

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІГІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБОТ

для студентів напрямку підготовки
6.051701 «Харчові технології та інженерія»

Обговорено і рекомендовано
на засіданні кафедри
харчових технологій, хімії і БЖД
Протокол № 1 від 30.08.2013

Чернігів ЧНТУ 2013

Технічна мікробіологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» / уклад. В.М. Челябієва, О.М. Савченко, Чернігів: ЧНТУ, 2013 – 106 с.

Укладачі: ЧЕЛЯБІЄВА ВІКТОРІЯ МИКОЛАЇВНА, кандидат технічних наук,
доцент
САВЧЕНКО ОЛЕСЯ МИКОЛАЇВНА, кандидат технічних наук,
доцент

Відповідальний за випуск: СИЗА ОЛЬГА ІЛЛІВНА, завідувач кафедри харчових технологій, хімії і БЖД,
доктор технічних наук, професор

Рецензент: БУЯЛЬСЬКА НАТАЛІЯ ПАВЛІВНА, кандидат технічних наук, доцент кафедри харчових технологій, хімії і БЖД Чернігівського національного технологічного університету

Зміст

Вступ	4
Лабораторна робота № 1 Оснащення, умови роботи та завдання мікробіологічної лабораторії. Підготовка матеріалів та обладнання до мікробіологічних досліджень.....	5
Лабораторна робота № 2 Методи мікроскопічного дослідження. Морфологія мікроорганізмів та розгляд їх у живому та фіксованому станах.....	22
Лабораторна робота № 3 Поживні середовища. Посів мікрофлори повітря, води та ґрунту. Перетворення мікроорганізмами сполук Карбону (вирощування бактерій різних типів бродіння).....	40
Лабораторна робота № 4 Аналіз посівів мікрофлори повітря, води та ґрунту. Перетворення мікроорганізмами сполук Карбону (дослідження різних видів бродіння).....	54
Лабораторна робота № 5 Виділення чистих культур мікроорганізмів..	64
Лабораторна робота № 6 Морфологічні та культуральні ознаки дріжджів.....	69
Лабораторна робота № 7 Визначення активності антибіотиків та фітонцидів.....	75
Лабораторна робота № 8 Морфологічні та культуральні особливості міцеліальних грибів.....	77
Лабораторна робота № 9 Оцінка якості борошна.....	87
Лабораторна робота № 10 Мікробіологія сирого і пастеризованого Молока. Мікробіологія майонезу.....	91
Лабораторна робота № 11 Санітарно-гігієнічний контроль умов виробництва.....	102
Перелік посилань	108

Вступ

Дисципліна “Технічна мікробіологія” входить до переліку дисциплін природничо-наукової (фундаментальної підготовки) фахівця освітньо-кваліфікаційного рівня “бакалавр” галузі знань 0517 «Харчова промисловість та переробка сільськогосподарської продукції» напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія».

Мікробіологічні процеси визначають технологію багатьох харчових виробництв: хліба, молока, спирту, пива, вина, кондитерських виробів тощо. Харчове виробництво неможливо уявити без мікробіологічного контролю сировини, напівфабрикатів і готової продукції. Для правильного ведення мікробіологічного контролю необхідно оволодіти специфічною методикою досліджень. Це досягається поєднанням теоретичного курсу та лабораторного практикуму, який дозволяє краще засвоїти теоретичний матеріал викладений на лекціях, ознайомитися з фактичним матеріалом на практиці, оволодіти технікою виконання мікробіологічних досліджень.

Виконання лабораторних робіт цього лабораторного практикуму підготує майбутнього фахівця до умов виробництва, дозволить оволодіти мікробіологічною технікою, самостійно приймати технічні рішення, забезпечувати оптимізацію технологічних процесів та високу якість продукції.

Лабораторна робота № 1

Оснащення, умови роботи та завдання мікробіологічної лабораторії. Підготовка матеріалів та обладнання до мікробіологічних досліджень

1.1 Мета: ознайомитись з приміщеннями та приладами мікробіологічної лабораторії, загальними правилами роботи в них, засвоїти правила підготовки посуду та інструментів до стерилізації, принципами та методам їх стерилізації.

1.2 Короткі теоретичні відомості

Мікробіологічні дослідження здійснюються в спеціальних приміщеннях, які називаються *мікробіологічною лабораторією*. Мікробіологічна лабораторія повинна бути влаштована у відповідності з ДСП 9.9.5.080-2002 Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю.

У структуру звичайної мікробіологічної лабораторії входить ряд приміщень спеціального призначення: одна або декілька лабораторних кімнат, бокс із передбоксом, приміщення для виготовлення живильних середовищ (кухня), автоклавна (стерилізаційна), термостатна, мийка, препаратурська, кімната для забору або прийому досліджуваного матеріалу і його реєстрації, віварій для лабораторних тварин. Всі приміщення розташовують так, щоб заразний ("брудний") матеріал не стикався і не перехрещувався з "чистим".

Функціональні кабінети повинні бути світлими, просторими, теплими, з підведенням гарячої і холодної води, електричного струму, орієнтація вікон на північ або північний захід. Стіни, двері, підлогу виготовляють із матеріалів, які легко миються і дезінфікуються.

Лабораторна кімната – основне приміщення для проведення досліджень. Жорсткий протиепідемічний режим роботи вимагає її щоденного вологого прибирання та щомісячного проведення дезінфекції підлоги, стін, столів та обладнання. Робочі столи покриваються спеціальним пластиком або склом. У лабораторії доцільно виділити й обладнати окремі робочі місця та закріпити їх за кожним співробітником.

На робочому столі лікаря-мікробіолога повинні знаходитись тільки предмети, необхідні для проведення бактеріологічних досліджень: газовий пальник або спиртівка, пастерівські й градуйовані піпетки, пінцети, бактеріологічні петлі, шпатель та покривні скельця, пробірки, штативи, чашки Петрі, аглутиноскоп, лупа, мікроскоп, банка з дезінфікуючим розчином. Біля стола повинна стояти посудина з дезрозчином, куди опускають відпрацьований заразний матеріал, який потім автоклавується.

Меблі бактеріологічної лабораторії повинні бути простими, зручними, які легко миються і дезінфікуються. Сучасна лабораторія оснащується мікроскопами, автоклавами, термостатами, сушильними шафами, центрифугами, дистиллятором, апаратом для згортання сироватки, рН-метром, холодильником, лабораторними терезами, фотоелектроколориметром, апаратом

для автоматичного підрахунку колоній, бактерійними фільтрами, комп'ютером, бактерицидними лампами.

Для проведення мікробіологічних досліджень в особливо стерильних умовах відводять окрему кімнату або **бокс**. Його площа повинна розраховуватись для роботи двох чоловік (5-8 м²), мати окремий вхід через тамбур (передбоксік), відділений від боксу скляною перегородкою. **Передбоксік** призначається для одягання стерильного одягу і проведення допоміжних робіт. В передбоксіку розміщують медичну шафу для зберігання стерильного матеріалу та шафу для спецодягу, водопровідний кран і умивальник для миття рук.

Бокси обладнують припливно-витяжною вентиляцією, в них подається стерильне повітря, що проходить через бактеріальні фільтри. Бокси та передбоксіки обладнують ультрафіолетовими опромінювачами. Вимикачі їх повинні знаходитися поза боксом і передбоксіком. Меблі, які встановлюють у боксі (стіл, стільці, невелика шафа для стерильного посуду, середовищ тощо), повинні бути простими, краще металевими, що спрощує їх знезараження. Стіни покривають облицювальною плиткою або світлою масляною фарбою, підлогу вистилають гладенькими плитами або лінолеумом. Перед початком і після роботи проводять вологе прибирання, дезінфекцію та опромінення бактерицидними лампами на протязі 1-2 год. Тут повинні бути газові або спиртові пальники. Повітря боксів систематично перевіряють на обсіменіння мікробами.

До підсобних приміщень належить: **мийна**, обладнана для миття посуду, **приміщення для приготування середовищ**, **стерилізаційна** кімната, де розміщені автоклави і сушильні шафи, **препаратурська кімната** для забору або прийому досліджуваного матеріалу, **віварій** (приміщення, обладнане для утримання піддослідних тварин).

Дезінфекція лабораторних приміщень. Підлогу, стіни і меблі в мікробіологічній лабораторії очищують пилососом і протирають розчинами різних дезінфікуючих речовин. Обробка пилососом забезпечує звільнення предметів від пилу і видалення з них значної частини мікрофлори. Встановлено, що при 4-х кратному проведенні щіткою пилососа по поверхні предмету з нього видаляється близько 47% мікрофлори, а при 12-ти кратному – до 97 %.

В якості дезінфікуючих розчинів найчастіше користуються 2-3% розчином соди (бікарбонату натрію), 3-5% розчином фенолу (карболової кислоти) або лізолу, 0,5-3 % водним розчином хлораміну і деякими іншими дезінфектантами.

Повітря в лабораторії найбільш просто дезінфікувати провітрюванням. Тривала вентиляція приміщення через квартиру (не менше 30-60 хв.) призводить до різкого зниження кількості мікроорганізмів в повітрі, особливо при значній різниці у температурі між зовнішнім повітрям і повітрям приміщення. Більш ефективний і найбільш часто вживаний спосіб дезінфекції повітря опромінення ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі від 200

до 400 нм. Ці промені мають високу антимікробну активність і можуть викликати загибель не тільки вегетативних клітин, але і спор мікроорганізмів. Вплив ультрафіолетових променів має бути безпосереднім і тривалим. Це пов'язано насамперед з тим, що ультрафіолетові промені мають слабку проникаючою здатністю. Вони не проходять, наприклад, крізь звичайне скло, легко поглинаються частинками пилу. Крім того, деякі предмети, такі як білий папір, пластини з полірованого алюмінію або хрому, можуть помітно відбивати ультрафіолетові промені. Тому залежно від ступеня забрудненості повітря для його стерилізації потрібно опромінення від 30 хв. до декількох годин.

Як джерело ультрафіолетового випромінювання використовуються бактерицидні лампи. Випромінювачем у них служить електрична дуга, що виникає в парах ртуті низького тиску. Більше 80 % випромінюваного ними спектру припадає на хвилі довжиною 254 нм. Зазвичай бактерицидні лампи являють собою трубки різного діаметру і довжини, виготовані зі спеціального скла, що пропускає випромінювання з довжиною хвилі 254 нм. Кожна трубка вмонтована в корпус-тримач і може бути забезпечена відбивачем. Конструктивне оформлення корпусу буває різним. Необхідно мати на увазі, що ультрафіолетові промені можуть викликати важкі ураження очей. Тому при роботі з бактерицидними лампами потрібно строго стежити за тим, щоб ні прямі, ні відбиті ультрафіолетові промені не потрапляли в очі. У невеликих приміщеннях при включеній бактерицидної лампі знаходитися не можна. Слід також враховувати, що при тривалій безперервній роботі бактерицидної лампи інтенсивність випромінювання знижується. У цих випадках опромінення доцільно вести з перервами.

Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельної обробки. Робочий стіл слід дезінфікувати не тільки до початку роботи, але і після її закінчення. Для протирання поверхні столу можна використовувати розчини лізолу і хлораміну, а також 70 % (за об'ємом) розчини ізопропілового або етилового спиртів. Спирти дуже ефективні відносно вегетативних форм мікроорганізмів. Ці спирти можна також застосовувати для дезінфекції рук. У тих випадках, коли поверхня столу має водовідштовхувальне покриття, особливо зручний лізол. Поверхню робочого столу можна дезінфікувати і ультрафіолетовими променями. При цьому слід враховувати, що бактерицидна дія променів тим вище, чим ближче поверхня, яка опромінюється, до джерела випромінювання.

Мікробіологічні дослідження проводяться в умовах стерильності, що виключає забруднення матеріалу сторонніми мікроорганізмами і з оточуючого середовища, а також попереджує забруднення зовнішнього середовища і персоналу мікробами з досліджуваного матеріалу.

Таким чином, **стерилізація** – один з найважливіших і необхідних прийомів в мікробіологічній практиці. Слово „стерилізація” в перекладі з латини означає „неплідний”. В мікробіології під стерилізацією розуміють знезараження – цілковите знищення мікроорганізмів або їх форм спокою (спор) у певному середовищі або на предметі.

Неповна стерилізація або пастеризація. Метод, запропонований Л. Пастером, застосовується для знезаражування харчових продуктів. При цьому матеріал нагрівається при температурі 50-65°C протягом 15-30 хв. або при 70-80°C – 5-10 хв. Може проводитися в термостаті або на водяній бані. Гинуть не всі мікроорганізми, можуть залишатись деякі термофіли і спори.

Стерилізацію проводять термічним і холодним способами в залежності від властивостей об'єкту та мети дослідження.

Термічна стерилізація здійснюється за допомогою високої температури .

Методи термічної стерилізації:

- *прожарювання на полум'ї або фломбування.* Цей метод дає гарні результати при стерилізації невеличких за розмірами лабораторних інструментів, які не псуються під дією вогню. Фломбуванням стерилізують бактеріологічні петлі, голки, кінчики пінцетів та деякі інші металеві предмети;
- *стерилізація кип'ятінням.* Проводиться у спеціальних стерилізаторах, куди заливають дистильовану воду. На дно стерилізатора вміщують марлю або вату. Стерилізацію проводять протягом 30 хвилин (рисунок 1.1). Кип'ятінням стерилізують шприці (у розібраному вигляді), металеві інструменти, гумові рукавички, пробки. Інструменти, які мають металеві частини, стерилізують у 2% розчині гідрокарбонату натрію, який попереджує появу іржі;
- *стерилізація сухим жаром.* Проводиться у спеціальній сушильній шафі при температурі 160-170 °С протягом 2 годин. Стерильні предмети виймають з сушильної шафи, коли температура знизиться до кімнатної. Сухим жаром стерилізують скляний посуд (пробірки, воронки, піпетки, конічні колби Ерленмейера, шприці тощо);
- *дробова стерилізація текучою парою або тиндалізація* використовується для знепліднення поживних середовищ, які змінюють свій склад і властивості при температурі понад 100 °С. Суть її полягає в нагріванні середовища у парах киплячої води при температурі 100 °С тричі по 30 хв протягом трьох днів. Короткотривале прогрівання кип'ятінням знищує тільки вегетативні клітини мікроорганізмів. Витримка середовищ протягом доби при кімнатній температурі або в термостаті при 30 °С дає змогу прорости життєздатним спорам. Вегетативні клітини, які утворюються з термостійких спор, гинуть при повторному кип'ятінні. Дробову стерилізацію поживних середовищ проводять в кип'ятильнику Коха або автоклаві без підвищеного тиску.
- *стерилізація насиченою парою під тиском – автоклавування.* Найбільш надійним способом стерилізації поживних середовищ, посуду і матеріалів є стерилізація парою в автоклавах (рисунок 1.2). При звичайному атмосферному тиску температура водяної пари дорівнює 100 °С. При підвищенні тиску пари температура її значно підвищується (таблиця 1.1). Спільна дія високої температури і тиску пари спричиняють швидку загибель не тільки вегетативних клітин мікробів, а й їхніх спор.

Таблиця 1.1 – Співвідношення між температурою, тиском і часом стерилізації в автоклаві

Тиск пари, атм	Температура, °С	Час стерилізації, хв.
0	100	30-60
0,5	111	20-30
1,0	121	15-20
1,5	127	15-20



Рисунок 1.1 – Кип'ятильник дезінфекційний електричний автоматичний одно режимний КДЗА 1-4



Рисунок 1.2 – Стерилізатори парові (автоклави)

До *холодної стерилізації* відноситься: фільтрування, дія різними фізичними факторами або хімічними речовинами.

Фільтрування застосовують для рідин, які змінюють свої властивості при нагріванні, а також для очистки бактеріальних токсинів, фатів і різних продуктів життєдіяльності бактерій. Фільтрування проводять крізь спеціальні дрібнопористі фільтри. Фільтри затримують мікроорганізми завдяки структурі матеріалу, з якого вони складаються. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. *Глибинні фільтри* складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частинки затримуються в них в результаті адсорбції і механічного захоплення в матеріалі фільтру. *Мембранні фільтри* мають

безперервну структуру, одержують з нітроклітковини, і захоплення ними частинок визначається в основному розміром пор. Як кінцевий процес фільтрування менш надійне порівняно зі стерилізацією паром, через значну ймовірність проходження мікроорганізмів крізь фільтр. Застосовується для стерилізації рідких поживних середовищ та інших рідких матеріалів.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. Для цього застосовують спеціальні бактерицидні лампи. Час опромінення 20 хв. Цим методом стерилізують повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах.

Під *хімічною стерилізацією*, або *дезінфекцією* розуміють знезаражування предметів, матеріалів тощо за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше застосовують розчин карболової кислоти (3-5%), лізолу (1-3%), формаліну (4%), хлорного вапна (10-20%). Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як консерванти при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин.

1.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: термостат, сушильна шафа, мікроскоп, посуд, пробірки, вата, марля, нитки, піпетки, чашки Петрі, папір, спиртівки, бактеріологічні петлі, шпатель Дрігальського, дистильована вода, пробірки зі щільним скошеним поживним середовищем.

1.3.1 Вивчити основні правила роботи при проведенні бактеріологічних і вірусологічних досліджень.

У лабораторіях відповідного профілю співробітники повинні дотримуватись протиепідемічного режиму і встановлених правил роботи:

- до роботи в бактеріологічній (вірусологічній) лабораторії допускаються особи, які обізнані з правилами роботи в ній;
- кожен співробітник повинен працювати лише на закріпленому за ним робочому місці;
- персонал лабораторії повинен мати індивідуальний спецодяг (халат, шапочку, взуття). У боксі працюють у стерильних халатах, шапочках і марлевих масках. При зараженні й розтині тварин одягають ще фартух, наруківники й гумові рукавички;
- палити, вживати їжу й зберігати харчові продукти в лабораторії категорично заборонено;
- матеріал, що надходить до лабораторії для дослідження, завжди вважають інфекційним, його обов'язково записують у спеціальному журналі і маркірують;
- відпрацьовані культури мікробів та заразні матеріали підлягають обов'язковому щоденному знищенню. Поверхню робочого місця, як і використані інструменти, дезінфікують;
- переливати рідини, які містять патогенні мікроорганізми, необхідно над посудиною з дезінфікуючим розчином. При набиранні таких рідин у піпетки потрібно користуватися гумовими балонами або грушами;

- коли при розбиванні колби чи пробірки заразний матеріал або жива культура потрапляє на робочий стіл, інші меблі, одяг, руки, підлогу, треба негайно повідомити про це завідувача лабораторії або лікаря-бактеріолога і в його присутності провести дезинфекцію заражених ділянок, потім обробити руки дезрозчином і ретельно їх вимити;
- у лабораторії не дозволяються зайві ходіння, різні рухи, непотрібні розмови. Виконання цих вимог попереджує проникання сторонніх мікробів із повітря й ротової порожнини в досліджуваний матеріал;
- необхідно завжди уникати втрат і виносу з лабораторії заразного матеріалу, живих культур та інфікованих тварин. Усі термостати, рефрижератори та сейфи з культурами потрібно обов'язково пломбувати. Контролює виконання цих правил завідувач лабораторії або лікар-бактеріолог;
- музейні або виділені культури, якщо це необхідно, зберігають в агарових стовпчиках під вазеліновим маслом або в запаяних ампулах з етикетками;
- після закінчення роботи столи дезинфікують, проводять вологе прибирання лабораторії з використанням дезинфікуючих розчинів. Предмети, матеріали, інструменти, інфіковані під час роботи, збирають у баки (відра) і в той же день стерилізують.

В учбовій мікробіологічній лабораторії:

- на початку роботи чергові повинні одержати від лаборанта відповідні матеріали та обладнання і розподілити їх серед студентів;
- під час роботи необхідно:
 - бережливо поводитися з мікроскопом та іншими предметами лабораторного обладнання;
 - вести записи в зошиті для лабораторних занять;
 - на пробірках і чашках відмічати номер групи і дату;
 - відпрацьовані препарати з живими культурами, піпетки, шпателі опустити в посудину з дезінфікуючим розчином;
 - бактеріологічні петлі та голки з залишками культури знезаразити прожарюванням в полум'ї спиртівки;
- по закінченню роботи обов'язково:
 - привести робоче місце і мікроскоп у вихідний стан;
 - обладнання здати черговому та прибрати робоче місце;
 - вимити руки, а при необхідності обробити їх дезинфікуючим розчином.

Забороняється в учбовій лабораторії:

- входити до лабораторії в головних уборах та верхньому одязі;
- знаходитися в лабораторії і працювати без халата;
- приймати їжу;
- класти на робочі столи сторонні предмети (портфелі, сумки, головні убори);
- зайве ходіння, різкі рухи, розмови, особливо під час посіву.

1.3.2 Ознайомитись з приміщеннями мікробіологічної лабораторії, їх обладнанням та призначенням (рисунки 1.3-1.7). Уважно вивчивши короткі теоретичні відомості скласти таблицю 1.2.



Рисунок 1.3 – Мийна кімната (в ній розташовані електроплита, дистильатор, бойлер, посудомийна та пральна машини).



Рисунок 1.4 – Приміщення для приготування середовищ (тут є електроплита, холодильник, терези, мийка, миючі розчини, шафи).



Рисунок 1.5 – Передбоксник (оснащений термостатами на різну температуру, шафами для середовищ і стерильного одягу для роботи в боксі, стаціонарними бактерицидними лампами – стельовими та настінними).



Рисунок 1.6 – Бокс для мікробіологічного посіву (обов'язково оснащений бактерицидними лампами – стельовими та настінними. Пробопідготовка харчових продуктів проводиться в передбокснику, а сам посів в боксі).



Рисунок 1.7 – Лабораторна кімната/

Таблиця 1.2 – Оснащення мікробіологічної лабораторії

Приміщення	Призначення	Обладнання
Лабораторна кімната		
Бокс		
Передбоксник		
Мийна		
Приміщення для приготування середовищ		
Стерилізаційна кімната		
Віварій		

1.3.3 Вивчити способи дезінфекції приміщень мікробіологічної лабораторії та заповнити таблицю 1.3.

Таблиця 1.3 – Способи дезінфекції приміщень мікробіологічної лабораторії

Дезінфекція:	Спосіб дезінфекції
повітря	
підлоги та стін	
робочої поверхні	
рук	

1.3.4 Виготовити ватно-марлеві пробки для пробірок та колб.

Ватно-марлева пробка запобігає забрудненню вмісту пробірки, колби атмосферними мікроорганізмами, а поживне середовище захищає від висихання. Пористість пробки одночасно забезпечує газообмін культури з оточуючим середовищем. Ватно-марлева пробка повинна бути достатньо цупка, щоб при застосуванні вона не сплющувалася і пропускала повітря, і міцна, щоб зберігала форму.

З вати формують довгі вузькі смужки (8-10 см) (рисунок 1.8, 1.9). Краї смужки з боків загинають в рівну смугу шириною 4-5 см (довжина пробки) і виготовляють валик, поступово ущільнюють. Коли товщина валику досягне необхідного розміру (діаметру пробірки або колби, якщо пробку виготовляють для колби) залишок ватної смужки відривають, пробку закручують між долонями рук, потім обгортають згорнутою вдвічі марлею, кінці марлі скручують в центрі та обв'язують ниткою, зайве обрізають ножицями. Перевіряють якість пробок: повинен бути «хлопок» у момент відкривання закритої пробкою пробірки, пробка повинна бути дуже тверда, кам'яна на дотик.

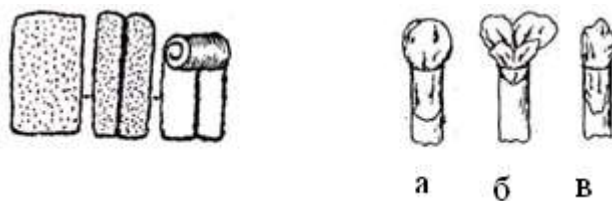


Рисунок 1.8 – Етапи виготовлення ватно-марлевої пробки

а – правильно виготовлена ватно-марлева пробка
б, в – пробки виготовані неправильно

Рисунок 1.9 – Ватні пробки

1.3.5 Підготовка до стерилізації посуду (рисунок 1.10).

Підготувати до стерилізації пробірки, піпетки, чашки Петрі, колби.

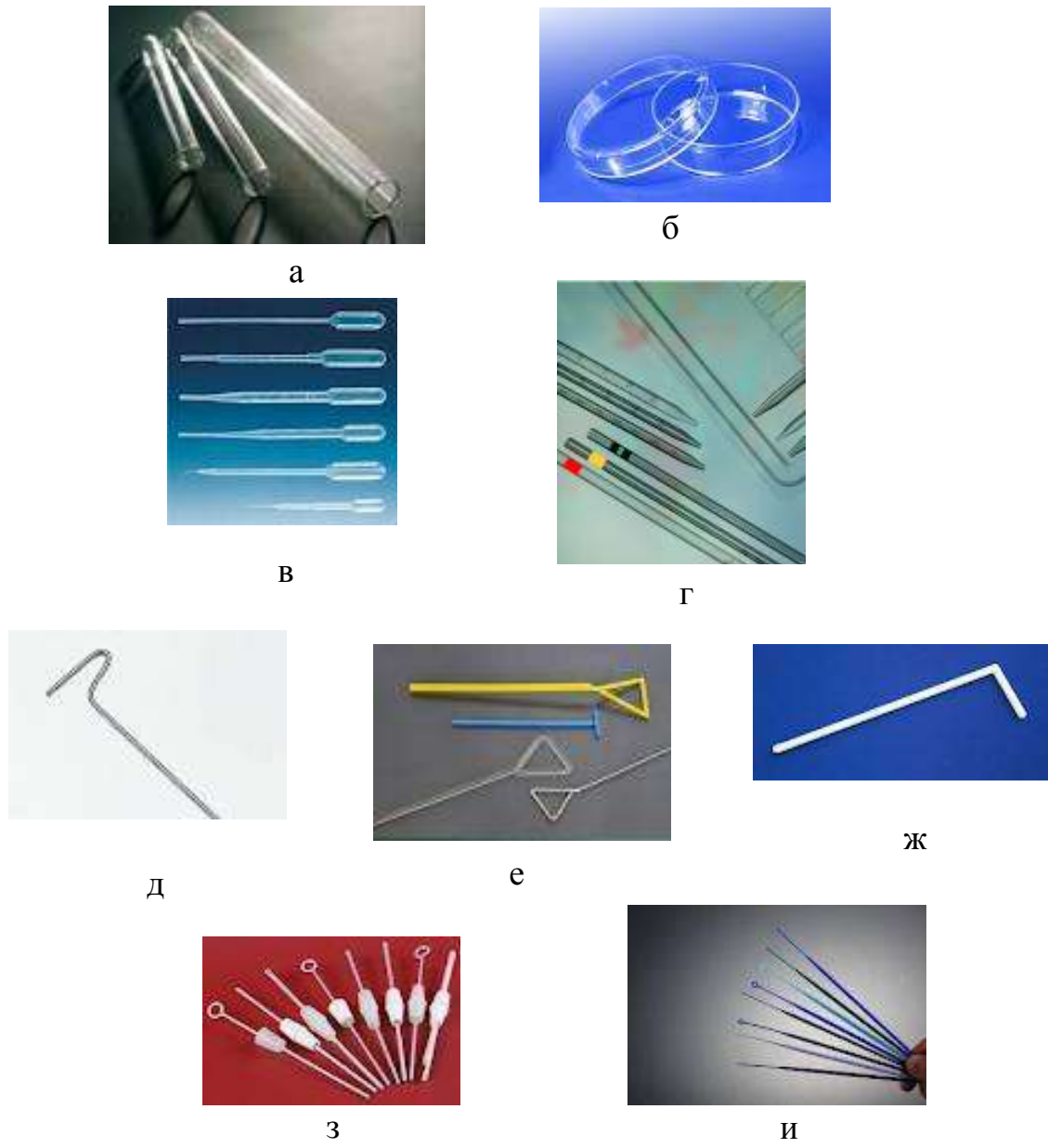
Вимиті та висушені пробірки закривають підготовленими ватно-марлевими пробками, об'єднують по 15-20 штук, та загортають в папір.

У верхню частину піпетки вкладають шматочок вати, який попередить потрапляння матеріалу в рот і забруднення рідини мікробами повітря під час роботи. Піпетки щільно загортають в папір, порваний смужками шириною 4-5 см і довжиною 50-70 см. Обмотування починають з нижньої частини піпетки. На папері обов'язково вказати об'єм піпеток.

Чашки Петрі стерилізують обгорнутими в папір по 1-5 штук.

Вимиті та висушені колби закривають приготованими ватно-марлевими пробками і зверху роблять ковпачки з пергаментного паперу.

Скласти таблицю 1.4 уважно вивчивши короткі теоретичні відомості.



а – пробірки звичайні; б – чашка Петрі; в – піпетка Пастера;
 г – градуйовані піпетки; д, е, ж – шпатель Дрігальського;
 з, и – бактеріологічні петлі

Рисунок 1.10 – Посуд мікробіологічної лабораторії

Таблиця 1.4 – Методи та режим термічної стерилізації обладнання для мікробіологічних досліджень

Обладнання	Метод стерилізації	Режим стерилізації	
		t°	час
Ватні пробки			
Посуд: піпетки, колби, пробірки, чашки Петрі			
Інструменти: шпателі, пінцети, бактеріологічні петлі, голки, ножиці			
Гумові пробки, шприці			

1.3.6 Навчитись стерилізувати бактеріологічну петлю прожарюванням в полум'ї спиртівки.

Бактеріологічну петлю беруть у праву руку і в горизонтальному положенні вносять її в нижню частину полум'я спиртівки, потім переводять в положення близьке до вертикального. Нагрівають у верхній частині полум'я спочатку нижню, а потім верхню частину дроту. Прожарюють 5-7 сек.

Петлю рекомендується тримати у полум'ї пальника майже вертикально, щоб дріт був рівномірно розпечений на всьому протязі. При прожарюванні треба пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній та периферійних частинах полум'я, тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки.

1.3.7 Оволодіти технікою мікробіологічного посіву.

Для виділення мікроорганізмів з виробничих і природних субстратів, приготування культур з метою передачі у виробництво і т.п. у лабораторній практиці користуються методами посіву та пересіву. *Посівом, або інокуляцією*, називається внесення мікробного матеріалу в стерильне поживне середовище. *Пересів* – це перенесення вирощеної на поживному середовищі культури мікроорганізмів на інше стерильне поживне середовище. Під час посіву (пересіву) мікроорганізмів потрібно дотримуватися таких правил (рисунок 1.11):

1. Запалити спиртівку або газовий пальник.
2. У ліву руку взяти дві пробірки: одну – зі стерильним середовищем, іншу (ближчу до себе) – з культурою, які тримають у нахиленому положенні. Великим і вказівним пальцями правої руки тримати бактеріологічну петлю, простерилізовану у полум'ї пальника.
3. Не випускаючи петлі, з обох пробірок вийняти ватні пробки мізинцем і безіменним пальцем правої руки, притиснути їх до долоні і тримають так під час наступних маніпуляцій. Обпалити краї пробірок, стежачи за тим, щоб

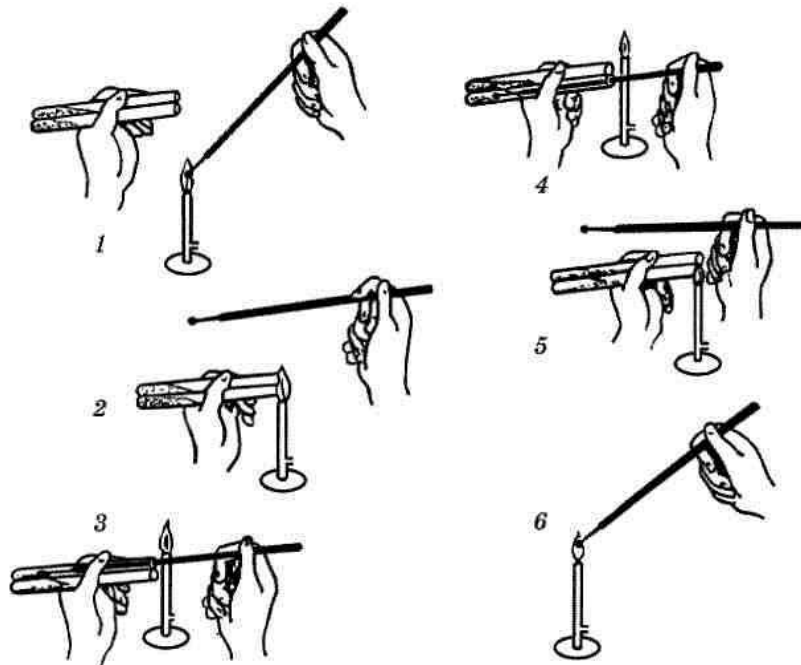
пробки не торкалися сторонніх предметів.

4. Петлю ввести у пробірку з культурою, яку пересівають. Обережно, не торкаючись стінок, відібрати краплю рідкої культури. У разі проведення пересівання із щільного середовища для охолодження петлі спочатку доторкнутися нею до поверхні середовища, де немає культури, після чого взяти невелику кількість мікробної біомаси.

5. Не торкаючись стінок пробірки, петлю з мікроорганізмами ввести у іншу пробірку й сполоснути у стерильному рідкому середовищі. У разі внесення клітин, взятих петлею зі щільного середовища, матеріал ретельно розтерти по стінці пробірки і верхньому краю рідкого середовища, весь час змиваючи його середовищем. Якщо проводять пересівання на щільне поживне середовище (скошений шар агаризованого середовища), петлю з клітинами мікроорганізмів опускають до дна пробірки, де скупчується невелика кількість конденсаційної води. Злегка торкаючись петлею поверхні косяка, але не руйнуючи його, проводять зигзагоподібний штрих.

6. Петлю вийняти, обпалити краї пробірок і внутрішні кінці пробок, після чого пробірки закрити. Якщо кінець ватної пробки загориться, то не слід кидати пробку. Її потрібно швидко ввести в пробірку, де вата сама потухне. Ні в якому разі не можна дути на пробку, яка горить, так як це тільки посилить горіння. Якщо в момент пересіву ватяна пробка впаде на стіл або на підлогу, то не слід знову вставляти її в пробірку. Потрібно взяти нову стерильну пробку і почати всю операцію заново.

7. Петлю знову прожарити у полум'ї пальника.



1 – обжарювання петлі; 2 – обжарювання країв пробірок; 3 – набір культури; 4 – посів культури; 5 – обжарювання країв пробірок; 6 – обжарювання петлі

Рисунок 1.11 – Пересів культури мікроорганізму

На пробірці зазначити назву культури і дату посіву (підпис зробити чорнилом або олівцем по склу). Засіяні пробірки вмістити у термостат для вирощування при оптимальній для цього виду культури температурі.

Описані прийоми слід виконувати біля полум'я пальника для запобігання забрудненню культур сторонніми мікроорганізмами. Не можна робити різких рухів, ходити тощо біля того, хто працює з чистою культурою, оскільки рух повітря посилює небезпеку випадкового зараження культури та середовища. Пересівати мікроорганізми краще в стерильному боксі.

Завдання 1. Взяти пробірки з дистильованою водою та бактеріологічну петлю і, імітуючи пересів у рідке середовище, проробить описані операції посіву, доки не оволодієте правильною технікою посіву. Потім взяти пробірку з дистильованою водою і пробірку із скошеним щільним поживним середовищем та імітувати посів на щільне поживне середовище.

Посів у рідке середовище можна робити петлею або піпеткою (пастерівською або градуйованою). Для цього піпетку за верхній кінець виймають з паперу або пенала, в яких вона стерилізувалась, і вводять в пробірку або колбу з культурою, дотримуючись обережності. Стерильною піпеткою відбирають із пробірки мікробіологічний матеріал. Відбирати рідку культуру піпеткою можна за допомогою гумової груші. Переносять відібраний матеріал у іншу пробірку. Всі операції виконують біля полум'я спиртівки, дотримуючись правил стерильності. Використану піпетку слід негайно перенести в дезінфікуючий розчин, наприклад 3-5% водний розчин фенолу або 2% розчин хлораміну.

Посів на щільні середовища у чашку Петрі. Посіви петлею на щільному середовищі роблять зигзагоподібним штрихом, вільно ковзаючи петлею по поверхні щільного середовища від одного краю чашки Петрі до іншого (рисунок 1.12); або прямою рисою, для цього петлею проводять пряму лінію знизу догори посередині поверхні поживного середовища, або суцільним посівом, розтираючи матеріал обережними круговими рухами по всій поверхні середовища (рисунок 13).



Рисунок 1.12 – Посіви петлею на щільному середовищі роблять зигзагоподібним штрихом (метод виснажливого штриха)

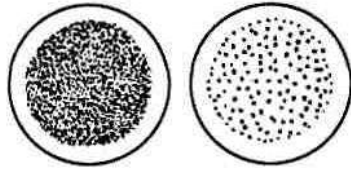


Рисунок 1.13 – Суцільний посів шпателем Дригальського

Посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб:

1. У ліву руку беруть пробірку з мікробіологічним матеріалом у праву прожарену бактеріологічну петлю.
2. Як описано вище петлею з пробірки набирають мікробіологічну культуру, пробірку закривають пробкою і ставлять у штатив.
3. Лівою рукою беруть чашку Петрі, великим і вказівним пальцями трохи відкривають кришку і роблять петлею посів у вигляді штриха.
4. Петлю знову прожарюють у полум'ї пальника і кладуть на місце.

Всі операції проводять біля полум'я спиртівки.

Якщо треба зробити суцільний посів, то культуру в чашку Петрі вносять петлею, потім її прожарюють і повертають на місце, беруть шпатель Дригальського і розтирають культуру по поверхні щільного середовища в чашці. При цьому чашку тримають у лівій руці трохи піднявши кришку великим і вказівним пальцями.

Завдання 2. Взяти чашку Петрі, бактеріологічну петлю, шпатель Дригальського і, імітуючи посів на щільне середовище, проробіть описані операції посіву штрихом та суцільного посіву, доки не оволодієте правильною технікою посіву.

У стовпчик агаризованого середовища посів роблять уколом бактеріологічною голкою (рисунок 1.14).

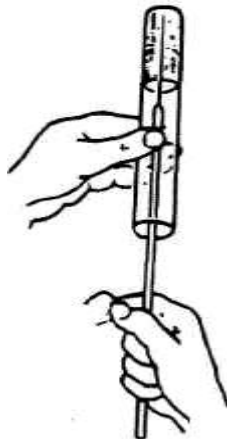


Рисунок 1.14 – Посів уколом

Засіяні і підписані пробірки, колби або чашки Петрі ставлять у термостат для вирощування.

Зробити висновок, що являє собою сучасна мікробіологічна лабораторія та в чому полягає головна умова мікробіологічних досліджень.

1.4 Висновок: Сучасна мікробіологічна лабораторія ... Головною умовою мікробіологічних досліджень є..., яка досягається...

Контрольні питання

1. Назвіть основні та допоміжні приміщення мікробіологічної лабораторії.
2. Призначення передбокснику, боксу, мийної, автоклавної кімнати мікробіологічної лабораторії.
3. Призначення стерилізації.
4. Назвіть основні способи термічної стерилізації.
5. Основні способи холодної стерилізації.
6. Яких вимог повинен дотримуватись персонал спеціальної мікробіологічної лабораторії?
7. Правила поведінки студентів в учбовій лабораторії.
8. Як правильно виготовити ватно-марлеву пробку?
9. Як підготувати до стерилізації пробірки, піпетки, чашки Петрі?
10. Як стерилізують бактеріологічні петлі на спиртівці?

Лабораторна робота № 2

Методи мікроскопічного дослідження. Морфологія мікроорганізмів та розгляд їх у живому та фіксованому станах

2.1 Мета: вивчити будову та навчитись працювати з найпростішою моделлю біологічного мікроскопу. Навчитись готувати живі та фіксовані препарати для вивчення морфології мікроорганізмів, навчитись простим методам фарбування фіксованих препаратів. Ознайомитись та розглянути основні форми мікроорганізмів.

2.2 Короткі теоретичні відомості

Вивчення морфології та будови клітин мікроорганізмів, розмір яких визначається здебільшого мікрометром (1 мкм = 0,001 мм), можливе лише за допомогою мікроскопів, які забезпечують збільшення досліджуваних об'єктів у сотні (світлові мікроскопи), десятки і навіть сотні тисяч разів (електронні мікроскопи). Мікроскоп (від гр. *micros* – малий, *scopeo* – дивлюсь) – оптичний прилад, що дає можливість отримати збільшене зображення дрібних предметів та їх деталей. У мікробіології мікроскоп використовують для вивчення живих і вбитих мікроорганізмів (забарвлених і незабарвлених). Найпоширеніші моделі біологічних мікроскопів, які допомагають досліджувати об'єкти у прохідному світлі: мікроскоп биологический исследовательский (МБИ), мікроскоп біологічний робочий (МБР), «Мікромед», «Біолам» та ін.

Біологічний мікроскоп (рисунок 2.1) складається з двох частин –

механічної та оптичної. Механічна частина мікроскопа має штатив, предметний столик, тубус з револьверною головкою, макро- і мікрометричний гвинти. Нижня частина штатива є опорою мікроскопа **1**, верхня (у формі дуги) тубусотримачем **6**. У верхній частині тубусотримача міститься револьвер **9**, що обертається навколо своєї вісі. У три-чотири отвори нижньої пластини револьвера вгвинчуються об'єктиви **10**. Обертанням пластини револьвера будь-який об'єктив можна підвести під тубус, центрування об'єктива по осі мікроскопа точно фіксується пружиною. Револьвер має гніздо для кріплення похилого чи вертикального тубуса **8**. Похилий тубус можна повернути навколо вертикальної вісі в будь-яке зручне положення і закріпити гвинтом. У нижній його частині розміщується призма, яка заломлює оптичну вісь мікроскопа під кутом 45° до горизонтальної площини. У верхній кінець тубуса вкладаються змінні окуляри **7**. Тубусотримач разом з тубусом можна переміщувати по вертикалі на 50 мм за допомогою механізму, змонтованого в основі штативу **1**. Механізм приводять у дію обертанням макрометричного **3** і мікрометричного **2** гвинтів. Макрометричний гвинт використовують для швидкого переміщення тубуса в обидва боки (вгору і вниз) по оптичній вісі мікроскопа і для початкового грубого наведення на фокус. Один його оберт відповідає лінійному переміщенню тубуса на 1 мм.

Мікрометричний гвинт призначений для тонкого фокусування. Повний оберт мікрометричного гвинта переміщує тубус на 0,1 мм. Барабан гвинта розділений на 50 поділок, кожна з них відповідає переміщенню тубуса на 0,002 мм (тобто 2 мкм). Мікрометричний гвинт дуже крихкий, тому з ним слід поводитися дуже обережно. При обертанні гвинта за годинниковою стрілкою тубусотримач мікроскопа (разом з окуляром і об'єктивами) опускається, проти годинникової стрілки – піднімається.

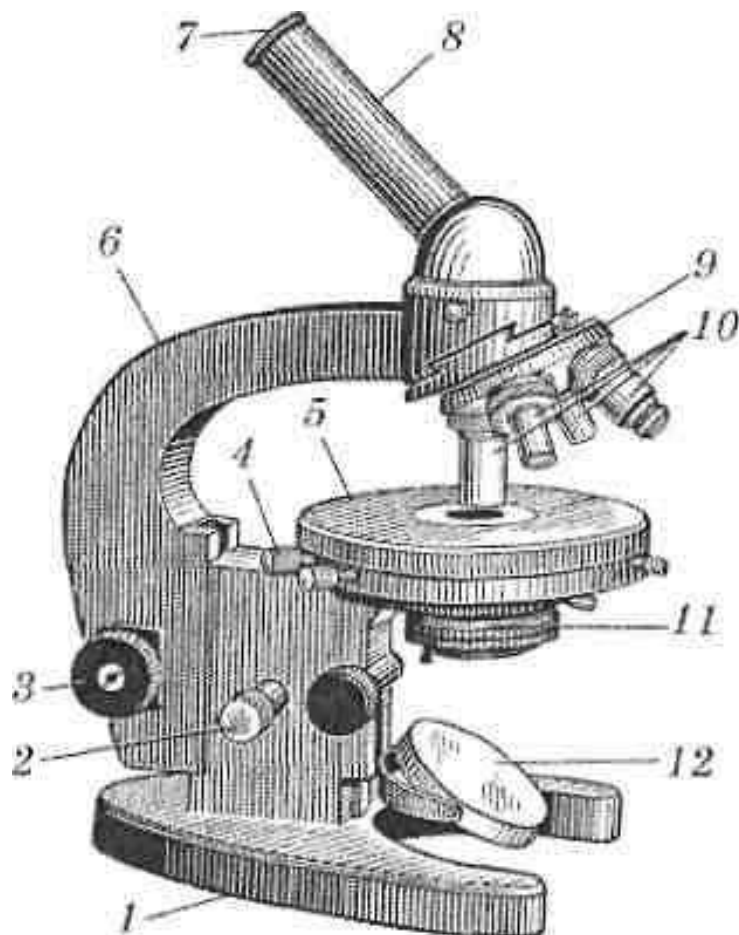
Предметний столик **5** мікроскопа має круглу чи прямокутну форму, в його центрі є отвір для проходження променів, які освітлюють препарат. Столик можна переміщувати в горизонтальній площині за допомогою двох гвинтів **4**, розміщених праворуч і ліворуч. Столик має два затискачі для закріплення препарату. Під предметним столиком на штативі закріплено кронштейн конденсора **11**, що переміщується у межах 20 мм за допомогою спеціального гвинта.

Оптична частина мікроскопа складається з освітлювального апарата, об'єктивів і окулярів. Освітлювальний апарат міститься під предметним столиком. Він складається з дзеркала **12** і конденсора **11** з діафрагмою.

Дзеркало зафіксоване на основі штатива, має два боки (увігнутий і плоский) і використовується для спрямування променів світла на препарат. Увігнуте дзеркало збирає і концентрує в площині препарату пучок паралельних променів, що йдуть від джерела світла; при денному світлі зазвичай використовують плоский бік дзеркала.

Конденсор, закріплений над дзеркалом, складається з двох лінз: верхньої – плоско-опуклої, нижньої – двоопуклої. Плоский бік верхньої лінзи може бути піднятий так, що відстань між конденсором і предметним столиком

мікроскопа дорівнюватиме 0,1 мм. Конденсор призначений для збирання паралельних променів, що йдуть від джерела світла і відбиваються дзеркалом, в одній точці – фокусі, яка має бути в площині препарату. Забарвлені мікроорганізми досліджують з піднятим угору конденсором, досягаючи у такий спосіб повного освітлення препарату. Незабарвлені мікроорганізми розглядають з опущеним конденсором: поле зору затемнюється, кут заломлення світлового променя у середовищі та мікроскопічному об'єкті не є однаковим і клітини стають видимими.



1 – основа штатива; 2, 3 – відповідно макрометричний і мікрометричний гвинти; 4 – гвинти для переміщення предметного столика; 5 – предметний столик; 6 – тубусотримач; 7 – окуляр; 8 – тубус; 9 – револьвер; 10 – об'єктив; 11 – конденсор; 12 – дзеркало

Рисунок 2.1 – Біологічний мікроскоп МБР-1

Під конденсором містяться ірис-діафрагма і відкидна оправа для світлофільтра. Ірис-діафрагма потрібна для затримання зайвих променів світла і складається із сталевих пелюстків, її отвір можна розширити або звузити за допомогою важеля. Будова ірис-діафрагми нагадує зіницю ока. Якщо використовують забарвлені препарати або розсіяне світло, діафрагму

розширюють, а у разі розглядання незабарвлених препаратів та при яскравому освітленні її звужують і поліпшують контрастність.

Об'єktiv **10** складається з системи шліфованих лінз, склеєних канадським бальзамом і вміщених у металеву оправу. Одне з позначень, які є на оправі, відповідає ступеню власного збільшення об'єктива – 8^x , 40^x і 90^x разів. Робочою лінзою об'єктива є передня – фронтальна. Збільшення об'єктива залежить від її фокусної відстані, і отже, від кривизни. Що більша кривизна лінзи, то коротша фокусна відстань і більше збільшення об'єктива. Цю обставину потрібно враховувати у практичній роботі: що більше збільшення дає об'єktiv, то нижче слід опускати його над площиною препарату; що менше збільшення об'єктива, то вище його положення (при збільшенні 8^x відстань від фронтальної лінзи до покривного скла дорівнює 18,2 мм).

Інші лінзи об'єктива (їх може бути 10 і більше) розміщені вище, як фронтальна. Вони мають різну кривизну поверхні і виготовлені зі стекол з різними оптичними властивостями. Ці лінзи називаються корекційними і призначені не для збільшення, а для отримання чіткішого зображення.

Крім власного збільшення, на металевій оправі об'єktivів зазначені її числові апертури (0,20; 0,65; 1,25).

Числова апертура визначається добутком синуса половини кута, під яким світло може потрапити в об'єktiv, на показник заломлення середовища n , яке межує з лінзою.

Числову апертуру можна підвищити, якщо між фронтальною лінзою та об'єктом вмістити краплю рідини, показник заломлення якої буде більший, ніж показник заломлення повітря ($n = 1$). Наприклад, якщо краплю води ($n = 1,3$), гліцерину ($n = 1,4$) або кедрової олії ($n = 1,515$) наблизити до показника заломлення скла ($n = 1,52$), промені, проходячи через середовища приблизно однакової густини, не заломлюються, збільшується $\sin U$, який становить <1 , чим досягається краще освітлення розглянутого об'єкта. Такі, об'єтиви називають *імерсійними*.

У біологічному мікроскопі застосовуються два типи об'єktivів: сухі та імерсійні. Імерсійні відрізняються від сухих зовні – на їх оправі є чорна кругова нарізка. Крім того, на ній вигравійоване позначення: МІ – масляна імерсія. Під час роботи з сухими об'єктивами (8^x і 40^x) між фронтальною лінзою і препаратом міститься повітряний прошарок: імерсійний об'єktiv (90^x) занурюють у краплю олії, яку наносять на покривне скло. Робота з таким об'єктивом вимагає обережності через дуже коротку фокусну відстань його фронтальної лінзи.

Окуляр **7** (див. рисунок 2.1) має дві лінзи: очну (верхню) і збиральну (нижню). Окуляри мають власне збільшення в 5^x , 7^x , 10^x , 12^x , 15^x і 20^x разів, яке позначено на їхній оправі.

Загальне збільшення мікроскопа визначається добутком збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Отже, застосовуючи різні комбінації окулярів і об'єktivів, можна збільшити досліджувані об'єкти в світловому мікроскопі у 42 (6 x 7) – 1350 (90 x 15) разів.

Чіткість отриманого зображення визначається роздільною здатністю мікроскопа, під якою розуміють мінімальну відстань між двома точками (двома штрихами), коли вони не зливаються в одну точку (лінію). Що більше роздільна здатність мікроскопа, то меншого розміру об'єкт можна побачити.

Роздільна здатність неозброєного ока становить 200 мкм, тобто 0,2 мм. Збільшити роздільну здатність мікроскопа можна у два способи: освітлюючи об'єкт ще більш короткохвильовими променями світла, наприклад ультрафіолетовими, або збільшуючи апертуру об'єктива і конденсора. Апертура об'єктива збільшується при його імерсії краще в кедровій олії. Апертуру конденсора можна також збільшити до 1,2, вміщуючи імерсійну олію між верхньою лінзою конденсора і нижньою поверхнею предметного скла.

Освітлювач – невід'ємна частина мікроскопа. У багатьох сучасних мікроскопах освітлювальний апарат разом з джерелом світла вмонтований в основу мікроскопа. У мікроскопів інших систем такого пристрою немає, тому в такому разі застосовують спеціальні освітлювачі.

Правила роботи з мікроскопом

Під час користування мікроскопом необхідно дотримуватися таких правил:

1. Оберігати мікроскоп від пилу, водяних парів, летких хімічних речовин, високої температури, зберігати його у футлярі або під скляним ковпаком.
2. Не залишати мікроскоп на сонці, біля запаленого пальника, оскільки може розплавитися канадський бальзам, що склеює лінзи в об'єктивах.
3. Для перенесення мікроскоп потрібно брати лише за ручку (тубусотримач) і тримати його прямо перед собою, не нахиляючи і не опускаючи донизу, оскільки при цьому окуляр може випасти з тубуса.
4. Перед початком роботи очистити від пилу механічну й оптичну частини мікроскопа м'якою сухою ганчіркою. Не торкатися пальцями лінз об'єктива та окуляра. Об'єктиви очищати лише із зовнішнього боку, не можна їх розгвинчувати і розбирати. Забруднені об'єктиви чистити у спеціальних майстернях. Пил з лінз окуляра краще витирати спеціальним пензликом, а потім змоченою в бензині тканиною.
5. Обережно ставитися до мікрометричного гвинта – не обертати його повністю.
6. Обережно працювати з імерсійним об'єктивом: на короткій фокусній відстані можна розчавити покривне скло препарату, що може призвести до появи подряпин на лінзі та зміщення системи лінз в об'єктиві.
7. Після закінчення роботи підняти тубус і зафіксувати об'єктив у зручному положенні, після чого обережно протерти фронтальну лінзу об'єктива м'якою чистою бавовняною тканиною або фланеллю. Особливу увагу слід звернути на імерсійний об'єктив. Якщо олія не витерта або присохла, її витирають тканиною, злегка змоченою в очищаючій рідині (бензині або розчині спирту).

Техніка мікроскопування із застосуванням сухих об'єтивів (збільшення 8^x і 40^x)

У навчальних мікробіологічних лабораторіях як джерело штучного освітлення часто застосовують лампи денного світла, встановлені на відстані 0,5-0,6 м. Для мікроскопування необхідно забезпечити правильне освітлення.

1. Мікроскоп поставити перед джерелом світла. За допомогою револьвера закріпити об'єтив зі збільшенням 8^x. Легке упирання і звук клацання пружини револьвера свідчать про те, що об'єтив встановлено за оптичною віссю.
2. Макрометричним гвинтом опустити об'єтив на відстань 0,5–1 см від предметного столика.
3. Повністю відкрити ірис-діафрагму і підійняти конденсор до упору.
4. Дивлячись в окуляр, повертанням дзеркала спрямувати промені від джерела світла через отвір ірисової діафрагми на об'єтив.
5. Під час мікроскопування забарвлених препаратів верхня лінза конденсора має розміщуватися на рівні предметного столика. Для оглядання незабарвлених препаратів ступінь освітлення регулювати, злегка опускаючи конденсор і прикриваючи ірис-діафрагму.
6. Підготовлений препарат («роздавлена» або «висяча» крапля) вмістити на предметний столик і закріпити затискачами.
7. Макрометричним гвинтом, обертаючи його на себе, плавно підняти тубус з об'єтивом (8^x) догори до появи зображення і переглянути кілька полів зору. Потрібну для дослідження ділянку препарату розмістити у центрі.
8. Підняти тубус (макрометричним гвинтом) і обертанням револьвера встановити об'єтив із збільшенням 40^x.
9. Для спостереження збоку обертанням макрометричного гвинта опустити тубус з об'єтивом майже до стикання з препаратом.
10. Дивитися в окуляр, дуже повільно піднімаючи тубус до появи контурів зображення. Точно фокусувати за допомогою мікрометричного гвинта, обертаючи його в той чи інший бік, але не більш як на один повний оберт. Якщо під час обертання мікрометричного гвинта відчувається стикання, то це означає, що його хід пройдено до кінця. В цьому разі повернути гвинт на один-два повних оберти у зворотний бік, знову знайти зображення за допомогою макрометричного гвинта і перейти до роботи з мікрометричним гвинтом. Корисно під час мікроскопування навчитися дивитися обома очима по черзі, оскільки при цьому менше втомлюється зір.

Техніка мікроскопування із застосуванням імерсійних об'єтивів

Препарат розмістити на столику і перевірити освітлення. У центр препарату на покривне скло або на мазок нанести краплю імерсійної олії й поставити об'єтив на 90^x. Спостерігаючи збоку, тубус мікроскопа за допомогою макрометричного гвинта опустити до занурення об'єктива в олію

майже до стикання лінзи з предметним або покривним склом. Цю операцію виконувати обережно, стежачи за тим, щоб не пошкодити фронтальну лінзу. Після занурення об'єктива в олію, користуючись макрогвинтом, обережно піднімати тубус і, дивлячись в окуляр, визначити площину препарату. При цьому слід пам'ятати, що вільна відстань під час роботи з імерсійним об'єктивом дорівнює 0,1-0,15 мм. Точне фокусування відбувається за допомогою мікрогвинта.

Після закінчення мікроскопування підняти тубус, зняти препарат і обережно протерти фронтальну лінзу спочатку сухою, а потім злегка змоченою в бензині серветкою.

Препарат на предметному склі очистити від олії фільтрувальним папером, потім скло обробити бензином або розчином спирту.

Підготовка предметних і покривних скельць

Препарати готують на предметних скельцях і накривають зверху покривними. Предметні скельця – це пластинки (76x26 мм) з тонкого скла з добре відшліфованими краями і товщиною, що не перевищує 1,2–1,4 мм. Більш товсті скельця порушують фокусування конденсора і знижують чіткість зображення, що утруднює роботу з імерсійним об'єктивом. Покривні скельця мають такі розміри: 18x18, 20x20, 18x24 мм тощо при товщині 0,15–0,17 мм. Покривні скельця більшої товщини погіршують якість зображення.

Предметні та покривні скельця мають бути чистими і ретельно знежиреними, що особливо важливо при готуванні фіксованих препаратів. Для перевірки чистоти скла на його поверхню наносять краплю води. При достатньому знежиренні крапля розтікається рівномірно і не збирається в опуклі пухирці, що повільно висихають. Використані скельця витримують 1–2 год у хромовій суміші (1л води, 50 г калію дихромату, 100 г технічної сульфатної кислоти), після чого обполіскують теплою водою і спиртом. У повсякденній роботі для вилучення жиру предметні скельця натирають шматочком мила, а потім витирають чистою бавовняною серветкою.

Зберігають чисті предметні скельця в сухому стані або в банках із притертими пробками, заповненими 96 %-м спиртом або сумішшю Никифорова. Виймати скельця варто пінцетом, тому що пальці залишають на їхній поверхні жирні плями. Перед уживанням скельця варто просушити на повітрі або протерти фільтрувальним папером, чистою тканиною. Покривні скельця повинні бути також добре вимиті, висушені і зберігатися в спеціальних коробках або чашках Петрі.

Відбір культури для дослідження

Мікроорганізми в лабораторних умовах вирощують у пробірках, колбах, чашках Петрі на щільному або рідкому поживному середовищах. Для відбору клітин із рідкого середовища використовують стерильні бактеріологічні петлі або піпетки. Мікроорганізми, що вирости на щільному середовищі, беруть петлями або препарувальними голками. При відборі необхідно дотримуватися таких правил, що запобігають забрудненню культури сторонніми мікроор-

ганізмами:

1. Запалюють спиртівку або газовий пальник.
2. Пробірку з вихідною культурою в рідкому середовищі обережно обертають між долонями, а потім поміщають у ліву руку між великим і вказівним пальцями і тримають у похилому положенні. Якщо культура вирощена в щільному середовищі, поверхня з культурою мікроорганізмів має бути оберненою догори і добре видимою.
3. Петлю тримають вертикально в полум'ї пальника і прожарюють до почервоніння дрiт, потім нахиляють і обпалюють частину тримача, що примикає до неї.
4. Мізинцем і безіменним пальцями правої руки притискають до долоні зовнішню частину ватяної пробки, виймають її з пробірки і тримають у такому положенні, не торкаючись навколишніх предметів.
5. Край відкритої пробірки обпалюють у полум'ї пальника.
6. Обережно вводять стерильну петлю в пробірку з культурою. Щоб не пошкодити клітини на щільному середовищі, петлю спочатку охолоджують, доторкнувшись до внутрішньої поверхні пробірки або поживного середовища, вільного від мікроорганізмів. Легким рухом відбирають невелику кількість мікробної маси або краплю рідини з клітинами. Виймаючи петлю з пробірки, стежать за тим, щоб матеріал не торкався її стінок або країв.
7. Знову обпалюють у полум'ї пальника край пробірки, потім внутрішній кінець ватяної пробки і пробірку закривають. Якщо ватяна пробка займеться, на неї не дмухають і її не кидають, а негайно вводять усередину пробірки і затискають тліючі місця рукою.
8. Пробірку з культурою ставлять у штатив, а відібраний матеріал використовують для приготування препарату.
9. Клітини мікроорганізмів, що залишилися на петлі, спалюють у полум'ї пальника.
10. Відбір культур мікроорганізмів, що вирости на щільному середовищі в чашці Петрі, роблять у тій же послідовності: запалюють пальник, стерилізують петлю (або голку), після чого відкривають великим і вказівним пальцями лівої руки кришку чашки Петрі. Уводять стерильну петлю під кришку і торкаються нею поверхні середовища, вільної від колоній. Гаряча петля зумовлює розплавлення середовища. Знімають з поверхні невелику кількість мікробних клітин, кришку чашки негайно закривають. Матеріал на петлі використовують для приготування препарату або посіву. Прожарювання петлі (голки) знищує клітини, що залишилися на ній. При прожарюванні мокрої петлі може відбуватися розбризкування дрібних крапельок рідини разом з мікробними клітинами, тобто утвориться аерозоль. Тому прожарювання петлі починають з ділянки дроту, що передує кільцю. Клітини, що залишилися на петлі, підсихають, тримач переводять у вертикальне положення і прожарюють петлю.

З рідкого середовища мікроорганізми можна відбирати градуваною або пастерівською піпеткою. При використанні пастерівської піпетки стерильним пінцетом надломлюють її тонкий запаяний кінець і злегка обпалюють усю піпетку. Стерильні піпетки, загорнені в папір, виймають за верхній кінець, закритий ватяним тампоном. Колбу (пробірку) з рідкою культурою беруть у ліву руку, піпетку – в праву між великим і середнім пальцями, затискаючи її верхній отвір вказівним пальцем. Якщо в піпетці рідини недостатньо, її набирають за допомогою гумової груші. Відібрану пробу використовують для приготування препаратів або посіву в нове поживне середовище. Не можна ставити брудну піпетку у штатив або торкатися нею навколишніх предметів. Її слід негайно опустити в дезінфікуючу рідину (0,5—3 %-й водний розчин хлораміну або 3—5 %-й водний розчин фенолу).

Приготування препаратів живих клітин

Живі мікроорганізми можна спостерігати в препаратах *«роздавлена»* і *«висяча крапля»*. Для приготування препаратів у вигляді *«роздавленої краплі»* на середину чистого предметного скла нанести маленьку краплю води, перенести в неї невелику кількість досліджуваних мікроорганізмів, добре перемішати і накрити покривним склом. Якщо досліджувані мікроорганізми ростуть на щільному поживному середовищі, мікробну масу перенести у підготовлену краплю води за допомогою петлі, якщо в рідкому середовищі — суспензію клітин нанести на предметне скло стерильною піпеткою або за допомогою петлі, краплю води на предметне скло можна не наносити. Крапля з досліджуваним матеріалом має бути невеличкою, щоб після притискання її покривним склом з-під останнього не виступала зайва рідина. Зайву рідину видалити фільтрувальним папером. Підготовлений препарат помістити на столик мікроскопа, закрити затискачами. Препарат *«роздавлена крапля»* допомагає встановити форму, розміри клітин, їх розмноження, рухомість, наявність спор, реакцію клітин на хімічні подразники.

Для приготування препарату *«висяча крапля»* невелику краплю суспензії мікроорганізмів нанести на покривне скло, перевернути його краплею донизу і помістити на спеціальне предметне скло із заглибленням у центрі. Край заглиблення заздалегідь змастити вазеліном. Крапля має висіти вільно, не торкаючись країв і дна заглиблення. Це дозволяє її вивчати впродовж кількох днів, спостерігаючи за ростом і розмноженням мікроорганізмів, утворенням і проростанням спор, рухомістю клітин.

Препарат *«відбиток»* готують для вивчення природного розташування в колонії клітин стрептоміцетів і міцеліальних грибів. Зі щільного середовища, на якому мікроорганізми ростуть суцільним газоном у вигляді колоній, вирізують скальпелем невеликий кубик або окрему колонію і переносять на предметне скло. Поверхня з мікроорганізмами має бути обернена догори. Потім прикладають чисте покривне скло, злегка надавлюють на нього петлею або голкою і негайно ж знімають, намагаючись не зрушити убік. Препарат поміщають відбитком вниз у краплю води або в розчин метиленової сині (1:40) на предметному склі і мікроскопують.

Фарбування живих клітин. Для виявлення деяких функціональних особливостей клітин і диференціації їхніх включень застосовують прижиттєве фарбування мікроорганізмів. Через токсичність барвників живі клітини фарбують нейтральним червоним, нейтральним фіолетовим, метиленовою синню, фуксином, еозином, еритрозином, зеленим янусом у дуже невеликих (0,001—0,0001%) концентраціях. На предметному склі краплю досліджуваних мікроорганізмів змішують із краплею розчину барвника, накривають покривним склом і через 2–3 хв мікроскопують.

Уявлення про природну форму, величину, будову мікроорганізмів, їхні окремі структури (позаклітинний слиз) дають негативні препарати. Для негативного фарбування застосовують рідку туш, 3 %-й водний розчин конго червоного, 10 %-й розчин нігрозину й інші барвники, що не проникають у мікробні клітини. Краплю туші або розчину барвника змішують із краплею культури, накривають покривним склом і розглядають із сухими об'єктивами. Барвники заповнюють простір, що оточує клітину, і в результаті незабарвлені мікроорганізми чітко виділяються у вигляді яскраво освітлених безбарвних капсул на темному тлі препарату. Можна застосувати комбіноване негативне фарбування фону з прижиттєвим фарбуванням клітин.

Приготування препаратів фіксованих і пофарбованих клітин

Фіксованими вважають клітини мікроорганізмів, у яких перервані життєві процеси, але цілком збережена тонка структура. Пофарбовані фіксовані клітини і деталі їхньої будови різкіше виділяються на фоні препарату. Це полегшує вивчення форми, розмірів, внутрішніх елементів (ядра, оболонки, спор, включень), спрощує підрахунок кількості клітин. Фіксовані препарати звичайно розглядають з імерсією. Приготування таких препаратів має такі етапи: приготування мазка, висушування, фіксація та фарбування.

Приготування мазка. На знежирене предметне скло нанести маленьку краплю очищеної води і петлею перенести в неї невелику кількість досліджуваного матеріалу, як для препарату «роздавлена крапля». Одержану суспензію рівномірно розподілити петлею або краєм покривного скла на площі 1–2 см² якомога тоншим шаром, щоб вона висихала майже відразу після приготування мазка.

Сушіння мазка. Найкраще сушити препарат при кімнатній температурі на повітрі. Якщо мазок висихає повільно, препарат можна злегка нагрівати у струмені теплого повітря, тримаючи скло високо над полум'ям пальника мазком догори. Цю операцію слід виконувати дуже обережно, не перегріваючи мазок, інакше клітини мікроорганізмів деформуються.

Фіксація. Цей процес має на меті вбити мікроорганізми, тобто зробити їх безпечними, якщо вони патогенні; забезпечити найкраще прилипання клітин до скла, зробити мазок більш сприятливим до фарбування (мертві клітини забарвлюються краще, ніж живі). Поширений спосіб фіксації – термічна оброб-

ка. Для цього препарат треба тричі пронести через найгарячіше полум'я пальника, тримаючи предметне скло мазком догори. Не слід сильно перегрівати мазок, оскільки можуть статися грубі зміни зовнішнього вигляду клітини і внутрішніх клітинних структур (зморщування). Іноді застосовують хімічні способи фіксації: занурюють предметне скло з мазком у мензурку з 96 %-м етанолом на 15-20 хв, з безводним метанолом на 3-5 хв, з розчином Никифорова на 15-20 хв, із сумішшю 96 %-го етанолу і 40 %-го формаліну (співвідношення 95:5) на 2 хв. Можна фіксатор наливати безпосередньо на мазок і витримувати зазначений час. Після закінчення фіксації мазок обережно промивають легким струменем з дистильованої води й фарбують.

Фарбування. Розрізняють *прості, складні і диференціальні* способи фарбування мікроорганізмів. При простому фарбуванні частіше використовують один барвник і профарбовують усю клітину. Це дає можливість чітко визначити форми і розміри клітин. Складне фарбування передбачає застосування двох або декількох барвників, наприклад, діагностичне визначення відношення бактерій до фарбування за Грамом. Диференціальне фарбування засноване на індивідуальному відношенні біологічних структур клітин до різних барвників (фарбування спор, оболонки, ядра капсул, метакроматина й ін.).

Для фарбування *простим* способом фіксований препарат вмістити на паралельні скляні мостики, які лежать на стінках кристалізатора, і облити з піпетки кількома краплями розчину вибраного барвника (фуксину, метиленового синього тощо). Слід звертати увагу на те, щоб кінець піпетки не торкався мазка. Тривалість фарбування – від декількох секунд до 1-3 хв.

Фарбувати мазок фуксином Пфейффера необхідно 1-2 хв, а лужним метиленовим синім – 3-5 хв. Після забарвлення препарат промивають водопровідною водою до зникнення струмочків барвника, висушують фільтрувальним папером і мікроскопують.

У повсякденній мікробіологічній практиці найчастіше використовуються основні барвники: фуксин основний, нейтральний червоний, конго червоний (дають червоне забарвлення), метиленовий та толуїдиновий синій (голубе, синє), генціанвіолет, метиленовий фіолетовий (фіолетове), хризоїдин, везувін (жовто-коричневе), брильянтовий зелений, малахітовий зелений (зелене) та інші.

Необхідно стежити, щоб під час фарбування розчин барвника на мазку не підсихав, і у разі потреби доливати нові порції. Після закінчення фарбування препарат промити струменем води доти, доки вода, що стікає, стане безбарвною. *У правильно зафарбованому і добре промитому препараті фон залишається чистим, а зафарбованими є лише клітини мікроорганізмів.* Потім препарат висушити на повітрі або обережно промокнути фільтрувальним папером і мікроскопувати з імерсією.

При висушуванні мазків за допомогою листків фільтрувального паперу потрібно кожного разу користуватися новими, так як при повторному вживанні

переносяться забарвлені бактерії з одного мазка на інший, що може привести до невірних висновків.

Виготовлення барвників для простого забарвлення

Фуксин основний готують у вигляді концентрованого фенолового фуксину Циля. Він дуже стійкий, може зберігатись на протязі декількох місяців. У концентрованому вигляді вживається лише для фарбування спор і кислотійких бактерій. Для простого забарвлення та за методом Грама його розводять дистильованою водою 1:10, отримуючи так званий розведений, або водний фуксин Пфейфера. Цей розчин дуже нестійкий і його готують безпосередньо перед вживанням.

Феноловий фуксин Циля

<i>Основний фуксин</i>	<i>1 г</i>
<i>Етанол 96°</i>	<i>10 мл</i>
<i>Фенол кристалічний</i>	<i>5 г</i>
<i>Гліцерин</i>	<i>кілька крапель</i>
<i>Вода дистильована</i>	<i>100 мл</i>

Спочатку фуксин з кристалами фенолу і гліцерином розтирають у ступці до однорідної маси, потроху додаючи спирт, потім, весь час перемішуючи, доливають дистильовану воду. Розчин витримують при кімнатній температурі протягом 48 год і фільтрують. З нього потім виготовляють водний фуксин.

Фуксин Пфейфера

<i>Фуксин Циля</i>	<i>1 мл</i>
<i>Вода дистильована</i>	<i>9 мл</i>

Метиленовий синій або метиленова синька. Спочатку готують насичений спиртовий розчин метиленової синьки, який дуже стійкий. При зберіганні його фарбувальні властивості, а також здатність давати метакроматичне забарвлення нуклеїнових сполук (напр. Волютинових зерен) значно підвищується за рахунок утворення азурів.

Насичений спиртовий розчин метиленової синьки

<i>Метиленової синьки</i>	<i>10 г</i>
<i>Етанол 96°</i>	<i>100 мл</i>

Із даного розчину готтують лужну метиленову синьку за Лефлером, яку дуже широко використовують для простого методу забарвлення.

Метиленова синька за Лефлером

<i>Спиртовий розчин метиленової синьки</i>	<i>30 мл</i>
<i>Гідроксид натрію, або калію 1 %</i>	<i>1 мл</i>
<i>Дистильована вода</i>	<i>100 мл</i>

Водно-спиртовий розчин метиленової синьки

<i>Спиртовий розчин метиленової синьки</i>	<i>10 мл</i>
<i>Дистильована вода</i>	<i>100 мл</i>

Лужна метиленова синька за Лефлером, як і її водно-спиртовий розчин, можуть давати забарвлення різної інтенсивності у різних видів бактерій.

До простих методів забарвлення можна віднести і *негативний спосіб Буррі*. При ньому за рахунок туші створюють темний фон, а бактерії залишаються незабарвленими. Для стабільних і чітких результатів необхідно дуже ретельно підготувати суспензію туші. Вибирають найкращі сорти рідкої китайської туші й розводять її дистильованою водою 1:10. Можна натерти сухої китайської туші й довести її до такої ж густоти. Суспензію туші довго центрифугують при 3 тис об/хв. Верхній шар відсмоктують піпеткою і в надавленій краплі під імерсійним об'єктивом перевіряють її на відсутність грубих частинок. Якщо суспензія хороша, її натягують у тонкі капіляри по 0,1-0,2 мл, запаюють і стерилізують в автоклаві.

При дослідженні краплю туші з капіляра випускають на предметне скло, додають крапельку матеріалу (рідину з сифілітичної виразки, культуру капсульних бактерій, лептоспір та ін.) і ретельно перемішують петлею. Шліфованим предметним склом зі зрізаними кутами готують тонкий препарат так само, як мазок крові, висушують, не фіксують. При мікроскопії тіла бактерій, спірохет, лептоспір виглядають білими, чітко окресленими на темному димчасто-сірому фоні. Замість туші можна використати 2-10 % розчини опалового синього, конго червоного, нігрозину, коларголу та ін. В такому разі фон буде мати інший колір.

Необхідно враховувати, що мікроорганізми в таких препаратах не вбиті і можуть стати джерелом зараження, як і в мазках, обережно фіксованих у полум'ї пальника.

Складне фарбування – фарбування бактерій за Грамом. Метод запропонований данським вченим Грамом у 1884 р. За цим методом фарбування всі мікроби поділяються на дві групи: грампозитивні, які набувають синьо-фіолетового кольору, і грамнегативні, які внаслідок того ж фарбування знебарвлюються при додаванні спирту, а при дофарбовуванні фуксином отримують рожевий колір.

Вважають, що здатність бактерій фарбуватися за Грамом пов'язана з молекулярною організацією і хімічним складом їхньої клітинної оболонки. Проте результати фарбування за Грамом теж залежать і від техніки виготовлення мазка (він повинен бути тонким), віку досліджуваної культури і тривалості фарбування.

Для фарбування за Грамом доцільно на одному предметному склі поряд з мазком із досліджуваної культури робити мазок із відомих грампозитивних або грамнегативних мікробів (для контролю). До найпоширеніших грампозитивних мікроорганізмів належать майже всі кулясті бактерії, молочнокислі бактерії, спорозносні бацили, дріжджі та багато інших. До грамнегативних — азотобактер,

оцтовокислі бактерії, кишкова паличка, протей, чудесна паличка, спірохети тощо.

Фарбування за Грамом виконують так. На знежиреному предметному склі приготувати три мазки з різних культур. У центр нанести мазок досліджуваного мікроорганізму, ліворуч і праворуч – мазки контрольних мікроорганізмів: грампозитивних і грамнегативних – кишкова паличка. Мазки висушити на повітрі, фіксувати над полум'ям пальника. На фіксовані мазки покласти смужку фільтрованого паперу і налити розчин карболового генціанвіолету. Мазки фарбувати протягом 1-2 хв. Папір з барвником зняти і, не промиваючи водою, обробляти мазок розчином Люголя протягом 1-2 хв. до повного почорніння. Потім розчин злити, препарат промити водою і 30 с обробляти етиловим спиртом для знебарвлення, для чого занурити предметне скло 2-3 рази в склянку зі спиртом або налити спирт на мазок. У цьому разі скло злегка похитувати і спирт змінювати кілька разів. Далі препарат промити водою і додатково забарвити водним розчином фуксину протягом 1-2хв. Фуксин злити, препарат знову промити водою, висушити і мікроскопувати з імерсією.

За правильного фарбування грампозитивні бактерії забарвлені в синьо-фіолетовий колір, грамнегативні – в червоний – колір фуксину.

Розчини для фарбування за Грамом:

Карболовий розчин кристал (генціан- або метил-) фіолетового. 1 г кристалів (генціан- або метил-) фіолетового, 10 см³ 96 %-го етилового спирту, 5 г фенолу розтирають у ступці, додають 100 см³ дистильованої води.

Розчин зберігають у посуді з темного скла з притертою пробкою при кімнатній температурі не більше 3 місяців.

Розчин Люголя. 2 г калію йодистого розчиняють у 5-10 см³ води, додають 1 г кристалічного йоду, залишають на кілька годин до повного розчинення йоду і доводять водою об'єм розчину до 300 см³.

Розчин зберігають у посуді з темного скла з притертою пробкою при кімнатній температурі не більше 3 місяців.

Фуксин Циля. 1 г основного фуксину, 10 мл 96 %-го етилового спирту, 5г фенолу розтирають у ступці, додаючи 100 см³ дистильованої води.

Розчин зберігають у посуді з темного скла з притертою пробкою при кімнатній температурі не більше 3 місяців.

Перед використанням фуксин Циля розводять у дистильованій воді в співвідношенні 1:9.

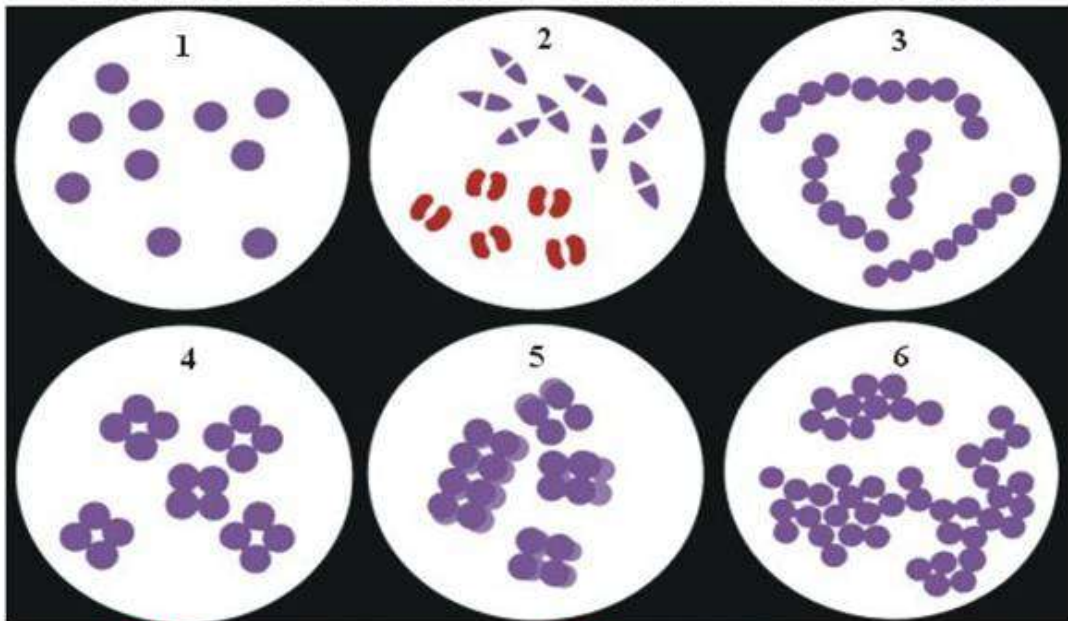
Різні форми мікроорганізмів

За формою мікроорганізми поділяють на 3 основні групи: кулясті (коки), паличковидні, звивисті.

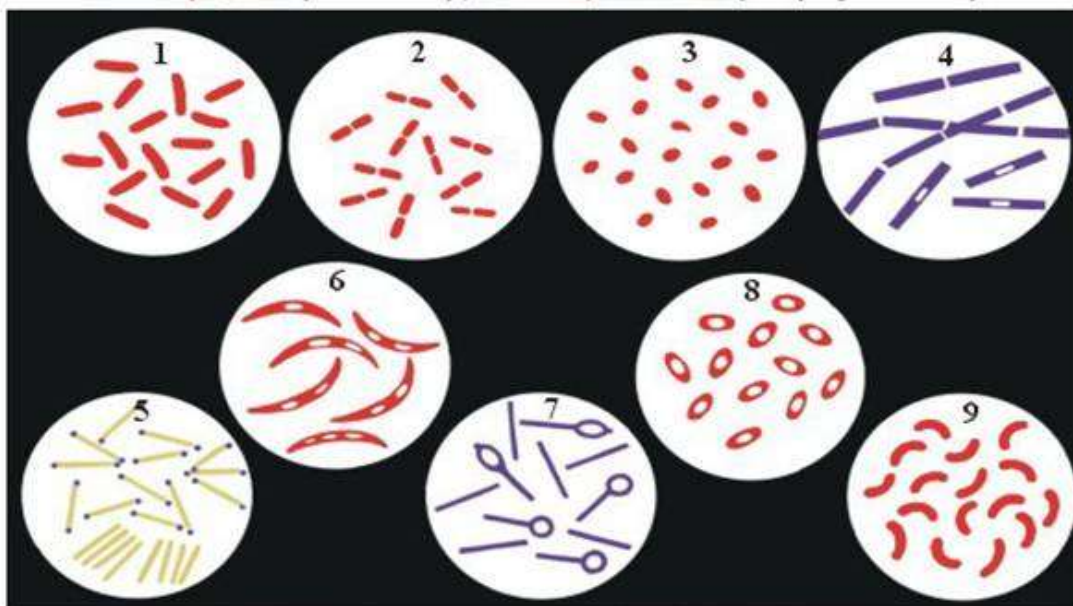
Залежно від площини поділу клітин і характеру їх взаєморозміщення серед коків (рисунок 2.2) виділяють:

КОКОПОДІБНІ І ПАЛИЧКОПОДІБНІ ФОРМИ БАКТЕРІЙ

SPHERICAL AND ROD-SHAPED BACTERIA



1. Мікрококи (Micrococci); 2. Диплококи (Diplococci);
3. Стрептококи (Streptococci); 4. Тетракоки (Tetracocci);
5. Сарцини (Sarcinae); 6. Стафілококи (Staphylococci)



1. Ешерихії (Escherichia coli); 2. Клебсієли (Klebsiellae);
3. Бруцели (Brucellae); 4. Бацили (Bacilli);
5. Коринібактерії (Corynebacteria); 6. Фузіформні бактерії (Fusobacteria);
7. Клостридії (Clostridia); 8. ґерсинії (Yersinia); 9. Вібріони (Vibrionae)

Рисунок 2.2 – Кокоподібні і паличкоподібні форми бактерій

- мікрококи – поділ в одній площині, клітини розміщуються поодинокі;
- стафілококи – поділ в одній площині, клітини утворюють неправильні скупчення у вигляді виноградного грона;

- диплококи – поділ в одній площині, клітини розміщуються попарно;
- стрептококи – поділ в одній площині, клітини утворюють ланцюжки різної довжини;
- тетракоки – поділ у двох взаємоперпендикулярних площинах, клітини розміщуються у вигляді тетрад;
- сарцини – поділ у декількох взаємоперпендикулярних площинах, клітини утворюють пакети з 8, 16, 32 і т.д. особин.

Паличковидні мікроорганізми мають циліндричну форму тіла. Клітини відрізняються одна від одної довжиною, площею поперечного перерізу, співвідношенням цих величин, нерівномірним потовщенням. Дані мікроорганізми можуть розміщуватися як поодинокі, так і утворювати короткі чи довгі ланцюги. Паличковидні мікроорганізми, які здатні утворювати спори, називають бацилами, а не здатні до спороутворення – бактеріями.

Звивисті мікроорганізми відрізняються за ступенем зігнутоності клітин і за кількістю витків рисунок 2.3:

- вібріони - клітини мають вигляд коми або півмісяця;
- спірили - клітини мають 4-6 витків;
- спірохети - клітини мають 6-12 витків.



а



б



в

а – вібріони; б – спірили; в – спірохети

Рисунок 2.3 – Звивисті форми мікроорганізмів

2.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: мікроскопи, імерсійна олія, розчин для очистки об'єктиву мікроскопа, тканина для протирання лінз об'єктиву; фільтрувальний папір; предметні скельця плоскі і з лункою; покривні скельця; спиртівки; сірники; розсіл квашеної капусти (огірків) або розчин дріжджів; дистильована вода; вода з водойми; метиленова синь; фуксин; скляні мостики; кристалізатор.

2.3.1. Вивчити будову біологічного мікроскопа. Навчитись користуватись біологічним мікроскопом. Розглянути тубус, окуляр, об'єктив, револьвер, спробувати повертати об'єктиви у револьвері, визначити, яка величина збільшення на об'єктивах та їх число апроксимації, визначити, який об'єктив використовують для імерсії, спробувати, як працює мікро- (дуже обережно) та макрогвинт, як рухається конденсор та відкривається ірис-діафрагма.

Замалювати мікроскоп та зробити відповідні позначення.

2.3.2 Приготування препарату "роздавлена крапля". На чисте сухе предметне скло нанести краплину розсолу квашеної капусти чи огірків (або краплину води, в яку додати невелику кількість дріжджів та розмішати), накрити покривним склом. Якщо досліджувати негусті суспензії мікробних клітин, то краплину води на предметне скло можна не наносити. Надлишок рідини з-під предметного скла слід видалити фільтрувальним папером. Розглянути препарат під мікроскопом та замалювати.

2.3.3 Приготування препарату "висяча крапля". Взяти предметне скло з вишліфованою заглибиною (лункою) у центрі і змастити вазеліном краї лунки. Далі, на чисте покривне скло нанести краплину розсолу квашеної капусти чи огірків (або інший досліджуваний матеріал), накрити предметним склом, швидко перевернути препарат. Крапля повинна вільно звисати, не торкаючись країв і дна лунки. Крапля стає герметизованою у вологій камері, що надає можливість спостерігати за препаратом навіть декілька днів. Розглянути препарат під мікроскопом.

2.3.4 Дослідження зубного нальоту під мікроскопом. На предметне скло нанести краплину води, потім сірником взяти невелику кількість зубного нальоту, змішати з краплиною води і виготовити фіксований зафарбований препарат (див. послідовність виготовлення фіксованих препаратів у коротких теоретичних відомостях). Через імерсійну систему мікроскопа розглянути препарат. Для цього на сухий фіксований зафарбований препарат наносять краплину імерсійної оливи. Встановлюють об'єктив 90x і, дивлячись збоку, обережно опускають тубус мікроскопа до занурення об'єктива в оливу. Слідкують за тим, щоб фронтальна лінза об'єктива не доторкнулася до предметного скла. Потім, спостерігаючи в окуляр, макрогвинтом повільно піднімають тубус і фокусують об'єктив. Тонке фокусування проводять за допомогою мікрометричного гвинта. Після закінчення дослідження піднімають тубус,

знімають препарат і обережно протирають фронтальну лінзу об'єктива спочатку сухим бинтом, а потім змоченим у розчині для очистки лінзи.

Замалювати препарат та визначити морфологічні типи за формою розглянутих мікроорганізмів.

2.3.5 Дослідження мікрофлори мулу водойми.

На предметне скло нанести краплину досліджуваної рідини, додати краплину барвника і приготувати препарат за методикою "роздавленої краплі" (див. короткі теоретичні відомості). Розглянути мікроорганізми у живому стані та замалювати їх у лабораторний звіт. Визначити морфологічні типи за формою мікроорганізмів і замалювати їх у лабораторний журнал.

2.4 Висновок: У мікробіологічній лабораторії для досліджень застосовують мікроскопи типу... Основні методи приготування препаратів для мікроскопіювання наступні... За формою виділяють наступні морфологічні типи мікроорганізмів... У розглянутих препаратах спостерігались такі морфологічні типи мікроорганізмів...

Контрольні питання

1. Які основні частини має оптичний мікроскоп? У чому полягають правила роботи з ним?
2. Як визначити основні характеристики оптичного мікроскопа?
3. У чому полягають особливості техніки мікроскопування із використанням сухих та імерсійних об'єктивів?
4. Що таке предметні та покривні стекла? Для чого вони використовуються?
5. Як приготувати препарат «роздавлена крапля», «висяча крапля»?
6. Як приготувати фіксований препарат?
7. Які існують методи фарбування препаратів?
8. Як пофарбувати препарат простим методом?
9. Які барвники використовують для простого методу фарбування?
10. Які основні морфологічні типи мікроорганізмів вирізняють за формою?

Лабораторна робота № 3

Поживні середовища. Посів мікрофлори повітря, води та ґрунту. Перетворення мікроорганізмами сполук Карбону (вирощування бактерій різних типів бродіння)

3.1 Мета: ознайомитись з основними видами та способами приготування поживних середовищ, оволодіти методикою посіву мікрофлори повітря, води та ґрунту, вирощування культур бактерій різних типів бродіння.

3.2 Короткі теоретичні відомості

Поживні середовища необхідні для накопичення, виділення і збереження мікроорганізмів, а також для вирощування культур з метою дослідження їх

обміну речовин або одержання цінних продуктів метаболізму. Середовище повинно включати всі компоненти, необхідні для конструктивних і енергетичних процесів клітини – джерела Карбону, Гідрогену, Оксигену, мінеральні елементи та мікроелементи. У мікробіологічній практиці використовують різні поживні середовища (як рідкі так і тверді).

За складом поживні середовища поділяються на природні (натуральні), штучні та синтетичні.

Натуральні середовища готують із продуктів тваринного або рослинного походження (наприклад, шматки картоплі, моркви, м'ясна вода, гідролізоване молоко, солодове сусло, дріжджова вода та ін.). Їх використовують для вирощування мікроорганізмів, нагромадження біомаси, зберігання чистих культур, але вони мало підходять для вивчення фізіології обміну речовин.

Штучні середовища складаються з різних хімічних речовин із додаванням природних продуктів невизначеного складу. До таких середовищ належать м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний желатин, бобово-пептонний агар тощо.

До складу синтетичних середовищ входять точно вказані концентрації певних органічних або неорганічних хімічних сполук (амінокислот, цукрів, мінеральних солей, вітамінів). Наприклад, середовище Рідер для вирощування дріжджів, середовище Чапека для грибів та ін. Їх використовують для дослідження обміну речовин, виявлення закономірностей росту чи біосинтезу яких-небудь метаболітів та ін.

За призначенням розрізняють універсальні, селективні та диференціально-діагностичні середовища. До універсальних належать середовища, сприятливі для росту багатьох видів мікроорганізмів (м'ясопептонний бульйон (МПБ), неохмелене пивне сусло та ін.). Селективні, або вибіркові, середовища забезпечують розвиток лише певних мікроорганізмів чи груп споріднених видів. Диференціально-діагностичні, або індикаторні, середовища використовують для диференціювання видів мікроорганізмів (наприклад, середовище Ендо, використовують для визначення кількості бактерій групи кишкових паличок, та ін.).

За консистенцією поживні середовища бувають щільними, рідкими і сипкими. Рідкі середовища застосовують для нагромадження біомаси мікроорганізмів, дослідження їх фізіолого-біохімічних властивостей, рідше – для зберігання, щільні – для виділення чистих культур, одержання ізольованих колоній, зберігання чистих культур у музеях та ін. Сипкі середовища (висівки, пшоно, буряковий жом, макуха та ін.) використовують для зберігання деяких видів мікроорганізмів та їх спор, приготування посівного матеріалу.

Для одержання щільних середовищ використовують агар, желатин і кремнекислий гель. Агар – складний полісахарид, його добувають із морських водоростей шляхом екстракції під час кип'ятіння. Готовий агар – це порошок, пластинки або стебельця світло-жовтого кольору. У воді набрякає, розм'якшується й утворює гель, що плавиться при температурі 100 °С і застигає при 40 °С. До середовищ додають 1,5-3 % агару.

Желатин – білок, який одержують виварюванням кісток, хрящів, сухожиль тварин. Желатиновий гель плавиться при температурі 22-26,5 °С, залежно від його концентрації в середовищі.

Кремнекислий гель (силікагель) готують змішуванням рівних об'ємів НСІ і рідкого скла (Na_2SiO_2 або K_2SiO_3).

Поживні середовища мають бути збалансовані за своїм складом, ізотонічні за концентрацією розчинних речовин, повинні мати оптимальну для росту певного мікроорганізму реакцію середовища (рН) і в'язкість.

Приготування поживних середовищ. Для приготування поживних середовищ використовують чистий посуд, що не містить сторонніх речовин. Краще користуватися скляним посудом (колби, флакони, склянки, матраці, пробірки і т.д.). Новий скляний посуд миють і занурюють на 8-10 год у 1-2 %-й розчин хлоридної або сульфатної кислоти, або кип'ятять у підкисленій воді, потім ретельно прополіскують спочатку проточною водопровідною, потім з дистильованою водою і сушать. Використаний посуд миють йоржами або щітками в теплій воді, застосовуючи кальциновану соду, мильний розчин, напіврідке мило або синтетичні миючі засоби, прополіскують спочатку проточною водопровідною, потім дистильованою водою. Дуже забруднений посуд із залишками жиру обробляють хромовою сумішшю і ретельно промивають водою. Сушать посуд при кімнатній температурі або в сушильній шафі, закривають ватяними пробками з паперовими ковпачками і зберігають у захищеному від пилу місці.

Рідкі поживні середовища фільтрують через паперовий або полотняний фільтр і розливають у пробірки за допомогою лійок з короткою гумовою трубкою, затискачем Мору і скляним наконечником. Для ущільнення рідких середовищ вносять потрібну кількість агару і нагрівають у киплячій водяній бані до повного розчинення. Розплавлені агаризовані середовища фільтрують через ватно-марлеві фільтри і розливають за допомогою металевих лійок для гарячого фільтрування. Для одержання скошеного агару пробірки заповнюють на 1/2 висоти, заповнення чашок – на 2/3 (краще використовувати пробірки великого об'єму), потім стерилізують.

Можна не розливати у пробірки, а стерилізувати середовище в колбах. Пробірки і колби перед стерилізацією закривають ватяними пробками. Після стерилізації пробірки для скошеного агару встановлюють у похилому положенні і залишають для застигання. Середовище має не доходити до ватяної пробки на 5-6 см.

Желатин, що додається в рідкі середовища, залишають для набрякання на 10-15 хв, потім нагрівають у водяній бані до повного розчинення.

Зберігають стерильні поживні середовища у прохолодному, помірно сухому приміщенні, у щільно закритих шафах, захищених від дії світла і висихання. У сирих приміщеннях ватяні пробки вбирають вологу, що приводить до розвитку міцеліальних грибів, що згодом можуть потрапити всередину колб і пробірок. На кожен колбу із середовищем прикріплюють етикетки зі складом (або назвою) і датою приготування.

Приклади приготування середовищ:

Приготування м'ясо-пептонного агару (МПА).

Спочатку готують м'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Для цього використовують яловичину, повністю очищену від кісток, плівок та жиру. М'ясо дрібно нарізають або пропускають через м'ясорубку, заливають водою (на 200 г м'яса – 400 г води) і залишають настоюватися на холоді протягом доби. Одержаний настій кип'ятять до освітлення бульйону, відфільтровують через чисту вату або марлю. Далі з розрахунку на 1 л фільтрату додають 5 г NaCl, 10 г пептону та 2 г агар-агару. Суміш нагрівають до повного розчинення агар-агару. Пептони – це суміш поліпептидів (продуктів неповного розкладання білку) з певним вмістом вільних амінокислот, ферментів, нуклеїнових кислот і деяких вітамінів.

Агар-агар – це складний полісахарид, який одержують із червоних водоростей. Він зручний тим, що більшість мікроорганізмів не використовують його як поживне середовище. У воді агар-агар утворює гелі, які зріджуються при 100 °С, а тверднуть при 40°С. Тому на агаризованих середовищах можна культивувати мікроорганізми при оптимально придатній для їх росту температурі. МПА є універсальним щільним середовищем.

Приготування середовища Ендо (з сухого). 50 г сухого середовища Ендо поміщають в колбу з 1000 см³ дистильованої води і розмішують. Кип'ятять на слабкому вогні до повного розплавлення агару (можна на водяній бані). Фільтрують і знову доводять до кипіння. Охолоджують, розливають в стерильні чашки Петрі, після застигання підсушують. Середовище Ендо має бути свіжоприготовленим.

Середовище Ендо використовують для визначення кількості *бактерій групи кишкових паличок*.

Приготування середовища Сабуро. 40 г глюкози, 10 г пептону, 18 г агару добавляють до 1 дм³ дистильованої води. Суміш підігрівають, періодично помішують до розплавлення складових частин, охолоджують до 50 °С, встановлюють рН 5,6+0,2, розливають в колби і стерилізують при 121 °С 15 хв.

Використовують для визначення кількості *пліснявих грибів і дріжджів*.

Середовище зберігають при температурі 2-6 °С не більше 14 діб.

Середовище Кесслер (з лактозою) – до 1000 см³ питної води додати 50 см³ жовчі нативної (без консервантів) сільськогосподарських тварин і 10 г пептону. Суміш кип'ятити (20 -30) хвилин на водяній бані при перемішуванні, фільтрувати через ватно-марлевий фільтр, потім додати 2,5 г лактози. Довести об'єм суміші водою до 1000 см³, встановити реакцію середовища рН (7,4-7,6), додати 2 см³ розчину кристалічного фіолетового з масовою часткою 1 %, розлити у пробірки по 5 см³, закласти поплавки. Стерилізувати (10-15) хвилин за температури (121 ±1)°С.

Сухе середовище Кесслер. Підготовку середовища для посіву проводити згідно з прописом на етикетці, використовувати з поплавками.

Середовища для виявлення бактерій групи кишкових паличок.

Середовище Кода (з сухого). 43 г сухого середовища Кода ретельно розмішують в колбі з 1000 см³ з дистильованої холодної води, нагрівають на слабкому вогні до кипіння і кип'ятять від 2 хв до 3 хв, встановлюють рН 7,5 - 8,0. Середовище розливають в стерильні пробірки з поплавками по 9 см³, додаткова стерилізація не потрібна. Готове середовище має синьо-фіолетовий колір.

Використовується тільки свіжоприготовлене середовище Кода. Застосовують для виявлення бактерій групи кишкових паличок.

Визначення рН поживних середовищ. Для визначення рН використовують потенціометри (рН-метри лабораторні) різних марок: рН-121, рН-340, рН-150М, ЭВ-74 та ін.

Стерилізація поживних середовищ. Стерилізацією, або знеплідненням, називають повне знищення вегетативних клітин та їхніх спор у будь-якому матеріалі – поживному середовищі, посуді, інструментах та ін. Вибір способу стерилізації залежить від властивостей об'єкта, що стерилізується. Для стерилізації можна застосовувати такі прийоми.

Автоклавування – стерилізація в автоклавах насиченою парою під тиском 0,05 – 0,2 МПа.

Стерилізація текучою парою – використовується для знепліднення поживних середовищ, які змінюють свій склад і властивості при температурі понад 100 °С. Суть її полягає в нагріванні поживного середовища при температурі 100 °С тричі по 30 хв протягом трьох діб. Короткочасне прогрівання середовища кип'ятінням знищує вегетативні клітини мікроорганізмів. Витримування середовищ протягом доби при кімнатній температурі або в термостаті при температурі 30 °С дає змогу прорости життєздатним спорам. Вегетативні клітини, які утворюються з термостійких спор, гинуть при повторному кип'ятінні.

Дробову стерилізацію поживних середовищ проводять в апараті Коха або в автоклаві з закритою, але не загвинченою кришкою. Тому що нагрівання ведуть у парах киплячої води, спосіб називають стерилізацією текучою парою. Дробовій стерилізації піддають середовища, до складу яких входять цукри, багатоатомні спирти, желатин.

Стерилізація шляхом переривчастого нагрівання була запропонована англійським фізиком Джоном Тиндалем і одержала назву *тиндалізації*. Середовища, що необернено змінюються при кип'ятінні, обережно прогривають при нижчій температурі: при 60-80 °С – впродовж 5 діб підряд по 30-60 хв або при 56- 58 °С – впродовж 6-7 діб, у першу добу – 2 год, у наступні – по 1 год. Температурну обробку середовищ ведуть у водяній бані або в ультратермостаті, де температура автоматично підтримується на визначеному рівні за допомогою спеціального пристрою. У проміжках між нагріваннями середовища витримують у звичайному термостаті при 30 °С.

Пастеризація, або неповна стерилізація – призначена для знищення

переважно аспорогенних мікроорганізмів одноразовим прогріванням при температурі 60-75 °С впродовж 20-30 хв або при температурі 80 °С впродовж 10-15 хв. Пастеризації підлягають продукти і середовища, які під дією більш високих температур зазнають глибоких змін, втрачають якості та поживну цінність.

Стерилізація фільтруванням, або холодна стерилізація. Стерилізацію рідких поживних середовищ, які не витримують навіть незначного нагрівання, проводять за допомогою спеціальних дрібнопористих бактеріальних фільтрів (азбестових фільтрів Зейтца, мембранних нітроцелюлозних фільтрів і керамічних свічок). На бактеріальних фільтрах затримуються механічні зважені домішки, у тому числі і клітини мікроорганізмів. Винятки становлять віруси і фаги. Фільтруванню піддають середовища з білками, антибіотиками, вітамінами, леткими речовинами, культуральні рідини з метою звільнення від клітин і збереження всіх продуктів метаболізму в незмінному вигляді. Фільтри виготовляють з позитивно заряджених матеріалів. Тому на стінках фільтрів виникає відповідний позитивний заряд. Унаслідок того, що більшість мікроорганізмів у водних розчинах несе на поверхні негативний заряд, при фільтрації має місце не тільки механічна затримка клітин, але й їх адсорбція.

Розлив середовища у чашки Петрі

Тверде поживне середовище розплавляють на водяній бані та охолоджують до 50 °С. Стерильні чашки Петрі виставляють на рівну поверхню. На спиртівці обпалюють отвір колби з середовищем, виймають пробку. Відкриту колбу тримають в нахиленому положенні горловиною в бік полум'я. Піднімають кришку чашки Петрі з одного боку (також в бік полум'я) і наливають 15-20мл середовища, яке рівномірно розподіляють по всій поверхні чашки. Закривають чашку і дають час середовищу застигнути. Пробку обпалюють в полум'ї спиртівки і закривають колбу.

Розлив середовища у пробірки

Агаризовані середовища часто розливають у пробірки для одержання агарового стовпчика або скошеної поверхні (косячок).

Колбу з середовищем беруть в праву руку, а стерильну пробірку, в яку наливають середовище, в ліву. Потім мізинцем лівої руки виймають пробку з колби з середовищем, а мізинцем правої руки – пробку з пробірки. В зоні стерильності проводять розлив. В пробірки середовище наливають шаром не більше, ніж на 1/3 пробірки.

Для одержання агарового стовпчика пробірку залишають у вертикальному положенні, а для одержання косоного агару – пробірку з середовищем виставляють у нахиленому стані.

Завдання даної лабораторної роботи пов'язані з визначенням мікроорганізмів – одного з показників нешкідливості навколишнього середовища як для людини, так і для визначення умов зберігання харчових

продуктів.

Гігієністи, з одного боку, визначають оптимальні умови зовнішнього середовища для життєдіяльності людини, а з іншого боку – розробляють способи обмеження шкідливого впливу середовища на організм, тобто розробляють гігієнічні нормативи, що регламентують фізичні умови середовища, а також вміст у них хімічних речовин і мікроорганізмів.

У цій лабораторній роботі пропонується визначити кількість мікроорганізмів у повітрі, ґрунті, питній воді і на поверхні столів, стін (лабораторії і виробничих приміщень), приладів, інвентарю і т.п.

3.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: м'ясо-пептонний агар, середовище Ендо, середовище Сабуро, стерильні чашки Петрі, плитка, водяна баня, термостат, стерильні піпетки, стерильні пляшки для відбору проби води, ватно-марлеві пробки для пляшок та колб, колби об'ємом 200-250 см³, 10% розчин цукру, дріжджі, чиста неочищена бульба, крейда, пиво, етиловий спирт, молоко, стебла льону, ґрунт.

Як вже зазначалось для виділення мікроорганізмів з виробничих і природних субстратів, підтримки в активному стані чистих культур, приготування культур з метою передачі у виробництво і т.п. у лабораторній практиці користуються методами посіву та пересіву. *Посівом, або інокуляцією*, називається внесення мікробного матеріалу в стерильне поживне середовище. *Пересів* – це перенесення вирощеної на поживному середовищі культури мікроорганізмів на інше стерильне поживне середовище.

Посів на щільні середовища. Посіви петлею на скошеному агаризованому середовищі роблять зигзагоподібним штрихом, вільно ковзаючи петлею по поверхні щільного середовища від одного краю пробірки (чашки Петрі) до іншого; або прямою рисою, для цього петлею проводять пряму лінію знизу догори посередині поверхні поживного середовища або суцільним посівом, розтираючи матеріал обережними круговими рухами по всій поверхні середовища.

Посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб: щільне поживне середовище у пробірках або колбах розплавляють у киплячій водяній бані, охолоджують до 48-50 °С і, дотримуючись правил стерильності, розливають рівним шаром товщиною 10-15 мм у стерильні чашки (стерильні, загорнуті у папір чашки Петрі, отримати у лаборанта). При цьому кришку чашки відкривати якнайменше. Верхню частину колби або пробірки з МПА при розливанні обпалити над полум'ям спиртівки. Для одержання рівномірного шару середовища чашки розмістити на горизонтальній поверхні і переміщувати по столу коловими рухами до застигання середовища.

Застигле середовище можна злегка підсушити в термостаті. Посів роблять скляним шпателем Дригальського або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних штрихів (метод виснажливого штриха).

3.3.1 Посів мікрофлори повітря

Седиментаційний метод (метод осадження Р. Коха). Як поживне середовище застосовують сусло-агар (СА), дріжджовий або м'ясо-пептонний агар (МПА). Одержати у лаборанта стерильні, загорнуті у папір чашки Петрі. Чашки Петрі з 10-15 см³ застиглого поживного середовища принести у досліджуване приміщення і відкрити. Кришки покласти одним кінцем на папір, у який були загорнуті чашки, а іншим – на край бортика відкритої чашки. Експозиція – 5, 10 або 15 хв залежно від забруднення повітря. Дослідник при цьому повинен знаходитися від чашок Петрі на відстані не ближче 2-3 метрів. Потім чашки Петрі закрити кришкою, позначити дослід маркером і помістити в термостат на 48 год (чашки з МПА витримувати при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, з сусло-агаром та іншими середовищами – при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). На наступному занятті підрахувати колонії бактерій і грибів, що вирости (окремо).

Седиментаційний метод Р. Коха – найбільш простий. Для посіву мікрофлори повітря застосовують також аспіраційний і фільтраційний методи.

При аспіраційному методі застосовуються прилади, за допомогою яких повітря прокачується та фільтрується. Потім адсорбовані на фільтрах приладу бактерії екстрагуються і висіваються на тверді поживні середовища.

До фільтраційних методів належить метод вловлювання бактерій повітря рідинами. При цьому певний об'єм повітря продувають через певний об'єм рідини (стерильна вода, буфер, рідке поживне середовище). По 1 або 0,1мл цієї рідини висівають у чашки Петрі на агаризоване поживне середовище.

У лабораторному звіті описати седиментаційний метод посіву мікрофлори повітря. Зазначити, у якому приміщенні проводився посів, час експозиції.

3.3.2 Посів мікрофлори води

При дослідженні води відкритих водойм, а також колодязів відбирають проби води на глибині 10-15 см від поверхні у стерильні флакони. Для відбору водопровідної води використовують стерильні склянки місткістю 500-1000 см³ з ватно-марлевими пробками. Перевозити проби води слід при температурі не вище 5 °С та досліджувати не пізніше як за 6 год після відбору проби.

Для посіву мікрофлори води необхідно використовувати стерильний посуд. Пробу води збовтати і 1 см³ розчину піпеткою вилити на дно чашки Петрі при цьому кришку відкривати якнайменше. Далі налити розтоплений на водяній бані МПА, який перемішують з водою обертаючими рухами чашки Петрі по поверхні столу. У результаті чого м'ясо-пептонний агар повинен рівномірно розподілитися по всьому дну чашки Петрі тонким шаром без пухирців повітря. Крім того, необхідно простежити, щоб МПА не потрапив на стінки чашки Петрі, оскільки для підрахунків кількості колоній таку чашку Петрі використовувати не можна. Після закінчення посіву закриті чашки Петрі поставити на горизонтальну поверхню для застигання МПА. Через годину після цього чашки Петрі перевернути догори дном, позначити дослід маркером і поставити в термостат при 20 °С для проростання. Розрахунки зробити через 7 діб.

Аналізуючи воду з різних водойм, особливо багатих органічними речовинами, необхідно перед висіванням її розвести у пропорції не менше ніж 1:1000. Для цього використовують ряд пробірок з 9-ма мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, їх нумерують. 1 мл досліджуваної води внести стерильною піпеткою у пробірку № 1, ретельно перемішати, продуваючи повітря, відібрати 1 мл речовини з пробірки № 1 і перенести у пробірку № 2. Після перемішування таку ж кількість речовини перенести з пробірки № 2 у пробірку № 3 (розведення 1:1000). Із пробірки № 3 висіяти по 0,05, 0,1 і 0,2 мл у чашки Петрі. Чашки підписати і поставити у термостат з 20°C.

У лабораторному звіті описати посів мікрофлори води. Зазначити де була відібрана проба води.

3.3.3 Посів мікрофлори ґрунту.

З огляду на різноманітність мікрофлори ґрунту її досліджують різними методами. Серед них: бактеріоскопічний, розроблений С. М. Виноградським, метод пластинок обростання за М. Г. Холодним. Кількісний облік мікроорганізмів методом підрахунку на твердих поживних середовищах, кількісно-якісний облік мікрофлори ґрунту за Д. М. Новогрудським, метод капілярів Б. В. Перфільєва і Д. Р. Габе, облік кількості бактерій у ґрунті за допомогою люмінесцентної мікроскопії за Д. Г. Зв'ягінцевим, облік бактерій в ризосфері за М. О. Красильниковим, облік ризосферної і кореневої мікрофлори методом К. З. Теппер та інші.

Дослідження мікрофлори ґрунту будь-яким методом дає надійні результати тільки тоді, коли правильно відібрано ґрунтові зразки. При дослідженні оранки знімають верхній двосантиметровий шар і відбирають з глибини всього орного шару. При вивченні мікрофлори ґрунтового профілю роблять ґрунтовий розріз і відбирають проби з генетичних горизонтів (знизу доверху).

Рекомендується використовувати стерильний бур, лопату та ніж. Відібрані зразки вміщують у стерильні скляні колби або в стерильні поліетиленові мішочки з етикетками, де позначено місце відбору зразка, горизонту тощо. Аналіз зразків необхідно проводити в той же день. Допускається витримування зразків у холодному приміщенні не більше двох діб. При висушуванні зразків кількість мікробів різко знижується.

Для одержання середньої проби ґрунту необхідно змішати окремі зразки, кількість яких залежить від рельєфу та площі, звідки їх відібрано. Рекомендується з площі 100 м² відбирати проби у трьох місцях, понад 100 м² – у п'яти, а з 1 га й більшої площі – у 15 місцях. Підготовлену середню пробу використовують для проведення аналізів, залежно від мети досліду використовують той чи інший метод дослідження.

Метод підрахунку на агарових пластинках. Цей метод за своєю точністю значно поступається перед методом С. М. Виноградського та дає тільки орієнтовні дані, переважно про кількість аеробних мікробів у ґрунті. Проте внаслідок простоти і доступності його дуже часто застосовують у навчальних мікробіологічних лабораторіях. Згідно з цим методом ґрунтову суспензію висівають на тверді поживні

середовища, вирощують на них колонії, підраховують та аналізують вирощені мікроорганізми.

Проведення роботи. Із зразка досліджуваного ґрунту відважують 1 г і роблять серію розведень у стерильній воді для одержання ґрунтової витяжки. Розведення готують так: у стерильну мірну колбу об'ємом 100 мл вносять 1 г ґрунту, додають 99 мл стерильної води і збовтують впродовж 3 хв. Отримали розведення 1:10. Потім відстоюють 1,5 хв. і роблять наступне розведення – відбирають з колби 1 мл суспензії ґрунту стерильною піпеткою, переносять її у пробірку і додають 9 мл дистильованої води. Отримали розведення 1: 100. Потім отримують розведення 1: 1000, 1:10000, 1: 100 000.

Для виготовлення кожного наступного розведення беруть окрему стерильну піпетку. У стерильні чашки Петрі стерильною піпеткою вносять 1 мл ґрунтової суспензії (наприклад, 1:100 000) і розподіляють рівномірно по дну. Розплавлене стерильне середовище (МПА, Сабуро) із пробірки виливають у чашку і, обережно похитуючи її, перемішують поживне середовище з ґрунтовою суспензією. З одного розведення готують 4-5 таких чашок.

Після застигання середовища для видалення крапель води з кришок чашки Петрі підсушують, позначають і ставлять у термостат при температурі 28-30 °С. Розрахунки зробити через 3-5 діб.

У лабораторному звіті описати посів мікрофлори ґрунту. Зазначити де була відібрана проба ґрунту.

3.3.4 Вирощування культур бактерій різних видів бродіння

Бродіння – еволюційно найдавніший та примітивний спосіб одержання енергії. Він характерний лише для прокариот. Найрозповсюдженішими типами бродіння є спиртове, молочнокисле, маслянокисле, оцтовокисле та бродіння пектинових речовин.

У лабораторному звіті описати методику вирощування бактерій розглянутих видів бродіння. Вказати мікроорганізми, які викликають ці процеси.

3.3.4.1 Вирощування культури бактерій спиртового бродіння

Збудники спиртового бродіння широко розповсюджені в природі особливо в середовищах з високим вмістом вуглеводів. Спиртове бродіння спричиняється дріжджами (роди *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*), а також окремими представниками бактерій (*Sarcina ventriculi*, *Zimomonas mobilis*, *Erwinia amylovora*) і муковорими грибами. Проте основними збудниками цього процесу є дріжджові гриби - сахароміцети (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. vini*, *Schizosaccharomyces rombe*). Вони витримують високі концентрації спирту в середовищі до 14%, утворюють менше побічних продуктів під час бродіння. Це одноклітинні організми округлої або овальної форми, факультативні анаероби, розмножуються нестатевим і статевим шляхом. Дріжджі широко поширені в природі. Описано близько 200 видів сахароміцетів. Найважливіше значення для людини має *Saccharomyces cerevisiae*.

Найхарактернішою ознакою всіх видів дріжджів цього роду є їхня здатність до активного зброджування моно- і дисахаридів з утворенням етилового спирту і CO_2 за такою схемою:



Оптимальна температура 25-30°C, рН=4-6. Елективність умов полягає в високій концентрації цукру (до 70%), низькому значенні рН середовища та спирту, який виділяється в процесі бродіння.

Закладання досліду. У колбу об'ємом 200-250 мл налити 50 мл 10% розчину цукру і додати 10г дріжджів. Колбу закрити ватним тампоном. На наступному занятті провести реакцію на виявлення спирту.

3.3.4.2 Вирощування культури бактерій молочнокислого бродіння

Молочнокислі бактерії поширені в природі дуже широко, їх можна знайти скрізь – у повітрі й ґрунті, у молоці й на поверхні овочів і фруктів. Вони грампозитивні, неспорозні, переважно нерухливі анаероби або мікроаерофіли. Розрізняють кулеподібні та паличкоподібні форми. В залежності від продуктів, які нагромаджуються під час бродіння, всі молочнокислі бактерії поділяють на дві групи – *типові або гомоферментативні*, що утворюють при зброджуванні цукрів як основний продукт молочну кислоту ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CHONCOOH}$), і *гетероферментативні або нетипові*, які в процесі зброджування цукрів, крім молочної кислоти, утворюють значну кількість інших речовин: оцтову, янтарну кислоти, спирт, ароматичні речовини, вуглекислий газ.

Кулеподібні (кокові) форми.

Гомоферментативні молочнокислі стрептококки. Типовий представник цієї групи *молочнокислий стрептококк (Streptococcus lactis)*. Його клітини мають овальну форму, які у молодих культур розташовані у вигляді коротких ланцюжків, а у старих – попарно. Молочнокислий стрептокок знаходиться в усіх кисломолочних продуктах і складає основу мікрофлори простокваш. В процесі життєдіяльності бактерій накопичується до 1% молочної кислоти, кислотність середовища підвищується до 120°Т (кислотність вимірюється в градусах Тернера. Градус Тернера – це кількість мілілітрів 0,1-нормального розчину лугу, необхідної для нейтралізації кислоти в 100 мілілітрах молока. Чим вища кислотність, тим вище ймовірність згортання, при 26 °Т молоко може згорнутися, при 28 ° Т – обов'язково згорнеться). При оптимальній температурі 30-35°C *Str. lactis* сквашує молоко протягом 10-12 годин. *Str. lactis* має антимікробну дію, утворює поліпептидні антибіотики низини. Вони стійкі до високих температур та затримують ріст багатьох грампозитивних мікробів в тому числі і патогенних (*Mycobacterium tuberculosis*).

Вершковий стрептокок *Str. cremoris* утворює довгі ланцюжки. Оптимальна температура 25-30°C. При зброджуванні молока згусток набуває сметаноподібну консистенцію. Деякі штами *Str. cremoris* можуть виробляти антибіотик диплококцин.

Гетероферментативні молочнокислі стрептококи.

Ароматоутворюючі стрептококи: *Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*, *Str. diacetylactis* надають кисломолочним продуктам приємного смаку і запаху. Температура росту $\approx 30^{\circ}\text{C}$.

Серед гетероферментативних молочнокислих стрептококів є термофіли (*Str. thermophilus*), які розвиваються при 45°C . Їх використовують при виготовленні сирів (швейцарського, радянського).

До гетероферментативних молочнокислих стрептококів відноситься також рід *Leiconostoc*. Бактерії зброджують сахара, надають специфічний запах кисломолочним продуктам.

Паличкоподібні молочнокислі бактерії.

Гомоферментативні термофільні молочнокислі бактерії. Вони розвиваються при $t=40-45^{\circ}\text{C}$, нижче 15°C їх ріст зупиняється. Під час бродіння сахарів утворюється до 3,5% молочної кислоти, кислотність середовища досягає $300-400^{\circ}$ Тернера. Бактерії мають вигляд довгих паличок, які розташовані поодинокі або у вигляді ланцюжків. На твердому поживному середовищі утворюють розгалуження, які нагадують корені. Представники:

- болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*) виділяють з південних простокваш;
- ацидофільна (*Lactobacillus acidophilum*) – із вмісту кишковика;
- сирна (*Lactobac. helveticum*) – з сирів.

Ацидофільну паличку використовують для приготування ацидофіліну, який має лікувальну дію при шлунково-кишкових хворобах.

Мезофільні бактерії розвиваються при $t=30^{\circ}\text{C}$ і розташовані ланцюжком, вони утворюють менше продуктів життєдіяльності, кислотність продукту не перевищує 180°T . Виділяють два види стрептобактерій: *Lactobac. casei*, який приймає участь в дозріванні сирів, та *Lactobac. plantarum* - стимулює процеси силосування та квашення овочів. Молоко згортають повільно.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії. Бета-бактерії зустрічаються на рослинах, зброджують цукри з утворенням великої кількості спирту та вуглекислого газу. Молоко не доводять до згортання, при цьому утворюється мало молочної кислоти і багато летких кислот, які надають певний аромат сирам, кефіру. Характерним представником бета-бактерій є *Lactobacillus brevis*, штами якого зброджують гексози, деякі дицукри, арабінозу та ксилозу.

Кефірні грибки або кефірні зерна (*Toxula kephir*). Їх використовують для виготовлення кефіру. До складу кефірних зерен входять молочнокислі стрептококи, ароматують коки, молочнокислі палички та молочнокислі дріжджі.

Закладання досліду. Добрим середовищем живлення для одержання культури молочнокислих бактерій є молоко. Для одержання бактерій молока свіже молоко залишають при кімнатній температурі (в термостаті при температурі $28-30^{\circ}\text{C}$). Молочнокислі бактерії викликають процес молочнокислого бродіння. Оптимальна температура розвитку молочнокислих бактерій неоднакова. Для молочнокислого стрептококу (*Streptococcus Lactis*) –

30-35°C; ацидофільної палички (*Lactobacter*, *Acidophilum*) – 40°C, термофільного стрептококу (*Streptococcus thermophilus*) – 40-45°C.

3.3.4.3 Вирощування культури бактерій маслянокислого бродіння

Маслянокисле бродіння – це складний процес перетворення вуглеводів до масляної кислоти та інших речовин:



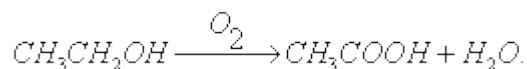
Даний процес характерний для групи анаеробних спороносних бактерій. Представником збудників маслянокислого бродіння є *Clostridium pasteurianum*.

Закладання дослідю. Розвиток маслянокислих бактерій можна одержати на картопляному середовищі. Для цього чисту неочищену бульбу картоплі нарізати дрібними шматочками, помістити у колбу на 1/3 об'єму, додати 1 г крейди, залити майже доверху водопровідною водою, закрити ваткою пробкою, поставити на водяну баню і витримати 10 хв. при температурі 80°C. При цій температурі гинуть всі безспоріві форми мікроорганізмів. Після пастеризації пробірки помістити в термостат із температурою 30°C на 2-3 доби. Через 2-3 доби в рідині можна виявити бактерії маслянокислого бродіння, серед яких переважає *Clostridium pasteurianum*.

3.3.4.4 Вирощування культури бактерій оцтовокислого бродіння

Оцтовокисле бродіння має аеробний характер, на відміну від інших видів бродіння. Він притаманний групі бактерій, які є облигатними аеробами. Будь-яке середовище, що містить невелику кількість спирту і не ізольоване від атмосфери, є сприятливим субстратом для розвитку оцтовокислих бактерій, які потрапляють до нього з повітря. Представниками оцтовокислих бактерій є *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacterium kützingianum* тощо.

Оцтовокислі бактерії здатні утворювати органічні кислоти (оцтову, глюконову, пропіонову) шляхом неповного окиснення цукрів і спиртів. Наприклад:



Оцтовокислі бактерії – це безспоріві, грамнегативні, малорухливі палички з перитрихальним (рід *Acetobacter*) або полярним (рід *Gluconobacter*) типом джгутикування. Оцтовокислі бактерії розвиваються лише в аеробних умовах. Як субстрат для окиснення вони використовують етанол, який окиснюють до оцтової кислоти, а також інші спирти і цукри. Деякі оцтовокислі бактерії (група *peroxydans*) здатні нагромаджувати оцтову кислоту, як проміжний продукт, який підлягає подальшому окисненню. Інші бактерії (група *suboxydans*) нагромаджують оцтову кислоту як кінцевий продукт. До першої групи належить *Gluconobacter oxydans*, до другої - *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum*, *A. xylinum* окиснюють оцтову кислоту дуже повільно.

Культури оцтовокислих бактерій відрізняються одна від одної розмірами

клітин, характером утворення плівки та її хімічним складом, стійкістю до спирту і оцтової кислоти (рис. 15). Оптимальна температура для їхнього розвитку лежить у межах 20-35°C. Для одержання нагромаджувальної культури оцтовокислих бактерій використовують слабоалкогольні напої (пиво, сухе вино). Розвитку оцтовокислих бактерій сприяє наявність у середовищі спирту і утворення оцтової кислоти, яка знижує рН середовища і пригнічує ріст інших мікроорганізмів.

Закладання досліду. Для вирощування оцтовокислих бактерій у конічну колбу налити тонкий шар непастерізованого пива (2 см). Товщина шару пива має велике значення, оскільки для оцтовокислих бактерій потрібно створити аеробні умови. До пива додати 10% від його об'єму – 6% оцтової кислоти і 0,5-1 см³ етилового спирту, закрити колбу пробкою і поставити в термостат при 30-35 °С на декілька діб. За 4-5 днів на поверхні пива утворюється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій.

Беруть свіже непастерізоване пиво і розливають його в колби шаром заввишки 2 см. До пива додають - і 0,5 -1 мл етилового спирту. Після цього колби закривають ватними пробками і ставлять у термостат при температурі 25-30° С.. Якщо плівка суха, зморшкувата - *Acetobacter pasteurianum*, гладенька і слизиста - *Acetobacter aceti*, а якщо плівка гладенька слизиста і піднімається по стінці колби вгору - *Acetobacter kutzingianum*.

За зовнішнім виглядом плівки можна припустити, який вид оцтовокислих бактерій переважає:

- *Acetobacter aceti* – коротка нерухома паличкоподібна бактерія, що не утворює спор. Її клітини утворюють ланцюжки. Під дією йоду клітини набувають жовтого кольору. При інтенсивному розмноженні бактерії утворюють слизову плівку на поверхні пива, яка не заповзає на стінки колби;
- *Acetobacter pasteurianum* – це бактерії, які морфологічно близькі до попередніх, але під дією йоду забарвлюються в синій колір. Вони утворюють суху зморшкувату плівку;
- *Acetobacter xylinum* – це бактерії, які на середовищі утворюють грубу зморшкувату товсту плівку. Під дією йоду клітини набувають синього кольору. Оцтову кислоту, що утворюється, окиснюють до вуглекислого газу і води. Ці бактерії є компонентом "чайного гриба", який вирощують у побуті для одержання охолоджувального напою;
- *Acetobacterium kutzingianum* – це бактерії, які утворюють плівку, що заповзає на стінки колби. Під дією йоду клітини бактерій забарвлюються в синій колір.

3.3.4.5 Вирощування культури бактерій бродіння пектинових речовин

Бродіння пектинових речовин. Пектинові речовини складають основу серединних пластинок, що склеюють клітини в тканинах. Розрізняють 3 типи пектинових речовин:

- пектинова кислота – ланцюжки з 5-100 залишків галактуранової

- кислоти, що утворюються при окисненні гексоз;
- пектин – ланцюжки галактуронової кислоти, деякі карбоксильні групи якої метильовані;
 - протопектин – декілька ланцюжків пектинової кислоти, які сполучені кальцієм.

Процес руйнування пектинових речовин відбувається в результаті ферментативного гідролізу, що спричиняється бактеріями, грибами та актиноміцетами. Вуглеводи, що утворюються, в анаеробних умовах зброджуються за типом маслянокислого бродіння.

Пектинове бродіння лежить в основі промислового одержання волокна із технічних культур – льону, конопель, джгута, кенафа. Найактивніше бродіння пектинових речовин спричиняють бактерії роду *Clostridium*.

Закладання досліду. Для вирощування пектиноруйнуючих бактерій використовують лляне середовище. 10-20 стебел льону довжиною 5-7 см зв'язати нитками у маленькі снопики. Покласти їх у велику колбу, залити водою і кип'ятити 10-15 хв. (для видалення екстрактивних речовин, що можуть бути джерелом Карбону для супутніх маслянокислих бактерій). Воду злити, снопики залити новою порцією води, закрити колбу ватною пробкою і поставити у термостат при 30-35 °С.

Через 4-5 діб у колбі почнеться процес пектинового бродіння, рідина помутніє і почне пінитись. Гази, що виділяються, піднімають снопики на поверхню середовища.

3.4 Висновок: Для посіву мікрофлори на лабораторній роботі застосовувались наступні поживні середовища... Провели посів мікрофлори повітря у ... приміщенні та мікрофлори проби води відібраної з ... і ґрунту. Посів мікрофлори повітря виконували ... методом. Виростили бактерії...бродіння. Практична цінність цих методів бродіння полягає у

Контрольні питання

1. Для яких цілей використовують поживні середовища?
2. На які групи поділяються поживні середовища?
3. Використання селективних і диференційно-діагностичних середовищ.
4. Що таке агар і желатин?
5. Що таке стерилізація і пастеризація?
6. Чому технологу потрібно знати санітарний стан повітря?
7. Що таке посів та пересів мікроорганізмів?
8. У чому суть седиментаційного методу посіву мікроорганізмів?
9. Які види бродіння ви знаєте?
10. Яка практична цінність процесів бродіння.

Лабораторна робота № 4

Аналіз посівів мікрофлори повітря, води та ґрунту. Перетворення мікроорганізмами сполук Карбону (дослідження різних видів бродіння)

4.1 Мета: оволодіти простими методами аналізу посівів мікрофлори повітря, води та ґрунту; розглянути під мікроскопом морфологію мікроорганізмів, які визивають певні види бродіння та навчитись за морфологічними ознаками та за допомогою характерних реакцій визначати вид бродіння.

4.2 Короткі теоретичні відомості

Повітря є несприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів, тому що в ньому немає органічних речовин. Мікрофлора повітря непостійна. У повітрі міститься значна кількість спор і вегетативних клітин мікроорганізмів. У ньому можна виявити дріжджі, міцеліальні гриби, спорові та безспорові, іноді патогенні бактерії. Мікроорганізми потрапляють у повітря із ґрунту, води, з поверхні рослин, з виділеннями хворих людей. у повітря попадають мікроорганізми, й можливе поширення збудників інфекційних захворювань. Повітря може бути джерелом забруднення мікроорганізмами харчових продуктів.

Вода є природним середовищем існування багатьох видів мікроорганізмів, що складають постійну водну мікрофлору, здатну жити і розмножуватися у воді, брати участь у перетвореннях азотвмісних речовин, сполук сірки, заліза, самоочищенні водойм.

Випадкова мікрофлора потрапляє у водойми з ґрунту, з талою або дощовою водою, з повітря з осідаючим пилом, з викидами промислових підприємств і стічних вод. Основним джерелом забруднення відкритих водойм мікроорганізмами, які можуть бути і патогенними, є стічні води.

Питну воду ретельно очищають і знезаражують. Оцінка якості питної води здійснюється комплексно за органолептичними, гельмінтологічними, фізико-хімічними і мікробіологічними показниками.

Виявлення у воді патогенних мікроорганізмів свідчить про її непридатність до вживання, тому головна вимога до якості води – відсутність патогенних мікроорганізмів.

У процесах ґрунтоутворення мікроорганізмам належить надзвичайно важлива роль. Адже під впливом біологічного чинника виникає основна властивість ґрунту, яка відрізняє його від материнської породи – родючість.

Оскільки ґрунт є найкращим середовищем для життя переважної більшості мікроорганізмів, мікрофлора ґрунту дуже різноманітна. У її складі: азотфіксуючі, нітрифікуючі та денітрифікуючі бактерії, целюлозорозкладачі, різні пігментні мікроорганізми, сірко- і залізобактерії, мікоплазми, актиноміцети, гриби, водорості, найпростіші тощо. В ґрунті живуть аеробні, анаеробні, автотрофні, гетеротрофні, психрофільні, термофільні, галофільні та інші мікроорганізми.

4.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: чашки Петрі засіяні мікрофлорою повітря та води на минулому лабораторному занятті; колби з вирощеними бактеріями різних типів бродіння приготовані на минулому занятті, мікроскопи, імерсійна олія, розчин для очистки об'єктиву мікроскопа, тканина для протирання лінз об'єктиву; фільтрувальний папір; предметні скельця плоскі і з лункою; покривні скельця; спиртівки; сірники; метиленова синь; фуксин; скляні мостики; кристалізатор; 10% розчину NaOH; кристалічний йод; розчин йоду у калій йодиду; 5% ферум (III) хлориду; 10% розчин соди; етиловий спирт; концентрована сірчана кислота.

4.3.1 Аналіз результатів посіву мікрофлори повітря

Найбільш простий спосіб визначення обнасіненості повітря мікроорганізмами – седиментаційний (чашковий) метод був розглянути на минулому лабораторному занятті.

Кількісний аналіз результатів посіву.

Підрахувати кількість колоній в чашці Петрі і розрахувати кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря.

Для проведення підрахунку колоній мікроорганізмів чашку Петрі з нижнього боку поділити на кілька секторів і в кожному підрахувати колонії окремо, а потім цифри підсумувати. Дрібні колонії підрахувати за допомогою лупи.

Підрахунок кількості мікроорганізмів в 1 м³ повітря виконати користуючись формулою Омелянського:

$$x = \frac{A \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{Bt},$$

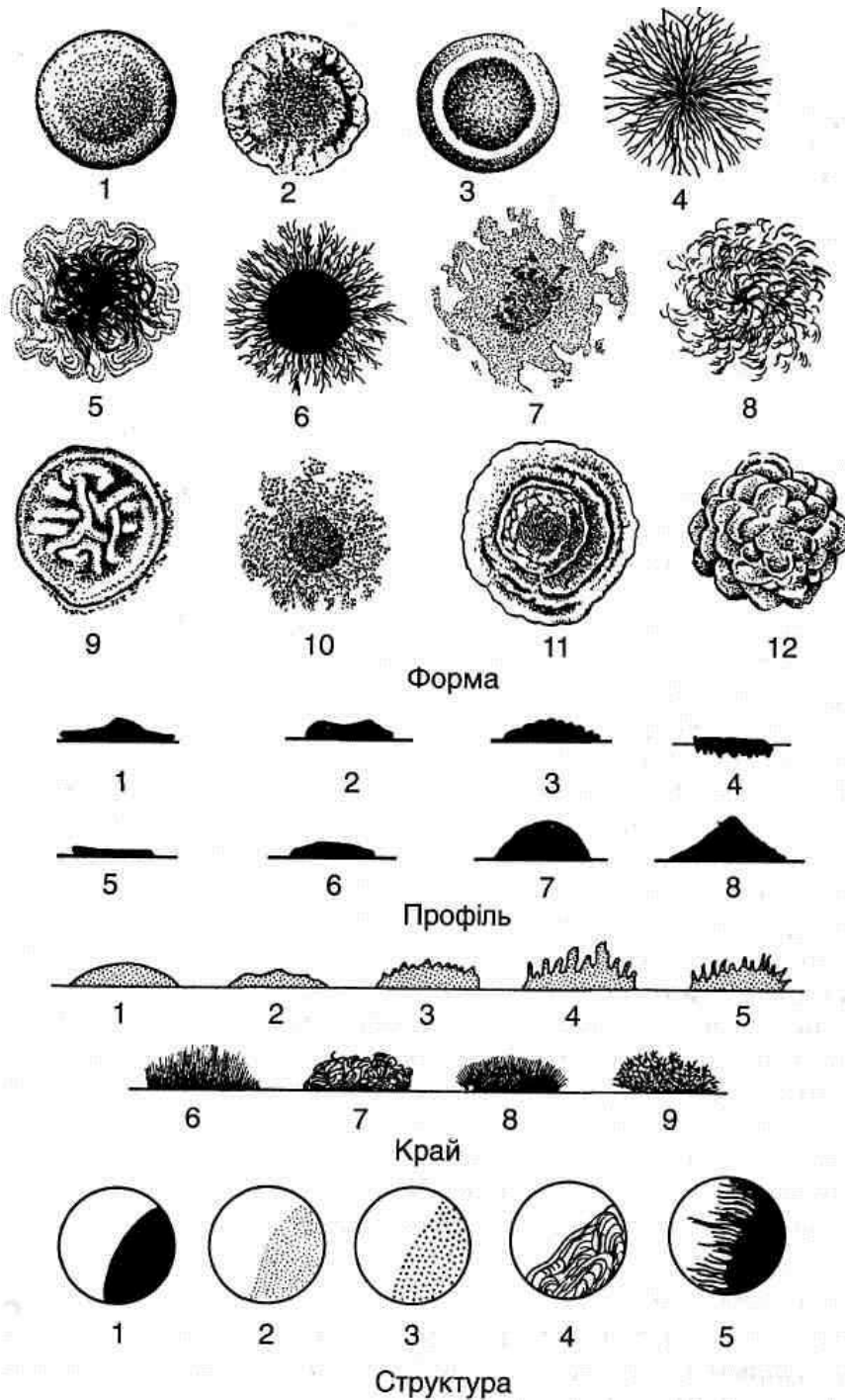
де x – кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря; A – кількість колоній, що вирости в чашці; B – площа поверхні чашки, см² ($S = \pi r = 78,5$ см²); t – час експозиції, хв; 100-5-100 – перерахунок на 1 м³ повітря (на чашку площею 100 см² протягом 5 хв осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 0,01 м³ повітря).

Критерій для оцінки повітря житлових приміщень наведені в таблиці 4.1

Таблиця 4.1 – Критерій для оцінки повітря житлових приміщень (в 1 м³ повітря)

Повітря	Літній режим	Зимовий режим
	Мікроорганізмів	Мікроорганізмів
Чисте	Менше 1500	Менше 4500
Забруднене	Більше 2500	Більше 7000

Після кількісного підрахунку зробити якісний аналіз мікрофлори повітря.



Форма: 1 – округла; 2 – округла з фестончастим краєм; 3 – округла з валиком; 4, 5 – ризоїдна; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – ниткоподібна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна.

Профіль: 1 – зігнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбкуватий; 4 – врослий у субстрат; 5 – плескатий; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний.

Край: 1 – гладенький; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – галузистий.

Структура: 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струминчаста; 5 – волокниста

Рисунок 4.1 – Вигляд колоній мікроорганізмів

Якісний аналіз

Описати окремі колонії мікроорганізмів. Для цього обрати одну з них, покласти чашку Петрі дном догори на столик мікроскопа і розглянути при малому збільшенні. Описати колонію за такими ознаками (рисунок 4.1):

- форма колонії (округла, овальна, ниркоподібна, сплющена);
- колір колонії;
- характер краю колонії (рівний, хвилястий, складчастий, променистий, зубчастий тощо);
- блиск колонії (блискуча, матова, прозора);
- центр колонії (є або відсутній);
- поверхня колонії (плоска, опукла, увігнута, складчаста, зерниста).

З описаної колонії, приготувати препарати: "роздавлена крапля", "висяча крапля" та фіксований зафарбований мазок.

Розглядаючи препарати, відмітити форму клітин, їх рухливість, наявність або відсутність спор. Дослідження повторити і на інших колоніях. Результати роботи занотувати в лабораторний журнал у вигляді таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Культуральні властивості мікроорганізмів повітря, виділених методом осадження за Р. Кохом

Ознаки колонії	№ колонії		
	1	2	3
Розмір			
Форма			
Колір			
Поверхня			
Профіль			
Краї			
Консистенція			

4.3.2 Аналіз результатів посіву мікрофлори води

Для санітарно-мікробіологічного оцінювання води визначають **мікробне число, колі індекс** та **колі-титр**. **Мікробне число** (кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів – МАФAM), тобто кількість живих мікроорганізмів в 1 см³, індекс бактерій групи кишкової палички (БГКП). **Індекс БГКП або колі-індекс** – мінімальна кількість кишкових паличок в 1000 см³ води. Бактерії групи кишкової палички належать до санітарно-показових індикаторних мікроорганізмів, які використовуються при оцінюванні фекального забруднення водних об'єктів. **Колі-титр** – найменший об'єм води (в мл) або щільної речовини (в г), в якому виявляють одну бактерію групи кишкової палички. Визначають бродильним методом або

методом мембранних фільтрів.

Для питної води згідно з чинним Держстандартом індекс БГКП – не більш як 3 КУО/см³ (КУО – колоніє утворююча одиниця – кількість мікроорганізмів у 1 см³); загальна кількість бактерій в 1 см³ води (мікробне число, кількість МАФАМ) – не більш як 100; колі-титр має бути не менше 300.

Для інших водних джерел норми не встановлені, але вважається, що артезіанська вода повинна мати загальну кількість бактерій в 1 см³ води не більш як 100, води колодязів і джерел – 1000, воду відкритих водоймищ можна використовувати в харчових виробництвах лише після очищення.

Вода колодязів може містити не більше 10 клітин кишкових паличок в 1 дм³. Колодязі не знезаражуються, а можливість біологічної контамінації (забруднення) дуже велика: з опадами, просочування забруднених зливових і ґрунтових вод. Тому вода в колодязях має постійно перебувати під контролем.

Кількісний аналіз результатів посіву.

Визначення мікробного числа. Колонії, що виростили як на поверхні, так і в глибині агару, підраховують. Оцінюють тільки ті посіви, при яких на чашках Петрі виростило від 30 до 300 колоній.

Результати підрахунку колоній у кожній чашці виражають у колонієутворюючих одиницях на 1 см³ аналізованої води. Порівнюють отримані результати з нормативними. За наявності в 1 см³ 0-100 колоній мікроорганізмів вода вважається чистою, 100-000 – сумнівної якості, понад 1000 – непридатною до використання у виробництві й без попередньої обробки для вживання людиною.

4.3.3 Аналіз результатів посіву мікрофлори ґрунту

Кількісний аналіз результатів посіву.

Підраховують (без відкривання кришки чашки) кількість колоній, що виростили на щільному середовищі у чашках Петрі. Найкращі результати одержуються при утворенні на чашках 20-50 колоній бактерій і 20-30 колоній грибів. По закінченні підрахунків колоній визначають середнє з 4-5 чашок і множать на розведення, взяте для аналізу. У такий спосіб одержують кількість аеробних мікробів у 1 г сирого ґрунту. Для точних дослідів кількість мікроорганізмів визначається в 1 г повітряно-сухого, а найточніших – абсолютно сухого ґрунту. Для таких розрахунків треба водночас визначати вологість ґрунтової проби.

Кількість мікроорганізмів на 1 г повітряно-сухого ґрунту розраховують за такою формулою:

$$A = \frac{B \cdot V \cdot G}{D},$$

де A – кількість клітин мікробів у 1 г повітряно-сухого ґрунту; B – середнє число колоній мікроорганізмів у чашці Петрі; V – відповідне розведення ґрунтової витяжки; G – кількість крапель у 1 мл рідини в піпетці; D – наважка ґрунту, взята для аналізу.

Результати досліджень заносять у таблицю 4.3.

Таблиця 4.3 – Кількість мікроорганізмів у ґрунті

Поживне середовище	Кількість колоній				Середнє	Розведення	Кількість мікроорганізмів в 1г сирого ґрунту
	Повторність						
	1	2	3	4			

Після кількісного підрахунку зробити якісний аналіз мікрофлори ґрунту.

Якісний аналіз.

Розглянути найбільш характерні колонії та описати їх культуральні властивості. Результати внести до таблиці 4.4.

Виготовити препарат мазок мікроорганізмів з колоній, культуральні властивості яких описували. Провести мікроскопування.

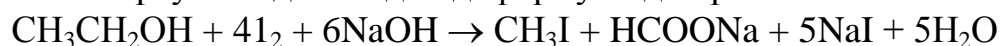
Таблиця 4.4 – Культуральні властивості мікроорганізмів ґрунту

Ознаки колонії	№ колонії		
	1	2	3
Форма			
Розмір			
Колір			
Поверхня			
Профіль			
Краї			
Консистенція			

4.3.4 Дослідження різних видів бродіння

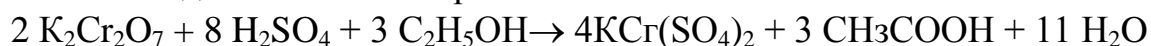
4.3.4.1 Якісні реакції на виявлення спирту при спиртовому бродінні

1) У пробірку налити 10 см³ рідини культури спиртових бактерій, додати 1-2 см³ 10% розчину NaOH і підігріти на спиртівці, не доводячи до кипіння. Потім вкинути декілька кристаликів йоду і продовжити нагрівання. При наявності спирту випадає осад йодоформу згідно рівняння:



Йодоформ можна визначити за характерним запахом.

2) До 1-2 см³ рідини культури спиртових бактерій додати 1-2 см³ концентрованої сірчаної кислоти і краплями 1%-ий розчин калію діхромату доти, доки оранжеве забарвлення цього реактиву не перейде в синьо-зелене за рахунок взаємодії з етанолом за рівнянням:



Розглянути під мікроскопом живий препарат дріжджів.

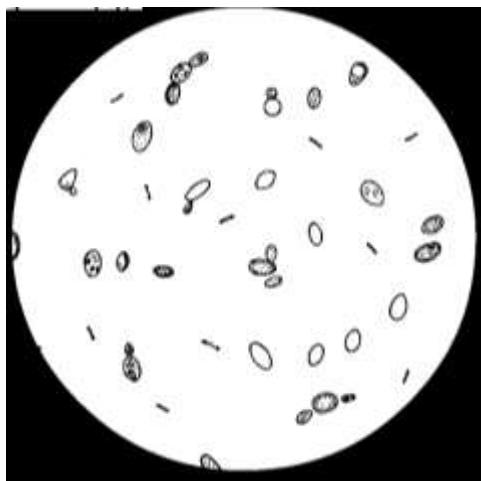
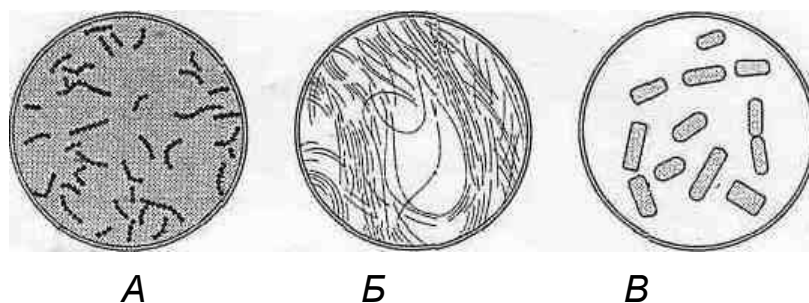


Рисунок 4.2 – Препарат живих клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.4.2 Дослідження культури бактерій молочнокислого бродіння

Приготувати фіксований зафарбований препарат культури бактерій молочнокислого бродіння, використавши кисле молоко, кефір, розсіл квашеної капусти або огірків. Розглянути фіксовані мікроорганізми через імерсійну систему мікроскопа (рисунок 4.3). Результати досліджень занотувати в лабораторний журнал.



A – молочний стрептокок (*Streptococcus lactis*); *Б* – болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*); *В* – ооспора молочної цвілі (*Oidium lactis*)

Рисунок 4.3 – Бактерії молочнокислого бродіння

4.3.4.3 Дослідження культури бактерій маслянокислого бродіння

Краплину рідини культури маслянокислих бактерій розмістити на предметне скло і додати до неї краплину йоду в калій йодиді. Йод зафарбовує крохмальоподібну речовину – гранульозу – мікроорганізмів. Це допомагає розпізнати мікроорганізми. Спори ж бактерій на препараті не зафарбовані.

Провести якісну реакцію на масляну кислоту, використовуючи

культуральну рідину. Для цього до 5 см³ рідини додати 2 см³ 5% ферум (III) хлориду. При нагріванні утворюється ферум(III)маслянокислий коричневого кольору.

Результати досліджень занотувати в лабораторний журнал.

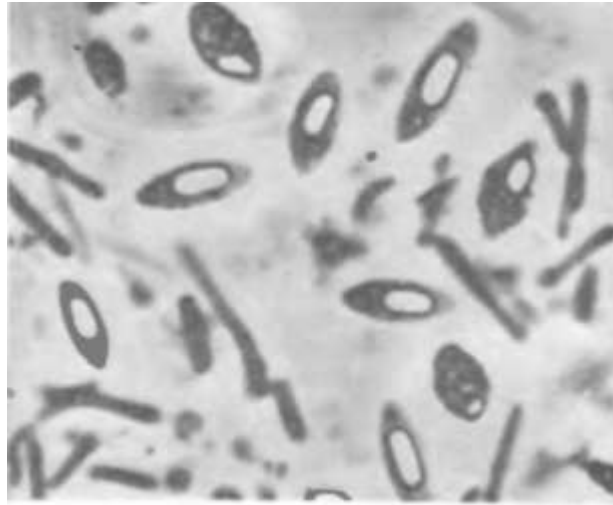


Рисунок 4.4 – Клітини Clostridium pasterianum зі спорами

4.3.4.4. Дослідження культури бактерій оцтовокислого бродіння

Розглянути колбу з культурою оцтовокислих бактерій, описати характер плівки, що утворилася. Виготовити прижиттєві та фіксовані мікропрепарати бактерій, розглянути їх через імерсійну систему мікроскопа (рисунок 4.5).

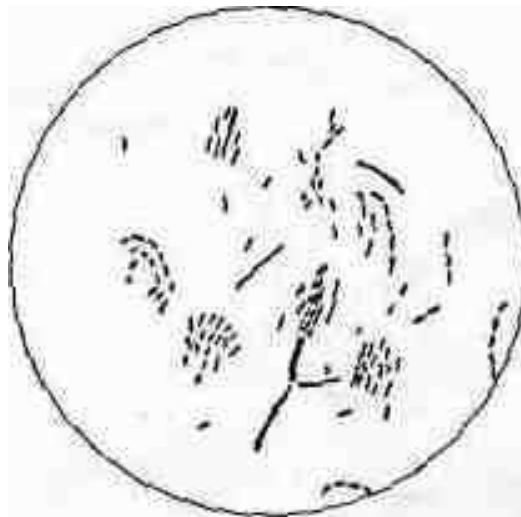


Рисунок 4.5 – Оцтовокислі бактерії

Провести якісні реакції на ацетатну кислоту.

1) В пробірку налити 5 см³ культуральної рідини, нейтралізувати її 10% розчином соди і додати невелику кількість розчину ферум (III) хлориду (довільної концентрації). Суміш нагріти. При наявності ацетатної кислоти з'явиться червоне забарвлення, внаслідок утворення ферум(III) ацетату і відчуватиметься запах ананасу.

2) До 2-3 мл культуральної рідини додати 0,5 см³ етилового спирту і 1-2 см³ концентрованої сірчаної кислоти. Під час нагрівання виникає запах оцтовоетилового ефіру (грушова есенція). Реакція відбувається за таким рівнянням: $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O}$

Результати досліджень занотувати в лабораторний журнал.

4.3.4.5 Дослідження культури бактерій бродіння пектинових речовин

Для вивчення морфології бактерій пектинового бродіння приготувати прижиттєві препарати. Снопик витягнути з колби, видавити краплину рідини на предметне скло, додати краплину йоду в калій йодиді, накрити покривним склом і розглянути під мікроскопом бактеріальні клітини зі спорами на кінцях. Бактеріальні клітини мають вигляд довгих паличок (рисунок 4.6). Під дією йоду клітини набувають синього забарвлення.

Результати досліджень занотувати в лабораторний журнал.

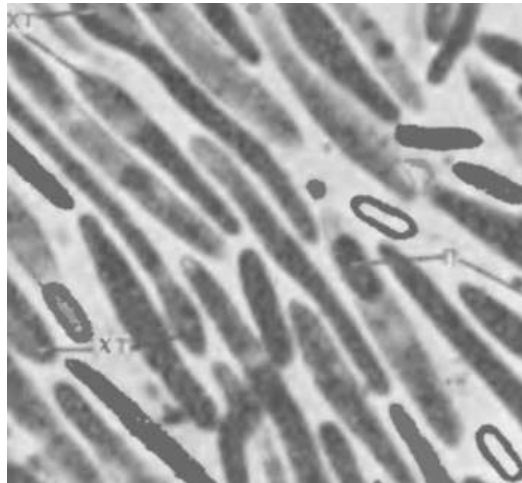


Рисунок 4.6 – Бактерії бродіння пектинових речовин

4.4 Висновки

- порівнявши отримані результати з нормативом оцінки повітря та води зробити висновок про чистоту повітря в дослідженому приміщенні та чистоту проаналізованих проб води;
- на основі проведених досліджень вказати характерні морфологічні ознаки мікроорганізмів та характерні реакції для визначення кожного з вивчених типів бродіння

Контрольні питання

1. Джерела забруднення повітря мікроорганізмами.
2. Чому повітря є несприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів?
3. Що таке КУО?
4. У чому суть розрахунку за Омелянським?

5. Навіщо технологам потрібно знати умови навколишнього середовища?
6. Чому треба визначати мікробіологічні показники води?
7. Звідки у воду попадають мікроорганізми?
8. Чому у воді не допускається наявність патогенних мікроорганізмів?
9. Скільки КУО/см³ допускається у воді питній, колодязній, артезіанській?
10. Дайте визначення терміну колі-індекс.

Лабораторна робота № 5

Виділення чистих культур мікроорганізмів

5.1 Мета: виділити чисту культуру *Bacillus subtilis*.

5.2 Короткі теоретичні відомості

Фізіологію, біохімічні властивості, цикли розвитку мікроорганізмів досліджують, як правило, при роботі з чистими культурами. Чистою культурою називають таку культуру, яка містить мікроорганізми одного виду. Вміння виділити мікроорганізми одного виду зі змішаної популяції, існуючої в природі, і підтримувати чистоту культури – необхідна умова роботи з мікроорганізмами.

Виділення чистої культури зазвичай включає три етапи: отримання накопичувальної культури; виділення чистої культури; визначення чистоти виділеної культури.

Отримання накопичувальної культури

Накопичувальної називають таку культуру, в якій переважають представники однієї фізіологічної групи або навіть одного виду мікроорганізмів. Метод накопичувальних культур був введений в практику мікробіологічних досліджень С. Н. Виноградським і М. Бейерінком. Сутність його полягає у створенні елективних, тобто вибіркових умов, які забезпечують переважний розвиток бажаних мікроорганізмів або групи мікроорганізмів із змішаної популяції.

При створенні елективних умов необхідно знати фізіологію або чітко представляти ті особливості, якими повинні володіти мікроорганізми, які виділяються. Елективні умови створюють найчастіше, підбираючи відповідні середовища, оскільки різні мікроорганізми для свого розвитку пред'являють неоднакові вимоги до джерел харчування. Наприклад, мікроорганізми, здатні фіксувати молекулярний азот, можуть рости в середовищі, зі складу якого виключені зв'язані форми азоту. Якщо внести в таке середовище ґрунт, то з великого розмаїття наявних у ньому мікроорганізмів в першу чергу будуть розвиватися азотфіксатори. Такі специфічні поживні середовища, що задовольняють потреби переважно однієї групи мікроорганізмів, носять назву елективних. В зарубіжній літературі більшого поширення набули терміни «накопичувальні» або «селективні» середовища.

Накопичувальні культури мікроорганізмів, що володіють високою вимогливістю до складу поживних середовищ, отримують інакше. При їх

виділенні використовується неоднакова чутливість клітин змішаної популяції до продуктів обміну речовин, що накопичуються в середовищі. Прикладом можуть служити молочнокислі бактерії, для накопичення яких використовують солодове сусло без крейди, тобто середовище, яке початково не є елективним. Після внесення природного матеріалу, що містить молочнокислі бактерії, в середовищі спочатку поряд з молочнокислими бактеріями добре розвиваються представники родів *Enterobacter* і *Escherichia*. Однак в міру накопичення в середовищі молочної кислоти і етилового спирту, утвореного гетероферментативними видами, умови для розвитку представники родів *Enterobacter* і *Escherichia* поступово погіршуються, тоді як молочнокислі бактерії, яким властива висока кислото-і спиртостійкість, продовжують рости. Таким чином, в результаті розвитку молочнокислих бактерій середовище набуває необхідну ступінь елективності, що й забезпечує отримання накопичувальної культури цих бактерій.

Іноді при виділенні мікроорганізмів з природних популяцій в середу включають антибіотики, які відрізняються специфічністю дії і дозволяють вибірково придушити зростання певної групи мікроорганізмів.

При створенні елективних умов слід враховувати неоднакове ставлення різних мікроорганізмів до аерації, температури, кислотності середовища і т. д. Тому при отриманні накопичувальної культури аеробних мікроорганізмів забезпечують велику поверхню контакту середовища з повітрям, навпаки для збагачення середовища анаеробними мікроорганізмами тим або іншим способом створюють анаеробні умови. Селективним фактором може служити також неоднакова швидкість росту різних мікроорганізмів при даній температурі.

Слід мати на увазі, що елективні умови далеко не завжди оптимальні для росту мікроорганізмів, що виділяються, однак вони краще переносяться ними, ніж супутніми формами.

Виділення чистої культури

Після того як отримана накопичувальна, приступають до виділення чистої культури. Чиста культура може бути отримана з окремої колонії або з однієї клітини.

Виділення чистої культури з окремої колонії. Основним методом виділення чистих культур мікроорганізмів до теперішнього часу є метод, запропонований Р. Кохом. Принцип його полягає в отриманні чистої культури з окремої колонії. Однак цей метод непридатний для виділення мікроорганізмів, які не ростуть або погано ростуть на щільних середовищах. До числа таких мікроорганізмів відносяться деякі бактерії, багато водоростей і простіших.

При виділенні чистої культури аеробних мікроорганізмів накопичувальну культуру висівають на поверхню щільного середовища. Для цього розплавлене на киплячій водяній бані стерильне поживне середовище, що містить агар або желатин, розливають у стерильні чашки Петрі. Після того як середовище застигне, на його поверхню з піпетки наносять краплю накопичувальної культури або її розведення у стерильній воді і стерильним скляним шпателем

Дрігальського розподіляють краплю спочатку по одній половині поверхні середовища в чашці Петрі, потім по другій половині, після чого цим же шпателем протирають поверхню щільного середовища послідовно в 2-й, 3-й і 4-й чашках. Зазвичай в перших двох чашках після інкубації спостерігають суцільний ріст мікроорганізмів, тоді як у наступних – ізольовані колонії. Розсівати накопичувальну культуру можна петлею методом штриха. У цьому випадку накопичувальну культуру або її розведення відбирають петлею і на поверхні щільного середовища проводять штрихи (рисунок 5.1). Перед кожним новим штрихом петлю стерилізують в полум'ї пальника.



Рисунок 5.1 – Розсів накопичувальної культури методом штриха, який виснажується

Після посіву чашки вміщують у термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворилася на кришці чашки Петрі при застиганні агару, не завадила отримати ізольовані колонії. Чашки витримують у термостаті протягом 1-7 діб залежно від швидкості росту мікроорганізмів. Вирослі ізольовані колонії відсівають петлею на поверхню скошеного щільного середовища в пробірці або в рідке середовище і так зберігають.

Ізольовані колонії аеротолерантних мікроорганізмів і факультативних анаеробів частіше отримують методом глибинного посіву.

Визначення чистоти виділених культур. Чистота виділеної культури мікроорганізмів повинна бути ретельно перевірена. Це здійснюється зазвичай декількома способами: візуальним, мікроскопічним контролем і висівом на ряд поживних середовищ. При візуальному контролі проглядається зростання мікроорганізмів по штриху на поверхні скошеного агаризованого середовища. Якщо зростання по штриху неоднорідне, культура забруднена. Такий контроль можливий тільки для культур, здатних рости на поверхні щільних середовищ.

Чистоту культур мікроорганізмів обов'язково потрібно контролювати під мікроскопом. Для цього слід приготувати препарат фіксованих забарвлених клітин і розглянути його з імерсійною системою або препарат живих клітин і розглянути його, використовуючи фазово-контрасний пристрій. Чиста культура багатьох мікроорганізмів, як правило, морфологічно однорідна; допустимо лише незначне варіювання розмірів клітин. Однак необхідно пам'ятати, що клітини деяких бактерій, наприклад, мікобактерій, нокардій та ін., дуже поліморфні, тому визначення чистоти таких культур при мікроскопуванні викликає деякі труднощі. Чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. Насамперед виділену культуру висівають на щільне середовище, сприятливі для її зростання. Однорідність

вирослих колоній свідчить про чистоту культури. Обов'язковий посів на м'ясо-пептонний агар – середовище, яке забезпечує зростання багатьох хемогетеротрофів. Критерієм чистоти культури є однорідність вирослих колоній або, навпаки, відсутність зростання, якщо дані мікроорганізми на м'ясо-пептонному агарі не розвиваються. Слід мати на увазі, що висновок про чистоту деяких культур мікроорганізмів не можна зробити тільки за результатами висіву на МПА. Особливо це стосується автотрофних мікроорганізмів, а також представників гетеротрофів, схильних розвиватися з одним або кількома супутниками. Чистоту таких культур мікроорганізмів перевіряють висівом ще на ряд середовищ – сусло, м'ясо-пептонний бульйон, картопляний агар та ін. Набір середовищ та їх склад визначаються особливостями метаболізму виділених мікроорганізмів, а також їх можливих супутників.

5.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: конічна колба на 500 см³, стерильні конічні колби на 200 см³, ватні пробки, сіно, крейда, дистильована вода, електрична плитка, МПА, мікроскоп, шпатель Дрігальського, предметні та покривні скельця.

1. Отримання накопичувальної культури сінної палички. Сінна паличка широко розповсюджена в природі і є збудником псування багатьох продуктів (м'ясо, риба, яйця та інші). Сінна паличка (*Bacillus subtilis*) – аеробні, рухомі, грампозитивні, спороутворюючі бактерії. Спори їх відрізняються високою термостійкістю. Оптимальна температура розвитку 35-45°C. Для одержання елективної культури сінної палички сіно дрібно нарізають і вміщують 10 г у конічну колбу на 300-500 см³, наливають воду і накривають ватною пробкою, додають 200 см³ дистильованої води, грудочку крейди і кип'ятять протягом 20 - 30 хв. Отриманий сінний відвар розливають у підготовлені стерильні колби шаром 2 см, закривають пробками та ставлять в термостат при температурі 25-30°C на 2-3 доби.

2. Виділення чистої культури. Розплавлений на киплячій водяній бані МПА, розливають у стерильні чашки Петрі. Після того як середовище застигне, на його поверхню з піпетки наносять краплю накопичувальної культури *Bacillus subtilis* і стерильним скляним шпателем Дрігальського розподіляють краплю спочатку по одній половині поверхні середовища в чашці Петрі, потім по другій половині, після чого цим же шпателем протирають поверхню щільного середовища послідовно в 2-й, 3-й і 4-ій чашках.

Після посіву чашки вміщують у термостат. Чашки витримують у термостаті протягом 1-7 діб залежно від швидкості росту мікроорганізмів.

3. Визначення чистоти виділених культур.

Перевірити чистоту виділеної культури:

– візуальним методом (якщо зростання по штриху неоднорідне, культура

- забруднена);
- під мікроскопом: для цього слід приготувати препарати фіксованих забарвлених клітин і розглянути його з імерсійною системою (рисунок 5.2) або препарат живих клітин і розглянути його, використовуючи фазово-контрасний пристрій.



Рисунок 5.2 – Препарат фіксованих забарвлених клітин *Bacillus subtilis*.

5.4 Висновок: Зробити висновок про чистоту отриманої культури *Bacillus subtilis*.

Контрольні питання

1. Яку культуру називають «чистою культурою», та з якою метою її застосовують?
2. Які основні етапи включає процес виділення чистої культури?
3. Що таке накопичувальне середовище?
4. Що треба враховувати при приготуванні накопичувального середовища?
5. Які Ви знаєте методи виділення чистої культури?
6. Який метод виділення чистої культури переважно застосовується для аеробних мікроорганізмів?
7. Який метод виділення застосовують для факультативних аеробів?
8. Якими способами визначають чистоту виділеної культури?
9. Критерії чистоти виділеної культури при візуальному способу визначення?
10. Як контролюють чистоту виділеної культури під мікроскопом?

Лабораторна робота № 6

Морфологічні та культуральні ознаки дріжджів

6.1 Мета: вивчити морфологічні та культуральні ознаки дріжджів та способи їх розмноження.

6.2 Короткі теоретичні відомості

Дріжджі – одноклітинні еукаріотні мікроорганізми. Дріжджі належать до класу *Hemiascomycetes* (класу сумчастих грибів), порядку *Endomycetales*. Для них властива відсутність міцелію і плодових тіл. Клітина перетворюється на сумку (аск), усередині якої формуються аскоспори. Дріжджові клітини розмножуються вегетативним способом – брунькуванням, поділом або брунькуванням-поділом, а також безстатевим (коли аски утворюються з диплоїдної клітини) і статевим (аски розвиватися в результаті злиття двох гаплоїдних клітин-гамет) способами.

Серед дріжджів-аскоміцетів найбільше практичне значення мають такі роди:

- *Saccharomyces* (сахароміцети). Рід *Saccharomyces* об'єднує багато видів. Найважливіше значення для промисловості мають такі види:
 - *Saccharomyces cerevisiae* – дріжджі зброджують глюкозу, галактозу, сахарозу, на 1/3 рафінозу, мальтозу, прості декстрини. Застосовуються в спиртовому виробництві у переробці крохмалистої сировини, меляси (рисунок 6.1);
 - *Saccharomyces carlsbergensis* – спричиняє бродіння глюкози, галактози, сахарози, рафінози, мелібіози, мальтози і простих декстринів. Застосовується в пивоварінні (рисунок 6.2);
 - *Saccharomyces minor* – зброджує глюкозу, галактозу, сахарозу, рафінозу на 1/3, мальтозу не зброджує. Використовується в хлібопекарському виробництві для приготування житнього хліба.
 - *Saccharomyces vini* – застосовується у виноробстві.

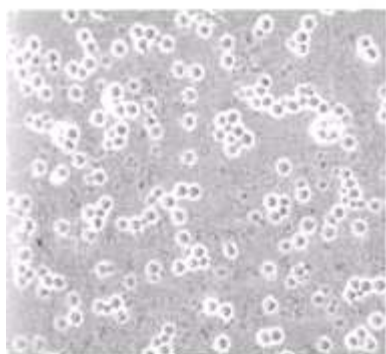


Рисунок 6.1 –
Saccharomyces cerevisiae



Рисунок 6.2 –
Saccharomyces carlsbergensis

- *Saccharomyces ludwigii* (рисунок 6.3) – великі лимоноподібні дріжджі, добре зброджують глюкозу, сахарозу, рафінозу на 1/3. Розвиваються у виноградних і плодово-ягідних соках, які самі забродили, в промисловому виробництві, в слизотечі дерев, у чайному грибку.

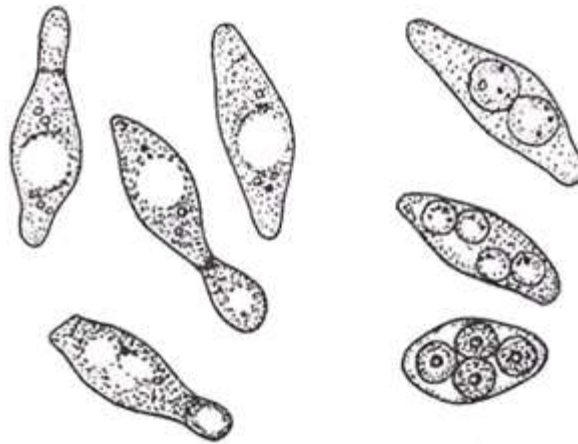


Рисунок 6.3 – *Saccharomyces ludwigii*

- *Schizosaccharomyces pombe* розмножується в оцукрених крохмалистих субстратах, які використовуються в тропічних країнах для виготовлення пива «помбе». Зброджує не лише сахарозу, глюкозу, мальтозу, рафінозу на 1/3, а й декстрини. Широко використовується на спиртових заводах Аргентини та Мексики. Інші види шизосахароміцетів зустрічаються в країнах помірного клімату в плодово-ягідних соках, які самі забродили.
- Під *Candida* застосовується для одержання кормових дріжджів на відходах харчових виробництв, гідролізатах деревини, соняшникового й рисового лушпиння, соломи, стеблин бавовнику, качанів кукурудзи та інших целюлозовмісних матеріалів, на парафінах, метанолі. Серед видів роду *Candida* широко використовуються види:
 - *Candida albicans (mycoderma)* (рисунок 6.4) – асимілює глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу. Окиснює етиловий спирт у CO₂ і воду шляхом дихання. Шкідник спиртового виробництва, пивоваріння, виноробства, виробництва квасу, безалкогольних напоїв. На спеціалізованих дріжджових заводах у дріжджоростильних апаратах розмножується з набагато більшою швидкістю, ніж дріжджі-сахароміцети. Подібними шкідниками є *Candida crusei*, *Candida guilliermondii* і *Candida pulcherrima*.
 - *Candida utilis* (рисунок 6.5) – застосовується для одержання кормових дріжджів на післяспиртовій барді.

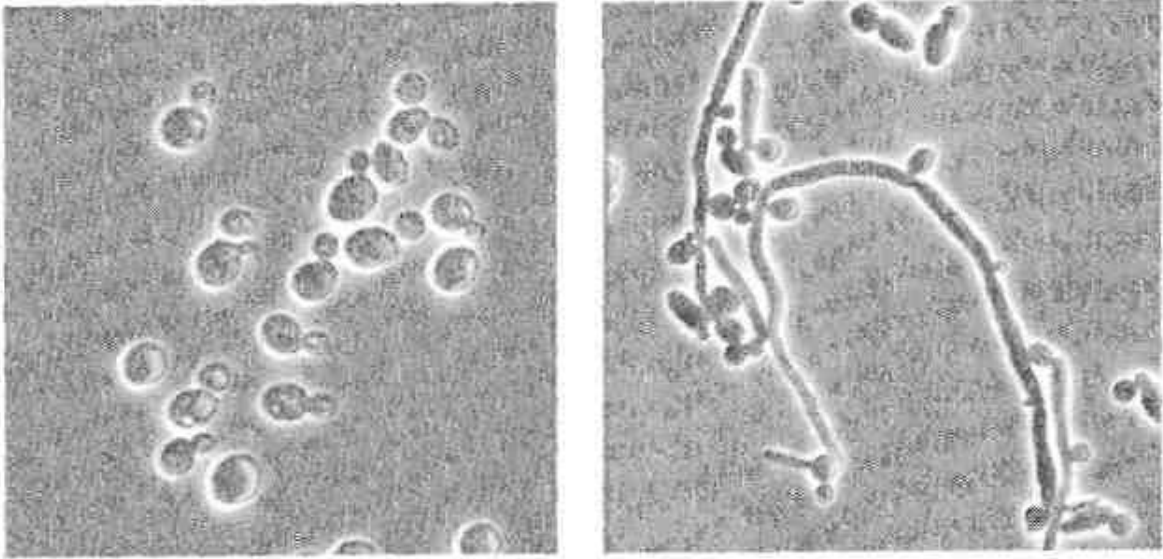


Рисунок 6.4 – *Candida albicans* (mycoderma)

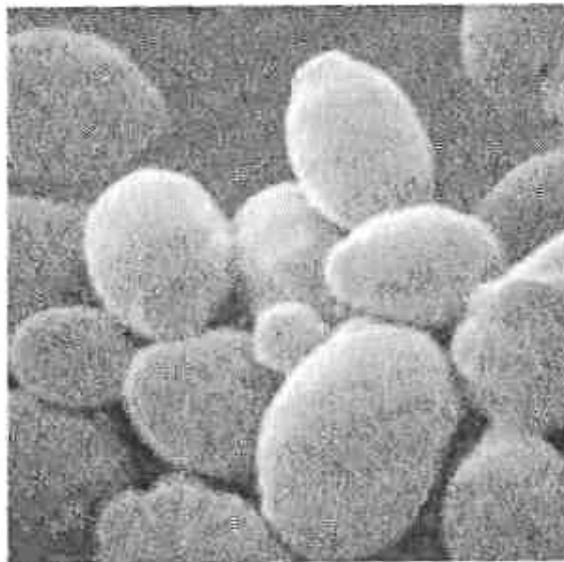


Рисунок 6.5 – *Candida utilis*

- Рід *Trichosporon* включає види:
 - *Trichosporon cutaneum* (рисунок 6.6) використовується для одержання кормових дріжджів на відходах спиртових заводів.
- Рід *Rhodotorula* – синтезує каротиноїди, внаслідок чого колонії забарвлюються в червоний колір. Відомі такі види, як *Rhodotorula rubra*, *R.flava*, *R.aurantiaes*, *R.glutinis*.

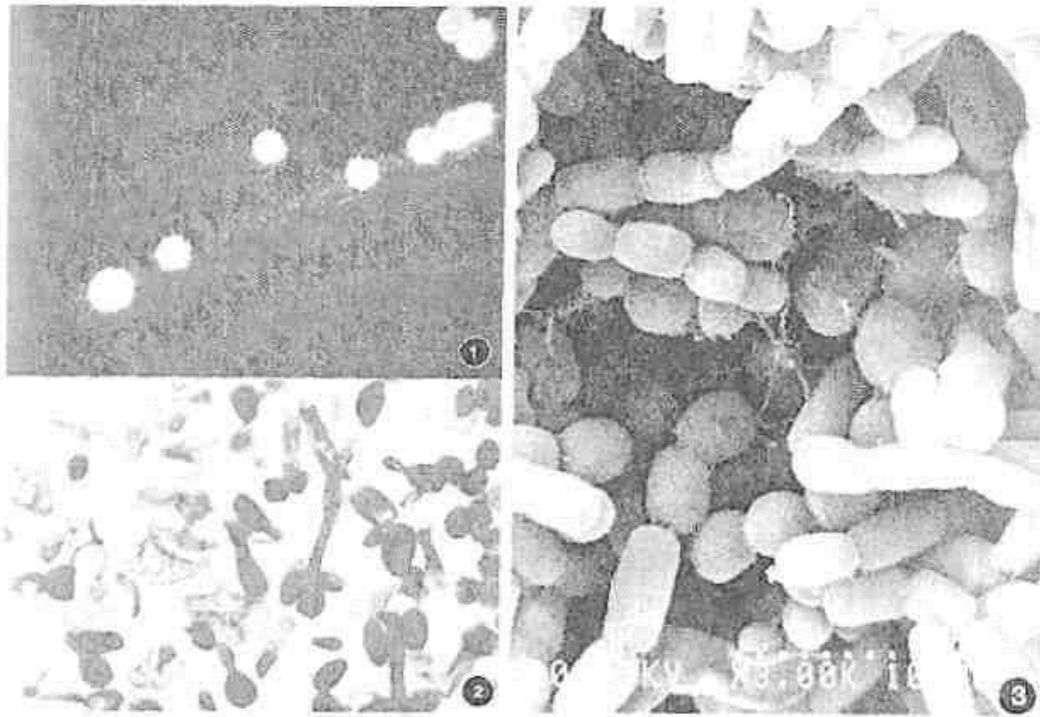
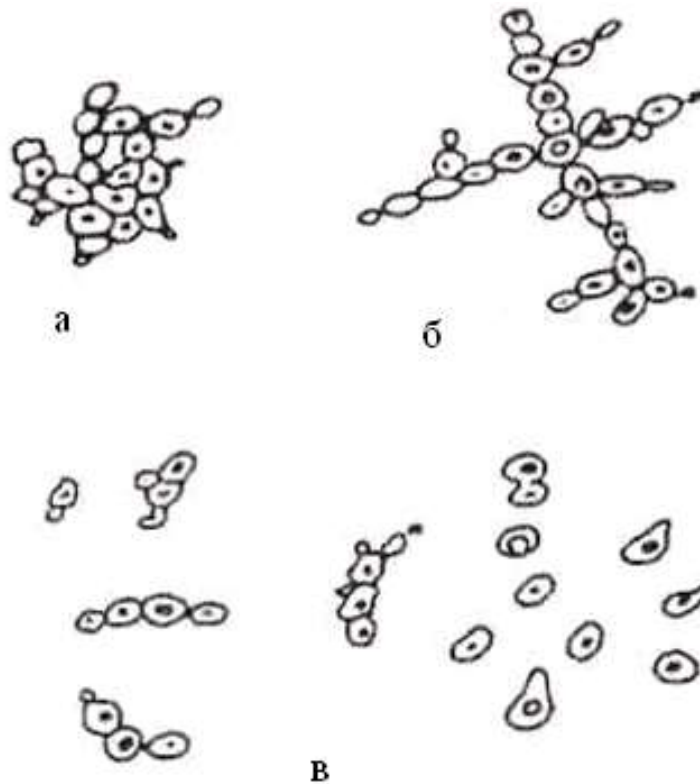


Рисунок 6.6 – *Trichosporon cutaneum*

Морфологічні ознаки дріжджової клітини та її внутрішній вміст змінюються з віком (рисунок 6.7).

Молоді дріжджі (12-16 год культивування) інтенсивно розмножуються (70-80 % клітин, що брунькуються). У них тонка оболонка, гомогенна (однорідна) цитоплазма, вакуолі відсутні або лише намічаються. Запасні речовини відсутні.

У зрілих дріжджів (24-48 год культивування) в цитоплазмі з'являється зернистість, вакуолі збільшуються, процес розмноження уповільнюється (не більш як 5-10 % клітин, що брунькуються), з'являються мертві клітини. Зрілі дріжджі під час перероблення крохмалистої сировини мають містити не більш як 1 % мертвих клітин, меляси – не більше 5 %. У засівних дріжджах пивоварного виробництва допускається до 5 % мертвих клітин. Ознака зрілості дріжджів – наявність глікогену і метахроматину, які відкладаються в клітині як резервний матеріал і витрачаються у міру її старіння. Дріжджі з високою бродильною активністю містять не менше 60-70% клітин з глікогеном. Старі дріжджі (72 год і більше) мають потовщену оболонку, яку добре видно під час мікроскопування. Цитоплазма гетерогенна (зерниста), вакуолі великі, іноді в клітині їх декілька. Глікоген і метахроматин відсутні. Культура містить значну кількість клітин із жировими включеннями, клітини не розмножуються. Характерна ознака – наявність великої кількості мертвих клітин. При відмиранні дріжджів цитоплазма скупчується в грудочку, в центрі клітина поступово деформується, оболонка розпадається, і клітина гине.



a – молоді; *б* – зрілі; *в* – старі

Рисунок 6.7 – Дріжджі різного віку:

Культуральні ознаки дріжджів визначають на щільних і рідких середовищах. Під час росту на щільних середовищах клітини дріжджів утворюють різноманітні колонії залежно від їх родової (видової) належності. Описують колонії, звертаючи увагу на такі культуральні ознаки:

- форма колоній – кругла, овальна, сочевицеподібна та ін.;
- розміри – діаметр, мм;
- оптичні властивості – прозора, напівпрозора, непрозора, матова, блискуча та ін.;
- колір – білий, сірий червоний, жовтий та ін.;
- поверхня – гладка, шорстка, складчаста, горбкувата, з радіальними колами та ін.;
- профіль – плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний та ін.;
- край колоній – рівний, хвилястий, торочкуватий, лопатевий, зубчастий та ін.;
- консистенція – масляниста, плівкова, в'язка та ін.

6.3. Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: вирощені в чашках Петрі дріжджі різних родів, предметні і покривні скельця, мікроскоп, культури дріжджів-сахароміцетів молодих (18-20 год), зрілих (36-48 год) і старих (більше 72 год), розчин метиленового синього, фільтрувальний папір, бактеріальна петля.

6.3.1 Розглянути колонії дріжджів, які виростили в чашках. Користуючись описом культуральних ознак різних родів дріжджів, визначити рід дріжджів.

Опис культуральних ознак деяких родів дріжджів

- ✓ Рід *Saccharomyces*. Колонії невеликих розмірів діаметром 2-3 мм, іноді точкові діаметром не менше 1 мм, білі, кремові. Опуклі, здіймаються над поверхнею субстрату. Краї колоній рівні, консистенція масляниста, пастоподібна. Гладкі, матові або з тьмяно-блискучою поверхнею;
- ✓ Рід *Schizosaccharomyces*. Колонії кремові або білі, матові, великі, з лопатевими краями, круто піднесеним конусом, на поверхні колоній – концентричні кола. Рідше – гладкі, консистенція пастоподібна.
- ✓ Рід *Saccharomycodes*. Колонії білі або сірі, сплюснені, розпливчасті ($d > 5$ мм), з трохи піднесеним куполом, дрібно вищербленими краями. На поверхні видніються радіальні брижки. Консистенція пастоподібна.
- ✓ Рід *Candida*. Колонії округлі, правильної форми, білувато-кремові, матові. Поверхня в дрібних складках, часто вкрита ворсинками, край дрібно порізаний (дрібнофестончастий). Профіль колоній опуклий. Структура дрібнозерниста, консистенція м'яка. Краї колоній врастають в агар.
- ✓ Рід *Trichosporon*. Колонії великі, круглі, білувато-жовтуваті, опуклі. Поверхня у великих зморшкуватих брижках, вкрита ворсинками, краї зрізані, видніються радіальні складки. По краю рясна зона міцелію, центр трохи піднятий. При старінні поверхня колоній стає слизуватою, блискучою, жирною. Погано береться петлею, консистенція щільна, волокниста.
- ✓ Рід *Rhodorula*. Колонії жовтогарячі або червоні, м'які, гладенькі, блискучі, правильної круглої форми, великі та дрібні з рівними краями, консистенція пастоподібна.

6.3.2 Приготувати препарати «роздавлена крапля» розглянутої колонії дріжджів. Визначити під мікроскопом розмір, форму і стан цитоплазми клітин. Препарати замалювати.

6.3.3 Ознайомитися з віковими особливостями сахароміцетів, приготувавши та розглянувши препарати «роздавлена крапля» колоній молодих, зрілих та старих дріжджів-сахароміцетів. Препарати замалювати, відмітити вікові особливості дріжджів-сахароміцетів.

6.3.4 Розглядаючи препарати колоній молодих, зрілих та старих дріжджів-сахароміцетів, вивчити способи розмноження дріжджів, звертаючи увагу на бруньки й перегородки. Препарати замалювати.

6.3.5 Виконати фарбування препаратів колоній молодих, зрілих та старих

дріжджів метиленовим синім. Метиленовий синій фарбує мертві клітини, а живі залишаються не пофарбованими. Вказати колонії яких, молодих, зрілих чи старих дріжджів містять більше мертвих клітин.

6.4 Висновок: розглянуті колонії дріжджів – це дріжджі роду.... Дріжджі-сахароміцети розмножуються способом. З віком кількість мертвих клітин в колонії дріжджів.....

Контрольні питання

1. Що таке дріжджі?
2. Які способи вегетативного розмноження дріжджів?
3. Які роди дріжджів найбільше поширені?
4. Галузі застосування дріжджів роду *Saccharomyces*.
5. Особливості шизосахароміцетів і сахаромікодів.
6. Застосування дріжджів роду *Candida*, *Trichosporon*, *Rodotorula*.
7. За якими ознаками відрізняються молоді, зрілі й старі дріжджові клітини?
8. Як виявляють мертві клітини в колоніях дріжджів?
9. Який відсоток мертвих клітин допускається у зрілих та старих дріжджів?
10. Культуральні особливості дріжджів.

Лабораторна робота № 7

Визначення активності антибіотиків та фітонцидів

7.1 Мета: вивчити чутливість мікроорганізмів до антибіотиків та фітонцидів методом дисків.

7.2 Короткі теоретичні відомості

Багато мікроорганізмів у процесі життєдіяльності виробляють біологічно активні речовини, які згубно діють на мікроби-антагоністи. Ці речовини називаються **антибіотики**. Від інших антимікробних речовин вони відрізняються вибірковістю дії, тобто пригнічують життєдіяльність і вбивають певні антагоністичні види мікроорганізмів.

Антагонізмом називаються такі взаємовідносини між мікроорганізмами, або між мікроорганізмами і біологічно активними речовинами, коли один вид їх не може розвиватися за присутності іншого виду мікроорганізмів, або за присутності певних біологічно активних речовин. Вперше це явище було відкрито Л. Пастером при культивуванні бацил сибірки і гнильних бактерій у 1877 р., а детально вивчено І. І. Мечниковим.

Антибіотики відрізняються за хімічною будовою та антимікробною дією. Одні з них лише пригнічують розвиток мікроорганізмів, інші призводять до їх загибелі.

Ознакою антибактеріальної активності речовини є утворення зони затримки росту на середовищі навколо диска, просоченого антибіотиком (метод дисків): при встановленні дисків на середовище антибіотик розчиняється

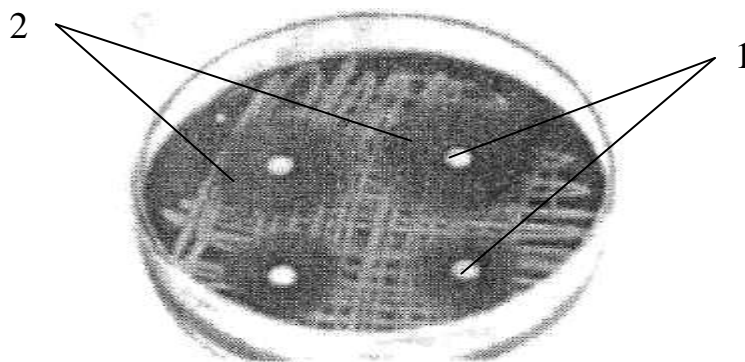
вологою середовища і дифундує в навколишнє середовище. Залежно від активності антибіотиків спостерігається різна площа затримки росту мікроорганізмів. На одній чашці Петрі можна одночасно визначати цим методом чутливість бактерій до багатьох антибіотиків.

7.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: термостат; чашки Петрі; спиртівки; бактеріологічні петлі; фільтрувальний папір; МПА; антибіотики: пеніцилін, стрептоміцин, біоміцин (або інші); фітонциди: цибуля і часник (або інші); чисті культури бактерій.

Чашки Петрі із застиглим МПА кладуть на стіл кришкою догори. Дотримуючись правил стерильності, наносять піпеткою на поверхню середовища краплю суспензії чистої культури, яка буде слугувати за тест-організм, і ретельно розтирають її по всій поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя. На поверхню засіяного МПА обпаленим над спиртівкою пінцетом накладають 4-5 дисків (кружечків фільтрувального паперу діаметром до 6-8 мм), просочених різними антибіотиками (пеніциліном, стрептоміцином, біоміцином або іншими) та фітонцидами – цибулею, часником тощо. Диски розташовують по колу чашки так, як показано на малюнку. Чашки позначають і ставлять у термостат при температурі 37 °С на 2-3 доби.

Антибіотики з дисків дифундують у поживне середовище, і навколо дисків виникають зони пригнічення росту бактерій (рисунок 7.1).



- 1 – кружечки фільтрувального паперу просочені певними дозами антибіотиків;
2 – зони пригнічення бактерій

Рисунок 7.1 – Визначення чутливості бактерій до різних антибіотиків.

Визначають зону пригнічення росту бактерій. Величина зони пригнічення росту визначає ступінь чутливості бактерій до того чи іншого антибіотика. Зона діаметром до 12-15 мм свідчить про малу чутливість, а більше 22-25 мм – про високу чутливість мікроорганізму до даного антибіотика.

Результати дослідів записують за такою формою:

Таблиця 7.1 – Результати дослідження антимікробної дії деяких антибіотиків та фітонцидів

Вид бактерій	Величина зони затримки росту бактерій, мм					Висновок про ступінь чутливості
	Пеніцилін	Біоміцин	Стрептоміцин	Цибуля	Часник	

7.4 Висновок: Серед досліджених речовин антимікробною дією по відношенню до бактерій виду... володіють такі речовини.... Найкращу антибіотичну дію проявив... Серед фітонцидів більш ефективним для бактерій виду....є....

Контрольні питання

1. Які біологічно активні речовини називають антибіотиками?
2. В чому полягає відмінність дії антибіотиків на мікроорганізми від інших антимікробних речовин?
3. В чому полягає метод визначення антимікробної активності за допомогою дисків?
4. Що значить вираз «антибіотики вбивають певні антагоністичні види мікроорганізмів»?
5. Чи однаковий характер дії різних антибіотиків?

Лабораторна робота № 8

Морфологічні та культуральні особливості міцеліальних грибів

8.1 Мета: вивчити морфологічні та культуральні ознаки міцеліальних грибів.

8.2 Короткі теоретичні відомості

Гриби (мікроміцети) – це численна і своєрідна група еукаріотних мікроорганізмів, налічує близько 100 000 видів. Вони не містять хлорофілу, не здатні до синтезу органічних речовин з CO₂, тому для розвитку потребують готових органічних речовин. Більша частина грибів – сапрофіти, але зустрічаються і паразитичні види.

У природі гриби поширені на різних субстратах: у воді, ґрунті, на рослинах і тваринах.

Багато грибів є продуцентами вітамінів, антибіотиків, органічних кислот, ферментів, стимуляторів росту та ін. Водночас численні гриби, які розвиваються на харчових продуктах, промислових матеріалах і виробках, спричиняють їх псування та руйнування. Існують гриби, які уражають

культурні рослини в процесі їхньої вегетації, чим завдають великої шкоди сільському господарству, а також гриби, патогенні для людини і тварин.

Веgetативне тіло більшості грибів – це грибниця, або міцелій, що складається з тонких розгалужених ниток-гіфів. Міцелій гриба – це розгалужена система гіфів, усередині яких міститься багатоядерна цитоплазма. Він може бути одноклітинний (несептований) або септований, тобто розділений перегородками (септами). Септи, проте, не розділяють гіфи на окремі клітини, оскільки мають центральну пору, через яку вільно перетікають цитоплазма та ядра. Тому всі гриби – одноклітинні організми. Гриби з несептованим міцелієм належать до нижчих класів, з септованим – до вищих.

Діаметр гіфів, з яких складається вегетативний міцелій, змінюється в межах 5-50 мкм і більше. Гіфи ростуть вершиною або кінцями розгалужень, тому клітини гіфів неоднорідні за довжиною. Частина міцелію розвивається в субстраті (субстратний міцелій), пронизуючи його та вбираючи з нього воду й поживні речовини. Частково міцелій розвивається на поверхні субстрату (повітряний міцелій) у вигляді тонких нальотів або плівок.

У більшості видів вегетативний міцелій незабарвлений; пігментований лише плодоносний міцелій, тому молоді колонії білі або сіруваті. З розвитком органів плодоношення колонії набувають жовтого, рожевого, бежевого, червоного, зеленого, чорного та інших забарвлень.

Гіфи окремих грибів можуть густо переплестися і навіть зростися між собою. З густого переплетення гіфів складаються так звані плодові тіла грибів, у яких містяться органи розмноження.

Гриби розмножуються вегетативним, статевим і безстатевим способами. Вегетативно гриби розмножуються окремими шматочками грибниці, конідіями або артроспорами, хламідоспорами або склероціями. Хламідоспори – ущільнені ділянки гіфів, що розрослися. Вони покриті товстою оболонкою, всередині містять поживні речовини. Склероції – більш або менш густі сплетіння гіфів круглої або еліптичної форми, їхні розміри змінюються від кількох міліметрів до десятка сантиметрів. Склероції стійкі до несприятливих умов, оскільки оболонки гіфів потовщені, пігментовані, порівняно з міцелієм містять менше води і більше запасних речовин – ліпідів, глікогену.

Органи безстатевого розмноження – спори та конідії. Спори утворюються всередині особливих вмістилищ – спорангіїв, які формуються на кінцях плодоносних гіфів – спорангієносіїв (ендогенне спороношення). У спорангіях деяких грибів містяться рухливі спори з джгутиками, які називаються зооспорами. Утворення конідій (екзогенне спороношення) відбувається на верхівці або бокових відгалуженнях гіфів – конідієносіїв. Процес статевого розмноження у нижчих і вищих грибів відбувається по-різному. У нижчих грибів злиття двох клітин-гамет і наступні процеси плазмо- і каріогамії приводять до утворення заплідненої клітини-зиготи (зооспори або зигоспори). Вона покривається товстою багатошаровою оболонкою і деякий час перебуває у стані спокою. При проростанні зиготи відбувається процес редукційного поділу диплоїдного ядра, в результаті чого в міцелії відновлюється гаплоїдний

набір хромосом. У вищих грибів утворена зигота ділиться, і статевий процес закінчується утворенням спеціальних клітин асків – сумок з гаплоїдними аскоспорами або базидій – витягнутих клітин з чотирма відростками і мігруючими в них базидіоспорами. Аскоспори і базидіоспори дають початок новому вегетативному міцелію з гаплоїдними ядрами.

Гриби, яким властиві всі три способи розмноження, називаються досконалими, гриби, що здатні розмножуватися вегетативним і безстатевим способами, – недосконалими.

Гриби поділяються на такі класи: хитридіоміцети (*Chytridio-mycetes*), гіфохитридіоміцети (*Hyphochytridiomycetes*), ооміцети (*Oomycetes*), зигоміцети (*Zygomycetes*), аскоміцети (*Ascomycetes*), базидіоміцети (*Basidiomycetes*), дейтеромицети (*Deuteromycetes*) або незавершені гриби (*Fungi imperfecti*).

Представники перших чотирьох класів грибів належать до нижчих класів, аскоміцети, базидіоміцети і дейтеромицети – до вищих.

Гриби класів хитридіоміцетів і гіфохитридіоміцетів мають слабо розвинутий зачатковий міцелій, інші складаються зі шматочка цитоплазми, навіть без оболонки, яка з'являється у процесі перетворення вмісту в спорангій.

Гриби розмножуються як безстатевим (рухливими зооспорами), так і статевим способом – злиттям двох рухливих статевих клітин (гамет). Основна частина цих грибів – внутрішньоклітинні паразити рослин. До них належать збудники раку картоплі (гриб *Synchytrium endobioticum*), захворювань капусти (*Olpidium brassicae*).

Гриби класу *Oomycetes* утворюють добре розвинутий багатоядерний міцелій (несептований). Безстатеве розмноження відбувається за допомогою зооспор з двома джгутіками, які розвиваються в зооспорангіях. Під час статевого процесу після злиття гамет утворюються зооспори.

Ооміцети – збудники захворювань деяких рослин. Так, фітофтора, або картопляний гриб, уражає бульби і бадилля картоплі, помідори і баклажани; плазмокара спричиняє хворобу винограду – мільдю.

Представники класу *Zygomycetes* мають добре розвинений несептований багатоядерний міцелій. Вони розмножуються безстатевим способом за допомогою нерухомих спорангіеспор або статевим способом – зигоспорами.

Серед представників зигоміцетів найбільше значення має родина *Mucoraceae* (мукові гриби). Для мукових грибів (рисунок 8.1, 8.2) властива різноманітність будови органів безстатевого спороношення. Багато мукових грибів спричиняють псування різних харчових продуктів, на яких вони розвиваються у вигляді пухнастої білої маси.

На Сході ці гриби використовуються для отримання алкогольних напоїв та у виготовленні харчових продуктів, які зброджуються із соєвих бобів. Деякі мукові гриби здатні до утворення ферментів, органічних кислот. Серед них зустрічаються також збудники захворювань людини і тварин. Найбільше значення з мукових грибів мають роди *Mucor* (*M. mucedo*, *M. racemosus*) і *Rhizopus* (*R. nigricans*, *R. delemar*).

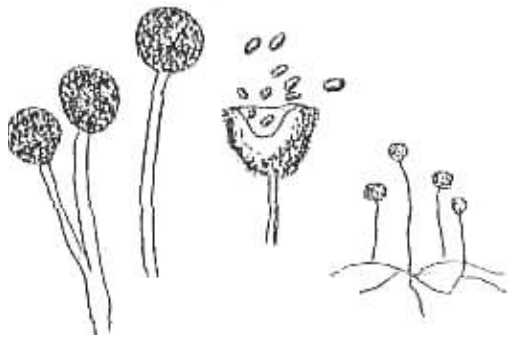


Рисунок 8.1 – *Mucor racetosus*

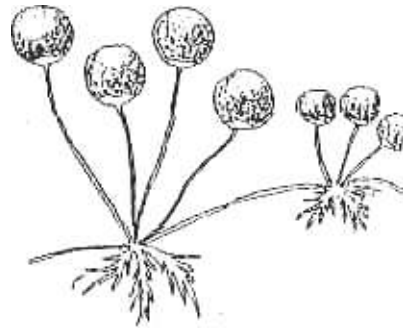


Рисунок 8.2 – *Rhizopus nigricans*

До класу *Ascomycetes* (сумчастих грибів) належать міцеліальні гриби, які мають добре розвинений міцелій.

Безстатеве розмноження міцеліальних аскоміцетів відбувається за допомогою конідій. Конідієносії виникають на міцелії одночасно або групами, утворюючи коремії, пікніди, ложе. При статевому розмноженні утворюються аскоспори в сумках (асках). Сумки розвиваються у багатьох грибів у плодових тілах різноманітної форми та будови. Деякі сумчасті гриби не мають плодових тіл, тому сумки у них розвиваються безпосередньо на міцелії. Гриби, що утворюють плодові тіла, називають плідосумчастими, а гриби, що не утворюють таких тіл, — голосумчастими.

Сумчасті гриби становлять поширену родину *Aspergillaceae*, яка об'єднує близько 200 видів грибів. Ця родина охоплює два роди – *Aspergillus* і *Penicillium*.

Аспергілові гриби спричиняють пліснявіння багатьох харчових продуктів, деякі види патогенні для людини і тварин (наприклад, *Asp. clavatus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. flavus*). Проте більша частина з них нешкідливі, широко використовуються в промисловості для одержання аміколітичних, протеолітичних і пектолітичних ферментів, органічних кислот (лимонної, ітаконової, глюконової), деяких антибіотиків.

Плодоносні гіфи *Aspergillus* мають угорі потовщення у вигляді кулястого здуття, на якому радіально розміщуються стеригми, а від них відшнуровуються довгі ланцюжки конідій. У різних видів аспергілів конідії забарвлені порізно (чорні, жовті, світло-зелені та ін.). Найбільше значення мають такі їх представники: *Asp. niger* – чорна цвіль – утворює спочатку білосніжний міцелій, який швидко росте. Він набуває жовтуватого, а потім чорного забарвлення. Конідієносії безбарвні, заввишки до 2 мм, закінчуються кулястим здуттям, на якому радіально розміщені стеригми, від яких часто відходять вторинні стеригми, а від них відшнуровуються довгі ланцюжки конідій. *Asp. niger*, *Asp. awamori*, *Asp. usamii*, *Asp. batate* (чорні аспергіли) використовуються для одержання амілолітичних, протеолітичних, пектолітичних ферментів, для виробництва лимонної кислоти, бежеві гриби *Asp. terreus* і *Asp. Itaconicus* – для виробництва ітаконової кислоти та пектолітичних ферментних препаратів, *Asp.*

nidulans – для одержання протеолітичних ферментів, а жовто-зелені гриби *Asp. oryzae* і *Asp. flavus* (рисунок 8.3) – для одержання аміло- і протеолітичних ферментів.

Пеніцилові гриби (рисунок 8.4) мають багатоклітинні розгалужені конідиеносії, на яких розвивається перший ряд витягнутих клітин-гілочок, на них розміщені циліндричні короткі клітини – метули, на яких зазвичай розміщуються один чи два ряди коротких пляшкоподібних клітин – стеритм. Кожна стеригма несе на вільних кінцях по ланцюжку конідій. Унаслідок паралельного розміщення гілочок все спороношення має форму китиці.

Пеніцилові гриби застосовуються для одержання антибіотика пеніциліну (*P. chrysogenum*), ферментного препарату глюкозооксидази (*P. vitale*), у виробництві сирів (*P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. candidum*). Деякі з них зустрічаються на зерні, солоді, харчових продуктах.

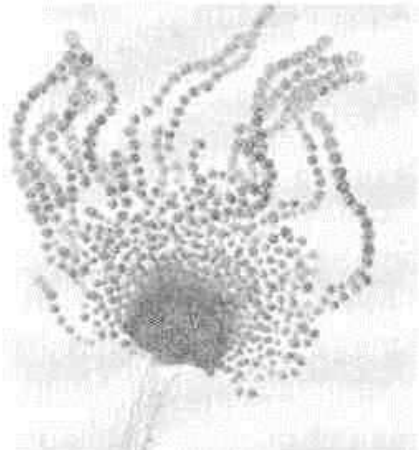


Рисунок 8.3 – *Aspergillus flavus*

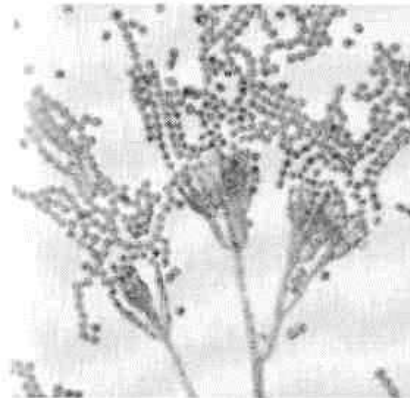


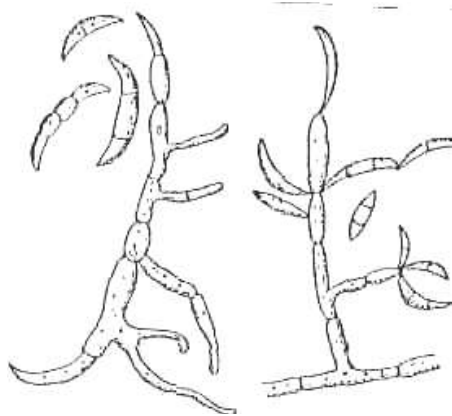
Рисунок 8.4 – *Penicillium chrysogenum*

Клас *Basidiomycetes* об'єднує гриби з розгалуженим септованим міцелієм – шапкові, домові, трутовики, сажкові, іржасті та ін. Гриби розмножуються безстатевим і статевим способами, утворюючи одно- або багатоклітинні базидії з чотирма базидіо-спорами. Іржасті гриби зустрічаються на злакових культурах. Вони відрізняються складним циклом розвитку. Деякі гриби весь цикл розвитку проходять на одній рослині (наприклад, іржа соняшника, гречки), інші – на двох (хлібна іржа). Свою назву гриби одержали у зв'язку з появою іржавих плям або смуг на уражених частинах рослин. Ураження злакових культур іржею призводить до їх недорозвинення, затримки утворення колосків і загибелі врожаю.

Клас недосконалих грибів (*Fungi imperfecta* або *Deuteromycetes*) об'єднує гриби різних видів із септованим міцелієм, що розмножуються лише вегетативним і безстатевим способами. Деякі з недосконалих грибів втратили будь-які органи плодоношення і розмножуються брунькуванням або шматочками міцелію. Найважливішими представниками цього класу є такі роди:

Fusarium (рисунок 8.5) – для різних його видів характерні серпоподібно вигнуті конідії, розділені поперечними перегородками. Вони розміщуються поодинокі або утворюють скупчення у вигляді рожевих подушечок на

коротких розгалужених конідієносіях. Описано понад 800 видів цього гриба. Одні з них – сапрофіти, поширені у ґрунті, на рослинних рештках, деякі ведуть паразитичний спосіб життя, уражаючи пшеницю, жито, кукурудзу, просо, гречку, спричиняють в'янення льону і бавовника. В овочесховищах гриби *Fusarium* спричинюють суху гниль картоплі і цукрових буряків (*F. solani*). У результаті життєдіяльності фузаріїв у зерні та насінні олійних рослин утворюються отруйні речовини, що спричиняють харчові отруєння – «п'яну хворобу» хліба (*F. graminearum*), септичну ангіну. Деякі види



використовуються для одержання гіберилінової кислоти, яка активізує ріст солоду в спиртовій і пивоварній промисловостях.

Рисунок 8.5 – *Fusarium*

Trichotecium на поживному середовищі утворює борошнисто-пухнастий, спочатку білий, потім рожевий міцелій; конідієносії добре розвинуті, прямостоячі, прості, без здуття біля вершини.

Trichotecium rozeum (рисунок 8.6) застосовується для одержання цитолітичних ферментів і антибіотика трихотецину.

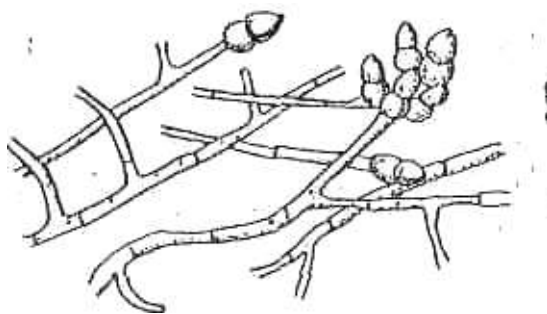


Рисунок 8.6 – *Trichotecium rozeum*

Botrytis (рисунок 8.7) міцелій брудно-сірого кольору пронизує субстрат у вигляді густої повсті. Конідії великі, одноклітинні, безбарвні або димчасті, яйцеподібні або круглі. Спричиняє кагатну гниль цукрових буряків під час зберігання. Збудник сірої гнилі капусти, моркви, помідорів, малини, полуниці, суниці (*B. cinerea*).

Alternaria (рисунок 8.8) – міцелій забарвлений у темний колір, тому колони на поживному середовищі темно-димчасті або маслиново-чорні. Конідієносії прямі, розгалужені або прості. Конідії багатоклітинні з поперечними та поздовжніми перегородками. У ланцюжках по 10 і більше конідій. Досить поширені у ґрунті і на рослинних тканинах. Цей гриб – збудник чорної гнилі у коренеплодів і плодів (*A. radicina*, *A. citri*), іноді спричиняє псування м'ясних і молочних продуктів.

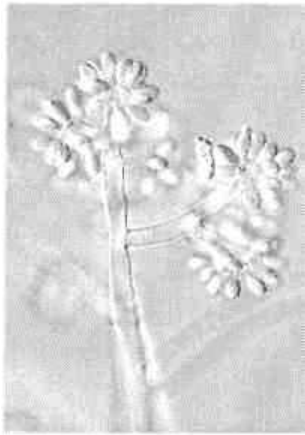


Рисунок 8.7 – *Botrytis cinerea*

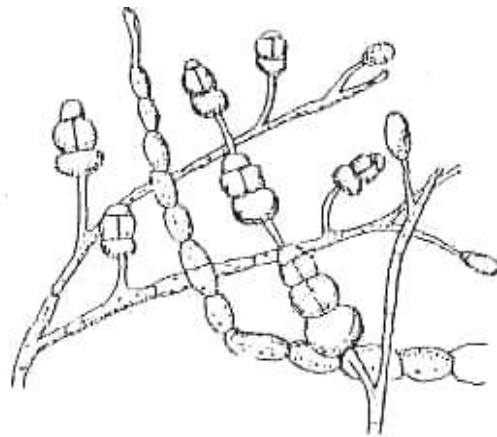


Рисунок 8.8 – *Alternaria*

Endomyces (рисунок 8.9) – не мають особливих органів плодоношення. Їхні розгалужені білуваті гіфи поділяються перегородками на клітини, які потім роз'єднуються, з кожної може розвинути новий міцелій.

Endomyces lactis (молочна цвіль) поширена на кисломолочних продуктах, маслі, квашених овочах, пресованих дріжджах, солоді, містяться на стінках сирих приміщень.

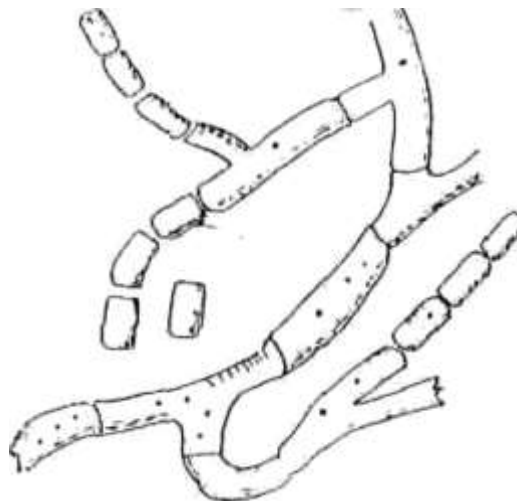


Рисунок 8.9 – *Endomyces*

Phoma (рисунок 8.10) розмножується пікнідами, в яких містяться дуже короткі конідієносії з безбарвними одноклітинними конідіями. Серед грибів

багато збудників псування харчових продуктів, паперу, матеріалів, містяться у сирих приміщеннях.

Cladosporium (рисунок 8.11) має розгалужені конідієносії, які несуть на кінцях ланцюжки конідій різноманітної форми і розмірів, найчастіше двоклітинні. Міцелій, конідієносії і конідії забарвлені в маслиново-зелений колір. Гриби виділяють у середовище темний пігмент. Вони часто розвиваються на різних харчових продуктах під час зберігання на холоді, а також виникають на поверхні кагатів.

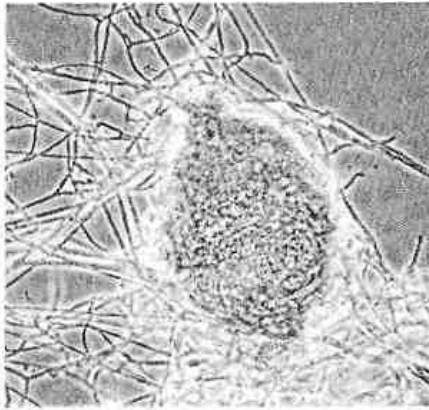


Рисунок 8.10 – *Phoma exigua*

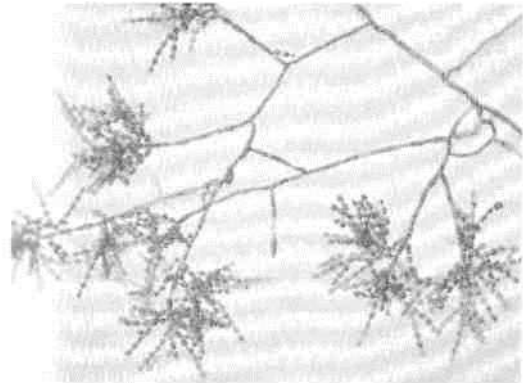


Рисунок 8.11 – *Cladosporium*

Catenularia (рисунок 8.12) – міцелій септований, спричиняє псування згущеного молока з цукром (*C.fuliginea*).

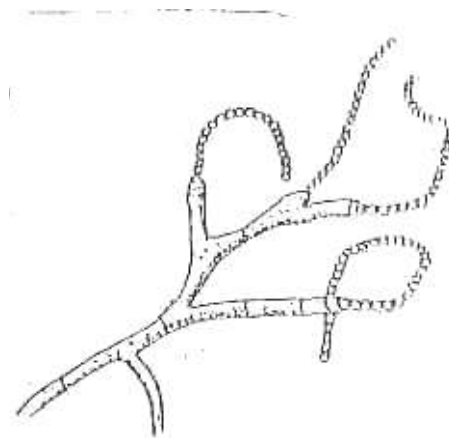


Рисунок 8.12 – *Catenularia*

8.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: гриби різних видів у чашках Петрі, покривні і предметні скельця, голка для роботи з препаратами грибів, мікроскоп, фільтрувальний папір.

8.3.1 Приготувати препарати грибів

Для приготування препарату грибів прожареною і охолодженою голкою взяти частину міцелію і перенести у краплю суміші води і гліцерину на предметне скло. Гриб ретельно розщепити препарувальними голками, потім

накрити покривним склом і розглядати при малому (об'єктив 8^x) і великому (об'єктив 40^x) збільшенні мікроскопа. Щоб будову міцелію можна було розглянути досить чітко, під покривне скло препарату можна додати невелику краплю фуксину. Особливо обережно слід готувати препарат мукорових грибів, оскільки при найменшому необережному русі спорангії лопаються і спори висипаються. Тому голками треба захопити лише верхній шар міцелію, не торкаючись поживного середовища.

Для розглядання стеригм і булавоподібного здуття аспергилів і китиць пеніцилів їх потрібно захопити разом з невеликим шматочком поживного середовища, розпрямити у краплі води і гліцерину на предметному склі, накрити покривним склом. При цьому відокремлюються конідії та можна розглянути будову цих грибів.

Розглянути приготовані препарати грибів. Замалювати препарати.

8.3.2 Користуючись ключем для визначення роду пліснявих грибів визначити класи до яких належать розглянуті гриби

Ключ для визначення роду пліснявого гриба

При вивченні окремих збудників пліснявіння харчових продуктів необхідно вміти їх розпізнавати, тобто встановлювати назву, належність до того чи іншого класу, родини, роду, виду. Рід гриба визначається за таким ключем:

1. Гриби розмножуються спорангієспорами, що містяться всередині спорангіїв – 2.

2. Гриби розмножуються конідіями, що утворюються ззовні на особливих конідієносцях, рідше – прямо на міцелії – 5.

Спорангієносці, як правило прості, рідше просто гіллясті. Спорангії всі однакові – 3.

Спорангієносці гіллясті. Спорангії двох видів: великі на головній осі і дрібні, завжди однорідні на бокових гілках – 4.

3. Спорангієносці поодинокі, прості, інколи утворюють галузки. Спорангії дрібні чи великі, завжди однорідні, безбарвні чи забарвлені. Спори круглі чи еліпсоїдні, гладкі, безбарвні чи сіруваті. Мукор (*Mucor*) – рисунок 8.1.

Спорангієносці ростуть на столонах з одного центра, з великими чорними головками. Спори сірі, округло-яйцеподібні, зморщені. Ризопус (*Rhizopus*) – рисунок 8.2.

4. Гілки розташовані на головній осі у вигляді кущів в один чи декілька ярусів. Місця відгалужень нероздуті. Спори циліндричні і еліпсоїдні, безбарвні. Тамнідіум (*Tamnidium*). Гілки у вигляді кущів відходять від головної осі і місця відгалужень роздуті. Спори еліпсоїдні і кулеподібні, безбарвні. Хетостилум (*Chaetostylum*).

5. Конідії утворюються на особливих конідієносцях, що відрізняються від звичайних вегетативних гіф – 6 .

Конідієносії або мало відрізняються від звичайних гіф, або гіф немає взагалі, і конідії утворюються прямо на міцелії – 14.

6. Конідієносії сильно розгалужені – 7.

Конідієносії не розгалужені чи слабо розгалужені. Розгалуження просте чи кущеподібне – 9.

7. Розгалуження деревоподібне – 8. Розгалуження китицеподібне, конідії розташовані ланцюжками, гладкі, безбарвні чи забарвлені, круглі. Пеніциліум (*Penicillium*) – див. рисунок 8.4.

8. Конідієносії деревоподібні, розгалужені. Конідії утворюються жмутами чи окремо, еліпсоподібні чи яйцеподібні, безбарвні чи слабо забарвлені. Вертициліум (*Verticillium*).

9. Конідієносії нерозгалужені, довгі з кустиками великих грушоподібних конідій на кінці. Конідії двоклітинні, безбарвні чи рожеві. Колонії гриба жовто-рожеві. Трихотеціум (*Trichotecium*) – рисунок 8.6.

Конідієносії та конідії іншої форми – 10.

10. Конідієносії галузяться. Розгалуження просте – 11. Прості (як виключення, просто розгалужені) конідієносії мають на кінці булавоподібне здуття, інколи таке здуття відсутнє – 12.

11. Конідії великі, неправильної форми, розташовані ланцюжками, забарвлені у коричневий колір. Колонії спочатку пухнасті, потім слизуваті, із сильним неприємним запахом. Акауліум (*Ascauiium*).

Конідії безбарвні, довгі, серповидно вигнуті, багатоклітинні, інколи розташовані ланцюжком одна за одною чи з'являються прямо на міцелії. Колонії гриба часто забарвлені у рожевий колір. Фузаріум (*Fusarium*) – рисунок 8.5.

12. Кінці конідієносіїв роздуті як булава і навколо покриті стеригмами, що несуть ланцюжки конідій – 13.

Розширення на кінці часто відсутнє, стеригми розташовані тільки на вершині конідієносіїв, але не ростуть на сторонах. Конідії дрібні, круглі, гладкі, безбарвні, на стеригмах розташовані ланцюжками. Цитроміцес (*Cytromyces*).

13. Стеригми, що містяться на кінцях роздутих як булава конідієносіїв, прості, нерозгалужені, несуть ланцюжки конідій. Конідії круглі, гладкі чи у вигляді шипів, забарвлені чи безбарвні. Аспергілус (*Aspergillus*) – рисунок 8.3.

14. Конідії утворюються прямо на міцелії – 16.

Конідії утворюються на конідієносіях, що мало чим відрізняються від звичайних гіф – 15.

15. Конідієносії видно тільки при приготуванні препарату «висяча крапля». Конідії легко розсипаються – 17.

Місця утворення конідій видно у звичайному мікроскопічному препараті – 18.

16. Одноклітинні конідії, безбарвні, округло-подовжені. Колонії слизуваті, чорні. Дематіум (*Dematium*).

Конідії одноклітинні, яйцеподібні, дріжджеподібні. Молоді колонії подібні на колонії дріжджів, потім стають кошлатими. Монілія (*Monilia*).

17. Конідії утворюються простим поділом міцелія і легко відпадають, безбарвні, прямокутні, інколи з'єднані у короткі ланцюжки. *Endomyces* – рисунок 8.9.

Конідієносії довгі, багатоклітинні. Конідії неправильної форми (довгі, круглі чи лимоноподібні), забарвлені у світлий маслиново-зелений колір. Кладоспоріум (*Cladosporium*) – рисунок 8.11.

18. На колоніях, що повільно ростуть, немає справжніх конідієносіїв. Дрібні, блискучі, жовто-коричневі конідії утворюють дуже довгі ланцюжки на кінцях звичайних гіф. Катенуларія (*Catenularia*) – рисунок 8.12..

Великі, багатоклітинні, округло-групієподібні чи загострено-витягнутої форми конідії утворюються поодинокі чи короткими ланцюжками на коротких бокових галузках вегетативних гіф, що відіграють роль конідієносіїв. Альтернарія (*Alternaria*) — рисунок 8.8.

8.4 Висновок: Розглянуті препарати – препарати вищих (нижчих) міцеліальних грибів класів....

Контрольні питання

1. Морфологічні відмінності грибів від інших груп мікроорганізмів.
2. Будова плодового тіла гриба. Особливості будови міцелію.
3. Способи вегетативного розмноження грибів.
4. Способи статевого розмноження грибів.
5. Класифікація грибів.
6. Характеристика нижчих грибів.
7. Будова і значення мукорових грибів.
8. Будова вищих грибів – аскоміцетів, їх практичне значення.
9. Які гриби належать до недосконалих? Їх практичне значення.
10. Роль грибів у зберіганні сировини та харчових продуктів.

Лабораторна робота № 9

Оцінка якості борошна

9.1 Мета: Оцінити якість борошна за кількістю виявлених у ньому спор бактерій.

9.2 Короткі теоретичні відомості

У хлібопекарному виробництві мікроорганізми мають важливе значення. Наприклад, такі мікроорганізми, як дріжджі та молочнокислі бактерії, спеціально використовуються для виготовлення тіста. Інші види мікроорганізмів, які потрапляють у сировину із зовнішнього середовища, можуть знижувати якість сировини, викликати псування готової продукції і бути причиною харчових отруень.

Сировина, яка використовується в хлібопеченні, завжди буває засіяна мікроорганізмами. Так, мікрофлора борошна походить переважно від мікрофлори зерна. Кількісний і якісний склад мікроорганізмів борошна залежить від ступеня зараженості зерна, способу його розмелювання та очистки. Загальна кількість мікроорганізмів у 1 г борошна може доходити до 3 млн. Проте ця цифра міняється залежно від вмісту вологи, тривалості зберігання тощо.

Якість борошна значною мірою визначає вміст у ній неспороносних *Erwina herbicola* і спороносних *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка) та *Bacillus subtilis* (сінна паличка) мікроорганізмів. Картопляна і сінна палички є найпоширенішими збудниками мікробного процесу псування хліба, хвороби, яку ще називають картопляною. Спори цих бактерій дуже термостійкі, завдяки чому вони зберігаються в хлібі під час його випікання. При повільному охолодженні такого хліба, створюються сприятливі умови для проростання спор, що спричинює в ньому гнильні процеси. У цьому випадку м'якуш хліба стає липким і набуває неприємного запаху. Такий хліб не придатний для споживання. Картопляна хвороба найчастіше вражає пшеничний хліб влітку. Пшеничний і житній хліб часто уражується також і так званою крейдянною хворобою, при якій на м'якуші хліба з'являється білий мучнистий наліт. Це міцелій цвільових грибів і дріжджеподібних мікроорганізмів.

На сьогоднішній день борошно із зерна пшениці повинно відповідати вимогам чинних стандартів: ГОСТ 12307-66 "Мука из твердой пшеницы (дурум) для макаронных изделий. Технические условия" та ГСТУ 46.004-99 "Борошно пшеничне. Технічні умови".

9.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покривні скельця; стерильні чашки Петрі та пробірки; мікробіологічні петлі; спиртівки; скляні палички; стерильні колби (100 см³); стерильні піпетки; розплавлене стерильне поживне середовище МПА; розбавлення робити у стерильній водопровідній воді або стерильному 0,5 %-му водному розчині NaCl; пшеничне та житнє борошно.

Для виявлення спор картопляної і сінної паличок розводять досліджуване борошно. Для цього у колбу на 50 см³ стерильної води вносять 5 г борошна (розбавлення 1:10), збовтують 5 хв. і нагрівають у водяній бані при температурі 95-97 °С протягом 10 хв. При цьому вегетативні клітини бактерій гинуть, а спори залишаються живими. При випіканні хліба зберігаються майже всі спори картопляної палички, які залишилися після нагрівання суспензії при 95°С протягом 10 хв. Прогріту суспензію розводять у пробірці зі стерильною водою 1:10 (на 1 см³ суспензії додають 9 см³ стерильної води) при цьому отримують розбавлення 1:100. По 1 см³ суспензій з різним розбавленням (1:10 і 1:100) висівають у чашки. Посіви заливають теплим МПА. Посіви термостатують 2-3 доби при температурі 25-30°С.

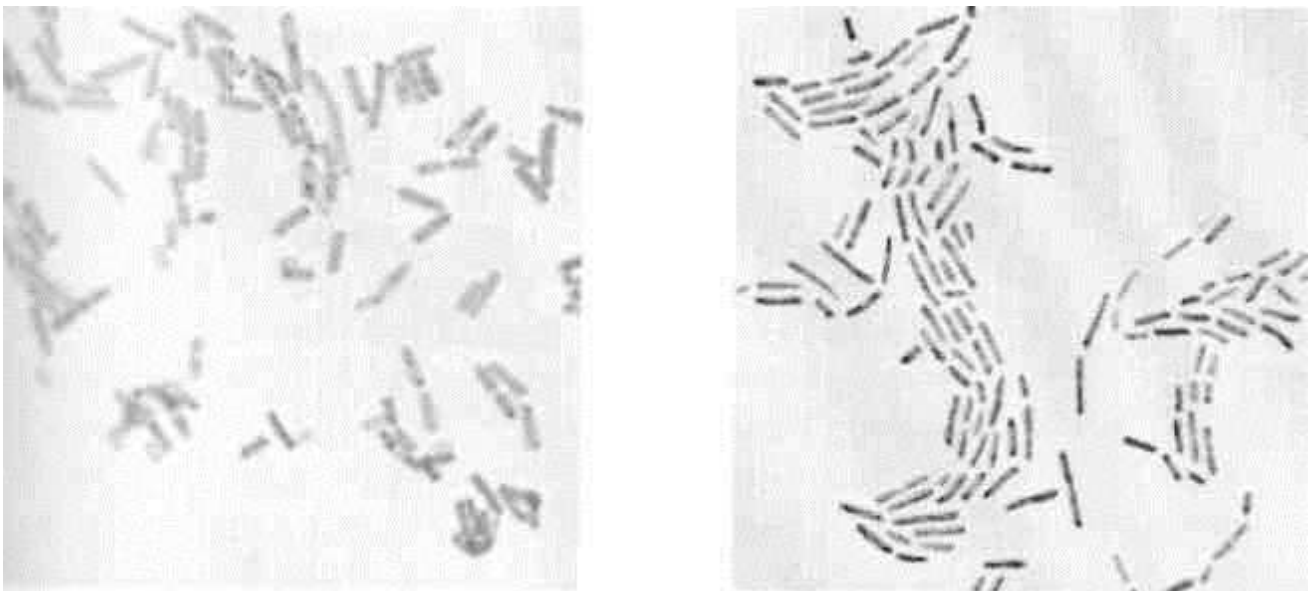
Рід *Bacillus* (рисунки 9.1-9.3) – спороносні паличкоподібні бактерії.

Bacillus subtilis (сінна паличка) утворює безбарвні колонії або сірувато-білі, трохи зморшкуваті або утворює бархатистий наліт, край хвилястий, розгалужений, щільно прилягає до агаризованого середовища (рисунок 9.2). Під мікроскопом бактерії мають вигляд коротких і тонких паличок завдовжки 3-6 мкм. Спори овальні (рисунок 9.1 а).

B. mesentericus (картопляна паличка) утворює колонії зморшкуваті, сірувато-білі, кремові, жовто-бурі, рідко забарвлені у чорний або рожевий колір (рисунок 9.3). Під мікроскопом палички тонкі, довгі або короткі завдовжки 5–10 мкм, поодинокі або з'єднуються у довгі нитки (рисунок 9.1 б). Спори овальні, клітини не роздуті.

По закінченні інкубації оцінити якість борошна. Для цього:

1. Приготувати препарат способом «роздавлена капля» з клітин колоній, які вирости на МПА, і під мікроскопом вивчити морфологічні властивості мікроорганізмів (форма клітин, розмір) та виявити серед них картопляну і сінну палички. Замалювати *Bacillus subtilis* та *Bacillus mesentericus* (рисунок 9.1)



а

б

а – *Bacillus subtilis*; б – *Bacillus mesentericus*

Рисунок 9.1 – *Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus* під мікроскопом

2. Вивчити культуральні ознаки (характер росту культури на МПА, форма колоній) *Bacillus subtilis* та *Bacillus mesentericus* (рисунок 9.2, 9.3). Підрахувати сумарну кількість колоній цих спорових бактерій, які вирости у чашці Петрі при кожному розбавленні (при цьому беруть до уваги, що кожна колонія утворилася з однієї спори) і визначити кількість спор у 1 г борошна (число колоній множать на розведення борошна). Порівняти отримані значення для різних розведень.

При наявності в 1 г борошна до 200 спор якість його вважається нормальною, якщо кількість спор є в межах від 200 до 400 – задовільною, від 400 до 1000 – сумнівною, а понад 1000 – таке борошно непридатне для використання.

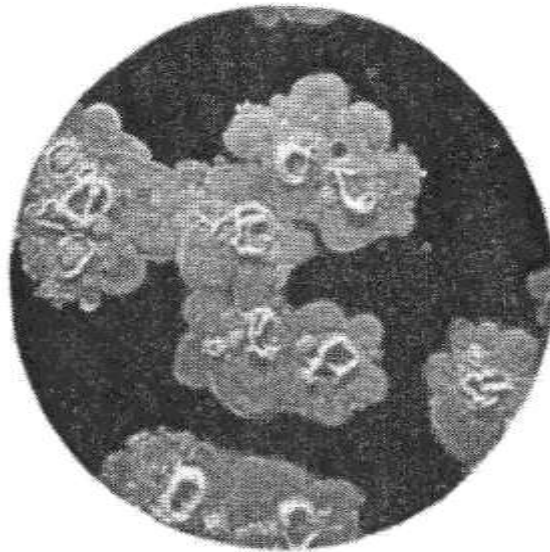


Рисунок 9.2 – Слизово-складчасті колонії сінної палички (*B. subtilis*) на МПА

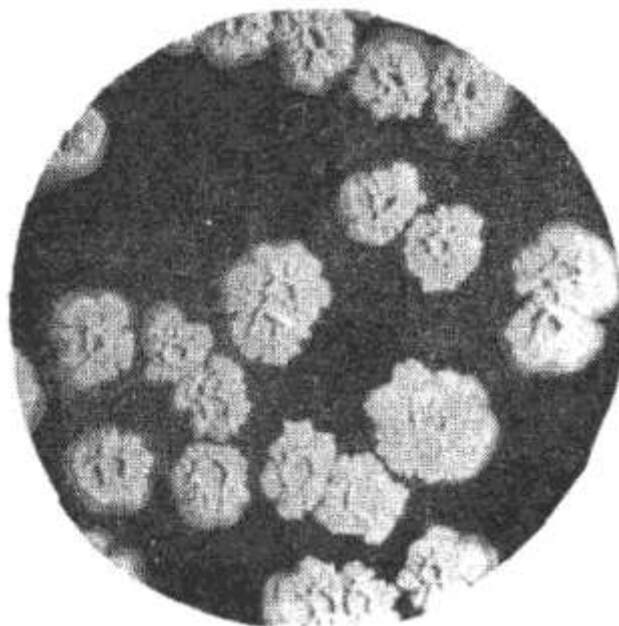


Рисунок 9.3 – Шкірясто-складчасті колонії картопляної палички (*B. mesentericus*) на МПА

9.4 Висновок: у дослідженому зразку борошна виявлені наступні мікроорганізми....За кількістю спор, що містяться у 1 г борошна, якість дослідженого зразка вважається....

Контрольні питання

1. Які мікроорганізми є корисними у хлібопекарському виробництві?
2. Які джерела потрапляння сторонніх мікроорганізмів у напівфабрикати та готову продукцію.
3. Вміст яких мікроорганізмів визначає якість борошна?
4. Чому *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis* не гинуть під час термічної обробки (при випіканні хліба)?
5. Що відбувається з хлібом, який виготовлений з борошна ураженого мікроорганізмами *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis*?
6. Як можна виявити збудника картопляної хвороби у сировині?
7. Як приготувати з 5 г борошна розбавлення 1:10; 1:100; 1:1000?
8. На якому середовищі можна робити посіви для виявлення *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis*?
9. Чи відрізняються зовні колонії *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis*?
10. При якому вмісті спор у 1 г борошна, якість його вважається нормальною?

Лабораторна робота № 10

Мікробіологія сирого і пастеризованого молока.

Мікробіологія майонезу

10.1 Мета: визначити загальну кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ) у сирому та пастеризованому молоці; визначити загальне мікробне число майонезу та експрес методом перевірити наявність умовно-патогенних мікроорганізмів у запропонованому зразку майонезу.

10.2 Короткі теоретичні відомості

Відбір проб

Відбір проб від рідинного або пастоподібного продукту (молоко, молоко сквашене, закваска рідка, цукровий сироп, вода тощо). З ємкості місткістю до 1000 см³ пробу відбирають піпеткою або металевим черпаком. Перед відбором проби вміст ємкості ретельно перемішують. З ємкості місткістю більше 1000 см³ ізольовані проби відбирають в один посуд з різної глибини не менше, ніж з трьох шарів продукту або після ретельного перемішування усього вмісту ємкості. При відборі проб із резервуару з краном, кран спочатку промивають водою, протирають тампоном, змоченим етиловим спиртом з масовою часткою 70 %, та обпалюють в полум'ї пальника, потім випускають від 10 см³ до 100 см³ рідини (в залежності від місткості резервуару та діаметру крану) і тільки після цього відбирають пробу в посуд таким чином, щоб кількість рідини, яка необхідна, потрапляла безпосередньо в посуд. Об'єм проби продукту приблизно 200 см³ води – 1500 см³

Відбір проб від сипучих продуктів (молоко сухе, ячні продукти, цукор тощо). Пробу відбирають після ретельного перемішування продукту мішалкою

або черпаком. Якщо продукт не може бути перемішаний (наприклад, мішок цукру), то проби відбирають шляхом взяття ізольованих проб з річних місць, різної глибини, а також, з поверхневих шарів, які контактують з тарою, в один посуд.

Відбір проб від готової продукції (маргарин та майонез). Відбір проб готової фасованої продукції проводять від декількох одиниць фасування (не менше двох - трьох) від кожної однорідної партії. Потім від кожного зразка відбирають приблизно по 50 г продукту в один посуд для одержання середньої проби. Проби від фасованої продукції масою до 1000г (маргарин, майонез) відбирають шляхом взяття ізольованих проб з різних місць пакувальної тари, а також з поверхневих шарів, які контактують з пакувальним матеріалом, в один посуд. Відбір проби проводять шпателем, ложкою тощо.

Підготовка проб до аналізу. Розкриття упаковки з пробою продукту проводять в асептичних умовах таким чином, щоб запобігти можливості забруднення продукту, навколишніх предметів та середовища. Відібрані проби перед дослідженням ретельно перемішують. Перед відкриттям пакувальної тари (банок, пакетів) з продуктом кришку банки або поверхню пакетів протирають тампоном, змоченим етиловим спиртом з масовою часткою 95%. Банку розкривають стерильним консервним ножом, її шийку обпалюють. Край пакету розрізають стерильним скальпелем або ножицями у тому місці, де попередньо обробили тампоном. Проби жирових продуктів (маргарину, масла) перед відбором з них наважок розтоплюють на водяній бані за температури не вище 45 °С

Відбір наважок. З кожної проби продукту залежно від показників, які визначають, відбирають одну або декілька наважок для приготування розведень та висіву на поживні середовища. Наважку для посіву відбирають ваговим або об'ємним методом безпосередньо після розкриття проби продукту біля полум'я пальника. Наважки від проби рідких та в'язких продуктів відбирають після їх ретельного перемішування об'ємним методом стерильною піпеткою. Частина рідкого продукту, яка залишилась на поверхні піпетки, залишають стекти до кінця піпетки. Краплинку, що утворилась, видаляють доторканням до внутрішньої стінки посуду. В'язкі продукти усувають з поверхні піпетки стерильним ватним тампоном. Наважку від проб рідких жирів відбирають теплою піпеткою, яка нагріта фламбуванням. Наважку від проб твердих та сипких продуктів (ячні продукти, сухе молоко, спеції та прянощі тощо) проводять стерильною ложкою або шпателем з різних місць продукту. Потім наважку переносять в попередньо зважений стерильний посуд, зважують.

Приготування розведень. Для приготування розведень використовують різні розчинники в залежності від продукту – фізіологічний розчин, пептонно - сольовий розчин і стерильну очищену (дистильовану) воду. Для обліку кількості мезофільних аеробних та факультативно-аеробних організмів (зустрічається скорочення КМАФАкМ або МАФАМ) продукт, який досліджують, розводять у 10, 100, 1000 разів і більше в залежності від обсіменіння, що передбачається (1×10^{-1} ; 1×10^{-2} ; 1×10^{-3} ; 1×10^{-4}). Для

встановлення відсутності бактерій групи кишкових паличок у певній кількості продукту готують те розведення, в якому і визначається ця група бактерій. Для виявлення пліснявих грибів продукт не розводять або розводять у 10 та 100 разів (1×10^{-1} ; 1×10^{-2}). Вихідне або основне розведення містить в 1 см^3 0,1 г продукту (1×10^{-1}). Його отримали перенесенням наважки 10 г (см^3) продукту в приготовлений розчин для розведення (колба з 90 см^3 відповідного розчину). Стерильною піпеткою ретельно перемішують вміст основного розведення і переносять 1 см^3 його у пробірку з 9 см^3 розчинника так, щоб піпетка не торкалася розчину. Одержують таким чином друге розведення, 1 см^3 якого вміщує 0,01 г (см^3) продукту – розведення (1×10^{-2}). Вміст пробірки другого розведення перемішують новою стерильною піпеткою, відбирають 1 см^3 і вносять у пробірку з 9 см^3 розчинника так, щоб піпетка не торкалася поверхні розчину. Перемішують новою стерильною піпеткою. Третє розведення містить 0,001 г (см^3) продукту в 1 см^3 (1×10^{-3}). Наступні розведення готують аналогічним способом. Пробу від нефасованого майонезу відбирають піпеткою в один посуд ізольованими пробами з різної глибини не менше, ніж з трьох шарів продукту або черпаком після ретельного перемішування.

Для висіву в поживні середовища використовують розбавлення наважки, що дозволяють одержати в чашці Петрі від 30 до 300 колоній. Кількість специфічних мікроорганізмів має бути менша: наприклад, стафілококів від 15 до 150 колоній, пліснявих грибів від 5 до 50 колоній.

Посів можна робити або в глибину, або на поверхню поживного середовища. Посів у глибину виконується перенесенням 1 см^3 рідини з відповідного розбавлення в стерильну чашку Петрі, що заливається розплавленим і охолодженим до $45 \text{ }^\circ\text{C}$ поживним середовищем ($15\text{-}20 \text{ см}^3$) і ретельно перемішується круговими рухами.

Посів на поверхню щільного поживного середовища здійснюється шляхом перенесення $0,1\text{-}0,2 \text{ см}^3$ рідини з відповідного розбавлення і розтиранням відразу ж досуха стерильним скляним шпателем по поверхні всього середовища.

Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів КМАФАнМ поширюється на харчові продукти, що містять у 1 г 300 і більше або в 1 см^3 30 і більше мікроорганізмів, і встановлює порядок визначення життєздатних клітин мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

Метод заснований на посіві визначеної кількості продукту або його розбавлень в агаризоване поживне середовище, культивуванні посівів в аеробних умовах при $30 \text{ }^\circ\text{C}$ впродовж 72 год, підрахунку всіх вирослих видимих колоній мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів і перерахуванні їхньої кількості на $1 \text{ г} (\text{см}^3)$ продукту.

Маса (об'єм) наважки, призначеної для готування вихідного розбавлення, має становити не менше $10 \text{ г} (\text{см}^3)$, а призначеної для безпосереднього висіву в поживні середовища – не менше $1 \text{ г} (\text{см}^3)$.

З наважки продукту готують вихідне і ряд десятикратних розбавлень. По

1 см³ продукту і/або його розбавлення висівають одночасно в дві стерильні чашки Петрі. У кожену чашку Петрі, що містить інокулюм, додають не пізніше ніж через 15 хв розплавлене й охолоджене до 45 °С агаризоване поживне середовище (МПА чи МПА з глюкозою). Середовище негайно і рівномірно перемішують з посівним матеріалом і залишають для застигання в горизонтальному положенні.

Після застигання агаризованого середовища посіви інкубують, поставивши чашки дном догори, при 30 °С впродовж 72 год.

Результати оцінюють для кожної проби окремо. На чашках, де виросло від 30 до 300 колоній, підраховують усі колонії, підсумовують і знаходять середнє арифметичне. Підрахувати колонії можна за допомогою лупи з п'ятикратним збільшенням. Отримане середнє арифметичне число колоній округлюють:

- якщо менше 100, його округлюють до найближчого числа, що ділиться на 5;
- якщо більше 100 і його остання цифра 5, округлюють до найближчого числа, що ділиться на 20;
- якщо більше 100 і його остання цифра не 5, округлюють до найближчого числа, що ділиться на 10.

Кількість мікроорганізмів у 1 г (см³) продукту обчислюють множенням округленого середнього арифметичного числа колоній на розбавлення наважки і діленням на кількість внесеного посівного матеріалу (маса, обсяг) у чашку. Наприклад, округлене середнє арифметичне числа колоній із двох чашок, засіяних по 1 см³ з 1:1000 або 10⁻³ розбавлення, дорівнювало 220. Загальна кількість мікроорганізмів у 1 г продукту буде дорівнювати

$$(220 \cdot 1000)/1 = 220\,000.$$

Загальну кількість мікроорганізмів записують у вигляді числа: (від 1 до 9,9)·10.

Наприклад, 220 000 клітин у 1 г записують як $2,2 \cdot 10^5$ КУО/г.

Молоко є одним із самих корисних і цінних продуктів харчування людини. За харчовою цінністю воно може замінити будь-який продукт, але жоден продукт не замінить молока. З глибокої давнини молоко використовувалося в лікувальних цілях. «Джерелом здоров'я», «білою кров'ю» називали молоко древні філософи.

Свіжовидоєне молоко здорової корови стерильне; рН свіжого молока 6,8. Однак у вивідних протоках молочних залоз корови нерідко зустрічаються різноманітні бактерії переважно представники родин: *Micrococcaceae*, *Bacillaceae*, *Escherichia*, *Corinebacterium*, *Lactobacillaceae*, тому в перших порціях молока часто є ці мікроорганізми. Ці порції треба виливати.

Мікроорганізми в молоко потрапляють з різних джерел: з посуду, із ґрунту, з повітря, з вимені корови, з рук доярок. Сукупність цих мікроорганізмів (дріжджі, гриби, різноманітні бактерії) і становить так звану спонтанну мікрофлору молока.

Присутність непатогенних бактерій звичайно не має великого значення,

якщо тільки не спричиняє тих або інших змін молока:

- консистенції: так зване «тягнуче» молоко – результат діяльності бактерії *Alcaligenes viscolactis*;
- кольору: синє молоко – результат діяльності бактерії *Pseudomonas synchyanea*, червоне молоко – результат діяльності бактерії *Serratia marcescens*.

Спонтанну мікрофлору розглядають як показник свіжості та санітарного стану молока. Мікрофлору молока можна звести до мінімуму при строгому контролі за санітарним станом молочного господарства, швидкому охолодженні та пастеризації молока.

Мікроорганізми, що потрапили в молоко, спочатку не розмножуються, тому що у свіжевидоєному молоці є специфічні бактерицидні речовини, наприклад, лактеніни, що затримують їхній ріст. Розвиток мікроорганізмів у молоці проходить кілька фаз:

- бактерицидна фаза – це час, впродовж якого мікроорганізми не розвиваються у свіжевидоєному молоці і навіть частково відмирають у результаті комплексної дії лактенінів, лакто-пероксидази, лізоциму й антитіл;
- фаза змішаної мікрофлори, під час якої розвиваються усі мікроорганізми, що потрапили в молоко;
- фаза молочнокислих мікроорганізмів, під час якої істотно зростає кислотність молока і перевагу отримують молочнокислі бактерії. Надалі, з підвищенням кислотності, молочнокислі бактерії сповільнюють темп свого розвитку, а інші групи мікроорганізмів поступово відмирають;
- фаза розвитку дріжджів, грибів і гнильних бактерій. Молочна кислота, яка нагромаджується, призводить до загибелі молочнокислих бактерій, завдяки чому створюються сприятливі умови для розвитку кислотостійких дріжджів, мікроміцетів та гнильних бактерій, що руйнують білки молока.

Через молоко можуть передаватися збудники багатьох інфекційних захворювань, які потрапляють у нього від хворих тварин, людей і бактеріоносіїв, а також з довкілля. Молоко є надзвичайно багатим на поживні сполуки середовищем для багатьох мікроорганізмів, у тому числі і патогенних.

У молоці ці мікроорганізми не тільки довго зберігаються, але й активно розмножуються (збудники тифо-паратифозних захворювань, дизентерії, бруцельозу). Стафілококи, розвиваючись, синтезують екзотоксин, що спричиняє важке харчове отруєння. Тому санітарно-гігієнічному стану молока повинна приділятися особлива увага.

Відповідно до вимог ДСТУ 2661-94 у молоці для оцінки санітарно-гігієнічного стану визначають такі мікробіологічні показники: КМАФАнМ, БГКП, патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели. Кількість останніх не допускається у 25 см³ продукту, золотавого стафілококу – у 0,1 см³, лістерій – у 25 см³.

За вмістом КМАФАнМ визначається ступінь загального забруднення молока мікрофлорою, що дає змогу оцінити його якість як сировини.

Майонез є висококалорійним харчовим продуктом, до складу якого входять рослинне масло (найчастіше рафінована і дезодорована соняшникова олія), сухе молоко, яєчний порошок, гірчичний порошок, оцтова кислота, цукор, сіль і смакові ароматичні добавки.

У виробництві майонезу не використовуються промислово корисні мікроорганізми. У цьому продукті може знаходитися тільки виробничо шкідлива мікрофлора, привнесена в продукт разом із залишковою мікрофлорою компонентів майонезу, а також з поверхні обладнання.

Із сировиною у виробництво майонезу можуть потрапити мікроорганізми, що розщеплюють білки, вуглеводи, жири. Це бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, дріжджі *Candida*, *Lipolitica* і гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium* та ін. Розвиваючись в майонезі ці мікроорганізми можуть викликати його псування.

Видами псування майонезу є:

- газотворення – викликається гетеро ферментативними молочнокислими бактеріями та дріжджами;
- бомбаж – викликається бактеріями роду *Clostridium* і дріжджами;
- гіркий смак - викликається гнильними бактеріями, що розкладають білок.

Основним компонентом майонезу, що впливає на розвиток у ньому мікроорганізмів є оцтова кислота, при додаванні якої активна кислотність майонезу знижується до 4,0-4,4 од рН. Це значення рН призводить до уповільнення розвитку і загибелі гнильних бактерій, а також бактерій кишкової групи.

Мікробіологічний контроль виробництва майонезу включає контроль сировини, готової продукції та контроль санітарно-гігієнічних умов виробництва.

При проведенні мікробіологічних досліджень визначають: загальне мікробне число в 1 г виробу, характер мікрофлори, БГКП, кількість дріжджів та грибів.

Для майонезу МАФАМ не досліджується. Вміст дріжджів не повинен перевищувати 1 000 в 1 г (см³), грибів – 10 в 1 г(см³), БГКП – 0,01 г(см³).

Визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів. Метод заснований на кількісному підрахунку числа колоній дріжджів та пліснявих грибів, які вирости на щільному поживному середовищі за температури (24±1)°С протягом 5 діб. Для визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів з кожної проби роблять посів по 1 г (см³) нативного продукту і розведення 1 x 10⁻¹ або по 1 см³ з розведень 1 x 10⁻¹ та 1 x 10⁻² на дві чашки Петрі (паралельний висів). В кожному чашку Петрі з попередньо промаркованою кришкою додають не пізніше як через 15-20 хвилин приблизно 15 см³ агаризованого поживного середовища, попередньо розтопленого і охолодженого до температури 40-45°С, обережними

обертами ретельно перемішують; залишають до застигання. Чашки з посівами витримують у термостаті за температурою 24 ± 1 °С протягом 5 діб з попереднім підрахунком через 3 доби. Посіви можна витримувати за кімнатної температури (не менше ніж 20°C).

10.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: приготувати для заняття молоко пастеризоване (розфасовані продукти для аналізу мають бути представлені в оригінальній упаковці), сире молоко (відбирається в стерильний посуд), майонез, стерильний посуд (піпетки на 1 см³, колби 100-200 см³); поживне середовище МПА, Ендо, Сабуро; термостат; чашки Петрі; спиртівки; розчин для приготування розбавлення.

10.3.1 Визначення КМАФАнМ

10.3.3.1 Відібрати проби молочних продуктів.

10.3.3.2 Зробити посів на визначення КМАФАнМ.

Кількість продукту, що засівається, встановлюється з урахуванням найбільш ймовірного мікробного обнасінення (таблиця 10.1).

Таблиця 10.1 – Об'єми продукту для посіву при визначенні КМАФАнМ

Найменування продукту	Об'єм, що засівається, см ³		
Молоко і вершки сирі	0,0001	0,00001	0,000001
Молоко і вершки пастеризовані	0,1	0,01	0,001

Із кожної проби роблять посів у дві-три чашки з розбавлень, зазначених у таблиці 10.1.

Приготування розведень.

Розбавлення роблять у стерильній водопровідній воді або стерильному 0,5%-му водному розчині NaCl. У процесі одного досліду користуються постійним коефіцієнтом розбавлення, найчастіше – десятковим. Отримують вихідне розведення. Для цього 10 см³ молока переносять у стерильну колбу і додають 90 см³ розчину для розведення. Потім отримують друге, третє та ін. розведення. Для цього стерильний розчин для розведення розливають стерильною піпеткою по 9 см³ у стерильні сухі пробірки, потім переносять стерильною піпеткою 1 см³ основного розведення в пробірку з 9 см³ стерильного розчину для розведення. Отримують розбавлення 1:10 (рисунок 10.1). Суспензію одержаного розбавлення ретельно перемішують за допомогою стерильної піпетки, вбираючи в піпетку і випускаючи з неї отриману завись. Цю процедуру повторити 3-5 разів, що дає можливість перемішувати суспензію і зменшити адсорбцію клітин на її стінках. Потім цією самою піпеткою 1 см³ одержаного розбавлення переносять у другу пробірку (це розбавлення 1:10²), з другої – в третю (1:10³) і т.д.

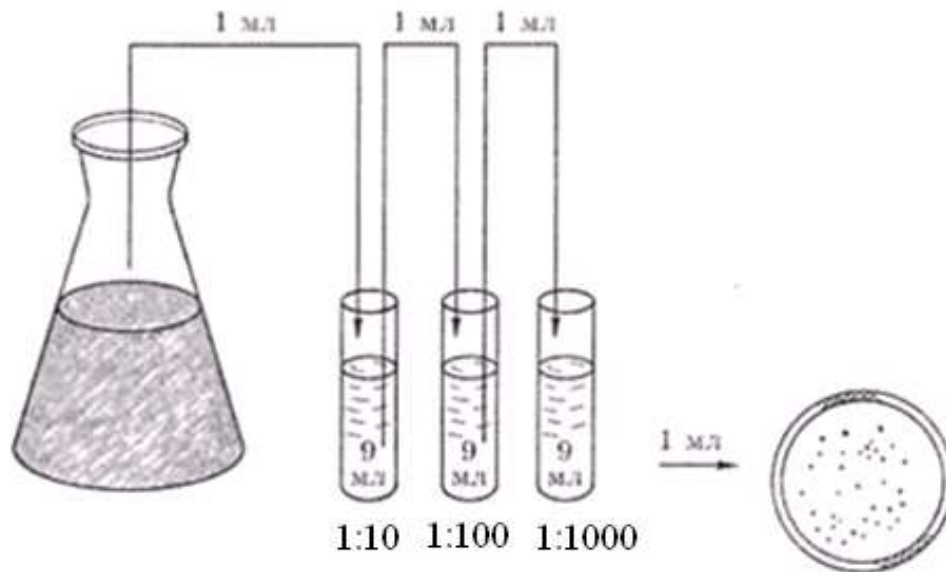


Рисунок 10.1 – Схема приготування розбавлень мікроорганізмів і посіву

Кожне з розбавлень має бути засіяне в кількості 1 см³ у одну чашку Петрі і залите поживним середовищем, що використовується для визначення КМАФАнМ у молоці і молочних продуктах, розплавленим й охолодженим до 40-45 °С. Після заливання агаризованого середовища вміст чашки Петрі ретельно перемішують легким обертальним погойдуванням для рівномірного розподілу посіяного матеріалу. Після застигання агару чашки Петрі перевертають кришками донизу і ставлять у термостат з температурою 30 °С на 72 год.

10.3.3.3 На наступному занятті проаналізувати посіви. Підрахувати всі результати. Отримані результати занести в таблиці. Результати порівняти з нормативними показниками за ДСТУ.

Кількість вирослих колоній підраховують на кожній чашці. Загальну кількість бактерій, виражену у колонієутворюючих одиницях (КУО) в 1 см³ досліджуваної проби, обчислюють за формулою:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)} d,$$

де $\sum C$ – сума колоній, підрахована на чашках Петрі; n_1 – кількість чашок з першим розведенням; n_2 – кількість чашок з другим розведенням; d – коефіцієнт найнижчого розведення.

Результат підрахунку виражають двома значущими цифрами. Якщо цифрою, яку округлюють, є п'ять, то парну цифру, що стоїть зліва, залишають такою самою (34,5 → 34), а непарну – округлюють до парної (33,5 → 34).

Приклад.

Розведення 10^{-2} : 278 та 290 колоній;

розведення 10^{-3} : 33 та 28 колоній.

$$\text{КУО/см}^3 = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \cdot 2)10^2} = \frac{629}{0,022} = 2,9 \cdot 10^4$$

Результати заносять у таблицю 10.2.

Таблиця 10.2 – Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів у молоці та молочних продуктах

Найменування продукту	Норматив, КУО/см ³	Результати, КУО/см ³	Висновок
Молоко гатунку:			
екстра	$<1 \cdot 10^6$		
вищого	$<3 \cdot 10^6$		
першого	$<5 \cdot 10^6$		
Молоко пастеризоване:			
у пляшках і в пакетах	$1 \cdot 10^5$		
у флягах і у цистернах	$2 \cdot 10^5$		

10.3.4 Визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів у майонезі

10.3.4.1 Для визначення кількості дріжджів та пліснявих грибів у пробі майонезу необхідно зробити розведення 1:10 та 1:100. Для цього відважують на терезах 1 г майонезу. Терези розміщують біля полум'я спиртівки. На терези ставлять стерильний посуд і відважують у нього 1 г майонезу з упаковки, тримаючи пакет біля полум'я спиртівки. При приготуванні розведення 1 : 10 необхідно 9 см³ рідини для розведення внести стерильною піпеткою у посуд, де міститься 1 г майонезу, та ретельно перемішати. Потім приготувати друге розведення 1:100, як це описано у попередньому досліді при приготуванні розведення молока. На кожне розведення роблять два паралельні висіви у чашки Петрі.

10.3.4.2 В кожну чашку Петрі з попередньо промаркованою кришкою не пізніше, як через 15-20 хвилин після внесення проб з розведень 1:10 та 1:100, додають приблизно 15 см³ середовища Сабуро, охолодженого до температури 40-45°C, обережними обертами ретельно перемішують; залишають до застигання. Чашки з посівами витримують у термостаті за температурою 24±1°C протягом 5 діб з попереднім підрахунком через 3 доби. Посіви можна витримувати за кімнатної температури (не менше ніж 20°C).

10.3.4.3 На наступному занятті проаналізувати посіви.

Для кількісного підрахунку відбирають чашки, на яких виросла від 15 до 150 колоній дріжджів та (або) від 5 до 50 колоній пліснявих грибів. Колонії дріжджів на середовищі мають білувато-жовтий колір, слизьку консистенцію. В

процесі зростання та збільшення розмірів колонії набувають перламутрового відтінку та куполоподібного підвищення. Розвиток плісняви супроводжується появою пухнастого павутиноподібного чи валоподібного утворення на поверхні середовища. Колір різноманітний. Кількість колоній дріжджів та пліснявих грибів підраховують окремо на кожній чашці. Обчислюють середнє арифметичне число колоній, які виростили на чашках. Результати обробляють і перераховують окремо для дріжджів та пліснявих грибів.

Кількість колоній дріжджів та пліснявих грибів в 1 см³ або в 1 г продукту (X) в КУО обчислюють за формулою:

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

де n – середнє арифметичне число колоній;

m – число десятикратних розведень.

Остаточним підрахунком є середнє арифметичне результатів, які обчислили за паралельними чашками. Результат заносять у таблицю 10.3.

Таблиця 10.3 – Кількість дріжджів та пліснявих грибів у майонезі

Найменування продукту	Норматив дріжджів, КУО/см ³	Результат, КУО/см ³	Норматив грибів, КУО/см ³	Результат, КУО/см ³
Майонез	<1 · 10 ³		<10	

10.3.5 Визначення коліформних бактерій (БГКП)

10.3.5.1 Для посіву використовують ту кількість продукту, в якій передбачається відсутність коліформних бактерій. По 1 см³ розведень майонезу 1:100 засівають у пробірки з 5 см³ середовища Кесслера з лактозою та поплавками. Посіви поміщають у термостат при 37⁰С на 24-48 год.

10.3.5.2 На наступному заняття проаналізувати посіви. Якщо протягом зазначеного часу в пробірках не з'явилося ознак газоутворення (поплавки почнуть підійматися, з'явиться помутніння) продукт вважають не забрудненим БГКП (рисунок 10.2). При виявленні пробірок з газоутворенням проводять подальшу ідентифікацію БГКП. З цією метою з таких пробірок за допомогою бактеріологічної петлі роблять посів на чашки з середовищем Ендо. Чашки поміщають у термостат при температурі 37⁰С на 18-24 год. При наявності росту темно – червоних з металевим блиском чи без нього червоних або рожево – червоних колоній за характером росту типових для коліформних бактерій (округлі, плоскі чи злегка випуклі або з піднятим центром, блискучі, легко знімаються з агару) з ознаками редукції (червоний відбиток під колонією та червоною зоною навколо колонії) на всі види колоній ставлять оксидазний тест та роблять мікроскопію. При виявленні грамнегативних оксидазанегативних паличок видається позитивний результат – в засіяному об'ємі продукції виявлені Коліформні бактерії.



Рисунок 10.2 – Проба на бактерії групи кишкової палички.

Реактиви для визначення цитохромоксидази (оксидазний тест).

Склад:

Розчин А: спирт етиловий з масовою часткою 95% – 100 см³, α-нафтол – 1 г.

Розчин Б: диметил-п-фенілендіамін гідрохлорид – 1 г.

Вода очищена (дистильована) – 100 см³.

Розчин А зберігається в холодильнику до 10 діб.

Розчин Б – використовується свіжого приготування.

Доцільно використовувати для визначення цитохромоксидази комерційні препарати згідно з інструкцією, що додається до препарату.

Постановка оксидазного тесту. По 2-3 ізольованих колоній кожного типу, які вирости на середовищі ЕНДО, знімають петлею або скляною паличкою і наносять штрихом на фільтрувальний папір, який змочений реактивом (2-3 краплі кожного реактиву). В місці нанесення бактеріальної маси папір не змінює кольору, якщо оксидазний тест негативний, і синіє протягом однієї хвилини, якщо бактерії мають активну оксидазу.

При виявленні безбарвних прозорих колоній на чашках з середовищем ЕНДО підозрілих на патогенні бактерії ці чашки повинні передаватися в лабораторії санітарно – епідеміологічних станцій для подальшої ідентифікації.

10.4 Висновок: КМАФАнМ у дослідженій пробі сирого молока складає...., норматив – ...; пастеризованого молока –..., норматив – Досліджене молоко за КМАФАнМ.... до вжитку.

Вміст дріжджів у дослідженій пробі майонезу..., норматив –...; вміст пліснявих грибів у пробі майонезу..., норматив –... Проба на вміст бактерій групи кишкової палички ... Досліджений майонез...

Контрольні питання

1. Як відбирають пробу продукції для мікробіологічного аналізу?
2. Як готують розведення твердих та рідких продуктів для посіву?
3. На які продукти поширюється визначення КМАФАнМ?
4. На чому заснований метод визначення КМАФАнМ?
5. Які особливості свіжовидоєного молока?
6. Як і звідки потрапляють мікроорганізми в молоко, майонез?
7. Що таке спонтанна мікрофлора молока?
8. Як змінюється мікрофлора молока у процесі зберігання?
9. Які мікробіологічні показники і чому потрібно визначати у молоці, майонезі?
10. Що дає змогу оцінити визначення КМАФАнМ у молоці?

Лабораторна робота № 11

Санітарно-гігієнічний контроль умов виробництва

11.1 Мета: ознайомитись із організацією санітарно-гігієнічного контролю на підприємствах харчової промисловості. Оволодіти мікробіологічними методами оцінки санітарного стану обладнання, тари, пакувальних і допоміжних матеріалів, рук та спецодягу робітників.

11.2 Короткі теоретичні відомості

Санітарно-гігієнічний контроль умов виробництва здійснюється:

- ✓ контрольно-виробничими лабораторіями підприємства, які виробляють продукти харчування;
- ✓ закладами державної санітарно-епідеміологічної служби України, які здійснюють державний санітарно-епідеміологічний нагляд;
- ✓ іншими організаціями, уповноваженими здійснювати державний контроль за якістю харчової продукції.

Під час санітарно-гігієнічного контролю оцінюється санітарний стан обладнання та інвентарю, пакувальної тари, рук та спецодягу працівників, промивних вод, питної води, повітря виробничих приміщень.

Методика взяття змивів з обладнання та інвентарю

Змиви беруть стерильними ватними або марлевими тампонами. Тампони ватні або марлеві для змивів стерилізують загорнутими у папір. Тампон може бути закріплений на дроті, який проходить через ватну пробку. В цьому разі його разом з пробкою вставляють в пробірку з 5 см³ фізіологічного розчину або пептонно-сольового розчину (тампон не повинен торкатися розчину) і все разом стерилізують при температурі (121±1)°С протягом (20±1) хвилин. Безпосередньо перед взяттям змиву тампон зволожують пептонно-сольовим розчином або фізіологічним розчином, які розлиті по 5 см³ у стерильні пробірки.

Фізіологічний розчин хлористого натрію з масовою часткою 0,85 %. Для приготування фізіологічного розчину з рН (6,9-7,0) використовують очищену (дистильовану) воду, рН підготовленої води перевіряють за допомогою рН-метра. В 1000 см³ води розчиняють 8,5 г хлористого натрію, розливають розчин у чисті пробірки діаметром (18-20) мм по 10 см³, в колби – по 93 см³, і стерилізують за температури (121 ± 1) °С протягом (15-20) хвилин. Після стерилізації в пробірках повинно залишитися 9 см³ розчину хлористого натрію, у колбах – 90 см³, (кількість, яка необхідна для приготування розведень з продукту).

Стерильна очищена (дистильована) вода. Очищену (дистильовану) воду розливають у колби або пробірки в необхідних кількостях і стерилізують за температури (121 ± 1) °С протягом 20 хвилин.

Пептонно – сольовий розчин (ПСР). 8,5г хлористого натрію та 1,0г пептону розчиняють в 1000 см³ очищеної (дистильованої) води при повільному нагріванні. Одержаний розчин розливають у колби і пробірки і стерилізують при температурі (121±1) °С протягом (20-30) хвилин.

Після взяття змивів тампон поміщають у ту ж пробірку, з якої проводили зволоження. Пробірки з тампоном ретельно струшують.

При контролі жирної поверхні використовують сухі тампони.

Змиви з великого обладнання і інвентарю беруть з поверхні 100 см² в різних місцях або за допомогою трафарету (розмір трафарету 10 см x 10 см).

Змиви з невеликих предметів беруть шляхом обробки тампоном всієї робочої поверхні, при цьому одним тампоном протирають не менше трьох однойменних предметів.

При дослідженні трубопроводів, насосів допускається використання для аналізу останніх порцій промивної води.

Методика взяття змивів з пакувальної тари (банок, кришок, пергаменту, коробок тощо)

Взяття змивів з банок та іншої пакувальної тари (коробочок, стаканчиків)

Спосіб 1

Для аналізу відбирають вибірково з конвеєру 10 скляних банок або іншої пакувальної тари (коробочок, стаканчиків), тампон зволожують пептонно-сольовим або фізіологічним розчином і послідовно протирають відібрану

пакувальну тару. Після взяття змивів тампон поміщають у ту ж саму пробірку, з якої проводили зволоження.

Спосіб 2

Для аналізу відбирають з конвеєру вибірково 10 банок з партії. В першу заливають – 15см³ фізіологічного або пептонно-сольового розчину, держать над полум'ям пальника під кутом 135°, щоб не потрапила мікрофлора із повітря. Обертанням банки змочується розчином вся її внутрішня поверхня, змивний розчин зливається в наступну банку. Таким чином однією порцією розчину обмивають усі 10 банок. З останньої банки змивний розчин засівають у середовище Кесслер.

Взяття змивів з кришок банок та полімерних стаканів

Змив проводять стерильним тампоном з внутрішньої поверхні 10 кришок.

Взяття змивів з пергаменту, підпергаменту, полімерної плівки, кашированої фольги, картонних заготівок

Для визначення чистоти матеріалів розгортають досліджуваний рулон або заготівку і з середини беруть змив стерильним тампоном. Із площі 100 см². Потім тампон поміщають у пробірку з 5 см³ фізіологічного або пептонно-сольового розчину таким чином, щоб він занурився повністю в розчин.

Методика взяття змивів з рук робітників

Змиви беруть у робітників, які контактують безпосередньо з продуктом. Змиви відбирають без попередження перед початком роботи, а також після відвідування туалету. Змиви з рук беруть зволеним тампоном (опис тампонів дивись вище), яким проводять не менше 5 разів по долонях та пальцях. Потім протирають дільниці між пальцями, нігтями та під нігтьовим простором.

Методика взяття змивів з спецодягу

Для взяття змивів з спецодягу протирають тампоном чотири площі по 25см³ з нижньої частини кожного рукава і передньої частини поверхні спецодягу.

Методика дослідження змивів та промивних вод

У разі необхідності дослідження змивів на визначення загальної кількості аеробних, факультативно-анаеробних мікроорганізмів беруть стерильною піпеткою 1 см³ змивної рідини і переносять на чашки Петрі. Після заливання агаризованого середовища вміст чашки Петрі ретельно перемішують легким обертальним погойдуванням для рівномірного розподілу посіяного матеріалу. Після застигання агару чашки Петрі перевертають кришками донизу і ставлять у термостат з температурою 30 °С на 72 год. Після закінчення інкубації підраховують всі результати (див. п.10.3.3.3).

Для виявлення бактерій групи кишкових паличок в розлите у пробірці по 5см³ поживне середовище (Кесслер або КОДА) асептично переносять залишки змивної рідини разом з тампоном.

Для дослідження змивів допускається використання середовища КОДА. При дослідженні харчових продуктів на БГКП допускається використання лише середовища Кесслера.

Промивні води з трубопроводів в кількості приблизно 10см³ вносять у колбу (40-50) см³ з середовищем Кесслер або КОДА. Вміст пробірки або колби добре струшують, щоб перемішати середовище з посівним матеріалом, після чого посіви інкубують у термостаті (24-48) годин за температури (37±1) °С. Подальше дослідження проводять згідно п. 10.3.5.

Треба контролювати, щоб рН змивів не було менше (7,0±0,1), бо кисла, реакція може змінити колір середовища КОДА.

Дослідження питної води

Відбір проб води, зберігання і проведення досліджень виконують згідно з ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно - бактериологического контроля". Оцінка результатів досліджень питної води централізованого водопостачання згідно з ГОСТ 2874-82 "Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством".

Дослідження повітря виробничих приміщень

Проби повітря відбирають у виробничих приміщеннях перед початком роботи. Вікна, квартирки та двері повинні бути зачинені. Рівень висоти відбору проб повинен відповідати висоті робочого столу або висоті обладнання.

Проби повітря відбирають аспіраційним методом за допомогою апарату для бактеріологічного аналізу повітря. Для визначення загальної кількості бактерій відбирають 100 дм³ повітря на поживний агар, розлитий у чашки Петрі по 15см³.

Санітарно-мікробіологічний контроль на підприємствах харчової промисловості проводять згідно інструкції затвердженої для відповідного напрямку виробництва (наприклад, виробництва майонезу, консервів тощо).

Результати санітарно-мікробіологічного контролю заносяться у відповідні журнали. Лабораторні журнали повинні бути прошнуровані, сторінки пронумеровані, підписані директором або головним інженером та скріплені печаткою. Записи у журналах повинні вестись чітко ручкою. Журнали знаходяться на відповідальному зберіганні у мікробіолога.

Обладнання мікробіологічної лабораторії

Відомча мікробіологічна лабораторія повинна бути повністю забезпечена лабораторним обладнанням, посудом, реактивами, поживними середовищами, які необхідні для проведення санітарно-мікробіологічного контролю. При повному навантаженні мікробіолога лабораторним контролем протягом дня він може зробити 25-27 аналізів. Якщо він, крім цього, зайнятий приготуванням поживних середовищ, стерилізацією посуду та середовищ, перевіркою правильності ведення технологічних процесів, візуальним контролем санітарно-гігієнічного стану виробництва, кількість аналізів, що він може виконати протягом дня, відповідно зменшується до 7 – 10.

Зазначений обсяг досліджень здійснюється мікробіологом виробництва. У випадку відсутності бактеріолога на підприємстві, укладається угода із санітарно-епідеміологічною станцією про проведення санітарно-бактеріологічного контролю на підприємстві з визначенням періодичності контролю.

11.3 Експериментальна частина

Матеріали та обладнання: Пробірки з тампонами для приготування змивів, пробірки з середовищем Кода, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки на 1 см³, стерильні колби на 500 см³, мясопептонний агар, бактеріологічні петлі, предметні скельця, термостат, спиртівки.

11.3.1 Дослідження чистоти рук. Закріплений на дерев'яному або металевому стрижні стерильний тампон змочують стерильною водою або фізіологічним розчином (про підготовку тампонів дивись у коротких теоретичних відомостях) і протирають ним долоні, тильну поверхню рук, під нігтями і між пальцями обох рук. Тампон занурюють в пробірку з водою, в якій проводилося змочування, вміст пробірки добре збовтують, відбирають 1 см³ і готують розведення (1:10 і 1:100).

Для визначення КМАНФАНМ проводять посів розведень в чашки Петрі на мясопептонний агар з наступним термостатуванням при 37⁰С протягом 48 годин. Залишок змиву разом з тампоном висівають у пробірки з 5 см³ середовища Кода (без поплавків) і проводять культивування при 43⁰С протягом 24 годин.

Облік результатів досліджень. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 см³ змиву. Відсутність кишкової палички за зміною кольору середовища Кода. При наявності бактерій групи кишкової палички (БГКП) колір середовища Кода з зеленого змінюється на жовтий.

Стан рук вважається: відмінним, якщо в 1 см³ змиву міститься до 1000 клітин мікроорганізмів; хорошим, якщо вміст мікроорганізмів становить від 1000 до 5000 в 1 см³ змиву; задовільним – при кількості мікроорганізмів в 1 см³ змиву від 5000 до 10000. Якщо кількість мікроорганізмів в 1 см³ змиву перевищує 10000 клітин, то санітарний стан рук погане (руки брудні). Сосіб підрахунку КУО/см³ дивись 10.3.3.3.

Згідно нормативної документації повинні бути відсутні БГКП (колі форми) у змиві зі 100 см².

11.3.2 Дослідження чистоти спецодягу. Закріплений на дерев'яному або металевому стрижні стерильний тампон змочують стерильною водою або фізіологічним розчином і протирають тампоном чотири площі по 25см³ з нижньої частини кожного рукава і передньої частини поверхні спецодягу. Тампон занурюють в пробірку з водою, в якій проводилося змочування, вміст пробірки добре збовтують, відбирають 1 см³ змиву і висівають у пробірки з 5 см³ середовища Кода. Проводять культивування при 43⁰С протягом 24 годин.

Згідно нормативної документації повинні бути відсутні БГКП (колі форми) у змиві зі 100 см².

Користуючись методиками, які описані у коротких теоретичних відомостях, можна зробити змиви з інших поверхонь: столів у буфеті, посуду тощо.

Контрольні питання.

1. Хто здійснює санітарно-гігієнічний контроль на підприємствах харчової галузі?
2. З якою метою здійснюють санітарно-гігієнічний контроль?
3. У чому зміст санітарно-гігієнічного контролю?
4. Як готують тампони для взяття змивів?
5. Яким чином готуються змиви з обладнання для оцінки його санітарного стану ?
6. Як проводять контроль чистоти трубопроводів, шлангів, рукавів?
7. Які мікробіологічні показники визначають у змивах з устаткування, трубопроводів, посуду?
8. Яким чином проводять мікробіологічний контроль допоміжних і пакувальних матеріалів?
9. Як проводять мікробіологічний контроль чистоти рук працівників?
10. Для виявлення бактерій якої групи застосовують середовище Кода? Які особливості його використання?

Перелік посилань

1. Безбородов А.М., Коган И.Б., Бочева С.С. Основы биотехнологии микробных синтезов.–Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1989. – 113 с.
2. Бочева С.С. Микробная индустрия. – Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1992.- 80 с.
3. Воробьева Л.И. Техническая микробиология. - М.: Изд-во МГУ, 1987. – 168 с.
4. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лабораторний практикум.+К.:НУХТ, 2009.–302 с.
5. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука,1975. – 390 с.
6. Клевакин В.М., Карцев В.В. Санитарная микробиология пищевых продуктов. - Л.: Медицина,1986. – 318 с.
7. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 322 с.
8. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология.–М.:Издательский центр «Академия». 2006. – 352 с.
9. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р., Поводзинський В.М., Грегірчак Н.М. мікробіологія харчових виробництв./За ред.. Т.П. Пирог:навчальний посібник.–винниця: Нова книга, 2007.–464 с.
- 10.Промышленная микробиология /Под ред. Проф. Н.С.Егорова.–М.: Высшая школа, 1989.–688 с.
- 11.Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии /Под ред. Акад. Г.К.Скрябина.–М.: Мир, 1984.–172 с.
- 12.Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987.–567 с.