрілкою і знову натиснути кнопку.
4. Установити рукоятку регулятора робочого струму на позначці 4А.
5. Через 10 хв. після вмикання мікроскопа починають вивчати досліджуваний об'єкт.
6. Лабораторія, в якій встановлено люмінесцентні мікроскопи, має бути обладнана вентиляційною установкою і затемненням.
7. Для люмінесцентної мікроскопії виготовляють препарати «роздушена крапля» або препарати-мазки, які обробляються спеціальними флуорохромами.
8. При роботі з імерсійними об'єктивами використовують нефлуоресціюючу олію або диметилфталат.

5. ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

Для дослідження найтонших структур мікробних клітин, вірусів використовують електронні мікроскопи, за допомогою яких можна отримати зображення досліджуваних об'єктів у мільйон і більше разів.

В електронних мікроскопах світлові промені, замінює струмів електронів, який при відповідних прискореннях має довжину хвилі майже в сто тисяч разів коротшу від довжини хвилі денного світла.

Для біологічних досліджень широко застосовують *просвічуючий (трансмісійний) електронний мікроскоп*. Електрони в ньому рухаються так, як і промені світла в світловому мікроскопі. Крім трансмісійних, використовують також *скануючі (растрові) електронні мікроскопи*, які дають об'ємне рельєфне зображення досліджуваного об'єкта.

Електронний мікроскоп складається з таких основних частин (рисунок 2.3): а) електронної-пушки (джерело електронів); б) електромагнітних котушок, які виконують роль конденсорної, об'єктивної і проєкційної лінз; в) предметного столика, екрана для зображення; г) окуляра; д) вакуумного насоса, оскільки рух електронів можливий тільки у вакуумі. При роботі з електронними мікроскопами необхідно суворо дотримуватися встановлених правил техніки безпеки.

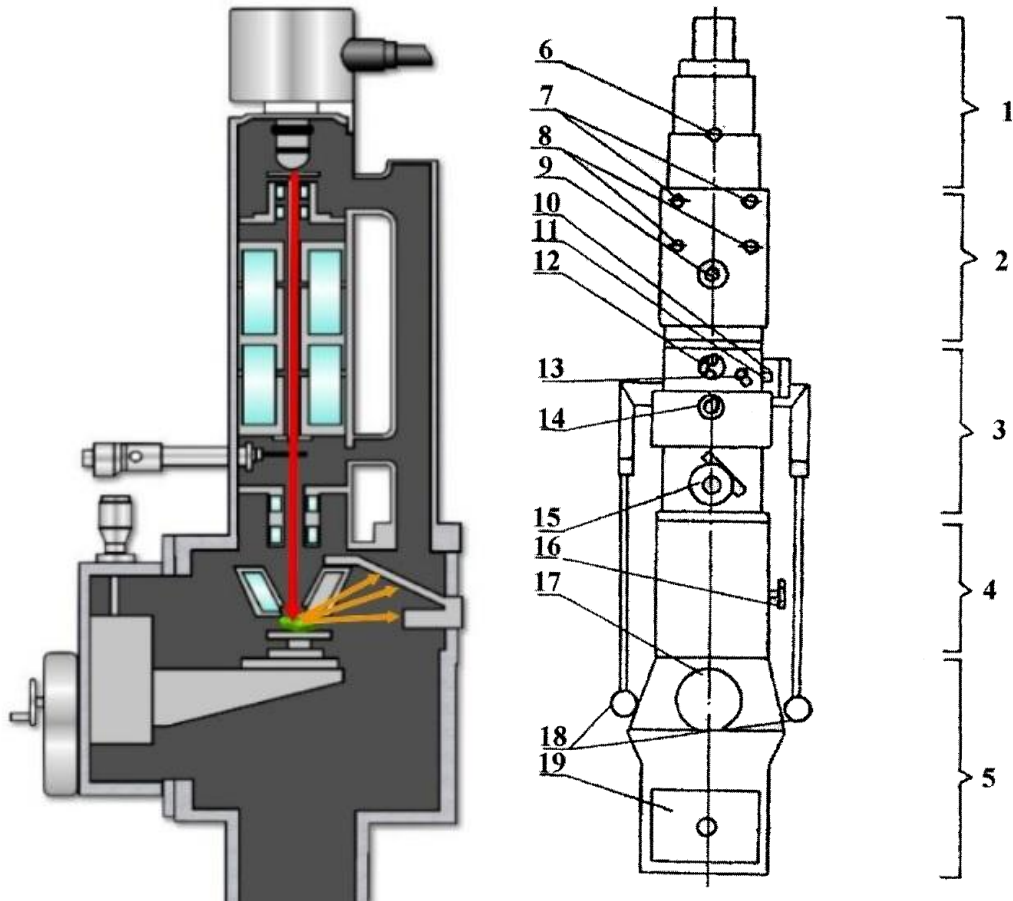


Рисунок 2.3 - Будова колони електронного мікроскопа УЭМВ-100К

1. електронна пушка; 2. блок конденсорних лінз; 3. об'єктивна лінза; 4. проєкційний блок; 5. тубус з фотокамерою; 6. гвинт переміщення електронної пушки; 7. гвинти переміщення першої конденсорної лінзи; 8. гвинти переміщення другої конденсорної лінзи, 9. діафрагма другого конденсора; 10. механізм установки утримувача об'єктів в шлюзовий пристрій; 11. клапан відкачки шлюзового пристрою; 12. механізм керування гоніометром; 13. ручка заглушки шлюзової камери; 14. апертурна діафрагма; 15. механізм мікродифракції; 16. маховик; 17. оглядове вікно; 18. ручки керування столиком об'єктів; 19. люк фотокамери.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання:

1. Які види мікроскопії відомі Вам?
2. Що входить до складу механічної системи світлового мікроскопа?
3. Що входить до складу оптичної системи світлового мікроскопа?
4. Як налаштувати роботу світлового мікроскопа?
5. Як визначається величина збільшення мікроскопа?
6. Що собою являє темнопольна мікроскопія?
7. У яких випадках застосовують темнопольну мікроскопію?
8. Що собою являє фазово-контрастна мікроскопія?
9. У яких випадках застосовують фазово-контрастну мікроскопію?
10. Що собою являє люмінесцентна мікроскопія?
11. Що собою являє первинна і вторинна люмінесценція?
12. Що таке «флуорхромі»? Назвіть найбільш використовувані з них.
13. В яких випадках застосовують люмінесцентну мікроскопію??
14. Що собою являє електронна мікроскопія і у яких випадках її застосовують?

3 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Тема: ВИГОТОВЛЕННЯ МІКРОСКОПІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ. МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ЗА ГРАМОМ

Мета: вивчення особливостей виготовлення мікроскопічних препаратів, придбання практичних навичок фарбування бактерій за Грамом

Матеріали і реактиви: халати, ковпачки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, мікроскопи, імерсійна олія, предметні та накривні скельця, пастерівські піпетки, бактеріологічні петлі, спиртівки, препарувальні голки, розчин фарб метиленової синьки, фуксину тощо, сінна настойка та мікробні культури, дезінфекційні розчини.

Для виготовлення фіксованих, а також живих мікропрепаратів («висяча крапля»), («роздушена крапля» тощо) зазвичай користуються культурами сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus*), які виготовляють за кілька днів до заняття.

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- які є види мікроскопічних препаратів;
- як є методи фарбування мікроскопічних препаратів;
- що лежить в основі поділу мікробів на грампозитивні і грамнегативні;
- правила з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів.

Уміти:

- виготовити мікроскопічні препарати для розгляду живих культур;
- виготовити мікроскопічні препарати для розгляду вбитих культур;
- провести просте фарбування мікроскопічних препаратів;
- провести фарбування мікроскопічних препаратів за Грамом;

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися певних **правил з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів**, а саме:

- не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
- відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
- під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними;
- відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати над полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором вверх;
- під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
- скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника;
- залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
- після закінчення роботи ватую, змоченою 70° етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

Об'єктами досліджень у мікробіології є еубактерії, ціанобактерії, актиноміцети, дріжджі, цільові гриби, деякі найпростіші. Найчисельнішу групу мікробів становлять бактерії. Це переважно одноклітинні прокаріоти. Вивчення основних форм еубактерії, актиноміцетів, дріжджів і цвільових грибів проводять на живих або фіксованих (вбитих) мікропрепаратах а допомогою імерсійної системи мікроскопа.

Мікроскопічні препарати бувають двох видів:

1. **Живі (нативні)** у вигляді препаратів: 1.1. «Висяча крапля» і 1.2. «Роздушена крапля»;

2. Фіксовані або вбиті.

1. **Вивчення мікроорганізмів у живому стані** найчастіше проводять на мікроскопічних препаратах «Роздушена крапля» або «Висяча крапля».

2. **Вивчення мікроорганізмів у фіксованому стані** проводять під імерсійним збільшенням мікроскопа на мікропрепаратах, які готують у такій послідовності :

- виготовлення мазка культури або мазка-відбитка;
- підсушування мазка до повітряного сухого стану;
- фіксація мазка, яку здійснюють високою температурою (на

полум'ї спиртівки або газового пальника) або хімічними речовинами (метанолом, етанолом, ацетоном, спирт-ефіром та іншими речовинами); **фіксацією мазка досягаємо**: а) знезараження бактерій; б) денатурації білку бактерій, що полегшує сприймання бактеріальною клітиною барвників; в) кращого прилипання мікробів до поверхні предметного скла.

– фарбування, яке може бути простим, коли застосовують лише один барвник, і складним, коли застосовують два і більше барвників (фарбування бактерій за Грамом, мікобактерій за Ціль-Нільсенем, спор за Пешковим і т.д.);

- промивання;
- підсушування;
- розглядання під великим збільшенням мікроскопа.

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 датським вченим Г. Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні), а інші бактерії забарвлюються у червоний або рожевий колір (грамнегативні).

Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового фіолетового барвника (генціанвіолет) з йодом після обробки мазка спиртом утримується клітинними покривами одних бактерій і вимивається з покривів інших. Для визначення цієї здатності необхідно використовувати додатковий барвник, яким обрано контрастний – червоний (фуксин).

Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синє-фіолетовий колір відображає **фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів**. Після проникнення у клітину розчинна хлорна форма генціанвіолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає в осад. При цьому цитоплазма клітини забарвлюється у синьо-фіолетовий колір. Наступна обробка препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) екстрагує ліпіди із цитоплазматичної мембрани, що призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціанвіолет-йод.

Тому прокаріоти, у яких клітинна стінка складається із моношару муреїну із крупними порами, клітини втрачають комплекс генціанвіолет-йод і забарвлюються у червоний колір, **тобто негативно за Грамом**.

Прокаріоти, у яких клітинна стінка має багатошаровий малопористий муреїновий шар, комплекс генціанвіолет-йод не вимивається після обробки спиртом, а тому вони зберігають синьо-фіолетовий колір, тобто забарвлюються у **грампозитивно**.

ХІД РОБОТИ

1. Виготовлення мікропрепарату «Роздушена крапля»

На чисте знежирене скло наносять 18-годинну культуру *Bac. mesentericus* або краплю огіркового розсолу або крапельку суспензії іншої досліджуваної культури.

Накривають покривним скельцем; надлишок рідини збирають фільтрувальним папером і розглядають під об'єктивом $\times 40$.

2. Виготовлення мікропрепарату «Висяча крапля»

На покривне скельце наносять краплю досліджуваної культури. Краї ямки на предметному склі змазують вазеліном або якоюсь олією (можна імерсійною). Предметне скло обережно накладають на покривне скельце таким чином, щоб крапля досліджуваної культури розмістилася по центру ямки предметного скла, але не торкалася країв ямки. Предметне скло із прикріпленим до нього покривним скельцем обережно перевертають, кладуть на предметний столик мікроскопа, наносять краплю імерсійної олії на покривне скельце і розглядають під імерсійним об'єктивом.

3. Простий метод фарбування мікропрепаратів

Готують мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушують, фіксують у полум'ї пальника та забарвити наносять розчин *метиленової синьки* (час контакту з клітинами – 3–5 хв.), промивають водою і розглядають під імерсійним об'єктивом.

Можна використати інші барвники, наприклад *фарбу Ребігера*, яка являє собою розчин генціанвіолету у формаліні. Для фарбування цією фарбою не потрібно фіксувати препарат, а просто після висихання його, нанести фарбу на 15–20сек. І добре промити водою.

4. Фарбування мікропрепаратів за Грамом

На зафіксований мікропрепарат кладуть фільтрувальний папір і на нього наносять генціановий фіолетовий барвник так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла, легко натиснути на папір пінцетом. Через 2 хв. папір знімають і на препарат наносять розчин Люголя на 2 хв.

Розчин Люголя зливають й обробляють препарат 96° етиловим спиртом – 30–60 секунд або йодований спирт – на 2 хв.

Препарат промивають до чистої води і дофарбувати фуксином протягом 2 хв.

Барвник змивають водою, препарати висушують та мікроскопують під імерсійним об'єктивом.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання:

1. Перелічіть основні правила з техніки безпеки при роботі із живими культурами мікроорганізмів (на це питання відповідають усі ЗВО!)
2. Які є види мікроскопічних препаратів?
3. Розкажіть хід виготовлення препарату «Роздушена крапля».

4. Розкажіть хід виготовлення препарату «Висяча крапля».
5. Перелічіть основні операції з виготовлення мікропрепаратів для вивчення мікроорганізмів у фіксованому стані.
6. Що ми досягаємо, фіксуючи мікропрепарати?
7. В чому полягає відмінність у фарбуванні мікробів простим і складним методом?
8. Наведіть приклади простого і складного методів фарбування.
9. В чому полягає суть поділу бактерій на грампозитивні та грамнегативні?
10. В чому полягає суть фарбування прокаріотів за Грамом?
11. Чому прокаріоти із моношаром муреїну фарбуються грамнегативно?
12. Які прокаріоти фарбуються грампозитивно?
13. Розкажіть хід фарбування мікробів за Грамом.

4 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема: МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ФОРМАМИ БАКТЕРІЙ.

ФАРБУВАННЯ КАПСУЛ, ДЖГУТИКІВ, СПОР

Мета: навчитися розпізнавати основні форми бактерій, вивчити будову капсул і спор бактерій.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметі та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; спиртівки; препарувальні голки; кедрова олія; розчини фарб – карболового генціанвіолету, метиленової синьки, фуксину, розчин Люголя тощо; мікробні культури; фільтрувальний папір; промивалки з дистильованою водою; спирт 1 %-й розчин H_2SO_4 ; сінний настій; культури азотобактера і клостридіума; розведені дріжджі.

Для виготовлення фіксованих, а також живих мікропрепаратів («Висяча крапля»), («Роздушена крапля» тощо) зазвичай користуються культурами сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus*), які виготовляють за кілька днів до занять.

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- основні форми бактерій;
- будову і роль капсул бактерій;
- роль і розташування джгутиків бактерій;
- будову, розташування і роль спор бактерій.

Уміти:

- фарбувати і виявляти капсули, джгутики, нуклеоїд і спори бактерій.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Форми прокариот. Три основні форми бактеріальної клітини: кулясту, паличкоподібну та звивисту описав у XVII столітті Антоній Ван Левенгук.

За теперішніх часів відомі наступні форми бактеріальної клітини:

1. Кулясті (коки) розподіляються на *мікрококи* (після розподілу розходяться, агрегацій не утворюють), *диплококи* (з'єднані попарно), *тетракоки* (з'єднані по 4), *стрептококи* (утворюють ланцюжки різної довжини), *стафілококи* (утворюють агрегації у вигляді виноградного грона) та *сарцини* (утворюють пакети з 8-16-32 клітин);

2. Паличкоподібні (циліндричні) - довжина клітини у кілька разів перевищує ширину, можуть мати загострену, закруглену, зрізану форму закінчень клітини, розподіляються на бактерії (не утворюють спор) і бацили (утворюють ендоспори), які можуть з'єднуватися попарно (диплобактерії, диплобацили) або утворювати ланцюжки різної довжини (стрептобактерії, стрептобацили);

3. Звивисті розподіляються на *вібріони* (мають вигляд коми), *спірили* (клітини мають 1-6 завитків), *спірохети* (мають більше 6 завитків);

4. Бактерії, які мають «незвичайну» форму клітини: *тороїдні* (форма зімкнутого або розімкнутого кільця); *простекобактерії* (мають вирости клітини); *зіркоподібні, трикутні, квадратні*. Також до незвичайних форм бактеріальних клітин можна віднести *стебельцеві* бактерії (рід *Caulobacter*), або *бактероїди* групи *Rhizobium* - V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

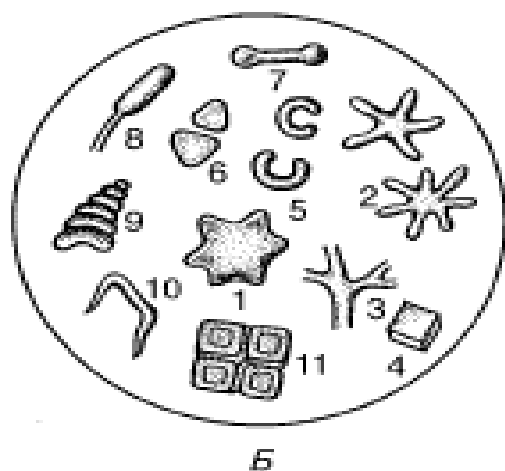
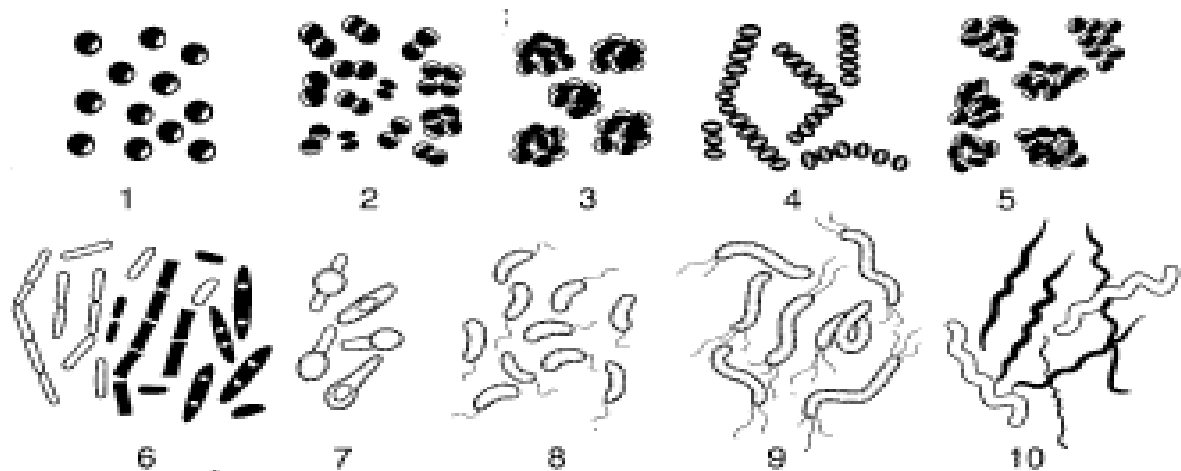


Рис. 17

Основні (А) та нові (Б) форми бактерій:
 А: 1 — монококи; 2 — дипло- та тетракоки; 3 — сарцини; 4 — стрептококи; 5 — стафілококи; 6, 7 — паличкоподібні бактерій; 8 — вібріони; 9 — спірили; 10 — спірохети; Б: 1 — бактерій, подібні до шестикутної зірки; 2 — бактерій, які утворюють вирости (простеки); 3 — бактерій, які галузяться; 4 — пластинчасті клітини археобактерій; 5 — тороїди; 6 — трикутні; 7 — голтельоподібні бактерій; 8 — ступенчасті бактерій; 9 — трихоми нециліндричні; 10 — червоподібні бактерій; 11 — клітини, з'єднані в пластинки

Рисунок 4.1 – Зовнішній вид основних та нових форм бактерій

Капсулоутворення. Низка видів бактерій утворюють слизисті капсули, які на 98 % складаються із води, а решта 2 % – полімерні сполуки – гомополісахариди, гетерополісахариди, екзополіпептиди. Капсули відіграють захисну роль, зокрема від висихання, від проникнення токсичних речовин і солей важких металів, від фагоцитозу (в організмі); з капсульних полісахаридів виготовляють плазму крові, плівки мікробної целюлози, сефадекси.

Для виявлення капсул застосовують різні методи, зокрема метод Бурі, метод Омелянського та низку інших.

Рух бактерій: бактеріальні джгутики, плаваючий і ковзний рух

Бактерії розподіляються на *рухомі* (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і *нерухомі* (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*).

До руху здатні бактерії, що мають джгутики (плаваючий рух) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (ковзний тип руху). Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур - нитки, крюка та базального тільця. Нитка джгутика виступає над поверхнею бактеріальної клітини, далі біля поверхні клітини вона приєднується до

крюка, який з'єднується з базальним тільцем, що повністю занурене в клітинні покриви та частково - у цитоплазму.

За характером розташування джгутиків бактерії поділяють на:

– **монотрихи** – бактерії з одним джгутиком на кінці (синьогнійна паличка);

– **амфітрихи** – бактерії, що мають 2 полярно розташовані джгутики або по кілька джгутиків на полюсах клітини (спірили);

– **лофотрихи** – бактерії, що мають по пучку джгутиків на одному або по обох полюсах бактеріальної клітини (палички синьо-зеленого молока);

– **перитрихи** – бактерії з великою кількістю джгутиків по всій поверхні клітини (кишкова паличка, сальмонели).

Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина - до 15 мкм, а діаметр - 12-18 нм). Простіше розглядати їх рух у мікропрепаратах «Роздушена крапля» та «Висяча крапля».

Для фарбування джгутиків розроблено ряд методів. Їх можна поділити на *звичайні світлові та імунофлуоресцентні*.

До перших відносять **методи: за Греєм, за Лейфсоном, за Леффлером**. Для виявлення джгутиків імунофлуоресцентним методом потрібно мати мічені ФІТЦ (флуоресцеїну ізотіоціанатом) антивидові глобуліни, люмінесцентний мікроскоп.

У прокаріот відсутнє оформлене ядро, але генетичний матеріал представлений ДНК. Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, називається **нуклеоїд** та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК. Стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокаріот можна спостерігати не обов'язкові структури, **бактеріальні плазмід** – невеликі, замкнені в кільце, ділянки ДНК. Плазмід, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про додаткові властивості організму та при діленні бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

До **спороутворення** здатна невелика кількість бактерій. Ендоспори утворюють представники невеликої кількості родів (близько 10) і переважно з циліндричною формою клітини, наприклад бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Amphibacillus*, *Sulfobacillus*. Спори бактерій, на відміну від спор еукаріот, не є способом розмноження, вони формуються ендогенно, тобто всередині материнської клітини і можуть мати центральне, субтермінальне (прикінцеве) або термінальне (кінцеве) положення. Діаметр спори може не перебільшувати ширину материнської

клітини (*бацилярний тип* при центральному або субтермінальному положенні), а може перебільшувати (*кlostридіальний тип* при центральному або субтермінальному положенні, *плектридіальний тип* - при термінальному положенні).

Спори у бактерій утворюються у відповідь на виникнення несприятливих умов середовища, а також утворення ендоспор – це один з етапів розвитку популяції, хоча ця стадія не обов'язкова. Ендоспори, на відміну від вегетативних клітин бактерій, більш стійкі до підвищеної температури (навіть до 140°C), опромінення та дії хімічних речовин. Вода у спорах знаходиться у зв'язаному стані, раніше ж вважалося, що спори майже не містять води. *Терморезистентність* спор пов'язують із вмістом дипіколінової кислоти, якої немає у вегетативних клітинах; *стійкість до дії хімічних речовин і опромінення* пояснюється багат шаровими оболонками.

Включення мікробної клітини. В цитоплазмі прокаріот містяться включення, що за консистенцією бувають твердими, рідкими і газоподібними. Одну частину цих включень складають запасні поживні речовини, другу - продукти клітинного обміну, а третя має пристосувальне значення в житті мікроорганізмів. До включень, які є запасними поживними речовинами належать полісахариди, ліпіди, поліпептиди, поліфосфати, сполуки сірки тощо. Серед включень, що їх відносять до продуктів клітинного обміну, трапляються кристалоподібні сполуки білкової природи (дуже токсичні для комах), молекулярна сірка, зерна карбонату кальцію – карбоксисоми, пігменти тощо. До включень, які мають пристосувальне значення, належать аеросоми (їх ще відносять до органел бактеріальної клітини).

У цитоплазмі мікробних клітин найчастіше можна виявити такі включення: глікоген, (тваринний крохмаль), гранульозу (крохмалеподібна речовина), гранули волютину, скупчення пігментів, сірку, залізо тощо. За хімічною природою волютин належить до поліфосфатів. Він є резервним джерелом фосфору у мікробній клітині. Волютин виявляють найчастіше послуговуючись методами Омелянського або Леффлера. Жирові включення можна виявляти і без фарбування на прижиттєвих препаратах, виготовлених із дріжджів. При великому збільшенні мікроскопа в дріжджових клітинах спостерігаються крапельки жиру, які заломлюють світло.

ХІД РОБОТИ

1. Виявлення капсул за методом Бурі

На чисте знежирене скло наносять краплю попередньо профільтрованої і розведеної туші та змішують її із краплею суспензії молоді культури азотобактера – *Azotobacter chroococcum*. Препарат накривають покривним скельцем і, коли він висохне на повітрі, вивчають

під імерсійним об'єктивом. На темному тлі чітко вирізняються диплококи азотобактера.

2. Фарбування джгутиків за методом Леффлера

На чисте знежирене скло наносять краплю води, в яку вносять з допомогою бак петлі часточку агарової культури, взятої із самого дна біля конденсаційної води, і залишають на 30 хв., щоб мікробна маса сама вільно розійшлася у краплі води. Впродовж цього часу препарат висихає. Тоді на нього наливають розчин протрави і залишають на 15 хв. Після цього препарат промивають у дистильованій воді, висушують і дофарбовують карболовим фуксином Ціля протягом 3–4 хв. при легкому нагріванні до появи парів. Промивають водою, підсушують при кімнатній температурі і розглядають під імерсією. Джгутики зафарбовуються у рожевий колір.

Рецепт протрави: танін 12 г, H₂O дистильована 48 мл, насичений розчин Fe₂(SO₄)₃ 30 мл, насичений спиртовий розчин фуксину 6 мл. Танін розчиняють у воді при нагріванні. Суміш фільтрують і зберігають у посудині з притертим корком. Протрава дозріває декілька днів.

3. Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза

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

Готують мазок *Saccharomyces cerevisiae* та висушують за кімнатної температурі. Фіксують мазок у рідині Карнуа або метанолом протягом 15 хв.

На фіксований мазок наносять барвник Романовського-Гімза або Майн-Грюнвальда та витримують 40–45 хв. в термостаті за 37°C. Препарат промивають водою, висушують фільтрувальним папером і досліджують під великим збільшенням.

В полі зору знаходять овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена у рожевий колір, а ядерний матеріал - у фіолетовий.

4. Фарбування спор за методом Пешкова

На фіксований мазок культури *Bacillus subtilis*, або клостридії *Clostridium sp.* наносять синьку Леффлера та довести барвник до кипіння на полум'ї спиртівки, при цьому предметне скло спочатку прогрівають над полум'ям по всій довжині, а потім затримують на кілька секунд над полум'ям так, щоб воно торкалося скла. Якщо скло було достатньо прогрітим, барвник закипає за 10–15 секунд У випадку, коли скло було перегріте, барвник не кипить, а випаровується, при цьому скло не слід тримати в полум'ї більше 10 секунд Після нагрівання скло не кладуть на холодні предмети, щоб запобігти його розтріскуванню.

Препарат ретельно промивають водою тільки після охолодження скла.

Вологий препарат дофарбовують барвником нейтральрот протягом 2–3 хв. Препарат промивають водою та висушують фільтрувальним

папером.

Спори фарбуються в синьо-блакитний колір, а вегетативні клітини – у рожевий.

5. Виявлення глікогену

На чисте предметне скло наносять краплину суспензії розведених дріжджів або культури *Bacillus mycoides* і додають розчин Люголя. Препарат накривають накривним скельцем, видаляють надлишок рідини смужкою фільтрувального паперу і вивчають під мікроскопом за допомогою імерсійної системи. Гранули глікогену фарбуються в червонувато-бурий колір.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання:

1. Назвіть основні форми бактеріальної клітини.
2. Що собою являють капсули бактерій і яка їх роль для бактерій?
3. Розкажіть методи виявлення капсул бактерій.
4. Види руху у бактерій.
5. Поділ бактерій за кількістю та місцем розташування джгутиків на мікробній клітині.
6. Опишіть методи виявлення джгутиків бактерій.
7. Що собою являє нуклеоїд бактерій і яким методом його можна виявити?
8. Які включення можуть бути у мікробної клітини і яка їх роль?
9. Методи виявлення глікогену і жиру дріжджів?
10. Які ви знаєте типи розташування спор у бактерій?
11. На які дві групи поділяються бактерії за величиною спор?
12. Яким чинниками обмовлена висока стійкість ендоспор до дії високої температури і до дії хімічних факторів та опромінення?
13. Розкажіть хід фарбування спор за Пешковим.
14. Розкажіть хід фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза.

5 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Тема: ДЕЗІНФЕКЦІЯ. ВИДИ, МЕТОДИ ТА ЗАСОБИ ДЕЗІНФЕКЦІЇ

Мета: навчитися способам дезінфекції, проведенню дезінфекції рук, виготовленню дезінфікуючих розчинів

Матеріали і реактиви: пінцет, вата, дезінфекційні засоби: 0,1 % розчин дезактину, стериліум, хлорамін, 70° етиловий спирт, 5 % настоянка йоду та ін.

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- способи дезінфекції;
- як проводити дезінфекцію рук, робочого місця, патологічного матеріалу.

Уміти:

- правильно продезінфікувати руки;
- виготовити дезінфікуючі засоби потрібної концентрації.

ХІД РОБОТИ

1. Опитування та оцінка засвоєння ЗВО матеріалу попередньої лабораторної роботи.
2. Коротке роз'яснення матеріалу по темі лабораторної роботи.
3. Практичне проведення лабораторної роботи.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Поняття про асептику та антисептику

Антисептика – це комплекс лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на знищення мікроорганізмів або пригнічення їх росту на певному об'єкті (рана, організм).

Вперше (1865 р.) антисептичні засоби (хлорну воду, срібло, йод) для лікування гнійних ран використав **М.І. Пирогов** (1810–1881) і висловив геніальну думку, що нагноєння ран викликають «госпітальні міазми».

Згодом англійський хірург **Джозеф Лістер** (1867 р.) описав основні принципи попередження інфікування ран, відкривши нову «антисептичну» еру в хірургії. А як антисептик він використав карболову кислоту.

З цією метою застосовують бактерицидні хімічні речовини.

Хімічні речовини, які згубно діють на мікроорганізми, але не впливають негативно на макроорганізм, та які застосовують для лікування інфекційних хвороб, називають **антисептиками**.

Асептика – система профілактичних заходів (дезінфекція, стерилізація), спрямованих на запобігання мікробному забрудненню рани, перев'язочного матеріалу, операційного поля, культури мікроорганізмів та ін. Запропонував і ввів її в хірургію німецький вчений Е. Бергман (1897 р.).

Правила асептики мають важливе значення і в мікробіологічній практиці. Медичним сестрам, лаборантам слід суворо дотримуватись правил асептики, щоб досліджуваний матеріал не забруднити сторонньою мікрофлорою. Усім працівникам лабораторій необхідно попереджувати забруднення чистих мікробних культур, живильних середовищ, спецодягу. Усі посіви треба проводити в зоні пальника.

Для проведення дезінфекції і стерилізації використовують різні методи залежно від того, який режим стерилізації вони забезпечують.

Дезінфекція – це повне знищення вегетативних і спорових форм **патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів** у навколишньому середовищі (у приміщенні: підлога, стіни, ручки дверей; на поверхні меблів, апаратів, приладів; на посуді, білизні; у патологічному матеріалі,

отриманому від хворих, тощо). Дезінфекція буває **поточною і заключною**.

Дезінфекція є видаленням або руйнуванням **патогенних мікроорганізмів**, що знаходяться на неживих об'єктах чи поверхнях, за допомогою хімічних агентів, які називають **дезінфікуючими речовинами**.

Дезінфекцію проводять тоді, коли неможливо застосувати стерилізацію парою чи іншими фізичними методами, наприклад, коли мають справу з великими площами, поверхнями та стаціонарним обладнанням.

Метою дезінфекції є запобігання передачі збудників від інфікованого організму до неінфікованого через об'єкти навколишнього середовища. Методи проведення дезінфекції наведено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Характеристика методів дезінфекції

Метод дезінфекції	Принцип методу
Механічний	Миття рук з милом, вологе прибирання приміщення, прання білизни, провітрювання приміщення тощо
Фізичний	Кип'ятіння, спалювання, оброблення парою, ультрафіолетове опромінювання
Хімічний	Оброблення хімічними засобами (антисептиками та дезінфектантами)

Дезінфекція буває **поточною і заключною**.

Поточну дезінфекцію проводять багаторазово протягом дня в лікувально-профілактичних та інших закладах.

Заклучну проводять одноразово наприкінці робочого дня, або в осередку інфекції після госпіталізації хворого, переведення хворого в іншу палату, або після смерті пацієнта.

Для дезінфекції використовують багато (понад 250) різних хімічних препаратів. Більшість із них випускають готовими для використання у вигляді концентрованої рідини, розчинів, таблеток, емульсій, суспензій, аерозолів.

Бактерицидна дія хімічних агентів зумовлена активністю функціональних груп, концентрацією активного компонента певної речовини, тривалістю контакту, рН, температурою, вологістю та наявністю органічної речовини. Як дезінфікуючі агенти застосовують галогени, фенол та їх похідні, сполуки важких металів, спирти, мікробіцидні гази та ін.

Галогени та їх похідні. При хімічній стерилізації здебільшого використовують хлор, йод та їх похідні. Як основу хлорних дезінфікуючих речовин використовують гіпохлорит натрію. Широко застосовують хлораміни, їх отримують, заміщаючи хлором водень амінових або імінових груп. У лабораторних умовах широко використовують **спиртовий розчин** (настойку йоду або його похідне (йодофор-вескодин). Хлор та йод активні проти всіх бактерій та їх форм у стані спокою - спор. Оскільки вони

активно з'єднуються з білком, то за його присутності їх слід брати в надлишку. При роботі зі сполуками хлору та йоду потрібно пам'ятати, що вони мають тенденцію виділятися з розчинів, надають їм неприємного запаху та є отруйними для живих тканин.

Для дезінфекції можна використовувати сполуки важких металів – ртуті, срібла, міді. Проте, оскільки препарати з ртуті (хлорид ртуті (II), оксиціанід ртуті) токсичні, а срібла – дорогі й мають переважно бактериостатичну, а не бактерицидну дію, їх не рекомендують використовувати для дезінфекції.

Фенольні сполуки, наприклад о-фенілфенол, ефективні проти вегетативних клітин бактерій у великих розведеннях і практично не мають запаху. Фенол справляє і дезінфікуючу дію на вегетативні клітини і спори бактерій, проте через неприємний запах його зрідка застосовують. Фенольні сполуки неефективні проти бактеріальних спор.

Спирти, як і феноли, містять гідроксильні групи, які надають їм бактерицидні властивості. Для дезінфекції використовують тільки етиловий та ізопропіловий спирти. Їх дезінфікуючі властивості приблизно однакові та збільшуються пропорційно концентрації від 50 до 70 %. При вищих концентраціях бактерицидна дія спиртів різко знижується. Абсолютний етиловий спирт майже не має летальної дії на клітини бактерій, бо спричинює закриття пор клітинної мембрани і таким чином його молекули не потрапляють всередину бактеріальної клітини. Спирти не викликають загибелі спор і мають повільну знезаражуючу дію.

Мікробоцидні гази. Встановлена здатність деяких газів знищувати вегетативні клітини та спори бактерій. До стерилізуючих газів відносяться формальдегід, окис етилену та пропіолактон.

Формальдегід має виражену спороцидну активність (згубну дію на спори бактерій). Максимальний стерилізуючий ефект досягається при відносній вологості 70% та температурі 22°C. При низьких температурах формальдегід втрачає дезінфікуючу активність. До його недоліків слід віднести гострий, подразнюючий запах та здатність утворювати на поверхні органічного матеріалу шар денатурованої речовини, що захищає мікроорганізми під ним.

Окис етилену використовують для дезінфекції у вигляді газової суміші, де на його частину припадає від 2 до 50%, іншим компонентом суміші є азот або вуглекислота. Окис етилену ефективно знищує вегетативні клітини та спори бактерій, але не справляє шкідливого впливу на різноманітні органічні матеріали, що легко пошкоджуються при нагріванні. **Його застосовують для стерилізації живильних середовищ, що містять термолабільні елементи, пластмасових чашок Петрі та інших предметів, що плавляться при температурі вище 100 °С.** Оскільки окис етилену не лише токсичний, а й леткий (температура кипіння -10,7°C), його можна легко видалити з об'єктів шляхом короткочасного нагрівання до 37°C. Слід пам'ятати, що окис етилену

нестійкий і розпадається у водних розчинах, утворюючи етиленгліколь, що може призводити до небажаних ефектів. **Крім того, окис етилену вибухонебезпечний та токсичний для людини, а тому не знайшов широкого застосування.**

β-пропіолактон при температурі 20°C є рідиною із солодкуватим подразнюючим запахом. У водних розчинах нестійкий. Ця сполука викликає загибель більшості мікроорганізмів та їх спор, її дія зумовлена зв'язуванням з білками, жирними кислотами та вуглеводами клітини, β-пропіолактон застосовують для стерилізації термолабільних живильних середовищ, вакцин, сироваток та інших нестійких біологічних матеріалів. Звичайно у відповідне середовище додають 0,2% рідкого пропіолактону і витримують при 25°C протягом 2–3 год. Протягом наступних кількох годин β-пропіолактон, що знаходиться в середовищі, повністю розпадається. Різні предмети та приміщення слід обробляти β-пропіолактоном в умовах відносної вологості 70-80% та концентрації його в повітрі 2–4 мг/мл. β-пропіолактон має подразнюючі та канцерогенні властивості, тому при роботі з ним необхідно притримуватися відповідних застережливих заходів для попередження потрапляння його всередину організму.

Дезінфекційні засоби, зареєстровані в Україні, застосовують відповідно до режимів, які регламентовані методичними вказівками і в установленому порядку затверджені головним державним санітарним лікарем України.

Останнім часом в Україні зареєстровані **ефективні дезінфекційні препарати** для проведення поточної і заключної дезінфекції: **МедіДес, Тетралін, КвікДес, Сентамін** та ін.

Їх можна використовувати для знезараження поверхні приміщень, твердих меблів, медичних приладів і апаратури, предметів догляду за хворими, лабораторного посуду, забрудненого виділеннями хворих, білизни, прибирального інвентарю, а також кухонного посуду.

Для гігієнічного оброблення шкіри рук медичного персоналу рекомендовано препарати **БактеріоСол, Октенісепт, Стериліум** та ін.

Дезінфекційні засоби можуть негативно впливати на людину, тому під час виготовлення дезінфекційних розчинів слід дотримуватися **правил техніки безпеки** (працювати в гумових рукавичках, герметичних окулярах, надягати чотиришарову марлеву пов'язку).

Ознайомлення з технікою проведення дезінфекції піпеток, інфікованого матеріалу, робочого місця

Градуйовані, пастерівські піпетки, шпателі, металеві інструменти відразу після використання опускають у посудину з дезінфекційним розчином, яка стоїть на кожному робочому місці.

Відпрацьований патологічний матеріал (кал, сеча, мокротиння, кров, спинномозкова рідина) обробляють сухими дезінфекційними засобами або їх розчинами.

Патологічний матеріал (гній, сеча, кров, мокротиння тощо), посуд, меблі та приміщення знезаражують бактерицидними дезінфекційними засобами. Ці засоби застосовують у комбінації з детергентами та дією високої температури.

Вибір дезінфекційного засобу, його концентрація, експозиція (термін дії) залежать від біологічних властивостей мікроорганізмів і властивостей патологічного матеріалу, в якому містяться ці мікроби.

Так, для **знезараження мокротиння хворого на туберкульоз** застосовують 2,5% розчин дезактину (експозиція – 360 хв.), а **випорожнень хворого на дизентерію** – 0,5% розчин дезактину (експозиція – 60 хв.) або засипають *сухим хлорним вапном* із розрахунку 200 г дезінфекційного засобу на 1 кг виділень, перемішують і витримують 1 год.

Посуд опускають в 1 % розчин хлораміну на 30 хв. або 1 % розчин МедіДес чи Тетраліну на 60 хв.

Робоче місце після закінчення роботи протирають ганчіркою, змоченою дезінфекційним розчином (0,2 % розчином Септаміну, 0,75 % розчином МедіДес чи Тетраліну).

Завдання 1 Проведення дезінфекції рук

Алгоритм проведення дезінфекції рук

- зробіть із вати дві кульки діаметром 1–2 см;
- візьміть пінцетом одну кульку, змочіть її у розчині дезінфектанту;
- протріть нею руки в такій послідовності: ліва рука – тильна сторона, долонна сторона, між пальцями, нігтьова пластинка, під нігтями; права рука – у такій самій послідовності;
- кульку опустіть у посудину з дезінфекційним розчином;
- візьміть пінцетом другу кульку і все повторіть;
- вимийте руки водою з милом;
- висушіть руки, змастіть їх кремом для рук.

Завдання 2 Виготовлення дезінфекційних розчинів

- Виготовлення 150 мл 70 °С спирту із 96 °С.
- Виготовлення 250 мл 3 % розчину хлораміну.
- Виготовлення 150 мл 5 % розчину перекису водню із пергідролу, що містить 33 % перекису водню.
- Виготовлення 100 мл 0,5 % розчину оцтової кислоти із льодяної оцтової кислоти.
- Виготовлення 250 мл 3 % формальдегіду із формаліну, що містить 37 % формальдегіду.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні запитання

1. Що таке асептика й антисептика?
2. Що таке дезінфекція?
3. Які є її види?
4. Які дезінфекційні засоби можуть бути використані в Україні?
5. Від чого залежить вибір дезінфекційного засобу і термін проведення дезінфекції?
6. Як дезінфекційні засоби впливають на макроорганізм? Як з ними слід поводитися?
7. Якими чинниками обумовлена Бактерицидна дія хімічних агентів?
8. Яким чином проявляється зубна дія галогенів та їх похідних на мікроорганізми?
9. Яким чином проявляється зубна дія спиртів на мікроорганізми?
10. Яким чином проявляється зубна дія фенолів та їх похідних на мікроорганізми?
11. Яким чином проявляється зубна дія галогенів та їх похідних на мікроорганізми?
12. Яким чином проявляється зубна дія формальдегіду на мікроорганізми?
13. Яким чином проявляється зубна дія β -пропіолактону на мікроорганізми?
14. Як проводять дезінфекцію піпеток, патологічного матеріалу?
15. Як проводять дезінфекцію робочого місця, рук?

6 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Тема: СТЕРИЛІЗАЦІЯ. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ

Мета: вивчити методи стерилізації, організація проведення стерилізації

Матеріали і реактиви: пінцет, піпетки, ватні тампони, спеціальні пенали, сушильна шафа, папір для обгортання

По закінченні лабораторної роботи здобувачі вищої освіти повинні:

Знати:

- способи дезінфекції;
- як проводити дезінфекцію рук, робочого місця, патологічного матеріалу.

Уміти:

- правильно продезінфікувати руки;
- виготовити дезінфікуючі засоби потрібної концентрації.

ХІД РОБОТИ

1. Посуд перед стерилізацією ретельно миють, висушують і загортають в папір (для збереження стерильності після прогрівання).

2. Кожну піпетку обгортають окремо довгими паперовими смужками шириною 4–5 см. У широкі кінці піпеток, заздалегідь вставляють ватяні тампони. Обгортання починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують біля кінця з тампоном. Папір повинен щільно охоплювати піпетку. Обгорнуті піпетки для запобігання забруднення і пошкодження паперу завертають по декілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали.

3. Чашки Петрі загортають разом по 2 – 4 штуки. Колби, пробірки закривають ватяними пробками, а зверху паперовими ковпачками.

4. Посуд, що підготовлений до стерилізації, завантажують в сушильну шафу не дуже щільно, щоб забезпечити циркуляцію повітря та рівномірне прогрівання предметів, які стерилізуються. Відмічають час, коли температура в шафі досягне 165–180°. Підтримують цю температуру протягом двох годин. Якщо шафа не забезпечена терморегулятором, необхідно весь час стежити за температурою, оскільки при зниженні її посуд не простерилізується, а при нагріванні вище 180 °С папір і пробки починають обвуглюватися.

5. Після закінчення стерилізації вимикають нагрівання. Шафу не відкривають до тих пір, поки температура в ній не знизиться до 80 °С, тому що при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу і тріснути сильно нагріте скло. Простерилізований посуд зберігають в закритому, захищеному від пилу місці. Розгортають його безпосередньо перед використанням.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мета процесу стерилізації полягає в повному знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор у середині або на поверхні об'єкта. Стерилізують поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини і т. д.

Стерилізація (від латин. sterilis – безплідний, слово «стерилізація» в перекладі означає знепліднення) – це знищення мікроорганізмів у різних об'єктах шляхом дії на них чинниками, згубними для мікробів.

Стерилізація – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці. В практичній роботі стерилізацію трактують, як методи які застосовують для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів стерилізації. Стерилізують живильні середовища, посуд, інструменти з метою не допустити розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах.

Всі засоби стерилізації розділяють на фізичні, механічні та хімічні; або на термічні та холодні. Вибір відповідного засобу залежить від властивостей об'єкту стерилізації.

Термічна стерилізація базується на знищенні мікробів за допомогою високих температур. Знищення мікробів високими температурами легко здійснюється і найчастіше використовується в практичній діяльності людини та найчастіше застосовується в

мікробіологічній практиці. При цьому потрібно пам'ятати, що у вегетативних (неспорових) клітинах денатурація білків і загибель починається вже при температурі 56–60°C. Більш термостійкі спори гинуть у сухій атмосфері при температурі 160°C протягом 1–2 год, а у вологому середовищі загибель спор відбувається при температурі 112–120°C протягом 20–30 хв.

Низькі температури не вбивають, а лише затримують розвиток мікроорганізмів. Холодні методи стерилізації включають різноманітні методи знищення мікроорганізмів. Називають їх холодними умовно, щоб підкреслити, що вони не пов'язані з дією високих температур. До цих засобів відносять хімічну стерилізацію або дезінфекцію, різні фізичні методи стерилізації (окрім використання температурного фактору) та механічне звільнення від мікроорганізмів.

До методів термічної стерилізації належать:

- 1) фламбування;
- 2) кип'ятіння;
- 3) стерилізація сухим жаром;
- 4) стерилізація текучою парою;
- 5) стерилізація парою під тиском;
- 6) пастеризація;
- 7) дробна стерилізація та тиндалізація.

Фламбування (від нім. flamme - полум'я) - прожарювання в полум'ї дрібних металевих або скляних предметів. Це найбільш швидкий і доступний метод стерилізації. Проте його використання поширюється тільки на термостійкі матеріали. Так стерилізують бактеріологічні петлі, металеві пінцети, скляні шпателі, палички, скельця, фарфорові ступки та інші інструменти. При прожарюванні гинуть усі мікроорганізми (вегетативні та спорові форми). Після прожарювання охолоджені предмети не можна класти на стіл; їх слід тримати так, щоб вони не торкалися інших предметів (рисунок 6.1).

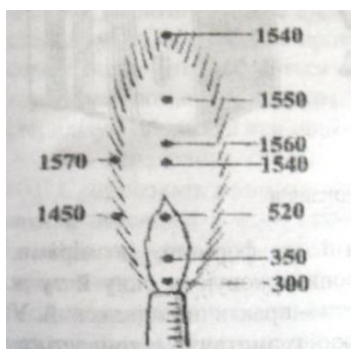


Рисунок 6.1 - Значення температури (у 0°C) в різних ділянках газового пальника

Кип'ятіння є одним з найпростіших способів стерилізації. Проводиться стерилізаторі (рисунок 6.2) - металевій прямокутній коробці з кришкою і сіткою на дні для розташування предметів, що стерилізуються. У нього наливають воду та нагрівають до кипіння. Кип'ятіння триває від 15–30 хв до 2 год. при температурі близько 100°C.

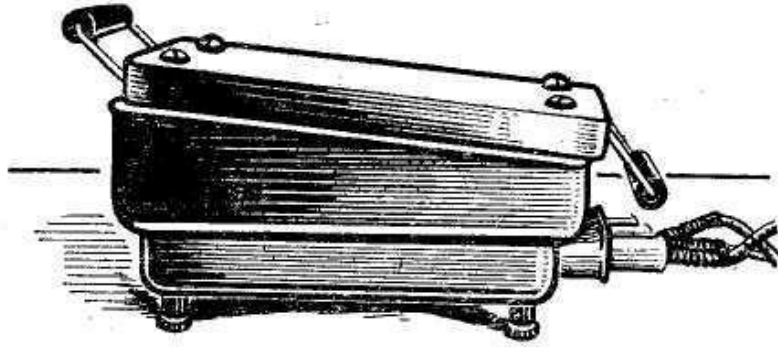


Рисунок 6.2 – Зовнішній вид стерилізатора

Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети - шприци, голки, скляні трубки та ін. При цьому гинуть, в основному, вегетативні клітини, спори бактерій зберігають життєздатність. Кип'ятінням у дистилаті стерилізують мембранні фільтри. Режим стерилізації для мембранних фільтрів 30–60 хв. з моменту енергійного закипання води. У мікробіологічній практиці таким способом стерилізації користуються зрідка у зв'язку з тим, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а скорочення часу кип'ятіння може не забезпечити стерильності.

Стерилізація сухим жаром. Проводиться гарячим повітрям у печі Пастера або сушильній шафі. Піч Пастера є шафою з подвійними стінками, покритою зовні азбестом для теплоізоляції. В середині шафи розташовані металеві полиці з отворами, на які поміщають матеріал, що стерилізується. Стерилізація проводиться при температурі 160–170° або 140°C протягом 1,5–2 год. або 3 годин. Нагрівання за допомогою сухого жару справляє значно слабший вплив на мікроорганізми, ніж волога пара. В той же час можуть серйозно пошкоджувати такі матеріали, як гума, папір, вата, тканина. Тому цей прийом переважно використовують для стерилізації предметів, які є непроникними для пари, зокрема посуду (чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо).

Перед стерилізацією пробірки і колби закривають корками. Ватно-марлеві корки не тільки захищають посуд та його вміст від потрапляння сторонніх мікроорганізмів, але на відміну від інших (гумових, алюмінієвих, пластмасових), забезпечують повітрообмін із зовнішнім середовищем. При стерилізації скляних піпеток їх верхні кінчики також закривають шматочками вати. При роботі з ними доцільно користуватися гумовими

грушами, але зручніше використовувати спеціальні автоматичні піпетки з одноразовими змінними наконечниками. Пробірки з корками завертають у папір по 10–15 шт., а чашки Петрі – по 2–3 шт. Кожну піпетку щільно обгортають паперовими смужками, а корки на колбах накривають фольговими ковпачками. У такому вигляді посуд вміщують до сушильної шафи і стерилізують.

Температура в сушильній шафі не повинна перевищувати 170°C, оскільки у протилежному випадку з вати та деяких сортів паперу можуть виділятися смолисті речовини, жирні кислоти, які мають здатність пригнічувати ріст мікроорганізмів. Ці речовини у невеликих кількостях також можуть виділятися й при значно нижчих температурах, а при охолодженні шафи осаджуватись на її стінках. Тому час від часу слід очищувати стінки печі. Для попередження інтенсивного змішування холодного забрудненого повітря зі стерильним вмістом шафи, її небажано відкривати до охолодження. Цей метод надійний - гинуть спорові і неспорові форми мікроорганізмів. Обгорнутий у папір простерилізований посуд можна зберігати.

Стерилізація текучою парою. Проводиться гарячим вологим повітрям в апараті Коха. У нижню частину металевого циліндру наливають воду, над нею розташовують полицю з отворами і матеріал, що стерилізується. Апарат щільно закривають конічною кришкою з отвором для виходу пари і нагрівають на вогні. Коли вода закипить, гаряча водяна пара з температурою близько 100°C «потече» сильним струменем з отвору кришки. З цієї миті відраховують час початка стерилізації.

Стерилізація текучою парою триває від 45 хв до 1,5 год. залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується. В такий спосіб стерилізують поживні середовища, які не можна нагрівати вище 100°C, наприклад м'ясо-пептонний желатин (при температурі вище 100°C він розріджується та не застигає). Цей спосіб стерилізації не достатньо надійний - повністю гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори зберігаються. Для досягнення повної стерилізації середовища в апараті Коха застосовують дрібну стерилізацію.

Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) - найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації живильних середовищ і посуду. Цей метод ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску, вищому від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні її тиску. Наприклад, при тиску 1,5 атм. температура пари становить 127°C, 2 атм. – 135°C.

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини і найстійкіші спори. Стерилізацію парою під тиском здійснюють у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах.

Для правильного автоклавування необхідно повністю витіснити повітря з робочої камери, оскільки повітря затримується між предметами,

які автоклавуються, внаслідок чого вони можуть не нагріватися до заданої температури. Крім того, заповнювати автоклав слід таким чином, щоб не перешкоджати вільному рухові пари.

Температура і тривалість автоклавовання живильних середовищ визначається, перш за все, їх складом. Термолабільні субстрати (молоко, желатинові середовища, середовища з цукрами, вітаміни тощо) зазвичай стерилізують при 0,5 атм. протягом 15-30 хв, пивне сусло та сусло-агар - при 0,7 атм. 20 хв, м'ясо-пептонні середовища при 1 атм. 20 хв.

Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкцій. Оскільки автоклав – це апарат, який працює при високому тиску і високій температурі, неправильна експлуатація його може бути причиною нещасних випадків. Для роботи з автоклавом допускаються тільки особи, які мають спеціальну підготовку і дозвіл відповідної інстанції.

Для контролю правильного режиму стерилізації використовують кілька методів:

- за допомогою прямого вимірювання температури;
- максимальних термометрів;
- хімічних індикаторів.

Перший спосіб здійснюють за допомогою термопар, розташованих в різних частинах камери. Зручнішим є використання максимальних термометрів та патентованих хімічних індикаторів. Останні змінюють своє забарвлення внаслідок прогрівання протягом певного часу при заданій температурі

Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металевий двостінний казан, здатний витримувати високий тиск. Внутрішня частина казана – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується. Вона оточена водо паровою камерою, яка має кран для виходу повітря і пари. При стерилізації у водо парову камеру наливають воду до необхідного рівня. Предмети у камері слід розміщувати не дуже щільно, оскільки пара повинна вільно проходити між ними. Кришка автоклава герметично закривається (рисунок 6.3).

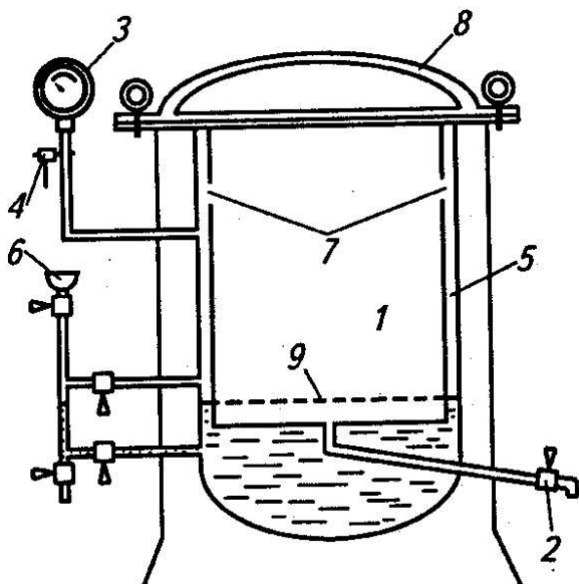


Рисунок 6.3 – Будова автоклаву

1. камера стерилізації; 2. кран для виходу повітря; 3. манометр; 4. запобіжний клапан; 5. – камера; 6. воронка для заповнення автоклава водою; 7. отвори для надходження пари в камеру стерилізації; 8. кришка автоклава; 9. підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються

Найпоширеніші режими стерилізації такі:

15–45хв. при надлишковому тиску 0,5 атм (температура досягає 110–112°C);

15–45 хв. при надлишковому тиску 1,0 атм (температура досягає 121°C);

10–30 хв при надлишковому тиску 1,5 атм (температура досягає 126°C).

Після закінчення часу стерилізації нагрівання припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пару. Стерилізують порою під тиском поживні середовища, скляний посуд, інструменти й ін. Автоклавування є швидким і надійним способом стерилізації, при якому гинуть всі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.

Пастеризація – одноразовий короткочасний прогрів матеріалу при температурах, нижчих 100°C, для знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Луї Пастер. Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості, для обробки продуктів, які втрачають смакові і поживні якості при кип'ятінні: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін. Пастеризацію зазвичай проводять при 60°C–75°C протягом 15–30 хв чи при 80°C 15 хв. Інколи нагрівають матеріал до 90°C і одразу ж охолоджують. Суть методу полягає в тому, що рідину, налиту стерильний посуд, прогривають на водяній бані при температурі 60–90°C протягом 10–30 хв. Застосовують пастеризацію для середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості при високих температурах.

У харчовій промисловості пастеризують молоко, вершки, вино, пиво, соки й ін. При цьому повністю зберігаються вітаміни і смакові якості продуктів. Пастеризовані продукти тривалому зберіганню не підлягають, оскільки при цьому методі стерилізації гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори залишаються.

У лабораторній практиці в такий спосіб відокремлюють види мікроорганізмів, що утворюють спори від тих, що не утворюють. У лабораторних умовах пастеризацію проводять або на водяній бані, або в термостаті при наступних режимах: 60–70 °C 30 хв; 80 °C 10–15 хв.

Дробна стерилізація (тиндалізація) або стерилізація текучою парою використовується для стерилізації поживних середовищ і розчинів, які псуються при використанні температур вище 100°C. Матеріал

стерилізується в декілька прийомів. Дрібним може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха.

Метод розроблений Дж. Тиндалем. Матеріал стерилізують при 100°C протягом 10 хв. За цей час усі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Потім рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30°C), і через декілька годин знову пропускають пару. Двох-трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор. Тиндалізацію зазвичай проводять 3 дні по 30 хв щодня, а в перервах залишають матеріал при кімнатній температурі. Це робиться для провокування зростання спор у вегетативні форми і їх знищення при подальших обробках, що підвищує надійність цих засобів.

Інший різновид дрібної стерилізації (дрібна пастеризація) проводиться у водяній бані при температурі 56 – 58°C протягом 1 г з 5 – 6-кратним повторенням через 24 год. В інтервалах між прогріваннями матеріал витримується при кімнатній температурі.

Тиндалізацією стерилізують поживні середовища бідні мікроорганізмами, а також середовища, що містять речовини, які легко руйнуються і денатурують при температурі вище 60°C (білки, вітаміни).

При *холодній стерилізації* використовують хімічні речовини або діють на об'єкт чинниками фізичної природи.

Хімічні методи припинення життєдіяльності мікроорганізмів базуються на використанні дезінфектантів і антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використанні антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з вибірковою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів при дезінфекції відбувається здебільшого в результаті гідролізу компонентів клітин, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів. Метод хімічної стерилізації застосовують при дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець і т. д.

Хімічну стерилізацію використовують для дезінфекції приміщень, столів, знищення патогенних культур мікроорганізмів тощо. Для стерилізації цим методом застосовують солі важких металів (найчастіше ртуті, міді, цинку), 50-60%-ний розчин етилового спирту, β-оксихіноліну, лізол, формалін (41%-ний розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, пероксид водню, перманганат калію, β-пропіолактон, йод, йодоформ, детергенти та інші хімічні сполуки.

Обладнання, яке має дзеркальні, оптичні поверхні, радіодеталі, а також вироби з термолабільних пластмас (чашки Петрі, центрифужні пробірки тощо) стерилізують, застосовуючи газовий метод. Найчастіше використовують оксид етилену, метилбромід, формальдегід, β-пропіолактон, озон тощо. Газову стерилізацію здійснюють у спеціальних герметичних апаратах. При стерилізації строго контролюють концентрацію газу, тиск, вологість, температуру і тривалість обробки, у більшості випадків процес відбувається при температурі 45°C–70°C. Режим стерилізації різними газами неоднаковий. Предметами,

простерилізованими газами, можна користуватися лише через 24 години (після десорбції газів).

До антисептиків або дезінфікуючих засобів належать мило, деякі органічні барвники, солі важких металів, окисники (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти (60–70% водні розчини), кислоти, антибіотики, газоподібні речовини (формальдегід, окис етилену, озон) та ін. Стійкість мікроорганізмів до їх дії може суттєво змінюватися залежно від таких факторів як концентрація активного компоненту, тривалість контакту, рН, температура, вологість.

Фізичні методи стерилізації: стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивним випромінюванням, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти та ін. Ці методи широко використовують в медицині.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів.

Приміщення (стерильні бокси, операційні, реанімаційні), інколи вироби з термолабільних пластмас (центрифужових пробірок, наконечників для піпеток та ін.), стерилізують за допомогою ультрафіолетових променів у діапазоні 260–280нм. Час опромінення, який встановлюють експериментально, залежить від потужності бактерицидної лампи, від величини об'єкту стерилізації. При обробці УФ-променями дрібних предметів їх одразу після стерилізації кладуть у стерильний обгортковий матеріал або стерильний посуд, де і зберігають до використання.

Веgetативні форми чутливі до опромінення, ніж спори, які в 3–10 разів більш стійкіші. Від УФ-випромінювання мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або іншими захисними оболонками. Обмеження при використанні даного методу стерилізації є низька проникна здатність УФ-променів і висока поглинальна здатність води і скла. Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. Зважаючи на можливу несприятливу дію ультрафіолетових променів на організм людини бактерицидні лампи включають лише за відсутності людей у приміщенні.

Рентгенівське і γ -опромінювання також ефективно для стерилізації пласт-мас, харчових продуктів, але вимагає суворого дотримання правил безпеки. Найбільш чутливі до γ -опромінення вегетативні клітини бактерій, потім йдуть цвілеві гриби, дріжджі, бактерійні спори і віруси. γ -Опромінення використовується для стерилізації лікарняного приладдя, антибіотиків, вітамінів, гормонів, стероїдів, пластмасового разового устаткування, шовного і перев'язувального матеріалу.

Механічний метод стерилізації (стерилізація фільтруванням) застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, леткі речовини і ін.). Метод полягає у пропусканні рідин і газів через спеціальні

дрібнопористі фільтри (бактерійні), діаметр пір яких не перевищує 0,45 – 0,2 мкм (менший за розміри бактерій). Фільтри затримують мікроорганізми. Для пропускання розчину через фільтр потрібний вакуум або тиск. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частки затримуються в них у результаті адсорбції і механічного захоплення в матриці фільтра. Мембранні фільтри мають безперервну структуру і захоплення ними часток визначається розміром пір. У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують:

1. Мембранні (колоїдні) фільтри, виготовлені на основі ефірів целюлози. Це диски різного діаметру товщиною 0,1-0,5 мм. Розміри пор вітчизняних мембранних фільтрів коливаються в межах від 0,35 до 9 мкм. Фірма “Міліпор” (Франція, США) продукує фільтри з розміром пор від 0,01 до 14 мкм, фірма “Синпор” (Чехія) – від 0,12 до 4 мкм.

На практиці придатність фільтрів для стерилізації встановлюють шляхом пробного фільтрування через них суспензії дрібних мікроорганізмів (наприклад, *Serratia marcescens*). Для перевірки на стерильність фільтрат у великих кількостях висівають на живильні середовища. Якщо протягом 5-ти діб тест-мікроорганізм не проросте, фільтри можуть бути використані для стерилізації.

2. Азбестові фільтри Зейца виготовляють з суміші азбесту і целюлози. Їх недоліком є те, що азбест адсорбує речовини рідини, а фільтрат забруднюється волокнами.

3. Пористі скляні фільтри виготовляють з фрагментів скла “пірекс”, сплавляючи їх диски фільтрів впаяні в скляні лійки – держачи різної форми. Скляні фільтри нестандартні, тому перед використанням їх обов'язково перевіряють, як і мембранні фільтри.

Для прискорення фільтрації на фільтрі, зазвичай, створюють перепад тисків, якого найчастіше досягають відкачуванням повітря з допомогою вакуумного насоса чи компресора.

Серйозним недоліком цього способу стерилізації є те, що фільтрування через будь-який фільтр, окрім видалення з розчину суспендованих у ньому частинок, може також призвести до різкої зміни властивостей фільтрату. Так, при фільтруванні може змінюватись рН незабуференого розчину, у фільтрат можуть потрапляти різного роду іони, гліцерин тощо.

Фільтри містять різні природні (коалін, азбест, целюлоза) або синтетичні (похідні целюлози) матеріали. До таких дрібнопористих фільтрів, розміри пір яких менше розмірів бактерій, належать фільтри Шамберлана (фільтрувальні свічки) з каоліну, пластинчасті азбестові фільтри Зейца (рисунок 6.4). Мембранні фільтри виготовляють з колодія, ацетату чи нітрату целюлози та інших матеріалів.

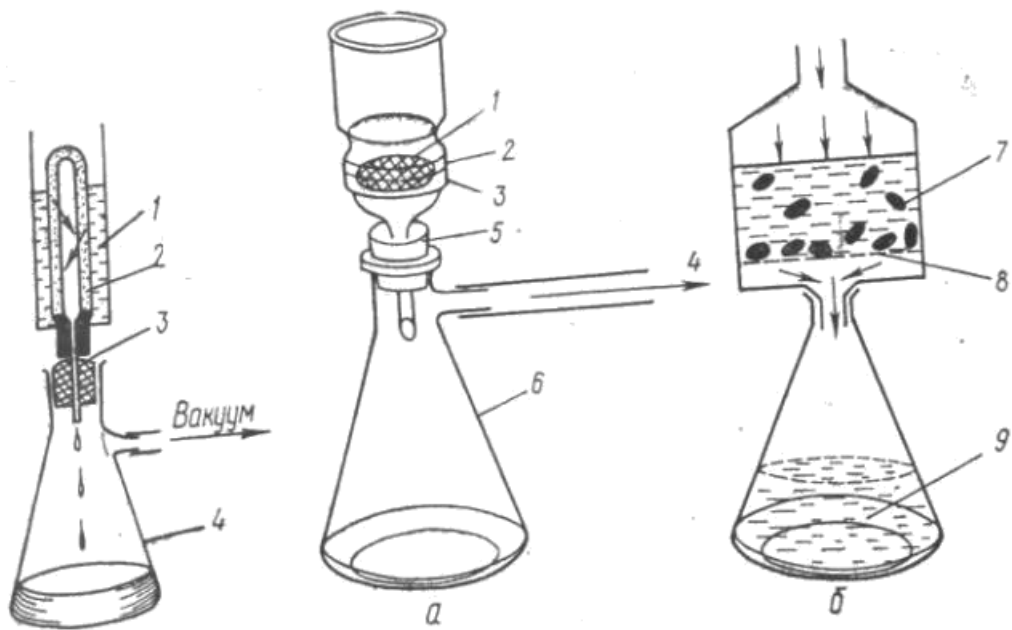


Рисунок 6.4 – Зовнішній вид приладів для стерилізації

Прилад для фільтрування із застосуванням свічки Шамберлана:

- 1- рідина, що фільтрується; 2. свічки Шамберлана; 3. гумова пробка;
- 2- 4. колби Бунзена.

Прилад Зейтца (а) і схема роботи мембранних (поверхневих) фільтрів (б);

- 3- великопориста скляна або металева пластинка; і 3- верхня нижня частини апарату Зейтца; 4- розрідження; 5. гумова пробка; 6. колби Бунзена; 7. мікробні клітини; 8. мембранний фільтр; 9. фільтрат.

Фільтри закріплюються в спеціальному утримувачі (приборі Зейтца), який вставляється в приймач фільтрату – колбу Бунзена. Фільтр Зейтца автоклавують в зібраному вигляді. Перед стерилізацією фільтр утримувачем, гумовою пробкою і колбою-приймачем загортають в папір. У відповідну трубку, яка буде приєднана до вакуумного насоса, вставляють ватний тампон.

В мікробіологічній лабораторії та особливо на виробництві постійно здійснюється контроль ефективності стерилізації. Для цього визначають кількість клітин, які вижили після стерилізації, методом посіву в чашки за кількістю колоній, що утворюються. Використовують також і спеціальні біологічні індикатори (бактеріальні спори), які за визначених умов стерилізації гинуть з прогнозованою швидкістю.

ХІД РОБОТИ

1. Посуд перед стерилізацією ретельно миють, висушують і загортають в папір (для збереження стерильності після прогрівання).

2. Кожну піпетку обгортають окремо довгими паперовими смужками шириною 4–5 см. У широкі кінці піпеток, заздалегідь вставляють ватяні тампони. Обгортання починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують біля кінця з тампоном. Папір повинен щільно охоплювати піпетку. Обгорнуті піпетки для запобігання забруднення і пошкодження паперу завертають по декілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали.

3. Чашки Петрі загортають разом по 2 – 4 штуки. Колби, пробірки закривають ватяними пробками, а зверху паперовими ковпачками.

4. Посуд, що підготовлений до стерилізації, завантажують в сушильну шафу не дуже щільно, щоб забезпечити циркуляцію повітря та рівномірне прогрівання предметів, які стерилізуються. Відмічають час, коли температура в шафі досягне 165–180°C. Підтримують цю температуру протягом двох годин. Якщо шафа не забезпечена терморегулятором, необхідно весь час стежити за температурою, оскільки при зниженні її посуд не простерилізується, а при нагріванні вище 180°C папір і пробки починають обвуглюватися.

5. Після закінчення стерилізації вимикають нагрівання. Шафу не відкривають до тих пір, поки температура в ній не знизиться до 80°C, тому що при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу і тріснути сильно нагріте скло. Простерилізований посуд зберігають в закритому, захищеному від пилу місці. Розгортають його безпосередньо перед використанням.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання:

1. Види стерилізації.
2. Автоклавування.
3. Стерилізація сухим жаром.
4. Стерилізація парою.
5. Пастеризація.
6. Дробна стерилізація.
7. Хімічна стерилізація.
8. Стерилізація фільтруванням.
9. Використання випромінювання для стерилізації.
10. Стерилізація посуду.

7 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Тема: ОРГАНОЛЕПТИКА МОЛОКА І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Мета: оволодіти методиками лабораторного дослідження молока і молочних продуктів. Навчитися визначати в молоці сторонні домішки.

Матеріали і прилади: штатив з бюреткою для титрування, піпетки, колби, 1% розчин фенолфталеїну, 0,1N розчин їдкого натру або їдкого калію, стакани хімічні, мірні циліндри.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Визначення сортності молока. Відповідно до Державного стандарту (ДСТУ 3662-97), молоко, яке реалізують державі, поділяють на такі сорти: Екстра, вищий, перший і другий. При цьому, крім показників органолептичної оцінки, враховують кислотність молока, ступінь його чистоти, бактеріальну забрудненість і вміст соматичних клітин. Молоко, яке не відповідає Держстандарту вважається не сортове, не приймається для переробки на молокозаводи, вертається у господарство. Сорт молока визначає його ціну.

1. Мікробіологія молока.

1.1 Молоко.

1.2 Вершки.

2. Мікробіологія кисломолочних продуктів.

2.1 Сметана. Сир кисломолочний.

2.2 Кефір. Ряжанка.

2.3 Вершкове масло.

2.3 Молочний маргарин.

2.4 Сири тверді.

Натуральне молоко – продукт нормальної фізіологічної секреції молочних залоз ссавців, одержаний за одне чи кілька доїнь без додавання до нього інших добавок або вилучення певних складників та призначений для подальшого перероблення.

Молочний продукт – виріб, одержаний із молока, який може містити необхідні для його виробництва інгредієнти, в тому числі харчові добавки за умови, що вони ні частково, ні повністю не замінюють складників молока (молочний жир, молочний білок, лактозу, тощо).

Фальсифікацією молока вважається навмисна зміна його натуральності шляхом додавання води, знежиреного молока, зняття вершків, додавання нейтралізуючих та консервуючих речовин, субстанцій замінників основних складників коров'ячого молока – молочного жиру, білків та непритаманних для молочної сировини білків, полісахаридів, біополімерів тощо. Під час фальсифікації порушується хімічний склад натурального молока, його фізико–хімічні показники та показники безпеки, а також співвідношення між окремими складовими частинами молока, що призводить до змін технологічних, фізико–хімічних, мікробіологічних та органолептичних властивостей молока. Слід відзначити, що цілий ряд

загальноприйнятих технологічних операцій в молочній промисловості такі як сепарування молока з метою відділення жиру, нормалізація молока за вмістом сухих речовин, жиру або білка, гомогенізація молока з метою отримання більш однорідної емульсії, умовно можна віднести до дій, які підпадають під визначення фальсифікації молока, але їх проводять свідомо у зв'язку з необхідністю контролю технологічного процесу виробництва молочних продуктів безпосередньо на молокопереробних підприємствах або на спеціальних заготівельних пунктах молочної сировини.

Під фальсифікацією молока розглядаються умисні дії, які не передбачені умовами зберігання, транспортування та технологією виробництва молочних продуктів і направлені на зміну фізико-хімічних показників та показників безпеки коров'ячого молока з метою отримання неправомірної вигоди та введення в оману фахівців молокопереробних підприємств та споживачів при оцінці його якості.

Молоко вважають фальсифікованим, якщо до нього додані сторонні речовини або частково відібраний жир. Це може бути вода, збиране молоко та інгібуючі речовини (сода, формалін, антибіотики, перекис водню, мийні, дезінфікуючі та консервуючі речовини).

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Визначення органолептичних властивостей молока

При визначенні органолептичних властивостей молока звертається увага на його колір, однорідність, консистенцію, запах, смак. Молоко із стороннім, не властивим йому кольором, смаком і запахом в їжу не допускається.

Під час органолептичної оцінки молока спочатку визначають його зовнішній вигляд, колір, консистенцію, а потім - смак і запах.

Молоко наливають в стакан з лабораторного скла і розглядають в розсіяному світлі. При цьому звертають увагу на однорідність консистенції і відсутність осаду на дні стакана, а також відсутність сторонніх відтінків. Органолептична оцінка на смак і запаху проводиться тільки за умови, якщо молоко не має стороннього забруднення, згустків крові або інших домішок.

Устаткування, посуд, реактиви: 1) водяна баня, термометр водний з діапазоном вимірювань від 0 до 100 °С, сушильна шафа, електроплита, колба конічна на 100, стакани хімічні на 50 і 100 мл, мірні циліндри на 100 мл, фольга алюмінієва, вода дистильована.

Хід визначення: наливають 60 мл молока в чисту, суху колбу з пришліфованим краєм, дезодоровану нагріванням в сушильній шафі при температурі 100⁰ С не менше 30 хв. з подальшим охолодженням до температури навколишнього середовища. Між шліфувальним горлом і краєм вкладають смужку алюмінієвої фольги.

Якщо досліджується сире молоко, то необхідно провести його пастеризацію на водяній бані. Рівень води у водяній бані повинен бути

вище, ніж рівень молока в колбі на 1–2 см, температура води – 85°C. Через 30 секунд після досягнення температури 72°C пробу виймають з водяної бані і охолоджують до 37°C. Оцінку запаху і смаку молока проводить комісійно (декілька спеціалістів) (дивись таблицю 7.1).

Відразу після відкриття колби визначають запах молока. Потім 20 мл молока наливають в сухий стакан і оцінюють смак. Оцінку проводять по п'ятибальній шкалі.

Молоко з оцінкою 5 і 4 бали відноситься до вищого, першого або другого сорту залежно від інших показників. Молоко з оцінкою 3 бали в зимово-весняний період відносять до другого сорту, в інші періоди року – до не сортового.

За результатами виконання завдання необхідно зробити висновок - до якого сорту може бути віднесений досліджуваний зразок молока.

Таблиця 7.1 – Балова оцінка коров'ячого питного молока

Показники якості молока	Оцінювання якості молока	
	Органолептична оцінка молока	Оцінка в балах
Запах та смак		
Чистий, приємний, злегка солодкуватий	Відмінне	5
Недостатньо виражений, пустий	Добре	4
Слабо виражений кормовий, слабо окислений, слабо ліполізний, слабо нечистий	Задовільне	3
Виражений кормовий, зокрема цибулі, часнику, полину або інших трав, які надають молоку гіркого смаку, солоного, окисленого, ліполізного, затхлого, запах сараю	Погане	2
Гіркий, прогірклий пліснявий, гнилісний; запах та смак нафтопродуктів, ліків, миючих, дезінфікуючих речовин та ін. хімікатів.	Погане	1

Завдання 2. Визначення кислотності молока, вершків і сметани

Кислотність молока визначають у градусах Тернера (Т°) титруванням 0,1 н. NaOH розчином луги 100 мл молока, розбавленого вдвоє дистильованою водою, у присутності індикатора фенолфталеїну. 1 мл луги, що йде на титрування, відповідає 1° Тернера. Свіжовидоєне молоко має кислотність 16-18°Т, а молоко, яке скипається при кип'ятінні, 22°Т і більше.

Для визначення кислотності молока застосовують: титрометричні методи визначення кислотності за ГОСТ 3624-92 та метод з застосуванням індикатора фенолфталеїну.

Для виконання аналізу наливаємо 10 мл молока у прозорий стаканчик, додаємо 20 мл дистильованої води і 3 краплі 1% спиртового розчину фенолфталеїну, перемішуємо і титруємо (додаємо по краплях) постійно перемішуючи, 0,1н NaOH до слабо рожевого кольору, який не зникає протягом 1 хвилини. Кількість луги, яка пішла на титрування множимо на 10 для перерахунку на 100 мл молока. Наприклад: на титрування пішло 1,8 мл 0,1 н NaOH, тоді - $1,8 \times 10 = 18$ градусів Тернера.

Висновок: Молоко має кислотність 18° Тернера, свіже і відповідає першому сорту.

Кислотність молока розраховують за формулою:

$$T = X \times 10 \quad (7.1)$$

X – об'єм їдкою натру або їдкою калію 0,1 N, витраченого на титрування

10 – коефіцієнт перерахунку.

Молоко 1 сорту має кислотність 16-18°Т, другого - 18-20° Т. Несортове - вище 20°Т.

Кислотність молочних продуктів визначається аналогічним методом. Кислотність вершків 25% жирності має 24°Т, 50% жирності - 36°Т. Кислотність сметани першого сорту має кислотність 80°Т, другого - 110°Т. Для дослідження беруть 5 мл сметани і додають 30 - 40 мл води, 3 краплі фенолфталеїну і титрують аналогічно як і при визначення кислотності молока. Наприклад: пішло на титрування 4 мл лугу (0,1 н NaOH). Результат множимо на 20 для перерахунку на 100 мл сметани ($4 \times 20 = 80^\circ\text{T}$). Сметана відповідає 1 сорту.

Кислотність сиру. 5 г сиру розтираємо у фарфоровій ступці у 50 мл дистильованої води, підігрітої до 35- 40° С, додаємо 3 краплі фенолфталеїну і титруємо до появи світло рожевого кольору яке не зникає протягом 1 хвилини. Наприклад: на титрування 5 г сиру пішло 9 мл 0,1 н луги. Кислотність сиру буде $9 \times 20 = 180^\circ\text{T}$.

Кислотність вершків. 10 г вершків і вносять до конічної колби (150-200 мл), додають 20 мл дистильованої води і 3 краплі 1% спиртного розчину фенолфталеїну. Отриману суміш перемішують і титрують 0,1 N розчином їдкою натру або їдкою калію до слабо-рожевого фарбування, яке не зникає протягом хвилини. Якщо буде червоно-рожевий колір фарбування, то кислотність менше 20°Т, якщо знебарвлюється, то кислотність молока вище 20°Т.

Кислотність свіжих вершків коливається в межах 18-20°Т, сметани 65-125°Т, сиру 210-270°Т.

Молоко з кислотністю що перевищує вимоги стандарту, підлягає переробці на кисломолочні продукти.

Завдання 3. Проведення реакції на присутність крохмалю в молоці та молокопродуктах

Посуд і реактиви: 1) пробірка; 2) піпетка циліндрова на 10 мл; 3) реактив Люголя.

Хід визначення: у пробірку наливають 5 мл молока, додають 2-3 краплі реактиву Люголя і перемішують. За наявності крохмалю настає синє фарбування молока.

Завдання 4. Проведення реакції на виявлення перекису водню в молоці та молокопродуктах

Перекис водню використовується як консервант, додається в молоко з метою уповільнення скисання.

Посуд і реактиви: 1) пробірка; 2) йодистий калій з крохмалем.

Хід визначення: у пробірку наливають 1 мл молока, додають 1 мл сірчаної кислоти, 0,2 мл розчину йодистого калію з крохмалем, **не струшувати!**

Через 10 хв. спостерігають зміну кольору в пробірці.

За наявності перекису водню настає синє фарбування молока.

Завдання 5. Проведення проби на високу пастеризацію

Посуд і реактиви: 1) пробірка, 2) розчин йодистого калію з крохмалю; 3) розчин перекису водню.

Хід визначення: у пробірку наливають 2 мл молока, додають 5 крапель розчину йодистого калію з крохмалю і 1 краплю розчину перекису водню. Суміш збовтують.

Якщо молоко непастеризоване або ж піддавалося нагріванню нижче 80°C, то воно відразу ж забарвлюється в темно-блакитний колір. Молоко, що піддалося нагріванню вище 80°C, кольору не змінює.

Завдання 6. Проведення реакції на присутність соди в молоці та молокопродуктах

Методика виконання завдання. Метод ґрунтується на зміні забарвлення розчину індикатора бром тимолового синього при додаванні його у молоко з содою.

Для визначення в молоці домішок соди у суху пробірку, розміщену в штативі, наливають 5 см³ досліджуваного молока і обережно по стінці додають 7-8 крапель розчину бром тимолового синього. Через 10 хв., не допускаючи струшування пробірки, спостерігають за зміною забарвлення кільцевого шару. Одночасно досліджують контрольну пробу з молоком без соди. Жовте забарвлення кільцевого шару вказує на відсутність в молоці соди. Зелене забарвлення різних відтінків свідчить про наявність соди в молоці. Чутливість методу - 0,05% доданої соди.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні запитання

1. Які показники визначають натуральність молока?
2. Яку питому вагу має натуральне молоко?

3. Який показник визначає свіжість молока?
4. Яким методом визначається кислотність молока?
5. Яку кислотність має свіже молоко, сметана, сир?
6. В яких одиницях визначається кислотність молока?
7. Що означає термін «мастит»?
8. За допомогою яких приладів визначають жир молока?
9. Які показники якості молока впливають на його сорт і ціну?
10. Назвіть прилади які зображені на фото?



8 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Тема: МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МОЛОКА І КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Мета роботи: визначення якості молока і кисломолочних продуктів за мікробіологічними показниками

Матеріали та обладнання: стерильний посуд: пробірки, чашки Петрі, градуйовані піпетки; стерильна дистильована вода; предметні скельця; мікроскопи; середовище Буліра (див. хід роботи); м'ясо-пептонний агар (МПА); сусло-агар; 2,5% розчин метиленового синього; 0,1 NaOH; фенолфталеїн; фенольний реактив; суміш Нікіфорова; досліджуване молоко та кисломолочний продукт; термостат, водяна баня, термометр.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

I. Мікробіологічний аналіз молока

Терміни та визначення понять

Вхідний контроль – контроль сировини, що надходить на підприємство, на відповідність показникам безпеки та якості, умовам зберігання та строкам придатності, встановленим у чинних нормативних документах на конкретний вид сировини.

Вихідний контроль – контроль продукції під час випуску з переробного підприємства на відповідність показникам безпеки та якості, встановленим у чинних нормативних документах на конкретний вид продукту.

Стандартний контроль – контроль санітарно-гігієнічного стану виробництва, сировини, виробничого процесу та готової продукції, що забезпечує гарантію безпеки та якості готових продуктів.

Посилений контроль – контроль санітарно-гігієнічного стану виробництва, сировини, виробничого процесу та готової продукції, який проводять у наступних випадках:

- перевищення норм мікробіологічної безпеки за одним чи декількома показниками, встановлених чинними нормативними документами;

- у разі виявлення специфічних органолептичних вад готового продукту для встановлення можливих причин мікробіологічного псування продукту;

- під час зміни технології виробництва чи виробників молока та молочної сировини;

- у разі виникнення нештатних ситуацій (аварій), що можуть призвести до випуску небезпечної продукції.

Коров'яче молоко містить 83-89% води і 11-17% сухих речовин, у складі яких 2-5% жиру, 2-4% білків та 4-5% вуглеводів. Молоко також багате на мінеральні речовини (кальцій, натрій, фосфор, калій, магній) і вітаміни (А, Е, Д, групи В, РР, С). Тому воно є прекрасним середовищем для росту мікроорганізмів.

За своєю природою свіжовидоєне молоко – стерильна біологічна рідина. Проте отримати стерильне молоко практично неможливо. Джерела забруднення різні: посуд та обладнання, повітря, вода, корми.

Нормальну мікрофлору молока складають молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*) і молочнокислі палички. Деякі з них в процесі своєї життєдіяльності продукують антибіотики і, таким чином, гальмують розвиток інших бактерій.

Санітарний стан молока визначають за вмістом у ньому бактерій групи кишкової палички (БГКП), а також спороутворюючих анаеробних бактерій, дріжджів. При дотриманні санітарно-гігієнічного режиму можна отримати молоко з відсутністю БГКП в 0,1 мл молока.

При інфекційних захворюваннях тварин у молоко можуть потрапити збудники туберкульозу, бруцельозу, сибірки, ящура, сальмонельозу, лептоспірозу та ін.

У навчальних лабораторіях найчастіше визначають загальну кількість мікроорганізмів у молоці (мікробне число) та колі-титр. Визначення в молоці патогенних мікробів проводять в спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

ХІД РОБОТИ

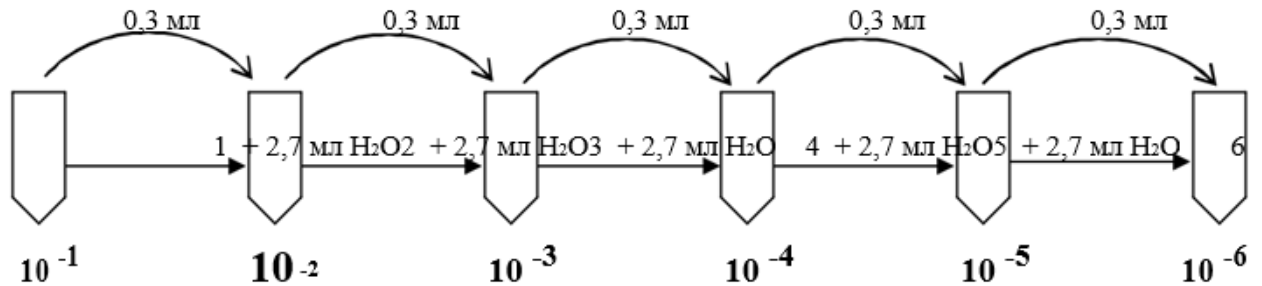
1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці

За шкалою оцінки якості молоко поділяється на 4 класи. До першого класу належить молоко, в 1мл якого налічується до 5×10^5 клітин

мікроорганізмів, до другого – від 5×10^5 до 4×10^6 , до третього – від 4×10^6 до 2×10^7 і до четвертого понад 20 мільйонів. Якість молока першого класу вважається доброю, другого – задовільною, третього – сумнівною, четвертого – незадовільною.

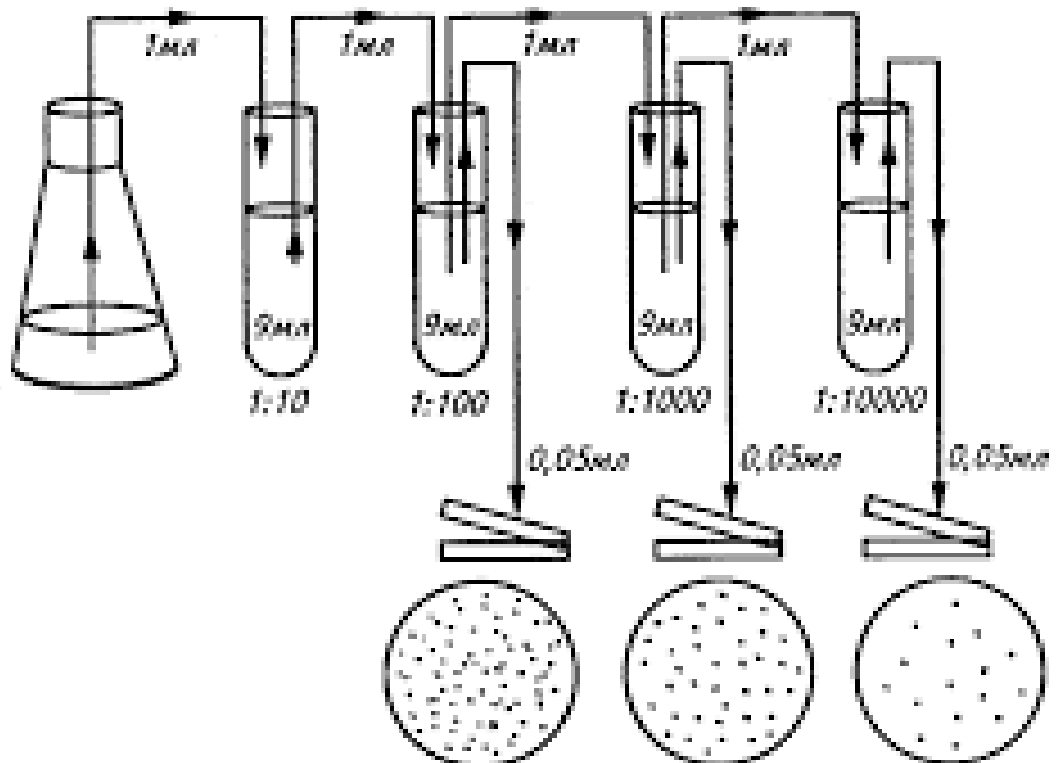
Беруть 0,3 мл молока і змішують з 2,7 мл стерильної води.

З цієї проби готують ряд послідовних розведень молока за наступною схемою:



Для визначення кількості бактеріальної флори 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі із м'ясо-пептонним агаром. Посіви інкубують при 37°C протягом 24 год, після чого підраховують кількість утворених колоній.

Для визначення дріжджів, 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі з сусло-агаром. Посіви інкубують при 30°C протягом 72 год, після чого підраховують кількість утворених колоній.



2. Визначення колі-титру молока

Колі-титром називається найменший об'єм або маса продукту, в якому виявлена хоча б одна кишкова паличка. Для визначення колі-титру молока засівають 6 пробірок із **середовищем Буліра** (у 1 л нейтрального МПБ додають 2,5 г маніту і водного розчину нейтрального червоного до вишнево-червоного кольору і стерилізують 15 хв) молоком у об'ємі 3мл, 2мл, 1 мл, 0,5 мл, 0,3 мл та 0,1 мл. Посів в усі пробірки проводиться стерильними піпетками. Проби культивують при 43 °С протягом 24 год. Результати враховують за зміною кольору середовища з вишневого на оранжевий та утворенням газу в поплавках. Якщо зміни не відбуваються, то говорять про відсутність кишкової палички в молоці. При виявленні газоутворення і помутніння середовища проводять оцінку якості молока.

Бродильним титром називається найменша кількість молока, яка викликала бродіння. Відповідно до ГОСТу, граничний титр кишкової палички в молоці групи «А» – 3 мл, групи «Б» – 0,3 мл.

3. Визначення якості молока за редуктазною пробою

Проба на редуктазу застосовується для швидкого визначення бактеріальної чистоти молока, не враховуючи точного числа бактерій. Принцип методу – бактерії, розмножуючись у молоці, виділяють у середовище фермент редуктазу (один із відновлюючих ферментів). Кількість ферменту, що виділяється, може бути різною і залежить від виду бактерій та їх віку. Однак деякий паралелізм між кількістю бактерій у молоці і його відновлюючою здатністю помічається.

У стерильні пробірки вносять 1 мл 2,5% розчину метиленового синього та 10 мл попередньо нагрітого до 38-40 °С досліджуваного молока, пробірки закривають гумовими корками. Ретельно перемішують вміст пробірок і поміщають їх в термостат з температурою 38-40°C (оптимальна для дії редуктази температура). Спостереження за знебарвленням спостерігають через 20 хв, 2 год і 5,5 год слідкуючи, щоб пробірки не струшувались. Верхній шар молока у пробірках може бути синім, але це не береться до уваги. Проба на редуктазу вважається завершеною, коли настає повне знебарвлення молока. Залежно від часу знебарвлення та зміни кольору молоко відносять до певного класу.



Окраска содержимого ампул	Качественная оценка	Отсутствие/наличие ингибирующих веществ
Ярко-фиолетовая (без изменения цвета среды)		Наличие
Фиолетовая		Наличие
Сизая с серым оттенком		Предел обнаружения
Бледно-желтая		Отсутствие
Желтая		Отсутствие

Характеристика класів молока

Найменування показників	I	II	III	IV
Час відновлення (знебарвлення)	більше 5 год 30 хв	від 5 до 2 год	від 2 год до 20 хв	Менше 20 хв
Якість молока	добра	середньої якості	погане	Дуже погане
Кількість мікроорганізмів в 1мл	менше 500 тис.	500 тис. – 4 млн	4–20 млн	більше 20 млн

II Аналіз якості кисломолочних продуктів

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

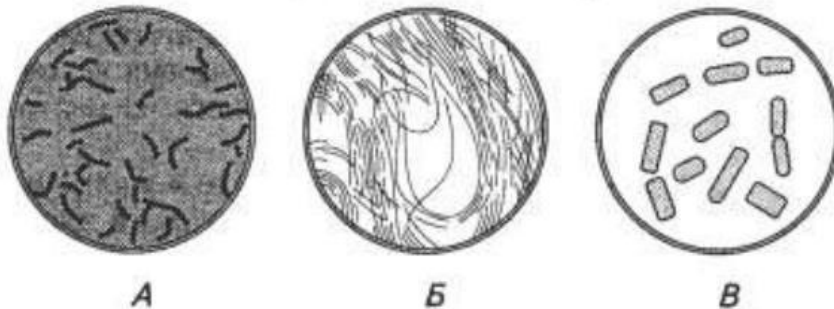
Молочнокислі продукти – добре середовище для розвитку мікроорганізмів. Тут містяться білки, невелика кількість пептону, вільні амінокислоти, вітаміни тощо. Молочнокисле бродіння, в залежності від накопичення кінцевих продуктів (молочної кислоти, оцтової кислоти, етилового спирту та інших органічних сполук), поділяють на гомоферментативне та гетероферментативне. Перший тип бродіння здійснюють, в основному, молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. bovis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*) і лактобацили (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. helveticus*), другий – лактобацили (*L. fermentum*, *L. brevis*), а також *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides* та інші.

Мікрофлора молочнокислого бродіння:

А – молочний стрептокок (*Streptococcus lactis*);

Б – болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*);

В – молочна цвіль (*Oidium lactis*).



Молочнокислі бактерії об'єднані в родину *Lactobacteriaceae*. Ця група морфологічно є досить гетерогенною (довгі і короткі палички, коки). Всі вони є грамозитивними, не утворюють спор (за виключенням *Lactobacillus inulinus*) і в більшості випадків є молорухливими. Молочнокислі бактерії є анаеробами або мікроаерофілами, у них немає гемопротейдів, але вони здатні рости в присутності кисню. Якщо певна бактерія здатна рости аеробно, але не має каталазної активності, то швидше за все, це молочнокисла бактерія. Інша особливість молочнокислих бактерій – потреба в багатьох ростових факторах, тому культивують їх на складних живильних середовищах (дріжджовий екстракт, молочна сироватка, томатний сік, кров). Оскільки внаслідок розвитку молочнокислих бактерій накопичується молочна кислота і, як наслідок, суттєво зростає кислотність середовища, то його слід добре забуферювати.

Для цього часто використовують крейдовий агар. За рахунок складних потреб для росту молочнокислі бактерії практично ніколи не зустрічаються в ґрунті, водоймах. У природних умовах вони зустрічаються:

- в кишківнику, а також на деяких слизових людини та тварин (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium*; *Streptococcus faecalis*, *salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*; *Pneumococcus*);

- на рослинах та їх рештках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbruckii*, *L. fermenti*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*).

Молочнокислі бактерії, які мешкають на рослинах, відіграють суттєву роль при запасанні кормів для худоби. Для виготовлення силосу рослинну масу пресують, додають органічні або мінеральні кислоти, солі, щоб створити сприятливі умови для розвитку молочнокислих бактерій.

Квашена капуста також є продуктом, в приготуванні якого беруть участь молочнокислі бактерії. “Природними” накопичувальними культурами молочнокислих бактерій є кисломолочні продукти (кефір, кисле молоко, йогурт, сметана, ряжанка, сир). У промисловому виробництві кисломолочні продукти отримують за допомогою спеціальних заквасок. Це переважно чисті або змішані культури молочнокислих бактерій, деякі закваски містять лактозасвоюючі дріжджі. При тривалому зберіганні молочнокислих продуктів на їх поверхні утворюється біла плівка. Така ж плівка може утворюватися при квашенні огірків, капусти тощо. Це молочна цвіль *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), яка є частим і небажаним супутником молочнокислого бродіння. Вона окислює молочну кислоту, яку продукують молочнокислі бактерії, до CO₂ та H₂O. При цьому знижується кислотність, що створює сприятливі умови для розвитку гнилісних бактерій. Показниками якості молочнокислих продуктів є наявність активної мікрофлори та молочної кислоти.

Мікроскопіювання молочнокислих бактерій. З кисломолочного продукту на предметному склі виготовити мазок, висушити і зафіксувати протягом 5-10 хв у суміші Нікіфорова (5% етиловий спирт і диетиловий ефір, 1:1) для усунення жиру. Це полегшує фарбування та мікроскопіювання бактерій. Фіксований препарат зафарбувати метиленовою синькою (5 хв) і розглянути в імерсійній системі мікроскопа.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні запитання

1. Як визначити загальне мікробне число молока?
2. Що значить колі-титр? Бродильний титр?
3. Для чого застосовують редуктазну пробу?
4. Яка різниця між гомоферментативним та гетероферментативним типом бродіння?

9 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Тема: ВИВЧЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК І МЕТОДІВ КУЛЬТИВУВАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи - вивчити біотехнологічні характеристики молочнокислих бактерій і їх застосування в харчовій промисловості на прикладі йогуртових і ацидофільних заквасок

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Молочнокислі бактерії широко поширені в природі. За морфологічними ознаками їх ділять на стрептококи і палички. У кожній групі є гомо- і гетероферментативні бактерії.

1. Молочнокислі стрептококи

Молочнокислі стрептококи відносяться до сімейства Streptococcaceae, рід *Lactococcus* і *Leuconostoc*.

До гомоферментативних відносять молочний (*Lactococcus lactis*) і вершковий (*Lactococcus cremoris*) стрептококи. Гетероферментативними є ароматоутворюючі стрептококи, здатні продукувати ароматичні речовини (діацетил, ацетоін) і засвоювати солі лимонної кислоти - цитрати. У цю групу входять *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*. Між гомоферментативними і гетероферментативних стрептококами займає місце термофільний стрептокок *Str. thermophilus*.

Молочнокислі стрептококи представляють собою кулясті або овальні клітини розміром до 1-2 мкм, розташовуються у вигляді коротких ланцюжків або попарно; нерухомі, спор і капсул не утворюють, по Граму фарбуються позитивно. У молодих культурах деякі штами вершкового стрептокока утворюють слизову капсулу. Клітини ароматоутворюючих стрептококів трохи дрібніше, ніж клітини

Lactococcus lactis і *Lactococcus cremoris*, а клітини термофільного стрептокока крупніше, ніж вершкового.

Молочнокислі стрептококи по відношенню до кисню є факультативними анаеробами і ростуть не тільки в анаеробних умовах, але і при доступі молекулярного кисню. Однак у присутності кисню у них не змінюється тип дихання, так як не проявляється аеробне дихання, а триває процес бродіння. Тому молочнокислі бактерії можна віднести до категорії аеротолерантних (повітряно-терпимих) анаеробів.

Температурні межі життєдіяльності цих мікроорганізмів досить широкі. Для мезофільних видів оптимальна температура становить 25-30°C, для термофільних - 38-43°C. Мінімальною температурою розвитку для мезофільних молочнокислих бактерій є 10°C, для термофільних - 20-22°C. Деякі молочнокислі бактерії здатні рости при дуже низьких плюсових температурах (до + 3°C). За потреби в поживних речовинах молочнокислі бактерії відносяться до найбільш складних мікроорганізмів.

Як джерело вуглецю вони можуть використовувати моно - і дисахариди, органічні кислоти.

Більшості видів молочнокислих бактерій для розвитку необхідні амінокислоти: аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин, валін. Тільки деякі види молочнокислих стрептококів можуть рости на середовищах, що містять амонійні солі в якості єдиних джерел азоту. Більшості молочнокислих бактерій необхідні вітаміни - рибофлавін (B2), тіамін (B1), пантотенова (B3), нікотинова (PP), фолієва (B9) кислоти, піридоксин (B6) і ін. Цим пояснюється позитивний вплив на ріст мікроорганізмів добавок до поживних середовищ різних екстрактів (кукурудзи, моркви, картоплі), дріжджового автолізу та інших вітаміновмісних з'єднань. Ріст та розмноження молочнокислих бактерій стимулюють і деякі пептиди, пурини (аденін, гуанін, гіпоксантин), піримідинові (урацил, тимін і ін.), Жирні кислоти (оцтова, олеїнова), а також лимонна кислота. Молочнокислі бактерії культивують на знежиреному стерильному молоці або на щільних і рідких штучних поживних середовищах з використанням гідролізованого молока та інших поживних речовин, одержаних з молока.

Розвиток молочнокислих стрептококів в молоці викликає його згортання (за винятком *Leuconostoc demons*) з утворенням рівного, без рясного відділення сироватки щільного згустку, що має приємний кисломолочний смак та запах. Ароматоутворюючі стрептококи утворюють згусток, в якому можна виявити в невеликій кількості бульбашки вуглекислого газу. На живильному середовищі (агар з гідролізованим молоком і крейдою) молочнокислі стрептококи утворюють дрібні (0,5-1 мм) каплевидні колонії з рівним краєм, з зонами просвітлення крейди. Колонії в товщі живильного середовища (глибинні колонії) мають форму човника або зерна сочевиці. *Lactococcus diacetylactis* на 3% -м агарі може утворювати глибинні колонії у вигляді павучків або грудочок вати, схожих на колонії молочнокислих паличок.

Молочнокислі бактерії ростуть в середовищах з низьким значенням рН - від 5,5 до 8,8. Характерною властивістю молочнокислих бактерій є висока їх спиртостійкість. Вони можуть розвиватися на поживних середовищах, що містять 15-18% етилового спирту, рідше - при 24%. Біохімічні властивості молочнокислих бактерій вивчають за енергією кислотоутворення, граничної кислотності, здатності зброджувати солі лимонної кислоти, якістю згустку, можливої протеолітичної активності бактерій і ін. Енергію кислотоутворення визначають за часом утворення згустку молока (кислотність близько 60°Т) при внесенні 0,5 см молоді (12-20-годинної) культури в 10 см³ стерильного знежиреного молока і вирощуванні посівів при оптимальній температурі.

Протеолітичну активність бактерій вивчають на МПЖ (м'ясо-пептоному желатині), молоці або визначають за допомогою спеціальних біохімічних досліджень і судять про неї за загальною кількістю утворених

водорозчинних продуктів розпаду білку, утворенню аміаку, сірководню, індолу, які характеризують глибокий розпад білкових речовин.

Здатність зброджувати солі лимонної кислоти (цитрати) визначають посівом бактерій на щільне середовище з цитратом кальцію. Поява зон просвітління навколо колоній свідчить про утворення водорозчинних продуктів бродіння при наявності ферменту цитритрази. Активність утворення ароматичних речовин встановлюють за кількістю летючих сполук (методом сублимації) і чотирьох-вуглеводних з'єднань (диацетилу і ацетоїну). Молочнокислі стрептококи мають різну активність.

Lactococcus lactis є першим мікроорганізмом, який виділений у чистій культурі (1873 р Лістером). *Lactococcus lactis* (рисунок 9.1) зустрічається на рослинах, з пилом і рослинними частинками потрапляє на доїльне обладнання, а потім в молоко. Він зустрічається у вигляді коротких ланцюжків з двох-шести ланок. Оптимальна температура розвитку близько 30°C. Окремі штами *Lactococcus lactis* можуть повільно розмножуватися при низьких температурах (нижче 7°C). При температурі 25°C за рахунок утворення молочної кислоти показник рН знижується приблизно до 4,5 і молоко згортається внаслідок кислотної коагуляції казеїну. *Lactococcus lactis* є активним кислотоутворювачем.

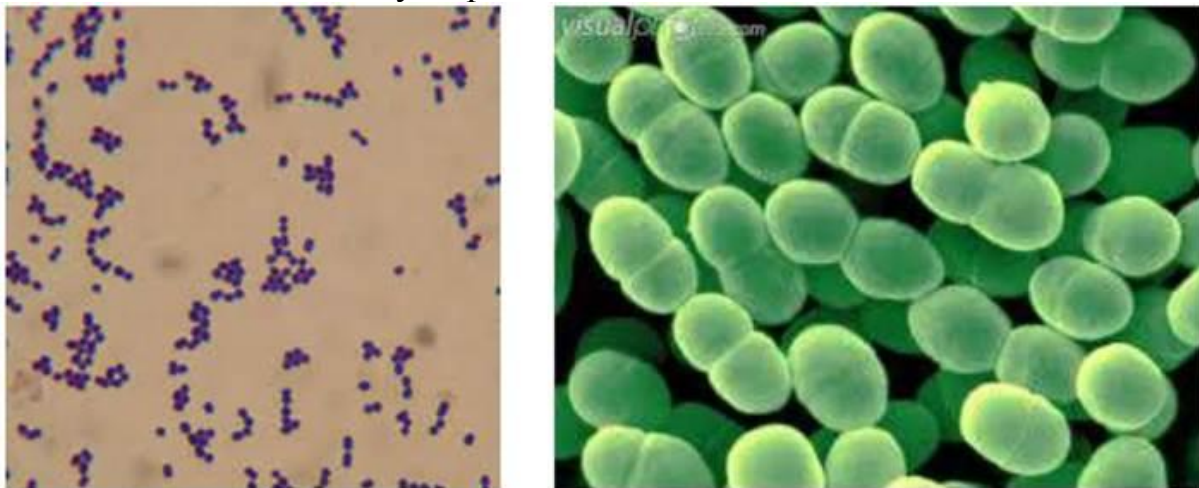


Рисунок 9.1 – Зовнішній вид *Lactococcus lactis* при мікроскопічному дослідженні

Активні штами згортають молоко за 4-7 год, Гранична кислотність при його розвитку досягає 120°Т. Не розвивається в середовищі, що містить 6,5% NaCl, і в лужному середовищі при рН 9,5. Багато штамів продукують антибіотик низин, який є поліпептидом з молекулярної масою 3500. Він пригнічує більшість стрептококів (але не ентерококів), стафілококів, мікрококів, деякі види бацил, лактобактерій, клостридій, актиноміцетів. При цьому відносно грамнегативних бактерій низин не володіє бактерицидною дією.

Lactococcus cremoris (рисунок 9.2) на відміну від молочного стрептокока не зброджує мальтозу і декстрин, позбавлена можливості

дезамінувати аргінін. Не зростає на середовищах, що містять 4% KCl, а також при температурі 39-40°C. При знижених температурах культивування (15-20°C) деякі штами утворюють значну кількість летючих кислот. Є слизоутворюючі штами, що формують згустки молока при температурі 10-18°C. Їх використовують в заквасках для виробництва сметани.

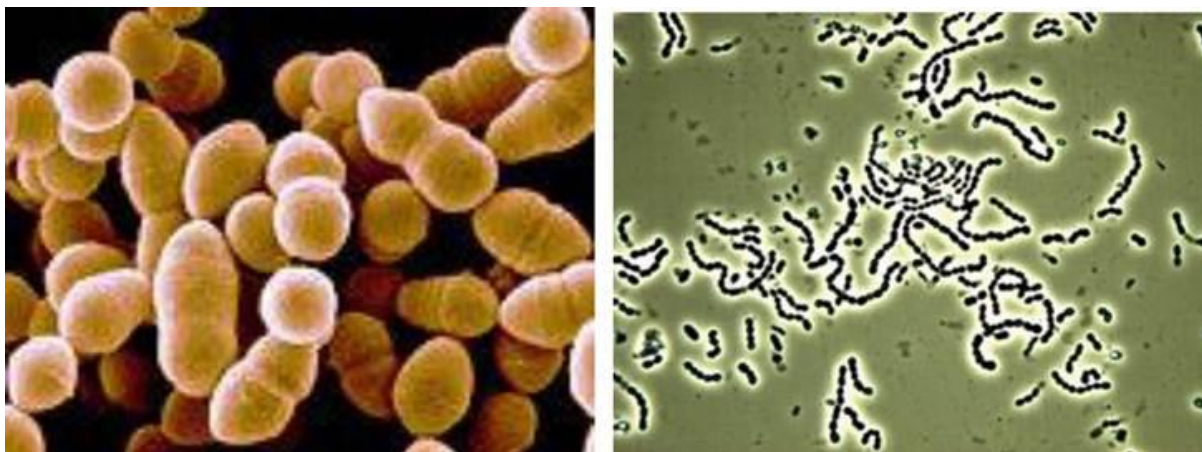


Рисунок 9.2 – Зовнішній вид *Lactococcus cremoris* при мікроскопічному дослідженні

Енергія кислотоутворення *Lactococcus cremoris* слабкіше, ніж у *Lactococcus lactis*, і становить 6-8 год, гранична кислотність 110-115°Т. Утворює довгі ланцюжки. Оптимальна температура розвитку *Lactococcus cremoris* 20-25°C, протягом 24 год при цій температурі спостерігається згортання молока при значенні рН, що дорівнює 5,0-5,2.

У заквасках *Lactococcus cremoris* в поєднанні з *Lactococcus lactis* сприяє утворенню більш густої консистенції продукту.

Ароматоутворюючі стрептококи ***Lactococcus diacetylactis***, виділяють фермент цитрітазу, який розщеплює цитрати з утворенням діоксиду вуглецю і ароматичних речовин - ацетоїну і діацетилу. Порівняно слабкий кислото-утворювач, але утворює діацетил в значній кількості. Має слабку енергію кислото-утворення (більше 16 год), гранична кислотність в молоці досягає 70-100°Т. Згусток молока часто містить бульбашки газу (CO₂). При дозріванні сирів CO₂ бере участь у формуванні малюнка сиру. При розвитку *Lactococcus diacetylactis* в молоці згусток набуває специфічний приємний запах і аромат, зумовлені накопиченням діацетила. Ацетоїн не володіє вираженим ароматом, але тісно пов'язаний з діацетилом. Для утворення діацетилу необхідна лимонна кислота. Тому збагачення поживного середовища лимонною кислотою сприяє продукуванню ароматичної речовини. Оптимальною температурою ароматоутворення є 25°C. Багато штамів розкладають аргінін з виділенням аміаку, стійкі до вмісту у середовищі 4% NaCl. Штами *Lactococcus diacetylactis* вводять до складу заквасок для сиру, сметани, звичайної простокваші.

Leuconostoc dextranicum є також слабким кислотоутворювачем. Він згортає молоко при оптимальній температурі через 2-3 доби. Гранична кислотність становить 70-80°Т. Оптимальна температура кислотоутворення 18-20°С при низькому значенні рН (менше 6), тобто при накопиченні молочної кислоти в процесі бродіння. Часто входить до складу заквасок для сирів.

Leuconostoc cremoris молоко не згортає, гранична кислотність 40-50°Т. Входить до складу заквасок для виробництва кисло-вершкового масла і сприяє збереженню аромату при його зберіганні.

Для розвитку *Leuconostoc dextranicum* і *Leuconostoc cremoris* велике значення має марганець, підвищений вміст якого в молоці в літньо-осінній період стимулює їх ріст та ароматоутворення. Штами молочнокислих стрептококів: *L. lactis*, *L. cremoris*, *Leu. cremoris*, *L. diacetylactis*, *Leu. dextranicum* входять до складу заквасок для виробництва сиру, сметани, кислого молока, кисло-вершкового масла, сирів.

Streptococcus thermophilus (рисунок 9.3) за енергією кислотоутворення перевершує всі молочнокислі стрептококи, досягаючи рівня термофільних лактобактерій. Він сквашує молоко через 3,5-6 год, гранична кислотність становить 110-115°Т. Термофільний стрептокок не росте на середовищах пеніциліну 0,01 МО/см³ і стрептоміцину 5 мкг/см³, що використовують в якості тест-культури при виявленні антибіотиків в молоці.

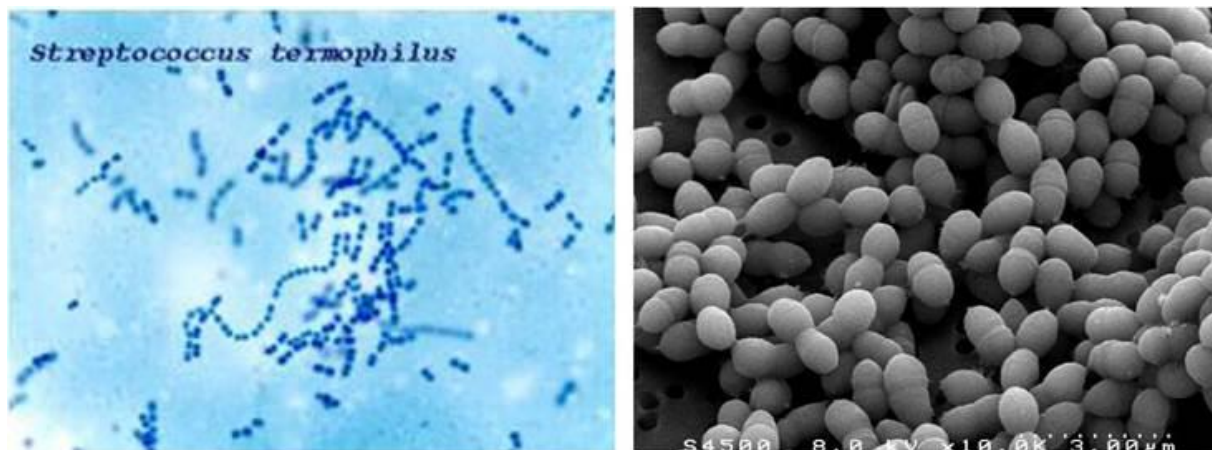


Рисунок 9.3 – Зовнішній вид *Streptococcus thermophilus* при мікроскопічному дослідженні

Чутливий до дії специфічних бактеріофагів. Більш інтенсивний ріст термофільних стрептококів спостерігається при додаванні до живильних середовищ основних амінокислот: валін, лейцину, ізолейцину, лізину, аргініну, метіоніну, гістидіну і проліну *S. thermophilus* володіє високою термостійкістю. Він витримує температуру 75°С протягом 15 хв і 65°С протягом 30хв, внаслідок чого складає значну частину залишкової мікрофлори в молоці після пастеризації. У рідкому середовищі, що містить глюкозу і 4% NaCl, термофільний стрептокок кислоту не утворює, а при

утриманні 2% MgCl₂ молочну кислоту синтезують окремі штами. При наявності в середовищі 0,1% метиленового блакитного *S. thermophilus* не розвивається. Деякі штами утворюють діацетил, в невеликій кількості синтезують ацетоін.

2. Молочнокислі бактерії

Молочнокислі бактерії (лактобактерії) відносять до сімейства Lactobacteriaceae, роду Lactobacterium, що включає три підродів: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* і *Betabacterium*. Термобактерії і стрептобактерії є гомоферментативні, а бета-бактерії - гетероферментативні молочнокислі бактерії.

***Thermobacterium*.** До термобактерій відносяться 8 видів, серед яких найбільш часто застосовують *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricum*, *L. lactis*. Термобактерії - довгі палички, не утворюють ланцюжків, при температурі нижче 15°C не розвиваються, оптимальний ріст при температурі близько 40°C, гомоферментативні.

***Streptobacterium*.** Підрід стрептобактерій включає 7 видів, серед яких в молочній промисловості використовують *L. plantarum* і *L. rhamnosus*. Утворюють довгі ланцюжки, що складаються з коротких паличок, розвиваються і при температурі нижче 15°C, оптимальний ріст при температурі 30°C, гомоферментативні.

***Betabacterium*.** До Бета-бактерій входять 11 видів паличок, найбільш вивченими серед них є *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*. Гетероферментативні.

Лактобактерії є палички, поодинокі або з'єднані попарно, розміром (4 - 10) x (0,5 - 0,6) мкм. Вони нерухомі, спор і капсул не утворюють, по Граму фарбуються позитивно. Клітини стрептобактерій дрібніше, ніж клітини термобактерій, і часто розташовуються у вигляді ланцюжків. Бета-бактерії мають найбільш дрібні і тонкі клітини.

Молочнокислі палички є факультативними анаеробами або мікроаерофілами. По відношенню до температури стрептобактерії і бета-бактерії є мезофілами, термобактерії - термофіли. На звичайних середовищах вони не ростуть, їх вирощують на середовищах з молоком. При розвитку в молоці викликають утворення однорідного щільного згустку з приємними кисломолочними запахом і смаком.

На щільному живильному середовищі лактобактерії формують дрібні гладенькі випуклі блискучі колонії сіро-білого кольору. Колонії лактобактерій різних видів майже не відрізняються. Однак в деяких випадках спостерігаються волокнисті, що врастають в субстрат колонії R-форми на відміну від гладких колоній, що відносяться до S-форм. Глибинні колонії термобактерій можуть бути темними, жовтуватобурими, іноді з короткими нитками. На відміну від глибинних колоній поверхневі колонії більші, локоноутворюючі або зернисті. Глибинні колонії стрептобактерій мають форму у вигляді човника, іноді з виростом.

Температурні межі росту термобактерії становлять 20-55°C, для мезофілів - 15-38°C. Оптимальною температурою розвитку для *L. helveticus* є 40°C, для *L. bulgaricus*, *L. Lactis* - 45°C, *L. acidophilus* - 37-38°C. Для мезофілів оптимальна температура 30°C.

Лактобактерії мають слабку протеолітичну активність, тому не ростуть в субстратах, де єдиним джерелом азоту є білок, де відсутні різні амінокислоти. У той же час є молочнокислі бактерії, які можуть розщеплювати білки.

Молочнокислі бактерії не відновлюють нітрати в нітрити, не утворюють пігментів, цитохромів, пероксидази, але деякі продукують каталазу, що розкладає пероксид водню (H₂O₂). Лактобактерії мають добре виражені цукролітичні властивості. Крім глюкози і лактози вони зброджують і інші цукру.

Так, багато гомо- і гетероферментативних видів (*L. plantarum* і *L. brevis* і ін.) інтенсивно використовують пентози, іноді навіть активніше, ніж глюкозу. Гетероферментативні молочнокислі бактерії зброджують фруктозу, оскільки у них є манітдегідрогеназа, що здійснює відновлення фруктози до маніту. Продуктами зброджування фруктози також є лактати, ацетати і вуглекислий газ.

Термофільні молочнокислі бактерії є активними кислотоутворювачами, вони сквашують молоко через 4-5 год, гранична кислотність досягає 200-350°Т, *Lactobacillus helveticus* (рисунок 9.4) є найактивнішим кислотоутворювачами, гранична кислотність молока при його розвитку досягає 350°Т. Ця паличка зброджує мальтозу і декстрин, не зброджує сахарозу, рафінозу, салицин. Деякі штами розвиваються в субстратах, що містять до 5% кухонної солі. Штами *L. helveticum* можна виділити з сичуга телят або кислого сирого молока. Використовується разом з *Streptococcus thermophilus* для виготовлення ементальського і Грюйерського сирів. Не тільки утворює молочну кислоту, а й бере участь, завдяки наявності протеолітичного ендoferменту, в дозріванні сирів. Її використання надає сиру виражений пряний смак.

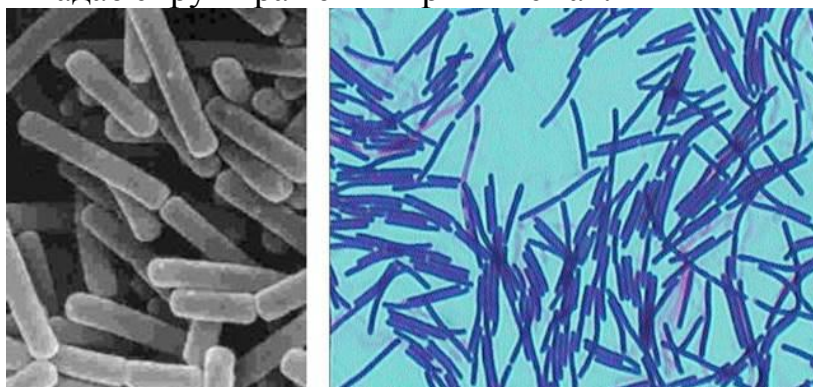


Рисунок 9.4 – Зовнішній вид *Lactobacillus helveticus* при мікроскопічному дослідженні

Lactobacillus bulgaricus (рисунок 9.5) утворює довгі палички і є гомоферментативними, доводить граничну кислотність молока до 200-300°Т. Штами болгарської палички утворюють ацетальдегід - ароматичну речовину, що додає специфічний смак і запах, і антибіотичні речовини, що пригнічують небажану мікрофлору кишечника. Болгарська паличка чутлива до багатьох антибіотиків, стійка до бактеріофагу. Штами *L. bulgaricus* виділяють, як правило, з сирого молока. Спільно з *Streptococcus thermophilus* вона застосовується для виготовлення йогурту.

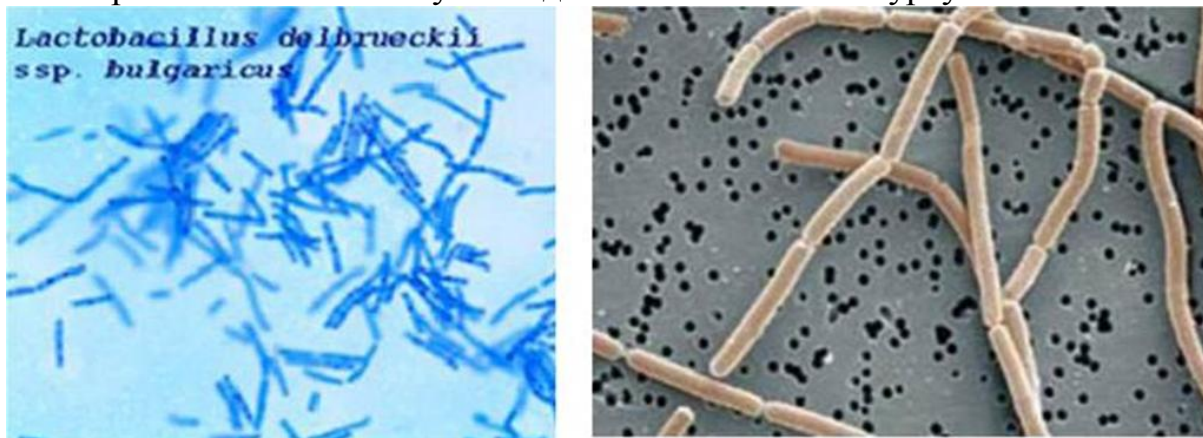


Рисунок 9.5 – Зовнішній вид *Lactobacillus bulgaricus* при мікроскопічному дослідженні

Lactobacillus Bulgaricus входить до складу заквасок для приготування багатьох кисломолочних продуктів, таких як кисле молоко, айран, кумис, кисломолочні напої. Її використовують також у складі спеціально розроблених заквасок для виробництва італійських м'яких сирів (Горгонзола Дольче і Горгонзола Пиканта), італійських витяжних сирів сімейства Паста Філата (моцарела, Качокавалло, Проволоне, Сулугуні), для виробництва швейцарського сиру Грюйер з високою температурою другого нагрівання.

L. acidophilus (рисунок 9.6) є кишковим мікроорганізмом, який можна виділити з вмісту травного тракту людини і різних тварин. Ацидофільна паличка здатна після культивування в молоці знову приживатися в кишечнику людини і пригнічувати там розвиток патогенних і небажаних мікроорганізмів (сальмонели, шигели, стафілококи, ешерихії та ін.). Антагоністичну дію *L. acidophilus* обумовлено антибіотиками які продукує - ацидофілін і лактоцідіном.

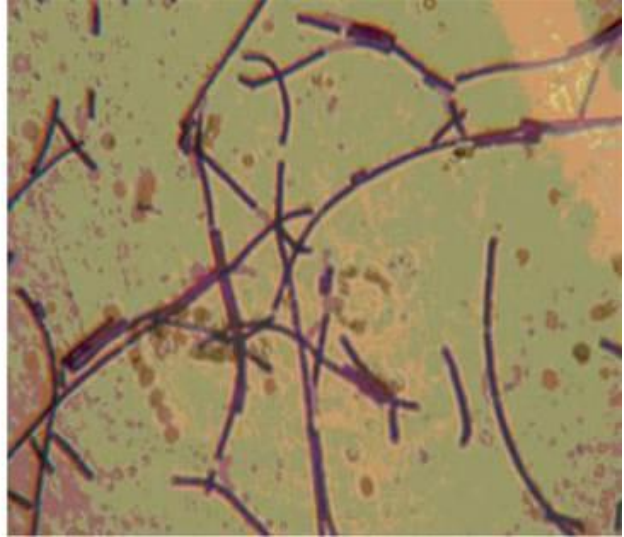
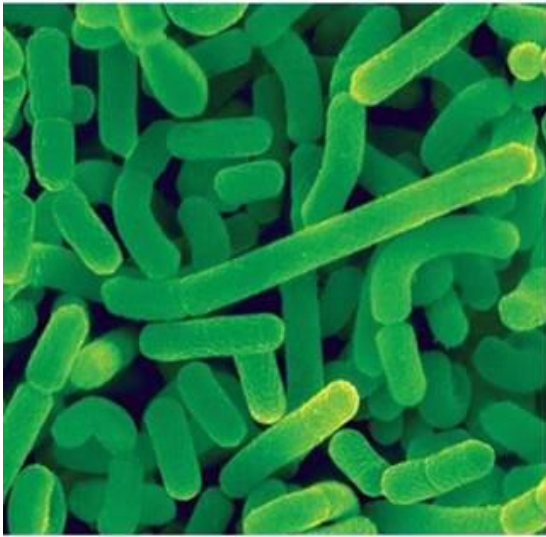


Рисунок 9.6 – Зовнішній вид *Lactobacillus acidophilus* при мікроскопічному дослідженні

Ацидофільні бактерії стійкі до лужної реакції (рН 8,3), наявності в середовищі фенолу (0,25-0,4%), жовчі (20%), КСІ (2%). Гранична кислотність ацидофільної бактерії досягає 200-250°Т.

L. acidophilus зброжує сахарозу, мальтозу, саліцин, часто раффінозу, декстрин. Є слизоутворюючі штами ацидофільної палички.

Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (*L. Lactis*) за своїми властивостями і поведінці в заквасці виявляють велику схожість з *L.bulgaricus*. Зброджують глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, раффінозу, декстрин і саліцин. Гранична кислотність молока, сквашеного *L. lactis*, досягає 120-180°Т. В результаті життєдіяльності бактерій відбувається інтенсивне кислотоутворення, що обумовлює вади сиру, сметани, звичайної кислого молока, - зайвий кислотний смак. Можуть викликати тягучість і нечистий, неприємний смак.

Стрентобактерії (рисунок 9.7) володіють добре вираженими цукролітичними властивостями. Вони зброджують фруктозу, галактозу, маніт, манозу, раффінозу, рибозу, саліцин, сорбіт, трегалозу, ескулін і ін. Глюкозу зброджують без утворення газу.

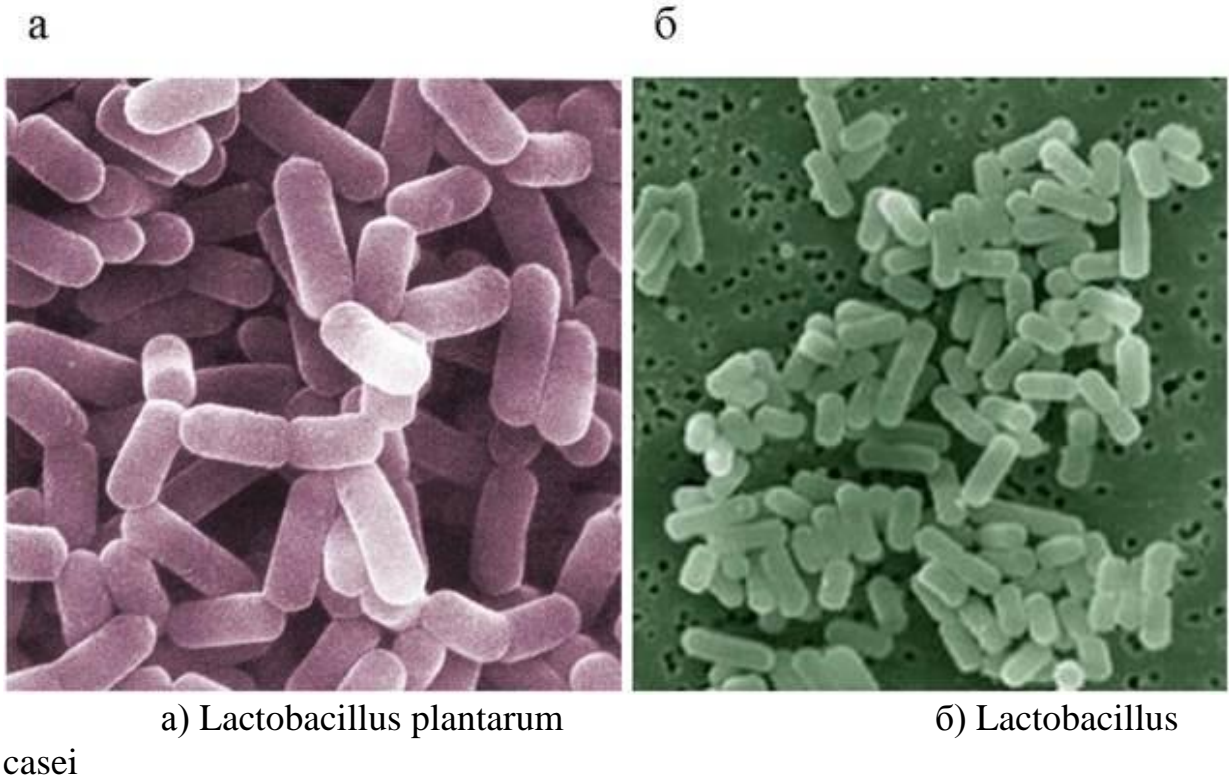


Рисунок 9.7 - Зовнішній вид стрептобактерій: *Lactobacillus plantarum* та *Lactobacillus casei* при мікроскопічному дослідженні

Лактобактерії продукують ряд гідролітичних ферментів, зокрема лактази, що розщеплює лактозу (молочний цукор) і перешкоджає розвитку лактазної недостатності. Лактобактерії підтримують кислотність товстої кишки на рівні 5,5-5,6 рН.

Лактобактерії казеї (*Lactobacillus casei*) - вид грампозитивних паличкоподібних анаеробних неспороутворюючих бактерій. *Lactobacillus casei* - нормальний резидент ротової порожнини, кишечника.

Бактерії видів *Lactobacillus casei* і *plantarum* є гомоферментативними і зброджують лактозу з переважним утворенням молочної кислоти. У молоці розвиваються повільно, гранична кислотність 80-180°Т. Мезофільні лактобацили мають порівняно низьку терморезистентність: вони не витримують нагрівання при 60°С протягом 10 хв. Однак частина популяції витримує короткочасну пастеризацію при 72°С і трохи вище. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (сирна паличка) постійно виявляється в різних сирах, особливо на пізніх стадіях дозрівання. У молочній культурі популяція цього виду представлена злегка вигнутими паличками товщиною 0,3-0,9 мкм і довжиною 0,8-4,0 мкм, розташованими поодинокі, парами або у вигляді ланцюжків.

Характерною особливістю *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* є здатність утворювати ланцюжки з різною кількістю клітин. *Lactobacillus casei* відрізняється від *Lactobacillus plantarum* здатністю утворювати газ з

цитрату натрію. Оптимальна температура росту 30-32°C, мінімальна - 10°C, максимальна - 45°C.

Lactobacillus plantarum використовується в складі мікрофлори антагоністичних заквасок і для виробництва пробіотичних напоїв, так як є представником резидентної мікрофлори кишечника. У морфологічному плані мікроорганізми цього виду надзвичайно мінливі. Вони являють собою палички з закругленими кінцями товщиною від 0,5 до 1,0 мкм і довжиною від 0,6 до 8 мкм; розташовуються поодиночі, парами або у вигляді коротких ланцюжків.

Розмір паличок і розташування залежать від індивідуальних властивостей штамів, фази розвитку культури, складу поживних середовищ, умов вирощування.

Штами, що використовуються в складі заквасок і концентратів для сирів з низькими температурами другого нагрівання, зазвичай складаються з клітин, за формою наближаються до коків (довжиною 0,8-3,0 мкм; товщиною 0,5-0,6 мкм). При розвитку у молоці до значних змін схильна довжина клітин. Зокрема, в сприятливих умовах популяція клітин *Lactobacillus plantarum* представлена в основному короткими паличками, які часто розташовуються парами і рідше в ланцюжках по три клітини; при погіршенні умов (наприклад, в кислих середовищах, що спостерігається при тривалій витримці заквасок) в мікропрепараті переважають довгі клітини. Оптимальна температура росту 30-32°C, мінімальна - 10°C, максимальна - 45°C. *Lactobacillus plantarum* володіє специфічною антагоністичною активністю до маслянокислих бактерій. Дослідження природи антагонізму показали, що дані культури утворюють в середовищах перекис водню в концентраціях, що інгібують або пригнічують розвиток спорових анаеробних бактерій. У нашій країні закваски, що містять *Lactobacillus plantarum* зі специфічною антагоністичною активністю до маслянокислих і ентеробактерій, широко застосовуються в промисловості.

В даний час біологічні методи боротьби зі шкідливою мікрофлорою під час сироваріння з'явилися в багатьох країнах (так звані захисні культури). Мезофільні гомоферментативні лактобацили нечутливі до бактеріофагів лактококів. Вони стимулюють розвиток лактококів в спільних культурах, тому включення в концентрати спеціально відібраних штамів мезофільних лактобацил, які не шкодять при виробництві сирів, може підвищити стабільність молочнокислого бродіння при виробленні сиру, що є необхідною умовою отримання сирів високої якості.

***Lactobacillus rhamnosus* (лактобактерії рамнозус)** - вид грампозитивних анаеробних неспороутворюючих бактерій. Раніше *Lactobacillus rhamnosus* як підвид відносили до виду *Lactobacillus casei*, однак, за сучасною систематикою *Lactobacillus rhamnosus* вважається окремим видом роду Лактобактерій.

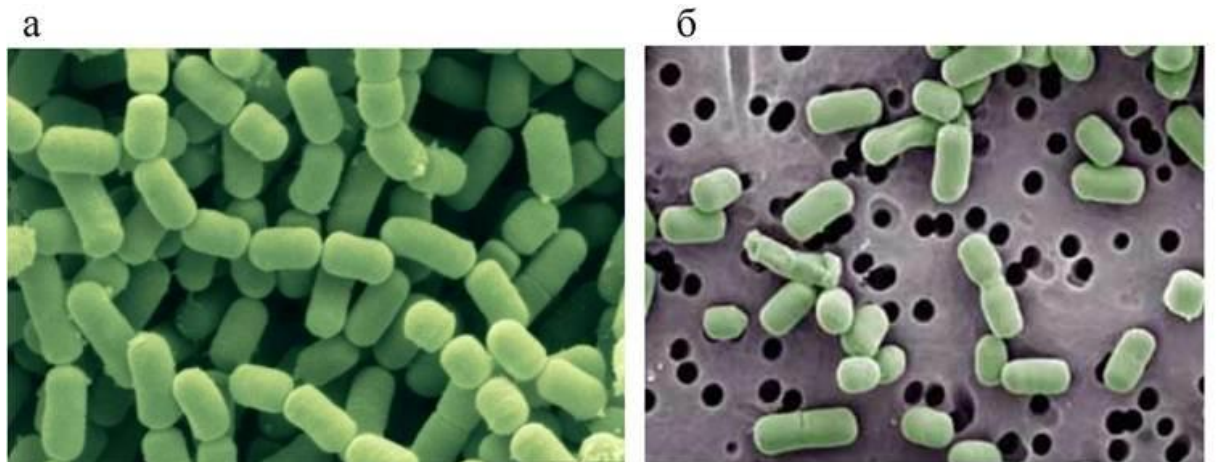
Стрептобактерії мають менш виражену кислотоутворюючу здатність. Вони сквашують молоко через 2-3 доби, гранична кислотність становить 180°Т. Стрептобактерії *L. plantarum*, *L. rhamnosus* здатні засвоювати крім лактози також солі молочної кислоти, т.б. лактати. Вони ростуть в гідролізованому молоці, що містить 6% NaCl і 20-40% жовчі, відновлюють і згортають лакмусове молоко і не утворюють аміак з аргініну. Володіють високою протеолітичною активністю (у 2 рази вище, ніж у мезофільних молочнокислих стрептококів), вміст вільних амінокислот в молоці підвищується з 10 до 60 мг%. *L. rhamnosum* на відміну від *L. plantarum* утворює CO₂ з цитрату натрію. *L. plantarum* продукує пероксид водню і синтезує бактеріоцини плантаріцин, діють гнітюче на кишкову мікрофлору і маслянокислі бактерії.

Бактеріоцини - речовини білкової природи, які продукуються бактеріями багатьох видів, вони пригнічують розвиток споріднених мікроорганізмів. *Lactobacillus plantarum* використовується у складі заквасок для приготування силосу, квашеної капусти, сирів з низькою температурою другого нагрівання.

Lactobacillus casei використовуються в різних БАДах та продуктах для надання їм властивостей пробіотиків.

На ринку кисломолочних продуктів найбільш відомі Actimel компанії Данон, що містять штам *Lactobacillus casei* Imunitass (або штам DN-11400) і Imunele компанії Вімм-Біль-Данн. За кордоном широко застосовується штам *Lactobacillus casei* Shirota (кисломолочний напій Yakult), штами F19 (продукт Cultura фірми Arla Foods), CRL431 (продукти фірми Chr. Hansen).

До групи бета-бактерій (рисунок 9.8) відносяться *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* і *L. fermenti*. У молочних продуктах частіше зустрічається *L. brevis*. По виду і розташуванню клітин ці мікроорганізми не розрізняються. Клітини їх є дрібними паличками. На поверхні щільних поживних середовищ вони утворюють круглі колонії. Бета-бактерії є дуже слабкими кислотоутворювачами, вони не згортають молоко. Температурний оптимум їх зростання становить 30°С. При додаванні дріжджового автолізу ріст бактерій значно посилюється і кислотність досягає 150-160°Т. За своїми властивостями вони близькі до аромат-утворюючих стрептококів. Бета-бактерії ростуть при 15°С і не ростуть при 48°С, деякі види бета-бактерій не ростуть навіть при 45°С. Бета-бактерії утворюють аміак з аргініну і вуглекислий газ із глюкози. Цими властивостями вони відрізняються від інших молочнокислих паличок. Бета-бактерії не згортають лакмусове молоко і лише частково його відновлюють (порозовіння). Вони можуть розвиватися в середовищі, що містить 4% NaCl. Бета-бактерії мають низьку терморезистентність. Входять до складу мікрофлори кефірних грибків.



a) *Lactobacillus fermentum*

б) *Lactobacillus*

brevis

Рисунок 9.8 - Зовнішній вид Бета-бактерій: *Lactobacillus fermentum* та *Lactobacillus brevis*

при мікроскопічному дослідженні

Lactobacillus fermentum є грампозитивним видом бактерій в роду *Lactobacillus*. Відмінна особливість цього виду полягає в тому, що температурний оптимум росту у нього значно вище - в межах 37-40°C. При 15°C росту не спостерігається. Вид *L. fermentum* часто зустрічається в заквасках і є специфічним для хлібопекарського виробництва.

Дослідження антиоксидантних властивостей штаму показало, що він може запобігти псуванню м'яких сирних продуктів. Експерименти, проведені шляхом введення штаму *Lactobacillus fermentum* в молочні продукти як пробіотичного компонента, показали, що він може знищити передбачуваних забруднювачів харчових продуктів, таких як патогенні *Salmonella SPP*, *Shigella SPP*.

Lactobacillus buchneri - грампозитивні, неспороутворюючі, анаеробні. *L. buchneri* є гетероферментативними бактеріями, що володіють найбільшою антагоністичною активністю проти дріжджів і пліснявих грибів. Вони здатні поряд з молочною продукувати значну кількість оцтової кислоти в процесі ферментації, що покращує аеробну стабільність силосу. Дослідженнями виявлено, що *Lactobacillus buchneri* пригнічують небажану мікрофлору і ефективно борються з накопиченням мікотоксинів.

3. Загальні методи ідентифікації молочнокислих бактерій

Для ідентифікації молочнокислих бактерій використовують морфологічні, культуральні та біохімічні методи. Існують також загальні методи, які враховують біохімічні відмінності в обміні речовин і хімічний склад клітин. Зокрема, молочнокислі бактерії можна ідентифікувати по здатності до зброджування вуглеводів і спиртів, а також за потребою у вітамінах, необхідних для росту бактерій. *S. thermophilus* на відміну від

інших гомоферментативних молочнокислих стрептококів зброджують, як правило, сахарозу. Більш широкий спектр зброджування вуглеводів мають гетероферментативні молочнокислі стрептококи, мезофільні молочнокислі палички, стрептобактерії і бета-бактерії. Є відмінності в зброджуванні вуглеводів і у термофільних молочнокислих паличок. Вважається, що *L. Vulgaricus* зброджують мальтозу. Однак відзначена здатність зброджувати мальтозу і у штамів *L. acidophilus*, яка залежить від активності їх кислотоутворення: вона більш виражена у слабких по кислотоутворенню штамів. Здатність молочнокислих бактерій до зброджування вуглеводів сильно варіює при зміні умов культивування. Тому дана ознака розглядають як допоміжний. При ідентифікації молочнокислих бактерій враховується також їх потреба у вітамінах. Ця ознака теж може бути корисним лише при дуже ретельному проведенні експериментів на строго певних поживних середовищах і при стандартних умовах. Для ідентифікації молочнокислих бактерій в якості таксономічної ознаки використовується специфічне для кожного виду утримання гуаніну і цитозину (Г + Ц), яке вимірюється у відсотках від загального змісту підстав в ДНК клітини.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Ознайомитися з біотехнологічними характеристиками молочнокислих мікроорганізмів.

Завдання 2. Ознайомитися зі складом і властивостями заквасок: для йогурту, ацидофільної, для виробництва сметани і сирів.

Завдання 3. Приготувати препарати заквасок і дослідити їх склад.

Завдання:

Ознайомитися з клітинами деяких видів молочнокислих бактерій (рисунок 9.9), бульйонна культура мікроорганізмів, збільшення x 1680 (96 год.):

- 1 - *L. acidophilus*;
- 2 - *L. fermentum*;
- 3 - *L. plantarum*;
- 4 - *L. casei*;
- 5 - *L. buchneri*;
- 6 - *L. brevis*.

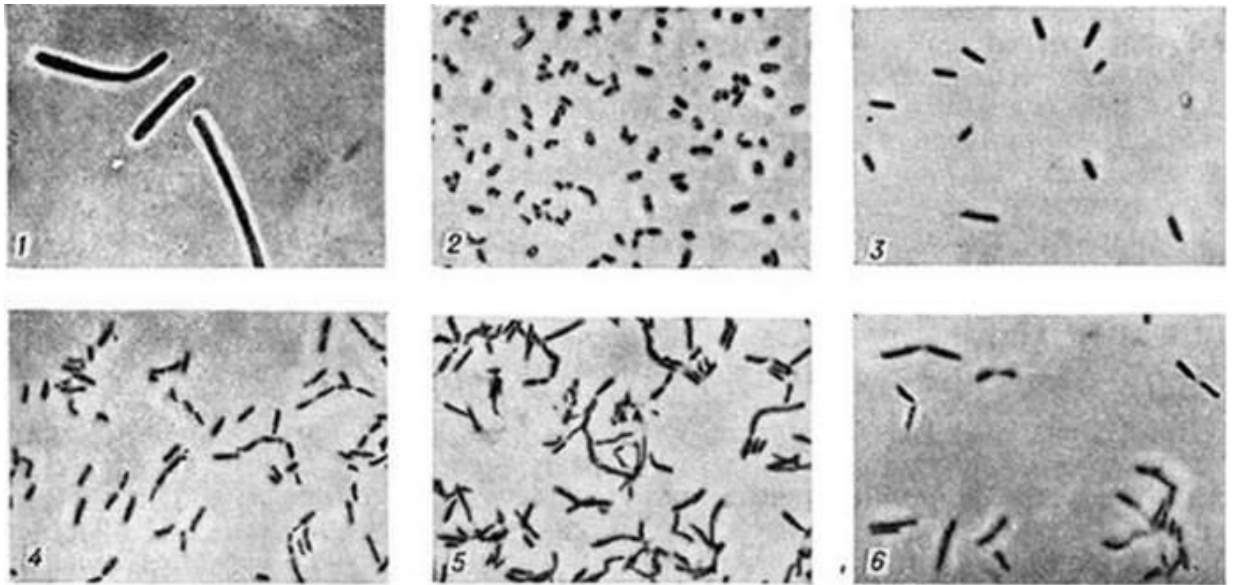


Рисунок 9.9 - Зовнішній вид клітин молочнокислих бактерій при мікроскопічному дослідженні: 1. *L. acidophilus*; 2. *L. fermentum*; 3. *L. plantarum*;
4. *L. casei*; 5. *L. buchneri*; 6. *L. brevis*.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні запитання

1. За якими мікроорганізмами визначають санітарний стан молока?
2. Назвіть основні групи молочнокислих мікроорганізмів та приклади їх застосування в біотехнологічному виробництві.
3. Назвіть основні властивості молочнокислих мікроорганізмів.
4. Якими біотехнологічними характеристиками володіють молочнокислі мікроорганізми?
5. Які основні методи ідентифікації молочнокислих бактерій?

10 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

**Тема: ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ**

Мета роботи: навчитися готувати поживні середовища для культивування мікроорганізмів з різноманітними харчовими потребами,

оволодіти технікою культивування мікроорганізмів на різноманітних поживних середовищах.

Матеріали та обладнання: газові пальники; ваги; важки; шпателі для відбору реактивів; скальпелі; стакани з термостійкого скла на 250 мл; мірні циліндри на 250 та 500 мл; лійки; вата, марля, фільтрувальний папір; скляні палички для перемішування; стерильний посуд для розливу середовищ; індикаторний папір для виготовлення рН; агар-агар; сухий порошок МПА; пептон; стандартизована суміш для приготування пептонної води; дистильована вода; водогінна вода; 30% розчин NaOH; 10% розчин HCl; набір реактивів: NaCl, NaNO₃, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, K₂SO₄, CaCO₃; глюкоза (або сахароза); картопля; житній хліб, термостат; електроплитка; бактеріологічні петлі та гачок; препарувальні голки; шпателі Дригальського; стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); культури дріжджів на МПА; ґрунтова бовтанка; культура цвілевих грибів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Частина I

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні і неорганічні субстрати, які надають їм енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи для харчування мікроорганізми отримують з навколишнього середовища. При культивуванні в лабораторних умовах використовують **поживні середовища**, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітини потребують для свого розвитку макроелементи (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) та мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь тощо). Для деяких мікроорганізмів додатково необхідні фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) і вітаміни. Отже, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту і розвитку мікроорганізмів.

Поживні середовища мають відповідати таким вимогам:

1. Містити всі необхідні джерела макро- та мікроелементів, а за необхідності – вітаміни і фактори росту.
2. Усі сполуки, які входять до їх складу, мають бути у певному збалансованому співвідношенні.
3. Містити у своєму складі необхідну кількість води.
4. Мати оптимальні для мікроорганізмів значення *pH* та *Eh* (окисно-відновний потенціал).
5. Бути ізотонічними, тобто мати такий самий осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини.
6. Бути стерильними.

Середовища, які використовуються в мікробіології, поділяють на групи за такими критеріями: походження, консистенція, призначення (Таблиця 10.1).

Таблиця 10.1 - Класифікація поживних середовищ

Консистенція				Склад та походження			Призначення	
Рідкі	напіврідкі	щільні	сипучі	натуральні	синтетичні	напівсинтетичні	Загального призначення	Спеціального призначення
								елективні

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів, для визначення їх фізіолого-біохімічних особливостей тощо.

Напіврідкі середовища містять 0,75–1% агар-агару (полісахариду, який отримують з бурих водоростей, температура плавлення біля 100⁰С) або 5–7,5% желатини (речовини білкової природи, яку отримують із сполучної тканини тварин, температура плавлення 25⁰С) і використовуються для визначення газоутворення та характеру росту мікроорганізмів.

Щільні середовища містять 1,5–2% агар-агару або 10–15% желатини. Вони використовуються для виділення чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх культуральних особливостей та антагоністичних властивостей.

Сипучі середовища (розварене зерно, а також сипучі субстрати, просочені поживними речовинами) використовуються, як правило, в промисловості.

Натуральні середовища мають рослинне або тваринне походження та *невизначений склад*. Це відвари злаків, фруктів та овочів; молоко, кров, сироватка, сеча, тваринні тканини, яйця птахів та їх зародки; дріжджовий автолізат; відвари м'яса; витяжки гною і ґрунту; вода озер і морів. До них належить м'ясо-пептонний бульон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонна желатина та ін.

Синтетичні середовища готуються з певних хімічно чистих речовин у точно вказаних концентраціях. Вони мають *визначений склад* і легко відтворюються. Наприклад, середовище Чапека для цвілевих грибів, середовище Ешбі для азотфіксуючих бактерій та ін.

Напівсинтетичні середовища мають *частково невизначений склад*. Вони містять як хімічно чисті сполуки (вуглеводи, фосфати, нітрати), так і

компоненти з не встановленим чітко складом (дріжджовий екстракт, пивне сусло, пептон).

Середовища загально призначення використовують для культивування більшості відомих мікроорганізмів. Наприклад, МПБ, МПА, МПЖ.

Середовища спеціального призначення готують з певною метою для конкретних потреб. Серед них розрізняють **елективні** (або селективні) середовища, які забезпечують оптимальні умови лише для певних мікроорганізмів (наприклад, середовище Ешбі для азотфіксаторів); та **диференційно-діагностичні середовища**, які використовують для ідентифікації мікроорганізмів (наприклад, середовище з желатиною для виявлення желатинази, середовище з кров'ю для визначення гемолітичної активності, середовище Ендо для виявлення кишкової палички).

Найважливіші хімічні елементи (вуглець, азот, фосфор та сірку) мікроорганізми споживають у різних формах.

Джерелами вуглецю можуть бути органічні речовини – цукри, спирти, органічні кислоти, амінокислоти та неорганічні – карбонати, діоксид та монооксид вуглецю.

Джерелами азоту можуть бути неорганічні сполуки (амонійні солі, нітрати, молекулярний азот) та неорганічні (амінокислоти). Найдоступнішим джерелом азоту для мікроорганізмів є амонійний азот, який має ступінь окислення (N^{3-}), бо саме в такому вигляді він включається в процес біосинтезу амінокислот. Для включення нітратного азоту в біосинтез мікроорганізмам потрібно спочатку його відновити з N^{5+} до N^{3-} . Цей процес називається асиміляторною **нітратредукцією** і потребує затрат енергії. Зв'язування молекулярного азоту називається **азотфіксацією** і є ще більш енергозатратним, тому азотфіксація притаманна лише певним мікроорганізмам. Деякі мікроорганізми використовують як джерело азоту амінокислоти, які одночасно можуть бути і джерелом вуглецю.

Універсальним джерелом фосфору для мікроорганізмів є фосфатні солі.

Джерелом сірки для більшості мікроорганізмів є сульфати. Для включення сульфатної сірки в біосинтез, її спочатку необхідно відновити з S^{6+} до S^{2-} . Цей процес називається **асиміляторною сульфатредукцією** і потребує енергетичних затрат.

Речовини, що поглинаються мікроорганізмами, мають забезпечити їх енергією, необхідною для активного біосинтезу, відновленими еквівалентами (тобто електронами), які потрібні для функціонування дихального ланцюга, фотосинтетичних електронтранспортних систем та процесів анаболізму, та вуглецем, який є основним клітинним компонентом.

За джерелом енергії мікроорганізми поділяють на: хемо- та фототрофи. Хемотрофи одержують енергію за рахунок хімічних реакцій, а фототрофи – у результаті перетворення енергії світла.

За походженням джерела електронів мікроорганізми поділяють на: орґано- та літотрофи. Орґанотрофи одержують електрони в процесі окислення орґанічних сполук, а літотрофи – неорґанічних.

За походженням джерела вуглецю мікроорганізми поділяють на: авто- та гетеротрофи. Автотрофи споживають неорґанічні джерела вуглецю, а гетеротрофи – орґанічні.

На відміну від інших орґанізмів, мікроорґанізми мають різноманітні варіанти метаболізму (дивись таблицю 10.2).

Таблиця 10.2 - Типи метаболізму мікроорґанізмів

Джерела енергії	Джерела електронів	Джерела вуглецю	
		Орґанічні речовини	Неорґанічні речовини
Енергія хімічних реакцій	Орґанічні речовини	Хемоорґаногетеротрофи	Хемоорґаноавтотрофи
	Неорґанічні речовини	Хемолітогетеротрофи	Хемолітоавтотрофи
Енергія світла	Орґанічні речовини	Фотоорґаногетеротрофи	Фотоорґаноавтотрофи
	Неорґанічні речовини	Фотолітогетеротрофи	Фотолітоавтотрофи

Загальна назва, що характеризує метаболічні особливості мікроорґанізму, складається з 4 коренів, наприклад, хемо-літо-гетеротрофи:

- перший корінь вказує на джерело енергії, яку використовує мікроорґанізм;
- другий – на походження електронів;
- третій – на джерело вуглецю;
- четвертий походить від грецького τροφή – живлення.

ХІД РОБОТИ

1. Необхідно приготувати наступні поживні середовища:

1. Щільне натуральне загальноновживане середовище – **м'ясо-пептонний агар (МПА).**
2. Рідке натуральне загальноновживане середовище – **пептонну воду.**
3. Щільне натуральне середовище – **картопляний агар.**
4. Щільне натуральне середовище – **хлібний агар.**
5. Щільне синтетичне селективне середовище – **середовище Чапека.**

6. Щільне синтетичне селективне середовище – середовище Ешбі.

1. Для приготування **м'ясо-пептонного агару (МПА)** використовують виготовлений промисловим способом сухий порошок, який містить усі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю та простотою приготування.

Компоненти складу м'ясо-пептонного агару (МПА), г/л:

гідролізат м'яса або риби	– 17,9;
пептон	– 10,0;
NaCl	– 5,0;
агар-агар	– 20,0.

Вказану в інструкції кількість сухого порошку слід розмішати в колбі з 1000 мл холодної дистильованої води. Перевірити рН за допомогою індикаторного паперу (або рН-метру) й за необхідності довести його до 7,2–7,4 розчином *NaOH*. Потім, при постійному перемішуванні, довести розчин до кипіння та до повного розчинення інгредієнтів. Отримане середовище профільтрувати в гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр. Стерилізувати при 121⁰С (при 1 атм. в автоклаві) протягом 15–20 хв.

2. Для приготування **пептонної води** до дистильованої води необхідно додати 1% пептону та 0,5% *NaCl* або розчинити в дистильованій воді стандартну суміш, виготовлену промисловим способом. Встановити значення рН на рівні 7,2–7,4 розчином *NaOH*. У разі застосування стандартного середовища, суміш прокип'ятити упродовж 3 хв. Потім розчин профільтрувати через паперовий фільтр і простерилізувати при 121⁰С (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

3. Для приготування **картопляного агару** 200 г картоплі (добре помитої та очищеної) подрібнити, залити 1 л водогінної води, кип'ятити 15 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водогінною водою до початкового рівня, додати 0,2% *NaCl* та 2% *агар-агар*. Нагріти, постійно перемішуючи, до повного розплавлення агару, за необхідності знову профільтрувати. Установити значення рН на рівні 7,0. Середовище простерилізувати при 121⁰С (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

4. Для приготування **хлібного агару** 200 г житнього хліба залити 1,3 л водогінної води, дати настоятися протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після цього рідину злити, профільтрувати через марлю, а потім – через паперовий фільтр. На 1 л рідини додати 5 г *глюкози* та 2%

агар-агару. Нагріти до повного розплавлення агару. Установити рН 5,0. Середовище простерилізувати при 116,5 °С (при 0,75 атм в автоклаві) 20 хв.

5. Для приготування **синтетичного середовища Чапека** в 1 л дистильованої води розчинити солі, виміряти рН, за необхідності довести значення рН до рівня 5,0 – 6,0, додати агар-агар, витримати протягом 15–20 хв. для його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати CaCO_3 (крейду) за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5 °С (при 0,75 атм в автоклаві) 10 хв.

Компоненти середовища, г/л: NaNO_3 -2,0 KH_2PO_4 -1,0; KCl –0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01; сахароза або глюкоза – 0,03; CaCO_3 – 3,0; агар-агар –20,0.

6. Для приготування **синтетичного середовища Ешбі** в 1 л водогінної води розчинити солі, виміряти рН, за необхідності довести значення рН до рівня 7,3 – 7,6, додати агар-агар, витримати упродовж 15–20 хв. для його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати CaCO_3 за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5 °С (при 0,75 атм в автоклаві) 10 хв.

Компоненти середовища, г/л:

KH_2PO_4 –	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –	0,2
K_2SO_4 –	0,1
NaCl –	0,2
CaCO_3 –	5,0
сахароза –	20,0
агар-агар –	20,0.

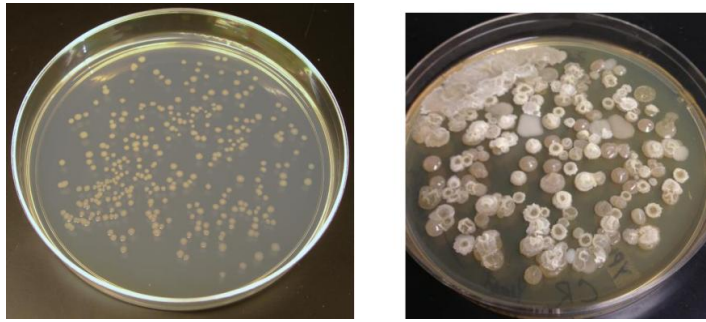
В звіті з лабораторної роботи охарактеризувати поживні середовища, умови для виготовлення рідких та агаризованих поживних середовищ різного призначення. Самостійно виготовити МПА та/або МПЖ та здати викладачу (фото середовища).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Частина II

Вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах називається **культивуванням** (lat. *cultus* – вирощування), а вирощені мікроорганізми – культурою. При вирощуванні мікроорганізмів у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при вирощуванні на твердому середовищі – колонії. **Колонія** – це потомство

однієї клітини, яка потрапила на агаризоване середовище. За виглядом колоній іноді можна розрізнити окремі види мікроорганізмів (рисунок 10.1).



А

Б

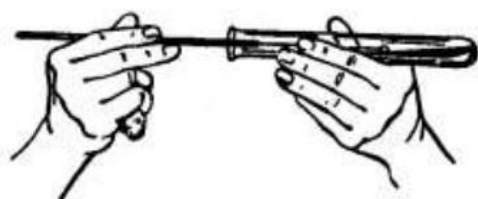
Рисунок 10.1 - Зовнішній вигляд колоній кишкової (А) та сінної (Б) паличок на м'ясо-пептонному агарі (час інкубації 24 год, $t^{\circ} - 37^{\circ}\text{C}$).

На рідких середовищах колонії розрізняти неможливо. Рідке середовище із клітинами, що там ростуть називається **культуральною рідиною**.

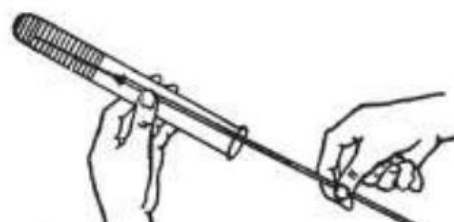
Внесення клітин мікроорганізмів чи іншого дослідного матеріалу (зразки ґрунту, проби води) в стерильне живильне середовище для отримання накопичувальної культури називається **посівом**. Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища до іншого (стерильного) називається **пересівом**. Культивування мікроорганізмів за певної температури називають **інкубуванням** (лат. *incubatio* – вирощування за штучно створеної температури).

Вирощують мікроорганізми у скляному посуді: пробірках, колбах, чашках Петрі.

В пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на твердих середовищах. Для вирощування аеробних культур пробірки зазвичай заповнюють рідким середовищем на 1/3, для анаеробних – на 2/3 об'єму. Для приготування твердого середовища пробірки заповнюють середовищем на 1/3-1/4 об'єму. Після стерилізації пробірки з не застиглим середовищем, яке містить агар, розташовують під невеликим кутом для отримання скошеної поверхні. Це так звані скошені середовища. На них ростуть аеробні культури. Тверде середовище, яке застигло при вертикальному положенні пробірки, називають стовпчиком. У стовпчик петлею здійснюють глибинний посів, здебільшого для анаеробів (рисунок 10.2).



А



Б

Рисунок 10.2 - Посів мікроорганізмів у пробірку на скошений агар (А) та у стовпчик (Б)

Мікроорганізми **в колбах** культивують переважно в рідких живильних середовищах. При посіві аеробних організмів колбу з культурою треба весь час струшувати на качалці.

В чашках Петрі мікроорганізми вирощують тільки на твердих середовищах. При цьому посів на чашку здійснюють як петлею (методом «виснажуючого штриха» по поверхні), так і шпателем (певний об'єм рідини розтирають шпателем Дригальського по всій поверхні середовища) (рисунок 10.3).

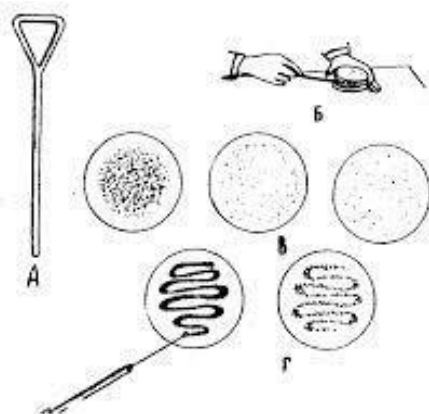


Рисунок 10.3 - Методи посіву мікроорганізмів на чашку Петрі: А – шпатель Дригальського, Б – посів шпателем по всій поверхні, В - при різних розведеннях культуральної рідини, Г – посів петлею методом штриха

Для посіву мікроскопічних грибів у чашку Петрі, чашку необхідно перевернути догори дном і в такому вигляді відкрити в межах стерильної зони. Кінчиком гачка, на якому містяться спори, конідії або грибний міцелій, потрібно доторкнутися до центру агарового диску. Чашку Петрі у перевернутому вигляді помістити в термостат і культивувати в такому вигляді з метою запобігання осідання грибних конідій та спор на поверхню агару.

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі, шпателі, які виготовляють з платинового дроту або ніхрому. При тривалому зберіганні мікроорганізмів у лабораторних умовах може відбутися зміна певних фізіолого-біохімічних чи морфологічних характеристик. Тому необхідно здійснювати пересів культур на свіжі середовища з певною частотою залежно від виду, середовища, умов культивування. При такому зберіганні не можна допускати пересихання середовища. Існують й інші способи зберігання

культур: під шаром стерильного вазелінового масла, в рідкому азоті, в ліофілізованому стані тощо.

ХІД РОБОТИ

Необхідно навчитися культивувати мікроорганізмами шляхом використання різних методів для їх посіву.

Алгоритм виконання завдання:

1. Розлити розплавлене агаризоване середовище на косяк, стовпчик та три чашки Петрі.
2. Після застигання середовища уколком пересіяти культуру дріжджів у стовпчик та штрихом на скошене середовище.
3. Розсіяти ґрунтову бовтанку (0,2 мл) шпателем Дригальського по поверхні чашки Петрі з МПА.
4. Розсіяти ґрунтову бовтанку методом «виснажуючого штриха» на поверхню чашки Петрі.
5. В стерильну маленьку чашку Петрі в центр гачком посіяти цвілевий гриб.
6. Залити стерильною піпеткою 2 мл МПБ в стерильну пробірку і далі в це рідке середовище засіяти культуру дріжджів з косяка.
7. Спостерігати за ростом мікроорганізмів та зробити висновок про відношення дріжджів до кисню за характером їх росту в різних умовах
8. Ознайомитися з різними методами посіву на МПА, МПБ. ПЖА (відео) та відповісти на контрольні питання.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.
2. Відповісти на контрольні питання.

11 ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОФЛОРИ М'ЯСА ТА М'ЯСНИХ ПРОДУКТІВ БАКТЕРІОСКОПІЧНИМ МЕТОДОМ

Мета роботи: визначення мікрофлори м'яса та м'ясних продуктів бактеріоскопічним методом

Матеріали і прилади: мікроскопи, знежирені предметне та покривне скло, біологічна петля або голка, склянки об'ємом 200 мл, скляні палички, пінцети, серветки паперові, етиловий спирт, фільтрувальний папір, індикатори.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Відповідно до Закону України "Про безпечність та якість харчових продуктів" та з метою забезпечення суб'єктами господарювання на ринку м'яса належної якості харчових продуктів для захисту життя і здоров'я людини в Україні діють:

- «Інструкція з товарознавчої оцінки та маркування м'яса» (наказ Міністерства АПК від 01.11.2011 N 587);

-«Правила передзабійного ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів (Наказ АПК N 28 від 07.06.2002);

- ДСТУ 8381:2015 М'ясо та м'ясні продукти. Організація та методи мікробіологічних досліджень;

- Державні санітарні правила і норми "Мікробіологічні нормативи та методи контролю продукції громадського харчування" ДСП 4.4.5.078-2001.

Безпека харчової продукції визначається відповідністю до мікробіологічним нормативам, встановленим Санітарними правилами.

Мікробіологічні показники харчової продукції характеризують дотримання технологічних та санітарно-гігієнічних вимог при виготовленні, зберіганні, реалізації та транспортуванні.

Гігієнічні нормативи за мікробіологічними показниками включають контроль за 4 групами мікроорганізмів:

- **санітарно-показові**, до яких належать мезофільні аеробні (нагадування!: організми, що найкраще всього ростуть при середніх температурах, не надто високих і не надто низьких) та факультативно-анаеробні мікроорганізми (нагадування!: організми, звичайно бактерії або археї, що виробляють АТФ за допомогою аеробного дихання коли кисень присутній, але також здібні до перемикання на анаеробне дихання. На відміну від них, облигатні анаероби не можуть рости і вмирають при наявності кисню) (МАФАНМ) та бактерії групи кишкових паличок - БГКП (коліформи);

- **потенційно-патогенні** мікроорганізми, до яких відносяться кишкова паличка (*Escherichia coli*), коагулазопозитивні стафілококи (*S.aureus*), бактерії роду *Proteus*, *Bacillus cereus* та сульфитредукуючі клостридії;

- **патогенні мікроорганізми**, в тому числі бактерії роду *Salmonella*, віруси;

- **мікроорганізми, що викликають псування продукту** - в основному це дріжджі та плісняві гриби.

При необхідності показники контролю безпеки можуть бути розширені за рахунок визначення: лістерій, шигел, ієрсиній, парагемолітичних вібріонів, фекальних стрептококів тощо.

На поверхні харчових продуктів постійно знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів. Вивчення цієї мікрофлори проводиться в різних країнах протягом багатьох десятиліть. Проведені дослідження дозволили виявити ряд закономірностей в обсіменінні продуктів харчування, формуванні мікрофлори в умовах різних технологічних процесів переробки харчових продуктів, її ролі в біологічній і харчовій цінності, а також етіологічну роль тих або інших продуктів

харчування в передачі інфекційних захворювань і харчових токсикоінфекцій людини.

На рисунку 11.1 зображено підготовку зразка свіжого м'яса до мікробіологічних досліджень.



Рисунок 11.1 – Підготовка свіжого м'яса до мікробіологічних досліджень

Багато харчових продуктів є сприятливим середовищем не тільки для збереження, але й для розмноження мікроорганізмів.

Всю мікрофлору харчових продуктів умовно поділяють на:

- **специфічну;**
- **неспецифічну.**

До **специфічної мікрофлори** відносяться штами мікроорганізмів, що застосовуються в процесі технологічного виробництва продуктів харчування (молочнокислі продукти, хлібобулочні вироби, пиво та інші.).

До **неспецифічної мікрофлори** відноситься випадкова мікрофлора, що попадає в харчові продукти під час заготовки, транспортування, переробки та зберігання. Джерелом цих мікроорганізмів може бути сировина, повітря, вода, устаткування, тварини та людина. Інфікування харчових продуктів мікроорганізмами може призводити до виникнення у людей харчових токсикоінфекцій та інших захворювань.

М'ясо, завдяки високому вмісту вологи і білків є сприятливим поживним середовищем для мікроорганізмів. Розвиваючись на м'ясі, мікроорганізми викликають його псування, оскільки для свого обміну вони використовують складові частини м'яса і виділяють такі продукти життєдіяльності, які різко погіршують його смак, запах, колір, консистенцію. Багато які з цих продуктів можуть бути причиною харчових отруєнь. Найхарактернішим і небезпечним видом псування м'яса під дією

мікрофлора є гнильне розкладання. Метою майже всіх прийомів технологічної обробки є збільшення стійкості м'яса до гнильного розкладання. При належному санітарному стані на поверхні м'яса виявляють кілька тисяч - десятки тисяч мікробних клітин. У разі низького рівня санітарного стану кількість мікроорганізмів на 1 см² поверхні м'ясних туш може досягати 500 тисяч клітин і більше. Якісний склад мікрофлори свіжого м'яса різноманітний. Більшу частину мікрофлори складають мікроорганізми шкіряних покривів і шлунково-кишкового тракту, які є основними джерелами мікробного обміну м'яса в процесі його обробки. Виявляють кокові форми бактерій, бактерії групи кишкової палички, гнильні спороутворюючі бактерії, неспороутворюючі грамнегативні палички, цвілеві гриби, дріжджі. Іноді можна виявити сальмонели та інші патогенні мікроорганізми.

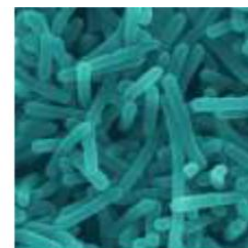
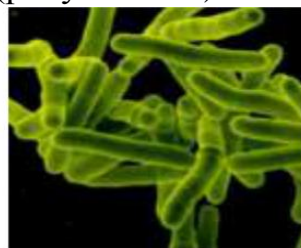
Тому для визначення мікробіологічних показників в харчових продуктах, а також характеру мікрофлори застосовують бактеріоскопічні методи досліджень.

Мікрофлора м'яса та м'ясних продуктів. ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ СВІЖОСТІ М'ЯСА

За класифікацією мікроорганізми, які уражують м'ясо та м'ясопродукти ділять на групи:

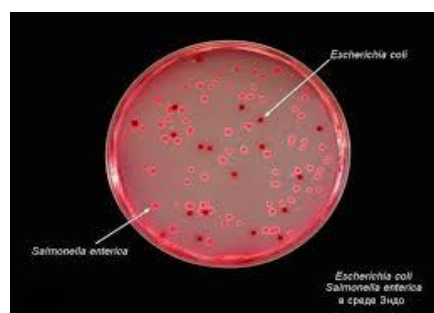
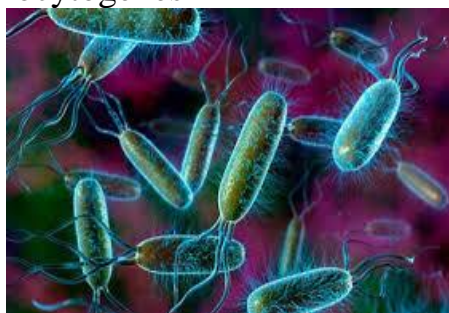
- патогенні та умовно-патогенні;
- санітарно-показові;
- сапрофіти.

До **патогенної мікрофлори** відносяться збудники інфекційних захворювань такі як ящур, туберкульоз, лістеріоз, сибірська язва та бактеріальні токсикоінфекції (рисунок 11.2).

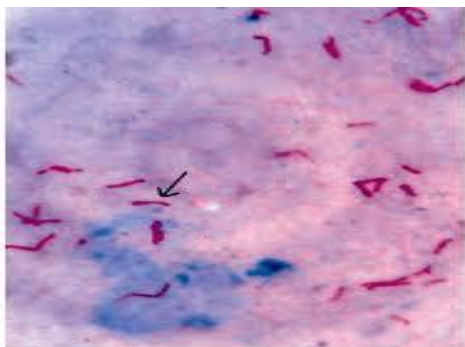


Bacillus anthracis
monocytogenes

Mycobacterium tuberculosis *Listeria*



Salmonella



Mycobacterium tuberculosis

Рисунок 11.1 – Види патогенної мікрофлори

До числа **санітарно-показових** мікроорганізмів відносять кишкову паличку, стрептококи групи А (рисунок 11.2).



Кишкова паличка

Стрептококи групи А

Рисунок 11.2 – Санітарно показові мікроорганізми

Сапрофітна мікрофлора м'яса включає близько 30 типів різних бактерій, які викликають порчу під час зберігання. Сапрофітна мікрофлора представлена бактеріями гниття, коками, молочнокислими бактеріями, дріжджами.

Під час зберігання м'яса та м'ясопродуктів на його поверхні активно розмножуються мікроорганізми, які поступово проникають у товщу, що свідчить про зниження якості м'яса.

Ознаки псування м'яса появляються при накопиченні в ньому бактерій у кількості 10^7 - 10^8 в 1г або 1 см² його поверхні. Тривалість

досягнення цієї “граничної” концентрації мікроорганізмів залежить від температури зберігання та первісного вмісту на поверхні продукту мікроорганізмів.



Bacillus subtilis
Сінна паличка

паличка



Bacillus mycoides



Pseudomonas
Синьогнійна



Bacillus mycoides



Clostridium дріжджові гриби молочнокислі бактерії

Рисунок 11.3 – Сапрофітна мікрофлора

Тому для виявлення свіжості м'яса та м'ясопродуктів використовують бактеріоскопічне дослідження де визначають кількість бактерій та ступінь розпаду м'язової тканини. Показники бактеріоскопічної проби наведені у таблиці 11.1.

Таблиця 11.1 - Показники бактеріоскопічної проби м'яса

Ступінь свіжості м'яса	Показники бактеріоскопічної проби (в полі зору мікроскопа)
Свіже	Мікроорганізми не виявляються або є лише одиничні (до 10 клітин) коки й палички. Слідів розпаду м'язової тканини немає
Сумнівно свіже	Виявляється не більше 30 коків або паличок, а також сліди розпаду м'язової тканини: ядра м'язових волокон у стані розпаду, чіткість контуру слабо помітна
Несвіже	Виявляється понад 30 коків або паличок. Спостерігається значний розпад м'язової тканини: майже повне зникнення ядер і повне зникнення чіткості контуру м'язових волокон

В таблиці 11.2 наведені температурні режими зберігання різних видів м'яса та терміни їх зберігання

Таблиця 11.2 – Температурні режими та терміни зберігання різних видів м'яса

№ з/п	Вид м'яса	Температура зберігання	Тривалість зберігання
1	Яловичина	+4...+6 °С	2 доби
		+18...+20 °С	2 доби
2	Яловичина	+18...+20 °С	7 діб
	Яловичина (після розморожування)	+18...+20 °С	2 доби
3	Куряче м'ясо	+4...+6 °С	2 доби
		+18...+20 °С	2 доби
4	Куряче м'ясо	+18...+20 °С	7 діб
	Куряче м'ясо (після розморожування)	+18...+20 °С	2 доби
5	Нирки свинячі	+4...+6 °С	2 доби
		+18...+20 °С	2 доби
6	Свинина	+4...+6 °С	2 доби
		+18...+20 °С	5 діб
7	Свинина	+18...+20 °С	7 діб
	Свинина (після	+18...+20 °С	2 доби

	розморожування)		
8	Легені свинячі	+4...+6 °С	2 доби
		+18...+20 °С	2 доби

Бактеріоскопічним методом дослідження м'яса та м'ясних продуктів є метод визначення свіжості охолодженого м'яса в мазках «відбитках».

Суть визначення методу свіжості охолодженого м'яса полягає в тому, що мазок взятий з харчового продукту забарвлюють по Граму та вивчають морфологічні властивості мікроорганізмів. Досліджують 25 полів зору кожного мазка, підраховують кількість мікробів і виводять середнє арифметичне для одного поля зору. Враховують кількість мікробів, якісний склад мікрофлори (коки або палички) та інтенсивність забарвлення препаратів.

Препарати-відбитки із свіжого м'яса забарвлюються погано. При мікроскопії препаратів з поверхневого шару м'яса виявляють поодинокі палички або коки; в препаратах з глибоких шарів у більшості випадків мікрофлора відсутня.

Препарати-відбитки з м'яса сумнівної свіжості забарвлюються добре. В полі зору препарату, зробленого з поверхневого шару м'язів, виявляють до 10 мікроорганізмів, а в препаратах з глибоких шарів до 20-30 мікробів (переважно коки).

Препарати-відбитки із зіпсованого м'яса забарвлюються інтенсивно, на склі помітні залишки тканин м'яса, що розклались. У кожному полі зору мікроскопа при дослідженні препаратів, одержаних з поверхневих і глибоких шарів м'язів, у середньому виявляють понад 30 мікробів (переважно палички).

ХІД РОБОТИ

1. Ознайомитись зі специфічною та неспецифічною мікрофлорою м'ясних продуктів, яка знаходиться на поверхні та всередині харчових продуктів, що представлена у теоретичній частині.

2. Вивчити метод визначення ступеня свіжості м'яса.

3. Приготувати препарати "відбиток" з поверхні зразків м'яса та м'ясопродуктів. Препарати забарвити по Граму згідно варіанту на введеному в додатку А.

Для бактеріоскопічного дослідження готуємо два мазки-відбитки: один з поверхневого шару, інший - з глибоко розташованих м'язів.

Для виготовлення мазків-відбитків з поверхневого шару м'яса стерильними ножицями вирізуємо шматочок масою 0,5-1 г, який прикладаємо зрізаним боком до поверхні предметного скла.

При виготовленні препарату з глибоких шарів поверхню м'яса припікаємо нагрітим шпателем, стерильними ножицями вирізуємо шматочок (3-3,5 см), який прикладаємо до предметного скла. Препарат

підсушують на повітрі, фарбують за методом Грама і проводять мікроскопію

Техніка забарвлення наведено у Додатку А.

4. Підготовлені препарати розглянути під мікроскопом. Описати показники бактеріоскопічної проби в полі зору мікроскопа. Зробити рисунки побаченого під мікроскопом зображення.

5. Зробити висновок про ступінь свіжості м'яса досліджуваного зразка.

Наприкінці лабораторної роботи необхідно:

1. За результатами виконання завдань лабораторної роботи оформити висновок в довільній формі.

2. Відповісти на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Яка мікрофлора харчових продуктів відноситься до специфічної та неспецифічної.

2. Яким шляхом неспецифічна мікрофлора потрапляє на харчові продукти.

3. В чому суть бактеріоскопічного методу дослідження мікрофлори харчових продуктів.

4. Дайте класифікацію мікроорганізмів, які уражують м'ясо.

**Тестові завдання для підготовки до екзамену з дисципліни
«Технічна мікробіологія»**

1. Які показники визначають при санітарній оцінці води?

- A. Загальне мікробне число
- B. Колі-титр
- C. Наявність та кількість анаеробів
- D. Наявність патогенних мікроорганізмів
- E. Колі-індекс

2. Дати вірну відповідь на питання: «Як називається процес пристосування мікробів до нових умов існування під впливом фізичних, хімічних, біологічних і антропогенних факторів?»

3. Вказати солодощі, які мають досить високу вологість(22-24%), що сприяє швидкому псуванню:

- A. Мармелад
- B. Пастила
- C. Карамель
- D. Шоколад
- E. Зефір

4. Загальне обсіменіння молока бактеріями визначають:

- A. По редуктазній пробі з метиленовим синім
- B. По зовнішньому вигляду м.о.
- C. По наявності у бактерій слизових капсул
- D. Шляхом прямого підрахунку м.о. під мікроскопом
- E. Шляхом підрахунку колоній на твердому поживному

5. Наведіть 3 приклади мікроорганізмів, які відносяться до звивистих бактерій:

- A. Вібріони
- B. Спірили
- C. Спірохети
- D. Коринебактерії
- E. Бацили
- F. Клостридії

6. Який вуглеводень входить до складу ДНК бактерій?

- A. Глюкоза
- B. Мальтоза
- C. Дезоксирибоза
- D. Лактоза

7. Оберіть види псування м'яса

- A. Ослизнення, кисле бродіння, пігментація
- B. Гниття, бомбаж, пігментація
- C. Кисле, плоскокисле, сульфідне
- D. Згірклість, пліснявіння, гниття

8. З якої структури бактеріальної клітини походять джгутики?

- A. Цитоплазматичної мембрани
- B. Клітинної стінки
- C. Цитоплазми
- D. Нуклеоїду

9. У вигляді ланцюжків розташовуються:

- A. Стрептококи
- B. Стафілококи
- C. Тетракоки
- D. Мікрококи

10. Фаза часткового, повільного збільшення кількості всіх тих мікроорганізмів, що потрапили в молоко при доїнні – це...

- A. Бактерицидна фаза
- B. Фаза змішаної мікрофлори
- C. Фаза розвитку молочнокислих паличок
- D. Фаза розвитку молочнокислих стрептококів

11. Мікроорганізми – це...

- A. частинки розміром менше 10 мкм, що рухаються;
- B. групи живих найдрібніших організмів, що складаються з однієї або декількох клітин;
- C. біологічні об'єкти, які здатні викликати захворювання тільки в тілі живих організмів
- D. найдрібніші неживі істоти, які можна побачити лише у мікроскоп;

12. Спіралеподібні бактерії по формі нагадують штопор, мають до

5 завитків – це...

- A. Вібріони
- B. Лептоспірили
- C. Спірили
- D. Спірохети

13. Кислота, що утворюється при ферментації тіста, сприяє набряканню білків, розвитку дріжджів – це...

- A. Оцтова
- B. Молочна
- C. Лимонна
- D. Масляна

14. Стрептококи це – ...

- A. Бактерії
- B. Віруси
- C. Гриби
- D. Актиноміцет

15. Теплова обробка при температурі вище 100°C з метою знищення всіх мікроорганізмів – це...

- A. Пастеризація
- B. Стерилізація

С. Кип'ятіння

Д. Бродіння

16. Закваска, яка готується із промислової закваски на молокопереробному підприємстві, щоденно і є вихідною для всіх заквасок, які застосовуються на підприємстві – це...

А. Первинна виробнича закваска

В. Виробнича закваска

С. Материнська закваска (лабораторна)

Д. Промислова закваска (оригінальна)

17. Які середні розміри еукаріотичної клітини?

А. 1-10 нм

В. 10-100 нм

С. 1-10 мкм

Д. 10-100 мкм

18. Набутий імунітет в організмі може бути:

А. Тільки штучний

В. Тільки набутий

С. Штучний і набутий

19. Який вміст вологи в макаронних виробах?

А. 20%-25%

В. 14%-20%

С. 5%-10%

Д. 11%-13%

20. Які мікроорганізми називають «пожирачі бактерій»?

А. Віруси

В. Бацили

С. Стафілококи

Д. Бактеріофаги

21. Що є субстратом для проростання мукофу?

А. Поверхня м'ясних харчових продуктів

В. Поверхні зернових цехів

С. Хліб

Д. Молоде зерно пшениці

22. Група мікроорганізмів, що займає проміжне положення між бактеріями та грибами:

А. Дріжджі

В. Коки

С. Аскоміцети

Д. Археї

23. Спирт, що утворюється в результаті бродіння...

А. Допомогає дріжджам розростатися

В. Пригнічує розвиток дріжджів

С. При вищій концентрації спирту, дріжджі починають активно бродити

D. Навіщо там дріжджі

24. З якою метою використовують масляну кислоту?

A. Для консервування продуктів

B. Її ефіри використовують в кондитерській промисловості, парфумерії тощо

C. Для очистки продуктів

D. Являється гарним підсолоджувачем

25. Генетика мікроорганізмів – це...

A. Наука про закони спадковості і мінливості

B. Наука про життя та розвиток бактерій

C. Наука про будову та функції ДНК та РНК

D. Наука про закони спадковості і мінливості мікроорганізмів, тобто про те, як успадковуються ознаки у мікроорганізмів і як відбувається їх зміна

26. Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи:...

A. Грампозитивні та грамнегативні

B. Аероби та анаероби

C. Вібріоли та спірили

D. Тимчасові та постійні

27. Мікроаерофіли – це...

A. Аероби, що розвиваються за значно високої концентрації кисню від 79 до 90% B. Аероби, що розвиваються за значно нижчої концентрації кисню - від 2 до 10 %

C. Мікроорганізми, які добре ростуть як без кисню, так і за його наявності

D. За наявності кисню гинуть внаслідок утворення перекису водню (H_2O_2)

28. Дезінфекція – це...

A. Повне знищення вегетативних і спорових форм патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі

B. Комплекс лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на знищення мікроорганізмів або пригнічення їх росту на певному об'єкті (рана, організм)

C. Комплекс санітарно-гігієнічних, інженерно-технічних та протиепідемічних заходів, які включають роботи з винищування та захисту від синантропних гризунів

29. Що відбувається з мікробною клітиною при плазмолізі?

A. Проходить ділення бактеріальної клітини

B. Бактеріальна клітина переходить в стан анабіозу

C. Бактеріальна клітина гине

D. Відбувається обмін речовин у клітині

30. Як називаються хімічні речовини біологічного походження, які здатні пригнічувати розвиток мікроорганізмів?

A. Бактеріофаги

- В. Антибіотики
- С. Антисептики
- Д. Бактеріолізینی

31. Назвіть мікроорганізми, які розмножуються у повітрі:

- А. Будь-які сапрофітні види бактерій
- В. Кишкова паличка
- С. Спори грибів
- Д. Повітря є несприятливим середовищем для розмноження бактерій

32. При якій концентрації цукру спиртове бродіння проходить найкраще?

- А. 5%
- В. 10%
- С. 15%
- Д. 30%

33. Головними продуктами маслянокислого бродіння є – ...

- А. Пропіонова і оцтова кислота, CO₂ та водень
- В. Масляна кислота, CO₂ та водень
- С. Етиловий спирт та CO₂
- Д. Тільки масляна кислота

34. Хто заснував мікробіологію як науку?

- А. Р. Кох
- В. І.І. Мечников
- С. Л. Пастер
- Д. Антоній ван Левенгук

35. На які царства поділяються всі відомі мікроскопічні істоти?

- А. Еукаріоти, прокаріоти, акаріоти
- В. Еукаріоти, прокаріоти
- С. Еукаріоти, акаріоти
- Д. Прокаріоти, акаріоти

36. Які розрізняють види псування консервів?

- А. Бомбаж, плоскокисле псування, сульфітне псування
- В. Бомбаж, плоскокисле псування
- С. Сульфітне псування, фосфорне псування
- Д. Бомбаж, гниле псування

37. При аналізі свіжості молока проводять пробу на редуктазу та на здатність до згортання. На основі якого з наведених показників можна ще встановити свіжість молока?

- А. Кислотність
- В. Сухий залишок
- С. Жирність
- Д. Вміст сторонніх домішок

38. Мікроелементи – це елементи, частка яких у клітині сягає:..

- А. До 0,01 %
- В. До 0,1 %

C. До 1,99 %

D. До 5 %

39. Організми мають ядро, оточене ядерною мембраною.

Генетичний матеріал зосереджений переважно в хромосомах, які складаються з ниток ДНК і білкових молекул. Діляться ці клітини мітотично це:

A. Бактерії

B. Прокаріоти

C. Еукаріоти

D. Віруси

40. З чого головним чином виробляють плавлені сири?

A. Із зрілих сирів

B. Із квашеного молока

C. Із суміші молока і ряжанки

D. Із прогірклих сирів

41. Яку назву мають взаємовідносини двох груп мікроорганізмів, коли одні використовують інших як їжу - ...

A. Аменсалізм

B. Хижацтво

C. Конкуренція

D. Паразитизм

42. Для виготовлення сиру, окрім закваски застосовують...

A. Сичужний фермент

B. Дріжджі

C. Молочнокислі стрептококи

D. Молочнокислі палички

43. Як називаються ферменти бактерій, що постійно представлені в бактеріальній клітині?

A. Ендоферменти

B. Екзоферменти

C. Індуцибельні

D. Конститутивні

44. Яка структура бактеріальної клітини синтезує білки?

A. Мітохондрії

B. Рибосоми

C. Ендоплазматичний ретикулум

45. Що забезпечує міцність клітинної стінки?

A. Полісахариди

B. Поліпептиди

C. Ліпіди

D. Муреїн

46. Яку функцію виконує капсула бактеріальної клітини?

A. Захист від імунних факторів

B. Урівноваження осмотичного тиску

- C. Контроль обміну речовин
D. Захист від температурних факторів
- 47. Який з наведених антибіотиків має протигрибкову дію?**
A. Рифампіцин
B. Гентаміцин
C. Ністатин
D. Цефалоспорин
E. Еритроміцин
- 48. Як називаються бактеріальні клітини, які мають джгутики по всьому периметру клітини?**
A. Амфітрихи
B. Монотрихи
C. Лофотрихи
D. Перитрихи
- 49. Яку функцію виконує спора бактеріальної клітини?**
A. Антілізоцимну
B. Збереження життєздатності бактерій за умов дії несприятливих факторів навколишнього середовища
C. Антифагоцитарну
D. Забезпечує антибіотикорезистентність
- 50. Як називається мінливість мікроорганізмів, не пов'язана із змінами структури ДНК бактеріальної клітини?**
A. Рекомбінація
B. Модифікація
C. Мутація
- 51. Кефір являється продуктом...**
A. Тільки діяльності молочно-кислих бактерій
B. Комбінованого бродіння молочно-кислого та спиртового
C. Молочно-кислого та метенового
- 52. Який вид дріжджів, переважно використовують у виноробстві:**
A. *Saccharomyces vini*
B. *Candida albicans*
C. *Saccharomyces cerevisiae*
D. *Saccharomyces pastorianus*
- 53. До молочнокислих бактерій не відноситься:**
A. *Lactobacillus casei*
B. *Lactobacillus brevis*
C. *Lactococcus lactis*
D. *Serratia Solinaria*
- 54. До яких з наведених категорій належать мікроорганізми, що здатні утворювати спори?**
A. L-форм бактерій
B. Грамнегативних бактерій

- C. Мікоплазм
- D. Грампозитивних бактерій

55. Що таке ріст мікроорганізмів?

- A. Збільшення кількості клітин
- B. Збільшення розмірів клітин
- C. Скоординоване подвоєння всіх структур, органел, і компонентів клітини, що, як правило, закінчується розмноженням

56. Збудниками псування охолодженої риби є:

- A. Бактерії роду псевдомонад
- B. Сальмонели
- C. Молочно-кислий стрептокок
- D. Дріжджі

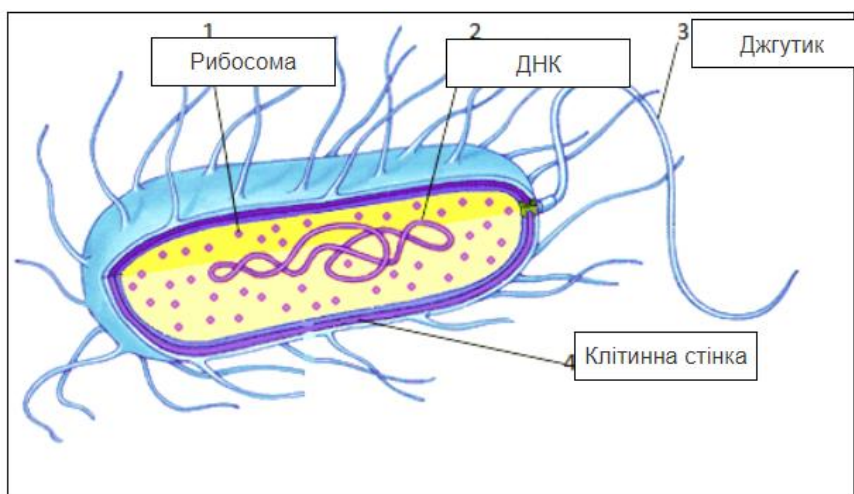
57. Міцелій якого грибу використовується при виготовленні сиру?

- A. *Penicillium roqueforti*
- B. *Fusarium*
- C. *Botrytis*
- D. *Oidium*

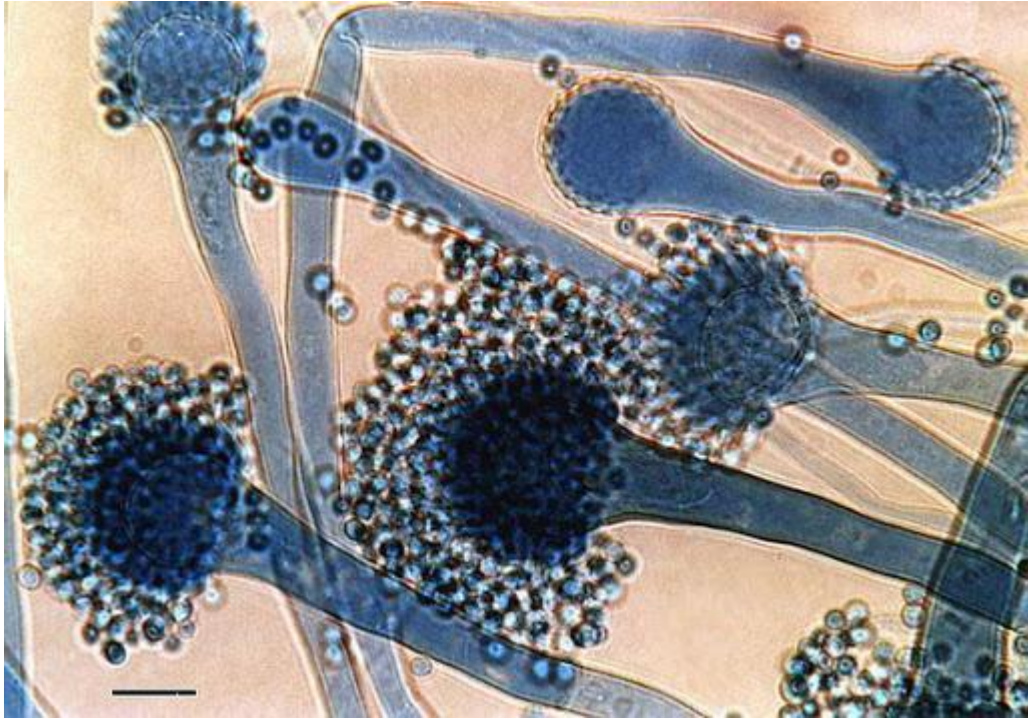
58. Міцелій якого грибу вражає фрукти, овочі та особливо ягоди?

- A. *Oidium*
- B. *Botrytis*
- C. *Fusarium*
- D. *Penicillium roqueforti*

59. На малюнку зображена клітина прокаріот. Встановіть відповідність:



60. Який гриб зображено на малюнку?



- A. Конідія
- B. Мукор
- C. Аспергіл
- D. Пеніцил

Рекомендована література

Базова

1. Пирог Т. Я. Загальна мікробіологія / Т. Я Пирог. – К. : НУ- ХТ, 2004. – 471 с.
2. Мікробіологія / Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. та ін. – Львів: Видавнич. Центр ЛНУ ім. І. Франка, 2009. – 359 с.
3. Гудзь С. П. Мікробіологія: практикум, тести / Гудзь С. П., Гнатуш С. О, Білінська І. С. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. – 228с.
4. Люта В.А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія, та імунологія : підручник / В.А. Люта, О.В. Кононов. – Київ : ВСВ «Медицина», 2017. –576 с.
5. Основи мікробіології / Гудзь С. П., Кузнецова Р. О., Кучерас Р. В. та ін. / - Київ: НМКВО, 1991. – 236 с.
6. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології : підручник / К.М. Векірчик. – Київ: Либідь, 2001 – 312 с.
7. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології / К. М. Векірчик. – К. : Либідь, 2001. – 143 с.
8. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / К. И. Бельтюкова, М. С. Матышевская, М. Д. Куликовская, С. С. Сидоренко. – К. : Наукова думка, 1968. – 316 с.
9. Вершигора А. Е. Общая микробиология. – К.: В-я шк., 1988. – 343 с.
10. Гусев М. В. Микробиология / М. В.Гусев, Л. А. Минеева. – М. : МГУ, 1985. – 376 с.
11. Тимаков В. Д., Левашов В. С., Борисов Л. Б. Микробиология. – М.: Медицина, 1983. – 509 с.
12. Асонов Н.Р. Микробиология : підручник / Н.Р. Асонов – М. : Колос, 1980. – 312 с
13. Шлегель Г. Общая микробиология. – Москва: Мир, 1987. – 566 с.
14. Определитель бактерий Берги. – Москва: Изд-во Мир. 1997. – Т. 1, 2.
15. Пешук Л. В. Основи тваринництва і ветеринарно-санітарна експертиза м'яса та м'ясних продуктів. Підручник. – К.: Центр учбової літератури, 2011. – 400 с.
16. Моисеева Е.А. Микробиология мясных и молочных продуктов при холодильном хранении. – М.: Агропромиздат, 1988.-223 с.
17. Нецепляев С.В., Панкратов А.Я. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения. – М.:ВО «Агропромиздат», 1990.-223 с.
18. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. К.: Либідь, 2001. – 312 с.
19. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та

імунологією. К.: Вища школа, 1992. – 431 с.

20. Ситнік І.О., Климнюк С.І., Творчо М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1988. – 392 с.

21. Власенко В.В., Власенко І.Г. Фізіологія та гігієна харчування. Вінниця: ТОВ «Меркюрі Поділля», 2012. – 300 с.

22. Каплін, М. М. Практикум до практичних занять з мікробіології, вірусології та імунології / Ч.1 : Загальна бактеріологія та імунологія / М. М. Каплін, В. М. Голубнича, Т. В. Івахнюк. – Суми : СумДУ, 2013. – 157с. – 79-85.

23. Ткачук О. О. Основи мікробіології та інфекційних хвороб / О. О. Ткачук, О. Л. Завальнюк. – Вінниця. – 2013. – 152с.

24. Білоруська Й. С. Основи мікробіології, санітарії та гігієни / Й.С. Білоруська– К. : Техніка, 2003.– 128с.

25. Бойчук Ю. Д. Екологічні проблеми харчування людини / Ю. Д. Бойчук, Е. М. Солошенко, В. І. Смоляр. – Черкаси, 2002. – 92с.

26. Громов Б. В. Екологія бактерій / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л. : Издательство ЛТУ, 1989.– 248с.

27. Люта В. А. Практикум з мікробіології: навчальний посібник / В. А. Люта, О. В. Кононов. – К. : Медицина, 2008. – 184 с.

Допоміжна

1. Словник по мікробіології, вірусології, імунології та інфекційних хвороб / [Під ред. Палія Т. К.]. – Вінниця: Б.в. 1995. – 109с.

2. Рудавська Г.Б., Ларіна І.В., Демкевич Л.І. Мікробіологія. – К.: КНТЕУ, 2001. – 324 с.

3. Харчова і переробна промисловість 7/2002, С. 12—13.

4. Козлова І. П. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти: навч. посібник / І. П. Козлова, О. С. Радченко, Л. Г. Степура, Т. О. Кондратюк, А. І. Піляшенко-Новохатний. – К. : Наук. думка, 2008. – 528 с.

5. Современная микробиология. Прокариоты: в 2 т. / под ред. Й. Ленгелер, Г. Древис и Г. Шлегель. – М. : Мир, 2005.

6. Сергійчук М. Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження / М. Г. Сергійчук. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 232 с.

7. Мікробіологія: підруч. для студ. ВНЗ / І. Л. Дикий, І. Ю. Холупяк, Н. Ю. Шевельова, М. Ю. Стегній, Н. І. Філімонова; за ред. І. Л. Дикого. - Х.: Вид-во НФаУ; Оригінал, 2006. - 432 с.

8. Технічна мікробіологія : підруч. / В.О. Коваленко, І.В. Цихановська, Т.А. Лазарева та ін. — Харків : Світ Книг, 2013. — 679.

9. М. Федечко, О. П. Корнійчук. – 2-е вид., перероб. і доп. – К.: Медицина, 2019. – 376с.

10. Люта В. А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія /В. А. Люта, О. В. Кононов: – К.: Здоров'я, 2018. – 576 с.

11. Мікробіологія м'яса та м'ясопродуктів (практикум): навч. посібник./ Власенко В.В., Скибіцький В.Г., Власенко І.Г., Ібатулліна Ф.Ж., Козловська Г.В., Мельник М.В./- Вінниця: «Едельвейс і К», 2008. - 308с.

12. Санітарна мікробіологія сировини та продуктів тваринного походження. Корнелаева Р. П., Степаненко П.П., Павлова Є. В.,-М.: 2006.- 407с.

13. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології і стандартизації продуктів тваринництва / Якубчак О.М., Хоменко В.І., Мельничук С.Д., Ковбасенко В.М., Кравців Р.Й. та ін. – К.: Біопром, 2005. – 800 с. 13

14. Семанюк В.І., Захарів О.Я. Мікробіологічні дослідження об'єктів довкілля, харчових продуктів тваринного походження, кормів. Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з курсу „Ветеринарна мікробіологія” – Львів 2004. - 54 с.

15. Основи тваринництва і ветеринарно-санітарна експертиза м'яса та м'ясних продуктів. Підручник. – Пешук Л. В /К.: Центр учбової літератури, 2011. – 400 с.

Інформаційні ресурси

1. <http://www.membrana.ru>
2. <http://www.elementy.ru>
3. <http://www.eLIBRARY.ru>
4. <http://www.window.edu.ru>
5. https://library.udpu.edu.ua/library_files/6399_01.pdf
6. <https://cutt.ly/ugScXmd>
7. <https://tinyurl.com/y2sjh9ch>
8. <http://www.health.gov.ua>
9. <http://vitaminz.su>
10. <http://zakon2.rada.gov.ua>
11. <http://www.zdorov.com.ua>
12. <http://www.i-medic.com.ua>
13. <http://www.enpui.npu.edu.ua>
14. <http://www.library.kpi.kharkov.ua>
15. <http://www.biochem.onaft.edu.ua>
16. <http://www.dev.lac.lviv.ua/lib>

Техніка забарвлення за Грамом

Суть забарвлення по Граму міститься в обробці препарату генціан-віолетом та йодом, при цьому в клітинах одних мікроорганізмів утворюється стійкий, нерозчинний у спирті комплекс – грампозитивні мікроорганізми. Клітини інших мікроорганізмів після обробки генціан-віолетом та йодом легко знебарвлюються спиртом і набувають червоного кольору під час забарвлення фуксином – грамнегативні мікроорганізми. По Граму забарвлюють тільки молоді клітини мікроорганізмів, тому що немолоді клітини мікроорганізмів забарвлюються не рівномірно.

Для забарвлення препаратів мікроорганізмів по Граму виконують послідовно операції:

1. На фіксований мазок наносять карболово-спиртовий розчин генціан-віолетового крізь смугу фільтрувального паперу. Через 1 - 2 хвилини її знімають, а барвник зливають.
2. Наносять розчин Люголю на 1 - 2 хвилини.
3. Знебарвлюють препарат етиловим спиртом протягом 30 - 60 секунд.
4. Промивають препарат водою.
5. Додають водневий розчин фуксину на 1 - 2 хвилини, після цього змивають водою та висушують.