

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ З ДИСЦИПЛІНИ
«ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ НАПРЯМУ ПІДГОТОВКИ 6.051701
«ХАРЧОВІ ТЕХНОЛОГІЇ ТА ІНЖЕНЕРІЯ»

ЧАСТИНА I

Затверджено на засіданні кафедри хімічної
технології високомолекулярних сполук
Протокол № 4 від 26.11.2015

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Технічна мікробіологія» для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія». Частина I / Укл.: Земелько М.Л., Руднєва Л.Л. – Д.: ДВНЗ УДХТУ, 2016. – 51 с.

Укладачі: М.Л. Земелько
Л.Л. Руднєва

Відповідальний за випуск О.В. Черваков, д-р техн. наук

Навчальне видання

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт
з дисципліни «Технічна мікробіологія» для студентів напряму підготовки
6.051701 «Харчові технології та інженерія»
Частина I

Укладачі: ЗЕМЕЛЬКО Марія Леонідівна
РУДНЄВА Лариса Леонідівна

Технічний редактор В.П. Синицька
Коректор В.П. Синицька

Підписано до друку 13.09.16. Формат 60×84¹/₁₆. Папір ксерокс. Друк різнограф.
Умов. друк. арк. 2,32. Обл.-вид. арк. 2,40. Тираж 100 прим. Зам. № 50.
Свідоцтво ДК № 5026 від 16.12.2015

ДВНЗ УДХТУ, просп. Гагаріна, 8, м. Дніпропетровськ, 5, 49005

Редакційно-видавничий комплекс

Дисципліна «Технічна мікробіологія» викладається студентам напряду підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» після вивчення таких дисциплін як неорганічна хімія, харчова хімія, основи фізіології, технології оздоровчих харчових продуктів, які є базовими для цієї дисципліни.

Для успішного засвоєння курсу та уміння застосовувати отримані знання на практиці і передбачений лабораторний практикум.

Основна мета мікробіологічного практикуму – формування у майбутнього спеціаліста поняття про різноманітність мікроорганізмів, про їх розповсюдження в природних умовах, про їх роль в багатьох процесах, що відбуваються у природі та технічному мікробіологічному процесі, про використання в тих чи інших галузях діяльності людини. Мікроорганізми мають особливе значення в технології харчових продуктів. Разом із тим мікроорганізми водночас із корисною функцією можуть викликати і псування харчових продуктів.

На лабораторних заняттях студент закріплює отримані теоретичні знання, засвоює методи мікробіологічного дослідження і правила роботи із культурами мікроорганізмів, а також методи їх знезаражування.

На першому лабораторному занятті студенти повинні ознайомитись із технікою безпеки і режимом роботи. Під час роботи в лабораторії необхідно виконувати наступне: вдягнути халат, шапочку чи хустинку. Перевірити, чи всі необхідні предмети є на місці, чи перебуває в робочому стані мікроскоп. Про всі недоліки або поломки доповідати викладачеві. Під час виконання лабораторних занять потрібно дотримуватись тиші, уникати лишнього ходіння по лабораторії, якомога менше відчиняти і зачиняти двері до лабораторії. Не дозволяється виносити за межі лабораторії будь-які матеріали (пробірки, фарби, предметні скельця, шприци та ін.). Особисті речі тримати у спеціально призначеному для цього місці.

На кожне лабораторне заняття студент повинен приносити: кольорові олівці, зошит для записів (лабораторний журнал), гумку для стирання олівців, простий олівець, лінійку. Змальовування мікробіологічних ознак мікроорганізмів виконувати або безпосередньо з препарату або із фотографічного знімка цього препарату із вказуванням ступеня збільшення.

Підготовленість студента до виконання лабораторної роботи визначає викладач за результатами співбесіди та оформлення лабораторного журналу і може допускати або не допускати до виконання конкретної роботи.

Для отримання допуску до роботи студент повинен знати:

1. Теоретичний матеріал із даної теми лабораторної роботи.
2. Методику виконання даної роботи.
3. Специфіку мікробіологічного процесу, який вивчається в процесі роботи.
4. Техніку безпеки виконання своєї конкретної лабораторної роботи.

Після закінчення практичної роботи студент повинен показати викладачеві свої результати, оформлені у лабораторному журналі. Записи повинні бути акуратно зроблені і мати такі розділи:

1. Назва роботи.
2. Мета роботи.
3. Прилади і матеріали.
4. Реактиви.
5. Хід виконання роботи.
6. Результати експерименту.
7. Висновки.

У пункті 6 студент може записати результати роботи у вигляді таблиці, рисунків, розрахунків або у вигляді детального опису роботи та її специфіки.

Після оформлення роботи відбувається співбесіда викладача із студентом.

Лабораторна робота оцінюється двома оцінками – за теоретичні знання і за техніку її виконання.

Після закінчення лабораторної роботи студент повинен прибрати робоче місце, протерти і поставити на місце мікроскоп, ретельно вимити руки з милом.

Всі інструменти після використання необхідно знезаразити прожарюванням на вогні горілки або спиртівки, кип'ятінням, дезінфекцією та ін. Всі використанні матеріали з мікроорганізмами, використані мікробні культури та інше необхідно знезаразити стерилізацією в автоклаві під тиском 0,1 МПа або дезінфекцією і лише після цього мити лабораторний посуд.

РОЗДІЛ 1

До розділу входять лабораторні роботи, під час виконання яких студент знайомиться з основним обладнанням, яке використовується в мікробіологічних лабораторіях, засобами і методами знезараження лабораторного посуду, методами приготування фізіологічних розчинів і специфіки їх використання в мікробіологічній практиці для вирощування культур мікроорганізмів, особливостями будови і функцій бактерій, грибів, формуються навички роботи з мікробіологічними препаратами.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Будова мікроскопів та їх використання в мікробіологічній практиці. Основні форми бактерій

Мета роботи: засвоїти правила користування мікроскопом. Ознайомитися з основними формами бактерій.

Обладнання і матеріали: мікроскоп, готові препарати (мазки) мікробів.

Завдання

1. Ознайомитись із будовою різних (за можливістю) мікроскопів.
2. Вивчити будову біологічного мікроскопа, правила користування ним в мікробіологічній практиці (звернути увагу на особливість роботи з імерсійним об'єктивом).
3. Здійснити мікроскопію готових препаратів з основними формами бактерій.

Методичні вказівки

Будова мікроскопа

Для вивчення мікроорганізмів користуються складними оптичними приладами – мікроскопами (від грецького “micros” – малий, “skopeo” – дивлюсь) (рис.1–4). Найпоширенішими біологічними мікроскопами є МБР-1, МБІ-2 з максимальним збільшенням до 1350 разів, “Біолам Р-2”.

Мікроскопи мають 2 основні частини:

- а) механічну;
- б) оптичну.

Будова механічної частини.

Ця частина складається із штатива, який в свою чергу, складається із ніжки (або башмака), основи і тубусотримача, предметного столика, який прикріплюється до основи штатива. Предметний столик може переміщуватись у горизонтальній площині за допомогою 2-х гвинтів, розміщених зліва і справа. На поверхні столика є дві клеми для закріплення препарату. В центрі предметного столика є отвір для проходження променів світла, які підсвічують препарат. Крім того, на предметному столику можна встановити хрестоподібний столик – препаратодій, який слугує для пересування препарату в 2-х взаємноперпендикулярних напрямках з допомогою 2-х гвинтів, розміщених справа. Тубусотримач (ручка мікроскопа) піднімається і опускається за допомогою мікрометричного і макрометричного гвинтів, які призначені для грубого і точного фокусування об'єкта. Повертанням гвинта за годинниковою стрілкою тубус опускається, проти годинникової стрілки – піднімається. Повертанням макрометричного гвинта на 1 оборот піднімають (або опускають) тубусотримач на 2 мм, мікрометричного – на 0,1 мм. Зверху тубусотримач має гніздо для прямого або нахиленого тубуса, на якому закріплений револьвер з 2–4 об'єктивами. Заміна об'єктивів здійснюється поворотом револьвера навколо осі.

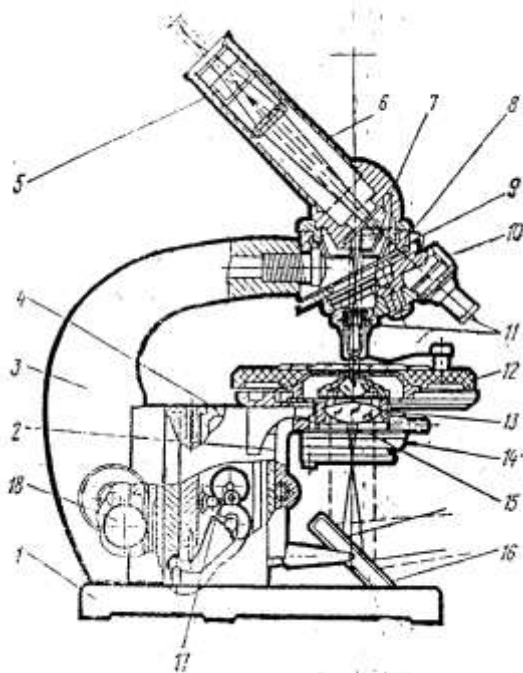


Рис. 1. Будова і оптична схема мікроскопа МБР – 1: 1 – башмак мікроскопа; 2 – кронштейн конденсора; 3 – тубусотримач (ручка мікроскопа); 4 – коробка з мікромеханізмом; 5 – окуляр; 6 – тубус; 7 – призма; 8 – головка тубусотримача; 9 – гвинт для фіксування револьвера; 10 – револьвер; 11 – об'єктив; 12 – предметний столик; 13 – конденсор; 14 – рукоятка ірис-діафрагми; 15 – апертурна діафрагма; 16 – дзеркало; 17 – мікрометричний гвинт; 18 – мікрометричний гвинт

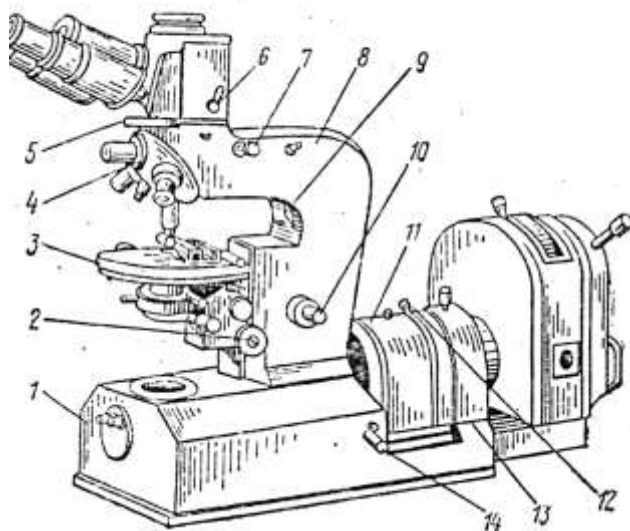


Рис. 2. Люмінесцентний мікроскоп МЛ – 1: 1 – основа мікроскопа; 2 – маховик грубої подачі; 3 – предметний столик; 4 – револьверний пристрій; 5 – поворотний диск із світлофільтрами; 6 – рукоятка; 7 – рукоятка висувної трубки; 8 – тубусотримач; 9 – рукоятка польової діафрагми; 10 – маховички мікроподачі; 11 – відкидний кожух; 12 – ручка діафрагми; 13 – освітлювальний пристрій; 14 – рукоятка відкидного дзеркала

Будова оптичної частини.

Оптична частина мікроскопів складається із апарату для освітлення, об'єктивів та окулярів. Апарат для освітлення розміщений під предметним столиком і складається із дзеркала, конденсора та ірис-діафрагми. Дзеркало має 2 поверхні: плоску та увігнуту; воно відбиває світлові промені і направляє їх до конденсора. Під час використання природного освітлення і великому збільшенні використовують плоске дзеркало; при штучному освітленні і малому збільшенні – увігнуте.

Конденсор – це система лінз і слугує для посилення яскравості освітлення об'єкта, що розглядається. Збираючи промені світла, відбиті дзеркалом, конденсор концентрує їх в площині препарату. Пересувається конденсор у вертикальному напрямку за допомогою гвинта. Під час опускання конденсора поле зору мікроскопа затемнюється, під час піднімання – світлішає. Якщо поле зору занадто освітлене – конденсор рекомендується опускати, а при слабкому освітленні – піднімати.

Ірис-діафрагма, вбудована в конденсор, складається із тонких металічних сегментів, які за допомогою важеля можна зсовувати або розсовувати, регулюючи цим попадання світла в конденсор.

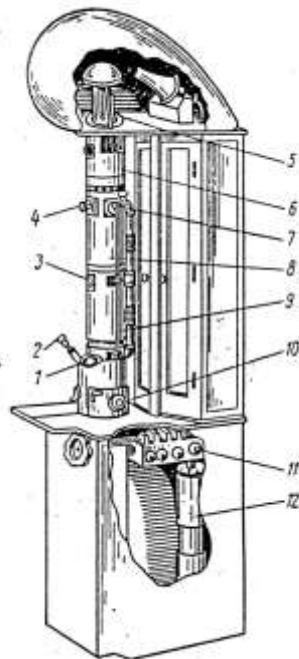


Рис. 3. Будова магнітного електронного мікроскопа:

- 1 – спостереження кінцевого зображення;
- 2 – світловий мікроскоп; 3 – спостереження проміжного зображення; 4 – люк для зміни зразків; 5 – електронна гармата;
- 6 – конденсорна лінза; 7 – камера об'єкту;
- 8 – об'єктивна лінза; 9 – проєкційна лінза;
- 10 – люк для виймання фотопластинок;
- 11 – вакуумний розподільчий пристрій;
- 12 – насос

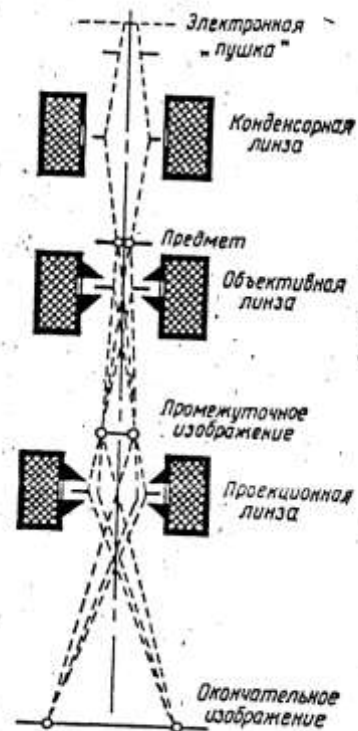


Рис. 4. Схема дії магнітного електронного мікроскопа

Об'єктиви є найціннішою частиною мікроскопа. Вони вкручуються в гнізда револьвера і складаються із системи лінз, які вміщені в металеву оправу. Передня або фронтальна лінза об'єктиву – найменша і єдина, яка дає збільшення. Інші лінзи в об'єктиві тільки коректують недоліки отриманого зображення і називаються корегуючими. В сильних об'єктивах фронтальна лінза має найбільшу кривизну при найменшому діаметрі, наближаючись до форми півкулі.

Всі об'єктиви поділяють на ахромати – простіші, та апохромати – досконаліші, які максимально усувають недоліки оптичного зображення. Крім того, об'єктиви розрізняють сухі та імерсійні. Сухими називають такі об'єктиви, під час роботи з якими між фронтальною лінзою і предметом, який розглядається, розміщений шар повітря. Імерсійними (від латинського

“immersio” – занурюю) називаються об’єктиви фронтальна лінза в яких під час роботи занурюється в нанесену на препарат краплю рідини з показником заломлення, який близький до показника заломлення скла. Найкращим для цього вважають кедрове масло із коефіцієнтом заломлення 1,515 (коефіцієнт заломлення скла $n_{\text{Дскла}}=1,53$). Світлові промені при переході із скла в шар кедрового масла не заломлюються і тому, не відбиваючись, попадають в об’єктив. Таким чином, досягається найкраще освітлення предмета, що розглядається. У випадку наявності повітря чи води замість масла ($n_{\text{Дпов}}=1$, $n_{\text{ДН}_2\text{O}}=1,33$) спостерігається заломлення світлових променів і в результаті не всі вони попадають в об’єктив.

Біологічні мікроскопи МБР-1 і МБІ-1, як правило, мають 3–4 об’єктиви із цифровими позначеннями 8, 20, 40, 60, 90х (імерсійний), які показують власне збільшення цих об’єктивів. Найсильнішими у мікроскопів є об’єктиви 90, 100, 110х.

Окуляр (від латинського “oculus” – око) вставляється у верхній кінець тубуса. Окуляр – це система двох плоско-випуклих лінз, які повернуті випуклістю в бік об’єктива. Лінза, повернута до ока, називається очною, а та, що повернута до препарату – збірною. Відстань між лінзами дорівнює півсуми їх фокусної відстані. В окулярах із більшим збільшенням фокус коротший, тому менша і довжина окуляра. Між лінзами міститься діафрагма, яка обмежує поле зору і затримує крайні промені світла. Окуляри вітчизняних мікроскопів відмічаються цифрами, які показують їх власне збільшення: 5, 7, 8, 10, 15х.

Найчіткіше зображення предмета можливе під час поєднання сильних об’єктивів із слабкими і середніми окулярами. Для того, щоб визначити збільшення даної системи мікроскопа, слід помножити показник збільшення об’єктива на показник збільшення окуляра.

Наприклад: окуляр 7х, об’єктив 90х. У цьому випадку збільшення буде дорівнювати 630 ($7 \times 90 = 630$).

Справжнє зображення предмета дає об’єктив. Окуляр лише збільшує зображення, яке дає об’єктив, який розглядається. Користуючись біологічним мікроскопом, можна розглядати предмети не менші 0,2 мкм.

Під час мікроскопії часто використовують електричне освітлення. В багатьох сучасних мікроскопах (МБІ-2, МБІ-6) пристосування для освітлення вмонтоване в основу мікроскопа.

Основні правила користування мікроскопом

1. Мікроскоп необхідно захищати від попадання пилу і вологи; після роботи ставити у футляр (якщо він є) або накривати тканиною.
2. На робочому столі мікроскопи ставлять ручкою до себе на відстані 3–5 см від краю стола.
3. Об’єктиви та окуляри треба протирати замшею або байкою.
4. Під час роботи з об’єктивами малого і середнього збільшення тубус переміщувати лише макрометричним гвинтом.

5. Не залишати тубус мікроскопа відкритим, тобто без окуляра, тому це призводить до накопичення пилу в тубусі і забруднення об'єтивів.

6. Під час зміни об'єтивів потрібно регулювати інтенсивність освітлення об'єкта, що розглядається. Ступінь освітлюваності регулюють, опускаючи чи піднімаючи конденсор. Під час розглядання препарату з об'єктивом 8 конденсор опускають, при переході на об'єтив 40 конденсор трохи піднімають, а під час роботи з об'єктивом 90 конденсор піднімають вгору до предметного столика.

7. Під час роботи з об'єктивом 8 відстань від препарату, що досліджується, до конденсора повинна бути біля 1 см, з об'єктивом 40 – 0,6 см, з об'єктивом 90 – біля 0,15 мм.

8. Препарат розглядають у декількох місцях, пересуваючи предметний столик боковими гвинтами. Одночасно повільно (не більше, як на півоберту) повертають мікрогвинт із метою фокусування об'єктива. Під час заміни одного об'єктива іншим місце препарату необхідно підвести точно в центр поля зору і лише після цього повернути револьвер із об'єктивом. Для цього великим і вказівним пальцями беруться за основу об'єктива і повільно обертають револьвер до появи клацання. Це свідчить про те, що об'єтив прийняв робоче положення.

9. Щоб отримати максимальне освітлення поля зору встановлюють об'єтив найменшого збільшення на відстані від препарату приблизно 1 см. Спостерігаючи в окуляр, направляють відбиті дзеркалом промені від джерела світла через отвір діафрагми конденсора на об'єтив. Якщо установка зроблена правильно, поле зору мікроскопа буде мати форму кола, яке добре і рівномірно освітлене. Пряме сонячне освітлення “пом'якшують”, розміщуючи між дзеркалом і конденсором у спеціальному тримачі матове скло; штучне освітлення – розміщуючи синє прозоре або матове скло, яке знебарвлює світлові промені.

Робота з препаратами

Відрегулювавши освітлення, на предметний столик кладуть препарат і, закріпивши клемами предметне скло, проглядають його із слабким сухим об'єктивом. У центрі поля зору встановлюють потрібну ділянку препарату, піднімають тубус і обертанням револьвера переводять під нього імерсійний об'єтив. На препарат наносять краплину імерсійного масла. Використовуючи візуальне спостереження збоку, опускають тубус поворотом макрометричного гвинта до зіткнення лінзи з краплею і трішки її роздушують. Необхідно слідкувати за тим, щоб не зіпсувати лінзу об'єктива і не роздавити предметне скло. Після цього, дивлячись в окуляр, піднімають тубус макрометричним гвинтом до моменту появи зображення того предмета, який ви розглядаєте.

Щоб отримати чітке зображення, переходять до роботи з мікрометричним гвинтом, обертаючи його легкими рухами в той чи інший бік, але не більше, ніж на один повний оборот. Якщо під час повороту мікрометричного гвинта відчувається опір, значить, хід його пройдений до кінця. У цьому випадку

повертають гвинт на один повний оборот назад, знову знаходять мікрокартинку з допомогою макрометричного гвинта і лише після цього знову переходять до роботи з мікрометричним гвинтом.

Після закінчення мікроскопування тубус піднімають, обертаючи макрометричний гвинт, препарат забирають, а фронтальну лінзу імерсійного об'єктива обережно витирають шматочком замші або чистої м'якої полотняної тканини, трішки змоченої в спирто-ефірній суміші або ксилолі. Не дозволяється залишати імерсійний об'єктив у маслі.

Для вивчення колоній мікроорганізмів, які вирости на щільних (густих) поживних середовищах і особливо для тривалого дослідження препаратів мікробів, користуються біноккулярними мікроскопами або біноккулярною насадкою, які дають стереозображення предмета і не так швидко втомлюють очі.

Основні форми бактерій

За формою бактерії поділяють на кулясті (коки), паличкоподібні (кlostридії, бацили) та звивисті (вібріони, спірили, спірохети) (рис. 5, 6).

Кулясті форми за розміщенням коків поділяються на мікрококи – клітини, що розміщені поодиноці; диплококи – коки, з'єднані по двоє; тетракоки – коки, з'єднані по чотири; стрептококи – коки, розміщені у вигляді довгого або короткого ланцюжка; сарцини – коки, розміщені у вигляді пакетів; стафілококи – безладне скупчення коків, найчастіше у вигляді грон винограду.

Паличкоподібні форми за розміщенням паличок поділяють на диплобактерії (палички, які з'єднані попарно) та стрептобактерії (палички, які розміщені у вигляді ланцюжка).

Серед спороутворювальних бактерій розрізняють бацили і кlostридії. У бацил діаметр спор менший за ширину вегетативної клітини, а у кlostридій спора більша за ширину клітини, тому клітина приймає форму веретена, тенісної ракетки, барабанної палички.

Звивисті форми поділяють на вібріони, які мають форму коми; спірили, які мають декілька (до 5) завитків та спірохети – з великою кількістю дрібних завитків.

Для мікроскопування бактерій використовують електронний мікроскоп. Перш ніж виконувати електронну мікроскопію бактеріологічний препарат спеціально підготовляють. Бактерії, віруси та інші біологічні об'єкти звільняють від середовища, солей, тканин. Це досягається відмиванням їх у дистильованій воді шляхом диференційованого центрифугування. Відмиті об'єкти наносять на дуже тонку плівку з будь-якого пластичного матеріалу (наприклад, колодію), яка замінює предметне скло. Після випаровування розчинника утворюється тонка плівка товщиною біля 10^{-8} см. Цю плівку переносять на решітку з дуже дрібними комірками і готують на ній препарат бактерій, причому препарат не зафарбовують, як для світлових мікроскопів. Після цього препарат відмивають водою, підсушують і закріплюють у тримачі прийомної камери мікроскопа.

Через таку тонку плівку промені проходять, не затримуючись, і падають на лінзу об'єктива.

За допомогою електронного мікроскопа можна отримати зображення об'єкта, збільшене в 40–50 тис. разів. Наступне оптичне збільшення в 5–6 разів дозволяє отримати корисне збільшення до 200–300 тис. разів. Роздільна здатність сучасних електронних мікроскопів від 1,5 до 0,8 і навіть 0,5 нм.

Один із недоліків електронної мікроскопії – дослідження мікроорганізмів лише у фіксованому стані, так як електрони при проходженні через препарат вбивають живу клітину.



Рис. 5. Форми бактерій:

Кулясті: 1 – мікрококи, 2 – стрептококи,
3 – диплококи і тетракоки, 4 – стафілококи,
5 – сарцини;

Паличкоподібні: 6 – палички без спор,
7 – палички зі спорами;

Звивисті: 8 – вібріони, 9 – спірили, 10 – спірохети

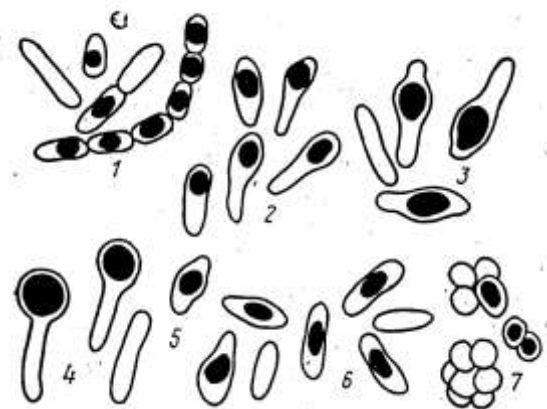


Рис. 6. Форма і розміщення спор у бактерій:

1 – сінна паличка; 2, 5 – збудники
маслянокислого бродіння; 3 – паличка
ботулізму; 4 – правцева паличка;
6 – картопляна паличка; 7 – сарцина, яка
розкладає сечовину

Завдання для контролю знань

1. Описати оптичний пристрій біологічного мікроскопа.
2. Яких правил потрібно дотримуватися під час користування і догляду за мікроскопом.
3. Які основні форми бактерій ви знаєте?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Барвники і барвні розчини. Приготування бактеріальних препаратів і методи забарвлення бактерій

Мета роботи: ознайомитись із барвниками і методами приготування їх розчинів. Навчитись готувати і забарвлювати бактеріальні препарати простим методом.

Обладнання і матеріали: набір сухих барвників. Набір готових розчинів барвників:

- а) основний і кислий фуксин;
- б) генціанвіолет;
- в) метиленовий синій;
- г) сафранін;
- д) малахітова і діамантова зелень.

Предметні скельця, розчин водного фуксину (фуксин Пфейффера), бактеріологічні петлі, фільтрувальний папір, спиртові або газові горілки, мікроскопи.

Методичні вказівки

Для роботи із мікроорганізмами потрібне певне обладнання. На робочому лабораторному столі повинні бути:

1. Спиртівка або газова горілка.
2. Бактеріологічна петля.
3. Предметні скельця.
4. Покривні скельця.
5. Набір барвників.
6. Мікроскоп.
7. Серветка.
8. Кедрове масло.
9. Пінцет.
10. Кювета з містком (або кристалізатор з містком).
11. Ємність з водою.
12. Пісочний годинник.
13. Олівець для скла (склограф).
14. Фільтрувальний папір.

Для вивчення форми мікробної клітини і деяких її структур препарат (мазок) із матеріалу, що містить мікроб, якого вивчають на даний момент, як правило, зафарбовують.

Більшість мікробів досить швидко і добре зафарбовуються розчинами анілінових барвників. За хімічними властивостями барвники поділяють на основні і кислі. Хромофором (тобто іоном, який надає забарвлення) основних барвників є катіон, а кислих – аніон.

До основних барвників належать:

1. Червоні:

- нейтральний червоний;
- фуксин основний;
- сафранін;
- тіонін;
- піронін;
- гематоксилін.

2. Сині:

- метиленовий синій.

3. Фіолетові:

- кристалічний фіолетовий;
- метиленовий фіолетовий.

4. Зелені:

- малахітовий зелений;
- метиленовий зелений.

Основні барвники, як правило, легко зв'язуються із ядерними (кислими) компонентами клітин.

До кислих барвників належать:

1. Червоні і рожеві:

- фуксин кислий;
- еозин;
- еритрозин.

2. Жовті:

- пікринова кислота;
- конго;
- флуоресцеїн.

3. Чорні:

- нігрозин.

Кислі барвники інтенсивніше забарвлюють основні компоненти клітин.

Частина 1. Приготування робочих розчинів барвників

Перш ніж приготувати робочі розчини барвників, які призначені для забарвлення мікробів, часто заздалегідь готують насичені спиртові розчини із сухих барвників. Для цього фарбу заливають 96%-ним спиртом у співвідношенні 1:10. При такому співвідношенні спирт насичується барвником

(та частина барвника, яка не розчинилась, залишається в осаді). З метою економії рекомендують на 100 мл етанолу брати такі кількості барвників: метиленового синього – 7,0 г; генціанвіолету – 4,8 г; основного фуксину – 8,1 г.

Для кращого насичення спиртові розчини поміщають в термостат і витримують до повного розчинення барвників. Із насичених спиртових розчинів в міру необхідності готують водні робочі розчини.

Карболовий фуксин (фуксин Циля)

а) беруть 100 мл насиченого спиртового розчину основного фуксину і 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Другий розчин, постійно помішуючи, поступово доливають до першого (**НЕ НАВПАКИ!!**). Після змішування готовий розчин фільтрують через паперовий фільтр і зберігають в склянці із темного скла і добре закупореній;

б) 1 г основного кристалічного фуксину, 5 г кристалічного фенолу, декілька крапель гліцерину, 10 мл 96% етанолу, 100 мл дистильованої води.

Фуксин і фенол ретельно розтирають в ступці, додаючи по краплях гліцерин. Після цього, постійно помішуючи, по краплині додають етанол, поступово збільшуючи порції етанолу; після додавання цієї порції етанолу починають доливати воду і перемішують. Розчин в ступці, який отримали, витримують 48 год у термостаті при 37°C до повного розчинення фуксину. Лише після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр.

Ця фарба дуже стійка і може зберігатися тривалий час. Фарбу використовують для роботи із мікроорганізмами, які важко зафарбовуються (спорові форми, кислотостійкі бактерії).

Фуксин Пфейффера

Готують із карболового фуксину Циля методом розведення дистильованою водою у співвідношенні 1:10.

Розчин нестійкий, під час зберігання знебарвлюється. Саме з цієї причини розчини такого типу готують безпосередньо перед використанням у невеликих кількостях.

Метиленовий синій

До 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього додають 100 мл дистильованої води та 1 мл 1%-го водного розчину КОН або NaOH.

Розчин цього барвника може зберігатися довго; після певної витримки у часі цей розчин фарбує навіть більш ефективно, ніж свіжо виготовлений.

Карболовий генціанвіолет

До 10 мл насиченого спиртового розчину барвника додають 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Розчин витримують протягом 2–3 днів у термостаті.

Розчин Люголя

Цей розчин не є справжнім барвником. Основна складова його частина – кристалічний йод. Розчин використовується для забарвлення клітин за Грамом.

Для приготування розчину 1 г I_2 і 2 г KI розчиняють у 300 мл дистильованої води. Йод погано розчиняється у воді, тому спочатку необхідно розчинити йодистий калій у 5–10 мл води, потім додати кристалічний йод, розчинити його в розчині йодистого калію і лише після цього долити ту дистильовану воду, що залишилась, тобто довести об'єм до 300 мл. Отриманий розчин фільтрують і зберігають у темних (коричнєве скло) пляшечках у прохолодному місці.

Перевірка якості готових фарб

Розчини фарб, як правило, фільтрують через паперові фільтри. Щоб переконатися, що після фільтрації в розчині немає нерозчинених частинок фарби, декілька краплин цього розчину наливають на предметне скельце. Через 2–3 хв фарбу змивають водою, скло просушують фільтрувальним папером і проглядають під імерсійним об'єктивом. При наявності нерозчинених частинок, які виявляються у вигляді окремих грудочок, необхідно профільтрувати розчин фарби знову і повторити мікроскопування цього розчину. Якщо у фарбі немає нерозчинених частинок, то предметне скло буде слабо і рівномірно забарвлене барвником.

Частина 2. Приготування бактеріальних препаратів

Препарат-мазок для зафарбовування готується у декілька етапів:

1. Виготовлення препарату.
2. Висушування мазка.
3. Фіксація мазка.
4. Зафарбовування мазка.

Для виготовлення препарату використовують предметні скельця – тонкі скляні пластинки розміром 76×26 мм із відшліфованими боками. Під час мікроскопування використовують покривні скельця товщиною 0,15–0,17 мм і розміром 18×18, 20×20, 18×24 мм.

Скельця повинні бути чистими, знежиреними і завчасно підготовленими. Якщо скельце добре знежирене, то крапля води рівномірно розтікається на його поверхні, не утворюючи випуклих ділянок.

Методи очищення скельць

1. Якщо скельце було у вжитку, то його витримують у концентрований H_2SO_4 протягом 1–2 год, потім промивають водою, кип'ятять у 2%-му розчині соди (Na_2CO_3) або мильній воді, ретельно ополіскують водою і протирають м'якою чистою тканиною.

2. Предметні і покривні скельця обробляють гарячим (80–90°C) 10%-ним розчином NaOH або КОН протягом 5–10 хв, потім ополіскують водою, переносять в 96%-ний етанол і зберігають у ньому до використання.

3. Нові скельця промивають у воді, потім у суміші спирту з ефіром (1:1). Оброблені предметні скельця зберігають у банці з притертим корком у сухому вигляді, в спирті або спиртово-ефірній суміші.

4. Покривні скельця обробляють спиртом, витирають чистою тканиною і зберігають у коробці або бюксі.

Чисті скельця беруть лише пінцетом, оскільки пальці залишають на них жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчиннику, їх перед використанням висушують фільтрувальним папером і трішки обпалюють на полум'ї горілки чи спиртівки.

Під час тривалого використання скельця втрачають прозорість і стають непридатними.

Виготовлення препарату мазка

Препарат-мазок готують за допомогою бактеріологічних петель або пастерівських піпеток (рис. 7,8,9). Бактеріологічну петлю готують із платинового або ніхромового дроту довжиною 5–7 см і товщиною 0,5 мм із привареною до нього скляною ручкою або вставляють у металеву ручку – петлетримач. Такий дріт легко стерилізується на полум'ї і швидко охолоджується.

Для виготовлення препарату-мазка культуру мікроба, яка досліджується, обережно розподіляють рівномірним тонким шаром на предметному скельці.

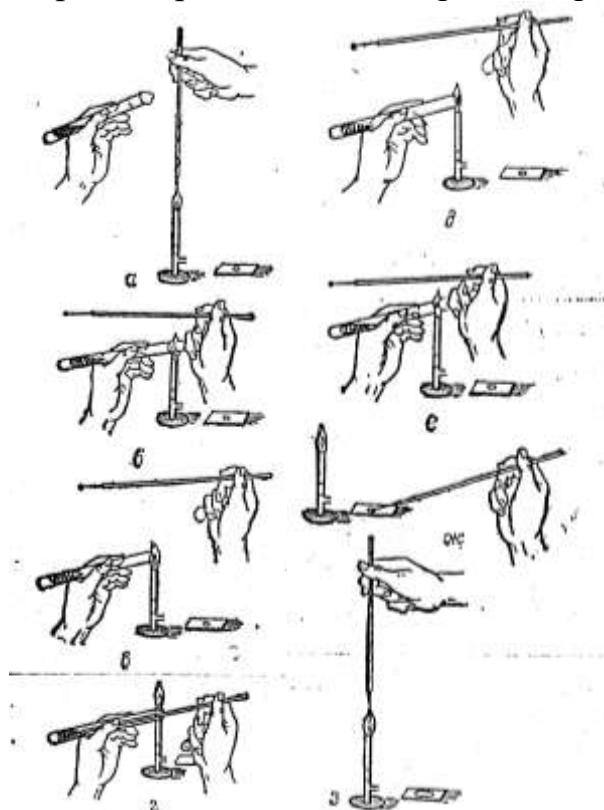


Рис. 7. Схема приготування мазка

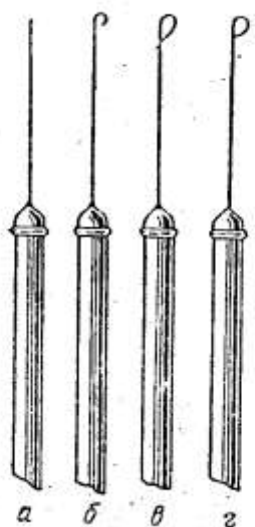


Рис. 8. Голка (а) і петля (б,в,г) для висівів: б, в – петля зроблена неправильно; г – петля зроблена правильно

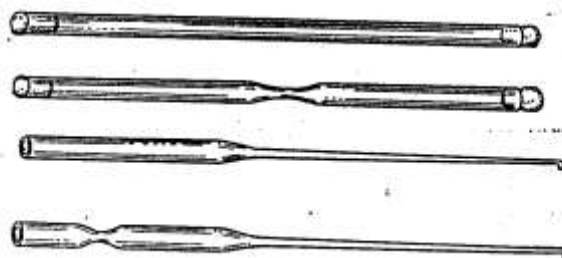


Рис. 9. Пастерівська піпетка на різних стадіях виготовлення

Метод А. Виготовлення мазка із культур, які вирости на щільному середовищі

На чисте предметне скельце стерильною піпеткою або бактеріологічною петлею наносять краплю стерильної води або фізіологічного розчину. Пробірку з культурою, з якої необхідно приготувати мазок, у нахиленому положенні розміщують на вказівному і середньому пальцях лівої руки і зверху притискають великим пальцем так, щоб добре було видно всю поверхню поживного середовища із мікроорганізмами, які вирости на ній.

Перш ніж взяти матеріал із культури, необхідно прожарити бактеріологічну петлю в полум'ї горілки до почервоніння. Петля при цьому повинна перебувати у вертикальному положенні, так, щоб полум'я охоплювало не тільки всю петлю, але і частину голкотримача. Під час роботи петлю або піпетку тримають у правій руці як олівець або ручку під час писання.

Затиснувши корок між мізинцем і долонею правої руки (в ній же тримають підготовлену петлю) виймають його із пробірки і тримають кінцем вниз, не допускаючи зіткнення з ручкою тієї частини корка, яка була в пробірці. Відкритий кінець пробірки обпалюють на полум'ї і відхиляють трохи до себе; після цього вводять в пробірку петлю (ще раз проведену через полум'я), охолоджують дотиком до стінки пробірки і набирають трішки матеріалу, лише дотикаючись до культури (не дряпати середовище петлею!) (рис.7).

Після відбирання проби пробірку відразу затикають ватним корком-тампоном, але перед цим обов'язково відкритий кінець пробірки і кінець корка обпалюють на полум'ї горілки.

Матеріал, який відібрали з культури, емульгують у краплині води, яка заздалегідь поміщена на предметне скло і рівномірно, тонким шаром розподіляють петлею на поверхні скельця (розмір приблизний 1,5×2 см).

Метод Б. Виготовлення культур, які вирости в рідкому поживному середовищі

Стерильну петлю опускають в рідину, захоплюють краплину і розтирають її на предметному скельці. На зворотному боці обводять олівцем для написання по склі те місце, де міститься мазок. Це полегшує пошук мазка під час мікроскопування. Після нанесення мазка петлю прожарюють і кладуть на місце.

Завдання

1. Ознайомитися із барвниками, які найчастіше використовуються в мікробіологічній практиці.
2. Приготувати будь-яку фарбу, визначену викладачем, і проглянути її під мікроскопом для перевірки її якості.
3. Приготувати мазок із зубного нальоту і зафарбувати простим методом.
4. Розглянути виготовлені і фарбовані мазки під мікроскопом.

Хід виконання роботи

Приготування препарату-мазка із зубного нальоту

На предметне скло наносять бактеріологічною петлею краплину стерильного фізіологічного розчину або води, потім обережно знімають зубний наліт сірником (без сірчаної голівки), розтирають у краплині і тонким шаром розподіляють на поверхні скла. Мазок підсушують на повітрі, фіксують і зафарбовують.

Висушування препарату виконують на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не рекомендується, оскільки при цьому відбувається грубе згортання білків у результаті швидкої втрати вологи; при цьому клітини втрачають природну форму. Під час висушування препарат накривають скляним ковпаком, захищаючи від мух і попадання пилу.

Фіксація висушеного препарату потрібна для забезпечення кращого присипання мікробних клітин до скла, а також для того, щоб убити мікроорганізми, оскільки мертві клітини легше зафарбовуються, ніж живі. Фіксацію препарату виконують над полум'ям спиртівки. Для цього предметне скло беруть за куточки великим і вказівним пальцями і, тримаючи мазком догори, повільно проводять скельце через полум'я не менш, ніж 3 рази. При цьому в сумі мазок повинен перебувати в полум'ї не більше 2 с. Тривала фіксація може змінити структуру мікробних клітин та їх форму. Якщо ж мазок недостатньо прогріли і погано зафіксували, він змивається зі скла при подальшій обробці.

Для фіксації можна використовувати також різні хімічні сполуки. До них належать:

Абсолютний етиловий спирт – в ньому мазки витримують від 15 хв до 30 хв.

Спиртово-ефірна суміш (етанол:ефір, 1:1) – в ній мазки витримують 2–5 хв.

Метиленовий або аміловий спирт – мазки в цих спиртах витримують протягом 5 хв.

Фіксація здійснюється шляхом занурювання мазка в кювету з однією із вищесказаних речовин або наливанням цих речовин на мазок.

Зафарбовування препарату-мазка

А. Метод звичайного зафарбовування.

Для зафарбовування використовують, як правило, який-небудь розчин для забарвлення, найчастіше – фуксин Пфейффера або метиленовий синій.

Методика зафарбовування: на фіксований препарат піпеткою наносять декілька крапель забарвлюючого розчину так, щоб покрити всю поверхню мазка: фуксин Пфейффера на 1–2 хв, метиленовий синій – на 3–5 хв. Після цього фарбу змивають водою, а мазок просушують між листами фільтрувального паперу або на повітрі.

Б. Складні методи зафарбовування.

Ці методи використовують з метою діагностики, для виявлення відмінних структур мікробів у тих випадках, коли мікроби не зафарбовуються простим методом.

Зафарбовування за Грамом.

На мазок, який виготовлений і фіксований за звичайною методикою кладуть смужку фільтрувального паперу (трішки вужчу і коротшу за предметне скло) і на неї наливають карболовий розчин генціанвіолету або кристалвіолету на 2 хв. Після цього папір знімають, фарбу зливають і на препарат наливають розчин Люголя на 2 хв. При цьому мазок чорніє. Зливають розчин Люголя і обробляють мазок 96%-ним етанолом 30 хв. Промивають водою. Знову додатково зафарбовують фуксином Пфейффера протягом 2 хв. Промивають водою, сушать і мікроскопують.

Грампозитивні мікроби забарвлюються в темно-фіолетовий, майже чорний колір, грамнегативні – в рожево-червоний.

Довідка. Кулясті форми мікробів (коки) в основному фарбуються за Грамом позитивно, звивисті – негативно. Серед паличкоподібних форм мікробів зустрічаються як грам позитивні, так і грам негативні (палички, які утворюють спори, зафарбовуються, як правило, позитивно). Щоб отримати правильне забарвлення бактерій, рекомендовано фарбувати молоді (добові) культури мікробів; старі культури дають не однакові результати при фарбуванні цим методом.

Запитання для контролю знань

1. Які барвники використовують для фарбування бактерій?
2. Яка методика приготування мазка із культури бактерій, вирощених на щільному поживному середовищі?
3. Пояснити суть забарвлення бактерій за методом Грама.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Методи зафарбовування кислотостійких бактерій

Мета роботи: ознайомитись із призначенням спеціальних методів зафарбовування. Оволодіти навиками зафарбовування препаратів кислотостійких бактерій.

Обладнання і матеріали: культура азотобактера та лейконостока, фуксин Циля, бактеріологічні петлі, предметні скельця, фільтрувальний папір, стерильна дистильована вода, фізіологічний розчин, мікроскопи.

Методичні вказівки

Кислотостійкі бактерії містять у своєму тілі жиророзчинні речовини і звичайними фарбами фарбуються дуже погано. Для їх фарбування використовують концентровані розчини фарб і підігрівання. Сприймаючи ту чи іншу фарбу, вони не знебарвлюються навіть при дії на них міцних розчинів кислот (сірчаної, соляної) та спирту. Цю властивість кислотостійких бактерій використовують для їх ідентифікації.

Із патогенних бактерій кислотостійкими є наступні: туберкульозна паличка, бактерії паратуберкульозного ентериту великої рогатої худоби, а також ряд сапрофітних мікробів, яких знаходять у молоці, маслі та ін. продуктах тваринного походження та в ґрунті.

Основним способом зафарбовування кислотостійких мікробів є метод Циль-Нільсена.

Завдання

1. Приготувати на предметних скельцях мазки із культур, що утворюють капсули.
2. Зафарбувати мазок за методом Циль-Нільсена.
3. Виконати мікроскопію отриманого мазка.
4. Забарвити бактерії, що утворюють капсули.
5. Забарвити спороутворюючі бактерії.

Хід виконання роботи

Приготувати і зафіксувати мазок, як вказано в роботі № 2. На такий зафіксований мазок накладають смужку фільтрувального паперу і наливають розчин карболового фуксину Циля. Предметне скло із мазком і нанесеною фарбою підігрівають на полум'ї спиртівки до початку випаровування і фарбу залишають на препараті без підігріву ще 2–3 хв. Після цього папірець знімають, фарбу зливають, препарат промивають водою 3–5 с, знебарвлюють 5%-ним розчином сірчаної кислоти, промивають 5–10 с спиртом, а потім водою. Дофарбовують метиленовим синім 1–2 хв, промивають водою, підсушують і мікроскопують. Кислотостійкі мікроби зафарбовуються у червоний колір, а фон мазка, в тому числі і кислотостійких мікробів – у синій.

Запитання для контролю знань

1. Які методи фарбування спор бактерій ви знаєте і в чому полягає їх суть?
2. Яка методика фарбування кислотостійких бактерій за Циль-Нільсеном?
3. Чому актуальне виявлення кислотостійких бактерій у жирах тваринного походження?
4. Які ви знаєте кислотостійкі патогенні бактерії?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Морфологія актиноміцетів, мікроскопічних грибів, дріжджів

Мета роботи: ознайомитись із морфологією грибів і технікою їх мікроскопічного дослідження.

Обладнання і матеріали: культури мікроскопічних грибів (мукор, риз опус, аспергіллус, пеніциліум, молочна пліснява, кладоспоріум та ін.), пробірки із суспензією дріжджів і дріжджі, які вирощені на гіпсових блоках, предметні та покривні скельця, препарувальні голки, суміш етанол:гліцерин = 1:1, мікроскопи.

Актиноміцети (рис. 10).

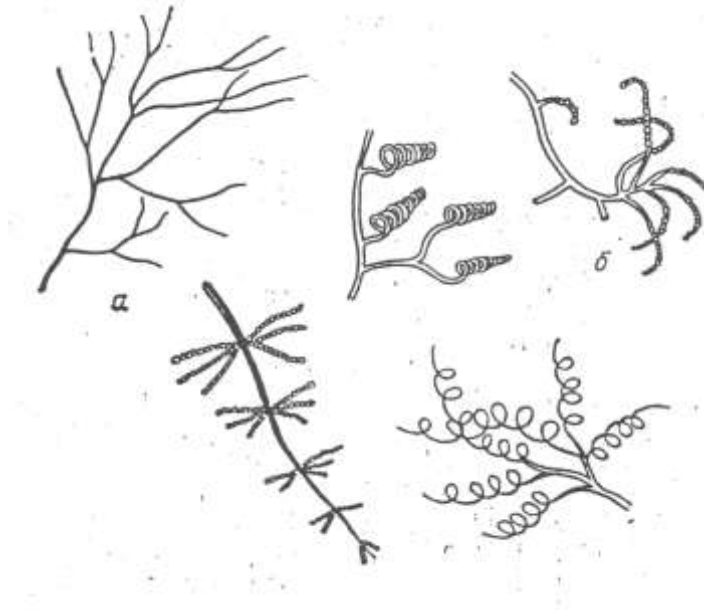


Рис. 10. Будова актиноміцетів:
а – міцелій; б – спороносці

Актиноміцети або променисті гриби (від грецького “actis” – промінь, “mucos” – гриб), належать до прокаріотів. Актиноміцети поділяють на 2 групи: вищі та нижчі. До вищих відносять організми із розвинутим одноклітинним галузистим міцелієм і особливими органами плодоношення. До цієї групи входять: актиноміцети, про актиноміцети, мікромоноспори та інші. До нижчих відносять організми, які не утворюють міцелій, їх клітини мають форму паличок і коків (мікробактерії, мікрококи та ін.).

Актиноміцети мають одноклітинний несептований галузистий міцелій, який забарвлюється грампозитивно. Він складається із сплетьонь тонких ниточок – гіфів різної довжини. Міцелій дуже подібний до міцелію грибів, але гіфи значно тонші. Діаметр тонких гіфів 0,1–1,0 мкм, найтовстіших – до 1,5 мкм.

Актиноміцети мають клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану, цитоплазму. В цитоплазмі є органели (ядерний апарат – нуклеотид), рибосоми, включення (вуглеводи, ліпіди, волютин та ін.).

Актиноміцети добре ростуть на простих поживних середовищах. Розвиваються при температурі 32–37°C, рН=6,8–7,4.

Актиноміцети, що вирощені на щільних поживних середовищах, можуть мати 3 типи міцелію: субстратний, надсубстратний і повітряний. Субстратний міцелій розвивається всередині середовища. Надсубстратний міцелій розвивається на поверхні агаризованого щільного середовища, розростаючись густим плетивом у колонії. Повітряний міцелій утворюється на поверхні колонії. Нитки його відходять від міцелію колоній, розростаючись у густу, пухнасту, бархатисту або мучнисту масу.

Колонії на щільних поживних середовищах можуть бути щільними, шкірянистими, міцно зчепленими із середовищем. Дрібні колонії мають розмір 0,5–2 мм, а великі – до 1 см і більше. Поверхня колоній буває гладенькою, горбистою, складчастою і зернистою. Багато актиноміцетів утворюють пігмент різного кольору: рожевий, червоний, зелений, бурий, чорний.

Актиноміцети дуже розповсюджені у природі. Деякі види актиноміцетів використовують для виготовлення антибіотиків. Серед актиноміцетів є сапрофіти і паразити. Останні викликають у людини і тварин важке захворювання – актиномікоз, який супроводжується руйнуванням м'яких тканин. Дуже велику роль відіграють актиноміцети у ґрунтоутворенні та утворенні гумінових речовин (перегною).

Мікроскопічні гриби (Fungi, Mycetes).

Під цією назвою об'єднують велику групу організмів, які не мають хлорофілу. Розділ науки, що вивчає гриби, називається мікологією. Гриби відносять до еукаріотів. Для живлення вони використовують готові органічні сполуки. Гриби досить різноманітні за морфологією, місцями заселення, фізіологічними властивостями.

Основою вегетативного тіла грибів слугує гіф; сплетення гіфів утворює міцелій.

Аскоміцети (сумчасті гриби) – вищі багатоклітинні гриби, гіфи міцелію септоровані. До аскоміцетів належать деякі ниткоподібні мікроскопічні гриби – аспергиллові, пеніцилінові.

Відносно до субстрату міцелій буває поверхневий або повітряний, і занурений або субстратний. Відрізняють міцелій за забарвленням; він може бути безбарвним або колірним (чорний, бурий, зелений та ін.).

Мукорові гриби (Mucor) (рис. 11) мають міцелій, який складається із однієї дуже розгалуженої клітини, від якої відгалужується плодоносний гіф – спорангієносець. На кінці гіфу утворюється заокруглене циліндричне потовщення – колумела. На ній міститься спорангій зі спорами. На спорангієносці після звільнення від спор залишається колонка, а в нижній її частині – комірець. Мукорові гриби ростуть на вологих зернах, кормах, стінах вогких приміщень у вигляді сіруватого пухнастого нальоту.

Деякі види мукорових грибів мають здатність викликати бродіння або окислення. Їх використовують у промисловості для виробництва різних органічних кислот, спирту, ферментних препаратів.

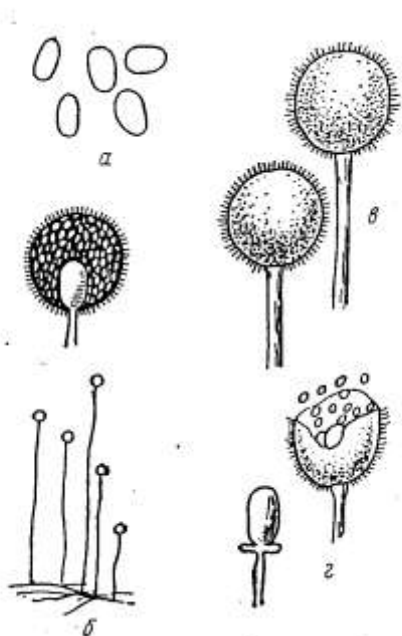


Рис. 11. *Mucor*:

а – спори; б – міцелій; в – спорангій; г – спорангій зі спорами

Ризопус (*Rhizopus*) (рис. 12) – гриби, які мають щось подібне до корневих волосків. Відрізняються від мукорів тим, що від їх міцелію відходять паростки – столони, які нагадують вуса суниці. З допомогою цих паростків гриб піднімається вгору по стінках скляного посуду, до яких він прикріплюється своїми нитками – ризоїдами. Під час розвитку волосків утворюється вузол, з якого відходять спорангієносії. В спорангії формується велика кількість спор. У більшості грибів спори мають яйцеподібну або бочкоподібну форму, їх оболонка має зморшки.

Розміщені пучком стовбурці спорангіїв розширюються на кінці та утворюють так звану апофізу. Утворення апофізи слугує характерною ознакою для роду ризопус. Спорангії спочатку білосніжні, а в зрілому стані зовсім чорні. При бурхливому розвитку грибкове сплетіння має вигляд ніби густозасіяного чорними крапочками.

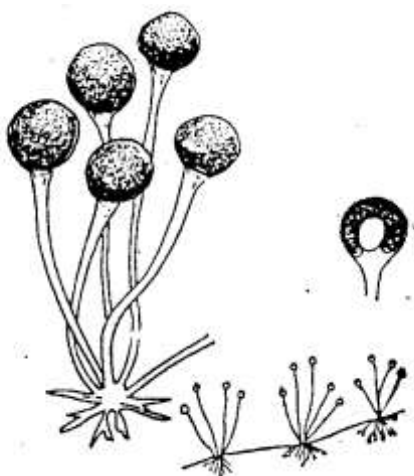


Рис. 12. *Rhizopus*:

Зліва – міцелій при великому збільшенні; справа – міцелій при невеликому збільшенні (внизу); спорангій в розрізі (вгорі)

Аспергілові гриби (Aspergillus) (рис. 13) нараховують більше 200 видів. Міцелій септорований (розділений поперечними перегородками), конідієносці (у деяких видів не септоровані) на вершині утворюють розширення у вигляді головки, від якої відходять відгалуження – стеригми із від шнурованими від них конідіями. Конідії розміщуються по радіусах кулі і нагадують цівки води, яка виливається із лійки, тому ці гриби іноді називають лійковою пліснявою. У різних видів плісняви конідії забарвлені по-різному (чорні, світло-зелені та ін.) і часто покриті тонкими щетинками.

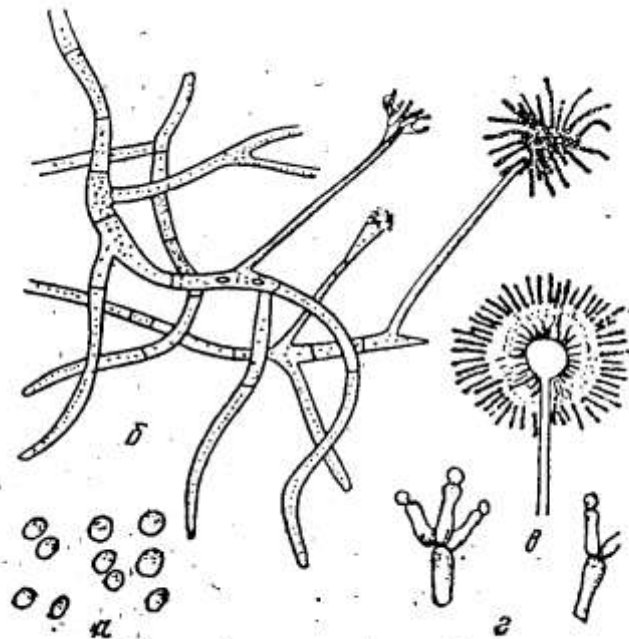


Рис. 13. *Aspergillus*:

а – конідії; б – міцелій із конідієносцями; в – конідієносець (схема); г – стеригми

Гриб приймає участь у мінералізації органічних сполук. Деякі види (наприклад *Aspergillus niger* – конідії гриба мають чорний колір) використовують у промисловості для добування лимонної кислоти. *Aspergillus oryzae* має конідії, які забарвлені в жовтий або жовто-зелений колір. Ці гриби містять ряд ферментів – амілазу, пектиназу, протеолітичні ферменти та ін.

Гриб приймає участь у мінералізації органічних сполук. Деякі види (наприклад *Aspergillus niger* – конідії гриба мають чорний колір) використовують у промисловості для добування лимонної кислоти. *Aspergillus oryzae* має конідії, забарвлені в жовтий або жовто-зелений колір. Ці гриби містять ряд ферментів – амілазу, пектиназу, протеолітичні ферменти та ін.

Пеніциліум (Penicillium) (рис. 14) має розгалужений міцелій (товщина ниток 2–3 мкм). Від міцелію відходять септоровані конідієносці, які на кінці розгалужуються у вигляді відростків – стеригм. Від них відходять конідії, розміщені у вигляді ланцюжків, – спори гладкої кулястої форми. У різних видів гриба спори різного кольору – білі, зелені та ін. Перед проростанням конідії значно збільшуються в розмірах.

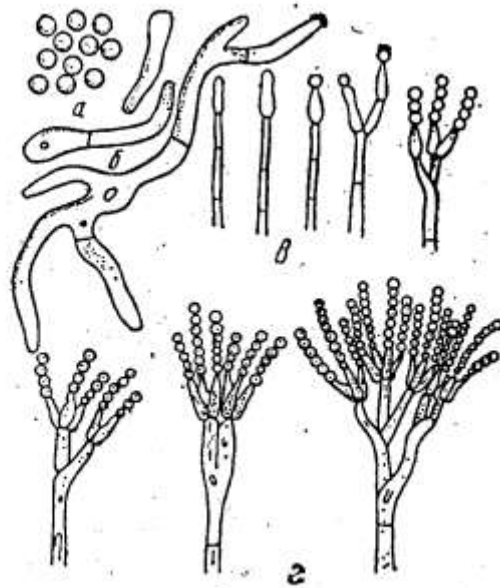


Рисунок 14. *Penicillium*

а – конідії; б – конідії, що проростають і розвиток міцелію; в – розвиток конідієносця; г – різні конідієносці

Незавершені гриби (Fungi imperfecti) вивчені недостатньо. Статеве розмноження у них не встановлене, і саме на цій основі їх і виділили в групу грибів. Гіфи міцелію септоровані. До цього класу належать: гриби роду кладоспоріум, молочна пліснява, альтернарія, катенулярія, дерматомицети та ін.

Кладоспоріум (*Cladosporium*) (рис. 15) зустрічається на сирі, яйцях, маслі, також всередині масла, оскільки може розвиватися при малому доступі кисню повітря. Міцелій оливково-зеленого кольору, на кінцях повітряних ниточок розміщені овальні спори у вигляді гронів, забарвлених подібно до міцелію. Ці гриби можуть виділяти темний пігмент, який забарвлює навколишнє середовище, в якому містяться ці колонії.

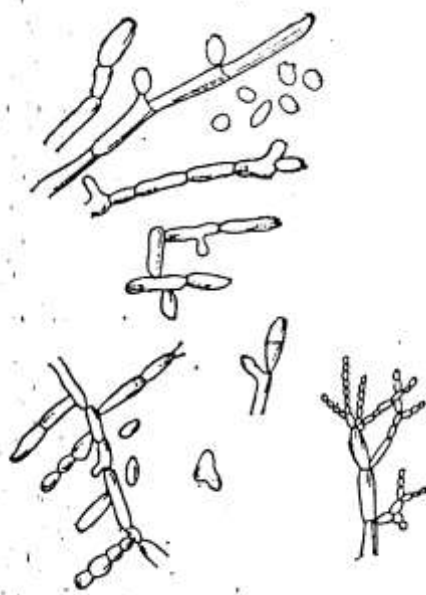


Рис. 15. *Cladosporium*

Молочна пліснява (*Endomyces lactis*) (рис. 16) розвивається в присутності кисню (аероб) у кислому середовищі. Ряд дослідників відносять ці організми до незавершених грибів, які дуже близькі до дріжджів. Міцелій білий септорований. У мазках має вигляд ниток, які досягають 300–500 мкм довжиною і 3–5 мкм у діаметрі. Спори (конідії) відділяються безпосередньо від кінця міцелію у вигляді прямокутних або овальних клітин, за виглядом подібних до дріжджових. Фарбуються грампозитивно.

Молочна пліснява у вигляді пухнастого білого нальоту з'являється на кисломолочних продуктах (сметані, кислому молоці, сирі), поверхні огіркового розсолу, стінах вогких приміщень.

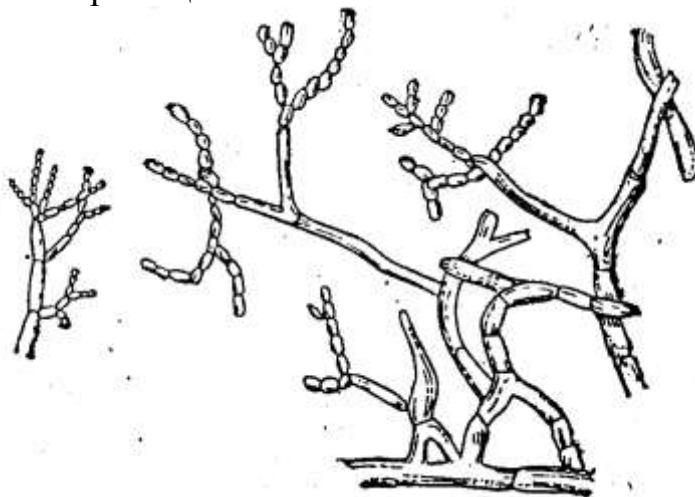


Рис. 16. *Endomyces Lactis*

Катенулярія (*Catenularia*) (рис. 17) утворює дрібні колонії. Міцелій септорований. На повітряних гіфах розвиваються довгі ланцюжки коричневих конідій. Деякі види (*Catenularia fulvinea*) викликають пороки у згущеному молоці із цукром, утворюючи грудки шоколадного кольору.



Рис. 17. *Catenularia*

Дріжджі (рис. 18).

Одноклітинні, без хлорофілу безміцеліальні гриби (еукаріоти). Відносяться до класу аскоміцетів (сумчасті гриби). Існує велика кількість видів грибів. Форма дріжджів різноманітна – яйцеподібна, еліптична, циліндрична, лимоноподібна і куляста. Розмір дріжджових клітин більший, ніж бактеріальних, досягає в діаметрі 8–10 мкм. Дріжджові клітини нерухомі, мають клітинну стінку, цитоплазму та ядро, яке дуже добре видно. У зрілих дріжджів є 1–2 вакуолі різноманітної форми. В цитоплазмі є включення: глікоген, волютин, краплини жиру. В деяких дріжджових клітинах може накопичуватися до 30–35% жиру.

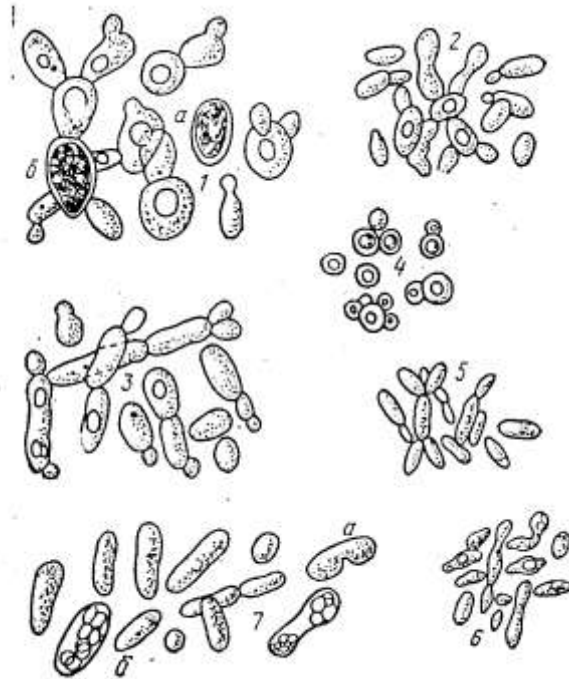


Рис. 18. Форми клітин дріжджів:

- 1 – яйцеподібні (а, б – клітини в спокої); 2 – еліпсоподібні; 3 – паличкоподібні; 4 – кулясті;
5 – витягнуті; 6 – лимоноподібні; 7 – дріжджі під час поділу (а – копуляція клітин,
б – клітини зі спорами)

Розмноження відбувається головним чином брунькуванням, рідше – спороутворенням, ще рідше – звичайним діленням. При брунькуванні в зрілій клітині на поверхні клітинної стінки з'являється випуклість – брунька, яка поступово збільшується. У цю випуклість із материнської клітини переходить частина цитоплазми та ядра, після чого брунька відділяється від материнської клітини і починає самостійне існування. Іноді дочірні клітини не відриваються від материнської, в результаті чого утворюються великі дріжджові колонії. Під час спороутворення в дріжджовій клітині утворюється 2–4, а іноді і 9–10 спор. Дріжджова клітина у цьому випадку розглядається як аскус (сумка), а спори – як аскоспори (рис. 19).

Деякі види дріжджів розмножуються подібно до бактерій простим діленням. Поділ відбувається шляхом утворення однієї або декількох поперечних перегородок.

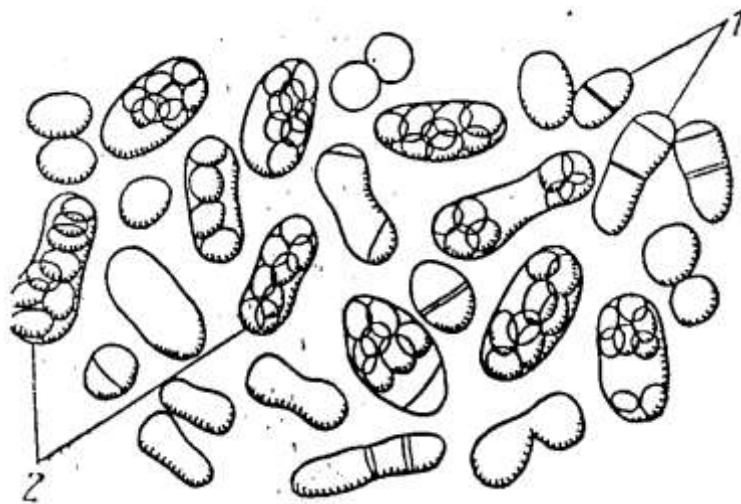


Рис. 19. Спори у дріжджів:
1 – процес поділу; 2 – процес спороутворення

У природі дуже поширені незавершені гриби роду *Torulopsis* та *Candida*. У більшості випадків вони мають кулясту форму. Деякі види роду *Torulopsis* використовують для отримання харчових і кормових дріжджів, інші у складі кефірних зернин використовують для приготування кефіру і кумису. Деякі види є шкідниками спиртового, винного виробництва і пива.

Завдання

1. Приготувати препарати актиноміцетів, мікроскопічних грибів, дріжджів.
2. Проглянути їх під мікроскопом і забарвити.

Хід виконання роботи

1. Приготування препарату гриба мукор.

Зняти препарувальними голками з поверхні гриба чорнувато-сірий пухнастий повітряний міцелій, внести в краплину води на предметному склі і за допомогою 2-х голок обережно, не руйнуючи структури міцелію, розправити гіфи міцелію, плодові органи. Краплину накривають покривним скельцем і трішки надавлюють. Покривне скельце потрібно опускати поступово, щоб не утворились пухирці повітря в препараті.

Під час мікроскопування виявити одноклітинну будову міцелію і органи розмноження – спорангій зі спорами, спорангієносець. Розглянути їх під мікроскопом із збільшенням 40х. У препараті завжди видно велику кількість спор, які висипались із тріснутих спорангіїв (гриб мукор виростити на сирому зерні або кормах, стінах).

2. Приготування препарату гриба пеніциліум.

Для мікроскопування гриба треба брати молоду, зелену частину міцелію – на межі з її білим краєм, використовуючи препарувальні голки. Гриб краще виростити на фруктах (яблуках, наприклад). Препарат готувати аналогічно пункту 1. Під час мікроскопування встановити багатоклітинні (септоровані) гіфи та органи розмноження – конідієносці з гроноподібними розгалуженнями на кінцях, на яких розміщені стеригми (по 2–4) із наявністю на них ланцюжка одноклітинних конідій.

3. Приготування препарату гриба кладоспоріум.

Зняти із сиру або масла невеликий шматочок повітряної пухнастої грибниці, перенести на предметне скло із краплиною води, накрити покривним скельцем і розглянути при збільшенні 40х. Під час мікроскопування знайти довгі багатоклітинні конідієносці, забарвлені в оливково-зелений колір, на кінцях яких розміщуються конідії (довгі, круглі або лимоноподібні).

4. Приготування препарату молочної плісняви (*Endomyces lactis*).

Зняти, обережно зіскрібаючи бактеріологічною петлею білий наліт із сметани чи сиру або кислого молока. Під час мікроскопування встановити багатоклітинність міцелію та відсутність спеціальних органів розмноження.

5. Приготування препарату дріжджів.

А. На предметне скло нанести краплину дріжджів і накрити покривним скельцем (виходить роздушена крапля). Проглядають із використанням об'єктивів 8 і 40х в затемненому полі зору, для чого звужують діафрагму або опускають конденсор.

Б. Препарат готують звичайним способом, висушують на повітрі, фіксують. На препарат кладуть смужку фільтрувального паперу, зафарбовують карболовим фуксином Циля, підігрівають 3–5 хв до появи випаровувань (у результаті і спори, і вегетативні форми забарвлюються в один колір – червоний), папірець знімають. Препарат знебарвлюють, опускаючи в 2%-ний розчин молочної кислоти. Препарат промивають водою і дофарбовують протягом 3–5 хв 1%-ним розчином метилового синього, знову промивають водою. Зрілі аскоспори забарвлюються в червоний колір, вегетативні клітини – в синій.

Запитання для контролю знань

1. Описати морфологію актиноміцетів.
2. Які види грибів використовують для виробництва органічних кислот, спирту, ферментних препаратів?
3. Описати будову грибків *Penicilium*.
4. Який тип пліснявих грибків з'являється на кисломолочних продуктах? Описати його будову і зовнішній вигляд плісняви.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Мікробіологічне дослідження масла

Мета роботи: ознайомитися із методами бактеріологічного дослідження масла.

Обладнання і матеріали: зразки солодковершкового і кисловершкового масла, пробірки із стерильною водою, водяна баня, термостат, стерильні градуйовані піпетки, пробірки, покривні і предметні скельця, розчини барвників, центрифуга, стерильні пробірки з гумовими або корковими пробками, чашки Петрі, бактеріологічні петлі, мікроскопи.

Методичні вказівки

В 1 г свіжого кисловершкового масла може бути від 10 до 100 млн мікробів (таблиця 1). В основному переважають молочнокислі бактерії. Питома вага сторонніх бактерій значно менша. Молочна кислота, утворена молочнокислими бактеріями, пригнічує розвиток бактерій гниття.

Під час дослідження кисловершкового масла, яке виготовлене методом швидкого сквашування, на початку зберігання основну мікрофлору складають молочнокислі бактерії, але в процесі зберігання спостерігається значно сильніший, ніж у маслі тривалого сквашування, розвиток сторонніх бактерій. Їх число в 1 г досягає 5–10 млн.

У солодковершковому маслі при найкращих технологічних умовах виробництва в 1 г масла міститься декілька тисяч таких бактерій. Проби масла відбирають стерильним щупом із 2–3 місць на відстані 3–5 см від краю. Щуп опускають приблизно на $\frac{3}{4}$ його довжини. Із щупу беруть шпателем 20 г продукту і поміщають у стерильну банку.

Масло в банці розтоплюють на водяній бані при 40–45°C і перемішують. 1 см³ розплавленого масла стерильною піпеткою вносять у пробірку з 9 мл стерильної води з температурою 35–40°C. З цієї пробірки роблять послідовні 2, 3, 4, 5 розведень.

Два рази на місяць у маслі визначають кількість протеолітичних бактерій, дріжджів і плісняви, бродильний титр. У солодковершковому маслі також визначають загальну кількість бактерій висівом 2, 3, 4, 5 розведень на МПА (м'ясопептонному агарі). Кількість молочнокислих бактерій визначають висівом 3, 4, 5 розведень на агар з гідролізованим молоком і крейдою.

Кількість протеолітичних бактерій визначають висівом на молочний агар 1, 2, 3, 4 розведень солодковершкового та 1, 2, 3 розведень кисловершкового масла.

Кількість мікроскопічних грибів (таблиця 2) та дріжджів підраховують на сусловому агарі або середовищі Сабуро при висіві з 1 і 2 розведень. Чашки Петрі з висівами поміщають у термостат із температурою 30°C на 2–3 доби. Після такої витримки в термостаті виконують кількісний облік мікрофлори загальноприйнятими методами.

Завдання

1. Підготувати мазки із проб солодковершкового і кисловершкового масла, зафарбувати їх за Грамом, замалювати мікрокартину.

Хід виконання роботи

Для приготування мазків масло нагрівають у центрифужних пробірках на водяній бані при 70°C. Після цього центрифугують 10 хв при частоті обертання 1500 об/хв. Верхній шар масла та білки зливають, а із осаду виготовляють мазки за загальноприйнятою методикою.

Мазки фіксують сумішшю спирту та ефіру (1:1) або хлороформом, зафарбовують за Грамом та мікроскопують із використанням імерсійного об'єктиву.

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

Запитання для контролю знань

1. Як відбирають та готують проби масла для дослідження?
2. Які поживні середовища використовують для визначення загальної кількості мікробів, протеолітичних бактерій, дріжджів та пліснявих грибів у маслі?
3. За якими критеріями оцінюють якість масла?

Таблиця 1 – Оцінка якості вершків і масла за мікробіологічними показниками (за числом бактерій)

Продукт	Загальна кількість бактерій	Гнильні бактерії
Вершки після пастеризації	До 100	—
	100 – 1 000	—
	1 000 – 5 000	—
	Більше 5 000	—
Вершки до внесення закваски (після визрівання)	До 1 000	—
	1 000 – 10 000	—
	10 000 – 75 000	—
	Більше 75 000	—
Масло солодковершкове свіже	До 10 000	До 500
	10 000 – 100 000	500 – 2 000
	100 000 – 1 000 000	2000 – 20 000
	Більше 100 0000	Більше 20 000
Масло солодковершкове десятиденне	До 500 000	До 5 000
	500 000 – 1 000 000	5 000 – 10 000
	1 000 000 – 5 000 000	10 000 – 50 000
	Більше 5 000 000	Більше 50 000
Масло кисловершкове свіже	Не обмежена	До 500
	" "	500 – 2 000
	" "	2 000 – 20 000
	" "	Більше 20 000
Масло кисловершкове десятиденне	Не обмежена	До 5 000
	" "	5 000 – 10 000
	" "	10 000 – 50 000
	" "	Більше 50 000

Таблиця 2 – Оцінювання якості вершків і масла за мікробіологічними показниками (за числом грибків)

Продукт	Мікроскопічні гриби	Оцінка
Вершки після пастеризації	— — — —	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно
Вершки до внесення закваски (після визрівання)	— — — —	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно
Масло і солодковершкове свіже	0 До 10 10 – 100 Більше 100	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно
Масло солодковершкове десятиденне	0 До 10 10 – 100 Більше 100	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно
Масло кисловершкове свіже	0 До 10 10 – 100 Більше 100	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно
Масло кисловершкове десятиденне	0 До 10 10 – 100 Більше 100	Відмінно Добре Задовільно Незадовільно

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів і сиру

Мета роботи: ознайомитись із схемою контролю заквасок і методами бактеріологічного дослідження кисломолочних продуктів (звичайне, Мечникове та ацидофільне кисле молоко, сметана, кефір, сир і майонез).

Обладнання і матеріали: закваски, кисломолочні продукти (кисле молоко Мечникова, кефір, кефірні грибки), предметні скельця, стерильні піпетки на 5 мл, розчини барвників, бактеріологічні петлі, культури молочнокислих бактерій на щільних поживних середовищах, водяна баня, пробірки діаметром 15 мм, 40%-ний розчин КОН, фільтрувальний папір, лійки.

Методичні вказівки

Високоякісні закваски, окрім здатності швидко закващувати молоко, повинні утворювати діацетил, леткі кислоти та ефіри, які надають специфічний аромат кисломолочним продуктам. Для приготування звичайного кислого молока, сметани і сиру використовують закваски із чистих культур *Str. lactis*, *Str. Diacetilactis* (рис. 20). До закваски болгарського кислого молока входять *Str. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* (рис. 21).

Контроль якості заквасок

Рідкі закваски контролюють методом безпосереднього мікроскопування забарвлених препаратів, визначають органолептичні показники, наявність сторонньої мікрофлори та активність закваски (за тривалістю сквашування молока).

Під час мікроскопування препарату проглядають до 10 полів зору, при цьому не повинно бути скупчень клітин молочнокислих бактерій та сторонньої мікрофлори.

Органолептичні показники (смак, запах, консистенція) повинні бути специфічними для кожного типу закваски.

Сторонню мікрофлору (кишкову паличку, спорові аеробні та анаеробні бактерії, дріжджі, мікроскопічні гриби) визначають так: кишкову паличку – шляхом висівання на середовище Кесслера; спорові бактерії – висіванням в стерильне знежирене молоко з додаванням парафіну для створення анаеробних умов і без парафіну для вирощування в аеробних умовах.

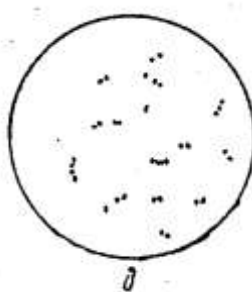
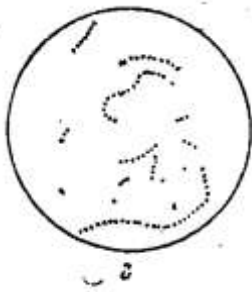
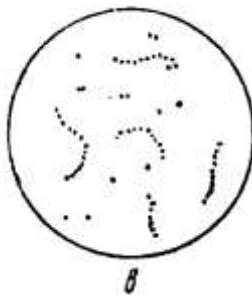
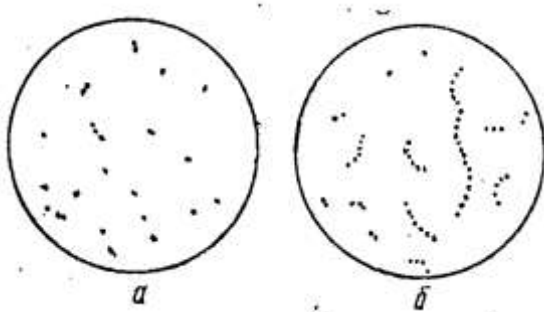


Рис. 20. Молочнокислі стрептококи:

а – Str. Lactis; б – Str. Cremoris;

в – ароматоутворювальні бактерії;

г – термофільний стрептокок; д – маммокок

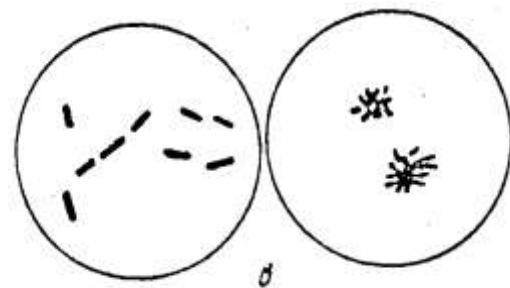
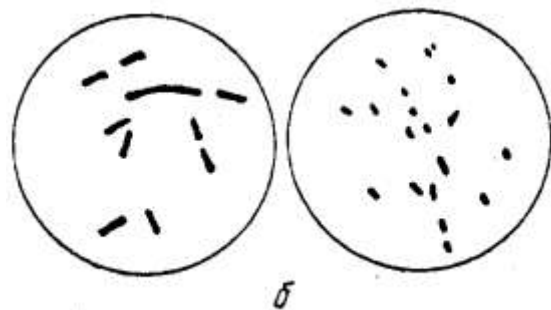
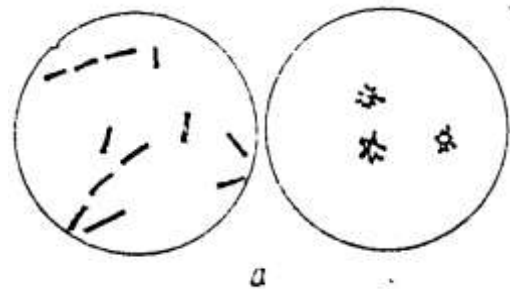


Рис. 21. Термофільні молочнокислі палички:

а – болгарська паличка; б – сирна паличка;

в – ацидофільна паличка

Якщо закваска забруднена анаеробними споровими бактеріями, парафінова пробка піднімається, молоко може пептонізуватись (тобто відбуватиметься процес розкладу білку). Під час мікроскопування препаратів із такого молока видно потовщені палички зі спорами.

Дріжджі та мікроскопічні гриби визначають висіванням закваски в чашки Петрі на сусло-агар.

Активність закваски визначають за часом згортання пастеризованого або прокип'яченого молока внесенням у нього 5% закваски. Закваска з молочнокислих стрептококів повинна сквасити молоко не довше, ніж за 7 год, а закваска з молочнокислих паличок – не більше, ніж за 6 год.

Сухі закваски контролюють аналогічно рідким (на присутність сторонньої мікрофлори, визначення органолептичних показників і на активність).

Приготування кисломолочних продуктів

Приготування кисломолочних продуктів на заквасках мезофільних молочнокислих бактерій

а) *Звичайне кисле молоко.* Готують шляхом додавання 5% закваски (від маси молока) в пастеризоване при 85–90°C і охолоджене молоко.

б) *Сметана, сир.* Для приготування використовують закваски, як і для кислого молока. Але для сметани використовують раси *Str. lactis*, які утворюють в'язку консистенцію, в той час як для кислого молока і сиру використовують раси, здатні утворювати під час сквашування молока рівний щільний згусток. Для покращання смаку та аромату вводять ароматотвірні бактерії. При використанні заквасок мезофільних і термофільних стрептококів у співвідношенні 1:1 значно скорочується тривалість технологічного процесу виготовлення сиру, оскільки сквашування відбувається при температурі 38–40°C.

У сметані і сирі можуть зустрічатися сторонні мікроорганізми: дріжджі, плісняві гриби, які дуже псують ці продукти.

а) *Кефір.* Для приготування кефіру використовують кефірні грибки (рис. 22), що являють собою симбіоз різних мікроорганізмів. Точний склад мікрофлори грибків поки що не встановлений. Шляхом мікроскопування зрізів кефірних грибків встановлено, що вони містять молочнокислі палички, "паличку строми", яка близька за властивостями до молочнокислої палички *Lb. caucasicum*, різні види дріжджів, молочнокислі стрептококи та оцтовокислі бактерії. Грибки у висушеному стані мають вигляд золотисто-жовтих зернят розміром із просяне зернятко і більші.



Рис. 22. Кефірні грибки

У процесі приготування кефір може забруднитися сторонньою мікрофлорою, що призводить до погіршення якості продукту. Наприклад, розвиток оцтовокислих бактерій, які розкладають білки і викликають слизоутворення, є причиною такого пороку, як ослизнення.

При температурі вище 20°C у результаті поганого закатування пляшок і попадання в них газотвірної мікрофлори (ароматотвірних і молочнокислих бактерій, дріжджів) спостерігається утворення вічок (газоутворення); цей процес може бути викликаний присутністю *Cl. Polymixa*, яка зустрічається в погано пастеризованому молоці. В готовому кефірі може також зустрічатися кишкова паличка, що занесена із брудною водою та ін. У цьому випадку утворюється ніздрюватий згусток. Щоб позбавитись від такого пороку закваски рекомендують підвищувати її кислотність до 200°Т протягом двох пересаджень.

Кефірну закваску рекомендують перемішувати для запобігання розвитку на її поверхні пліснявих грибків.

У мазках із якісного кефіру виявляють молочнокислі стрептококи, палички і дріжджові клітини. Вміст молочних стрептококів складає 94–99% від всієї мікрофлори, паличок – 4–6%, дріжджів – 1%. У витриманому кефірі виявляють 50–70% стрептококів і по 10% молочнокислих паличок і дріжджів.

г) *Кумис*. Щоб одержати кумис, як закваску використовують чисті культури *Lactobacillus bulgaricus* та дріжджі. Готують кумис із кобилячого молока. *Lact. bulgaricus* зброджує лактозу з утворенням молочної кислоти; дріжджі утворюють спирт.

Для мікроскопії пробу кумису центрифугують, з осаду готують мазки і забарвлюють за Грамом або метиленовим синім; виявляють грампозитивні великі палички і дріжджі.

*Приготування кисломолочних продуктів,
виготовлених на заквасках термофільних молочнокислих бактерій*

а) *Кисле молоко Мечникова*. Для приготування цього кислого молока використовують суміш рас: *Str. thermophilus* та *Lb. bulgaricus*. Кисле молоко Мечникова готують із молока пастеризованого при температурі 85–90°C. При заквашуванні молока сумішню термофільного стрептококу і болгарської палички (беруть 5% закваски) згортання відбувається через 2,5–3 год при температурі 40–42°C. Для закваски *Str. thermophilus* беруть у 5–10 разів більше, ніж *Lb. bulgaricus*; якщо в суміші більше стрептокока, то кисле молоко менш кисле на смак.

Кислотність готового продукту повинна бути 60–90°Т. Мікроскопування препарату повинно показати, що кількість клітин *Lb. bulgaricus* у 2 рази менше, ніж *Str. thermophilus*. Для мікроскопування з кислого молока бактеріологічною петлею роблять мазок, який висушують, фіксують на полум'ї і забарвлюють переважно розчином метиленового синього. В мазках повинна бути специфічна мікрофлора.

б) *Ацидофільне кисле молоко*. Його готують аналогічно кислому молоку Мечникова. До складу закваски входять *Str. thermophilus* та *Lb. acidophilus*. У молоці ацидофільна паличка не зустрічається. Вона здатна переносити вищі концентрації продуктів гниття і кисле середовище в порівнянні з іншими молочнокислими мікробами та утворює специфічні сполуки, які виявляють антибіотичну дію на кишкову паличку та деяку патогенну флору. Ці сполуки термостабільні, є біологічними антисептиками, які не шкідливі для організму.

Мікробіологічне дослідження ацидофільного кислого молока, ацидофільного молока та ацидофіліну виконують аналогічно кислому молоку Мечникова.

в) *Ацидофільне молоко*. Це молоко відрізняється від ацидофільного кислого молока лише тим, що його мікрофлора складається лише із *Lb. acidophilus*.

г) *Ацидофілін*. Його готують із пастеризованого молока сквашуванням закваскою, що складається із *Lb. acidophilus* та із додаванням *Str. lactis* і кефірної закваски.

Визначення колі-титру кисломолочних продуктів виконують за тією ж методикою, як і для молока із розбавленням 1/10 відповідно до технологічної інструкції з мікробіологічного контролю виробництва на молочних, сироробних і маслоробних заводах.

Завдання

1. Ознайомитися із мікрофлорою заквасок (виявлення CO₂, ацетоїну і діацетилу).
2. Приготувати закваску або молочнокислий продукт (за завданням викладача).
3. Провести мікроскопування мазків заквасок, кислого молока і кефіру. Замалювати картину.
4. Виконати мікроскопію препаратів із кефірних грибків на виявлення специфічної мікрофлори (по можливості).

Хід виконання роботи

Перевірка закваски на якість

1. Визначення CO₂.

У пробірку наливають 20 мл добре перемішаної закваски, відмічають її рівень і поміщають на водяну баню з холодною водою. Температуру води в бані піднімають до 90°C і, не виймаючи пробірки з бані, відмічають рівень підняття згустку. Якщо в заквасці є CO₂, згусток робиться губчастим і піднімається над сироваткою на 0,6–3 см і вище. Це вказує на присутність у заквасці *Str. diacetylactis* або *Str. paracitrovorus*.

2. Визначення ацетоїну і діацетилу.

Три краплини фільтрату закваски змішують у фарфоровій чашці з трьома краплями 40%-го розчину КОН. Якщо в заквасці є ацетоїн і діацетил, через 10–15 хв з'являється рожеве забарвлення. Забарвлення, яке з'являється через 30 хв і пізніше, не враховується. Цей метод ефективний у тому випадку, якщо в заквасці немає кишкової палички.

3. Визначення спорових бактерій у заквасці.

У дві пробірки наливають по 20 мл стерильного знежиреного молока, в одну із них додають трохи парафіну. В кожну пробірку висівають по 1 мл рідкої закваски. Обидві пробірки ставлять при температурі 85°C і витримують 10 хв. Після цього пробірки охолоджують і розміщують у термостаті при температурі 30°C на дві доби. Через дві доби здійснюють візуальне спостереження і під мікроскопом.

У випадку забруднення закваски анаеробними споровими бактеріями парафінова пробка піднімається.

4. Визначення активності закваски.

У пробірку наливають 20 мл прокип'яченого та охолодженого до кімнатної температури молока, додають, до нього 5% (за об'ємом) закваски і залишають стояти при кімнатній температурі. За часом згортання молока визначають наявність певної мікрофлори. Не більше, як за 6 год сквашують молоко молочнокислі палички; за 7 год сквашують молоко стрептококи.

Точні результати отримують проведенням мікроскопування мазка (див. п.6).

5. Приготування звичайного кислого молока.

У пробірку наливають 20 мл молока, пастеризують при 85–90°C протягом 15 хв, охолоджують до 30°C, вносять 5% закваски мезофільних молочнокислих бактерій. Молоко сквашується через 6–8 год; після утворення згустку кисле молоко поміщають у приміщенні з температурою, близько 0°C (у холодильник, ближче до морозилки) – для набухання білків. Готове кисле молоко повинне мати рівний згусток і слабо-кислий смак (кислотність 85–110°T).

6. Мікроскопічне дослідження кислого молока або сметани.

Бактеріологічною петлею роблять мазок із готового кислого молока (сметани) або виготовленої самостійно (див. п.5). Мазок висушують, фіксують і забарвлюють метиленовим синім. При спостереганні під мікроскопом виявляють клітини молочнокислих стрептококів.

7. Мікроскопічне дослідження закваски.

Виконують аналогічно п.6. Якщо закваска забруднена анаеробними споровими бактеріями, то при мікроскопуванні видно потовщені палички зі спорами.

8. Приготування кефірної закваски.

Сухі грибки (на кінчику шпателя) заливають кип'яченою і охолодженою до 30°C водою, витримують 1 добу. Через 24 год воду обережно зливають, а грибки знову заливають прокип'яченою водою і залишають на 24 год. При цьому грибки набухають і розм'якшуються. Після цього їх переносять у кип'ячене молоко з температурою 20–25°C і знову витримують 1 добу. Іноді для відновлення нормальної мікрофлори кефіру роблять 6–7 пересадок.

Після цього грибки ретельно промивають чистою, стерильною водою з температурою 15–20°C, заливають незбираним молоком, пастеризованим при 95°C з розрахунку 20 мл молока на 1 г грибка. Суміш витримують при 20°C до сквашування. Закваска повинна мати приємний аромат і трішки щипаючий смак.

9. Приготування кефіру.

У пастеризоване молоко вносять 3–5% грибкової закваски, перемішують і витримують до початку згортання молока при температурі 18–20°C.

10. Мікроскопічне дослідження кефіру.

Готують звичайним методом мазок із кефіру (див. п.6). У мазках з якісного кефіру знаходять молочнокислі стрептококи, палички і дріжджові клітини

Запитання для контролю знань

1. Чим відрізняється закваска для звичайного кислого молока від закваски болгарського кислого молока?
2. За якими показниками контролюють якість рідких і сухих заквасок?
3. Які кисломолочні продукти готують із використанням у заквасках мезофільних молочнокислих бактерій?
4. Чим відрізняються ацидофільні кисломолочні продукти від інших кисломолочних продуктів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Мікробіологічне дослідження сиру

Мета роботи: ознайомитись з методами дослідження сиру і молока, яке використовується у виробництві сиру.

Обладнання і матеріали: пробірки стерильні з ватними тампонами, молоко, сичужний порошок, тепла дистильована вода, предметні скельця, етанол, діетиловий ефір, метиленовий синій, мікроскоп.

Методичні вказівки

Для приготування сирів використовують закваску, яка містить *Str. lactis*, *Str. cremoris* та ароматоутворюючі бактерії *Str. diacetylacti*, *Str. pagacitrovorus*.

Для приготування швейцарського сиру використовують *Lb. helveticus*, *Str. thermophilus*, *Str. lactis*, *Str. cremoris*. Щоб отримати характерний рисунок сиру типу швейцарського використовують закваски пропіоновокислих бактерій *P. acidi propionici* (рис. 23). В анаеробних умовах їх клітини дрібні, кокоподібні, розміром 0,5–0,6 мкм, розміщені ланцюжком або попарно, нерухомі, грампозитивні. В аеробних умовах клітини паличкоподібні, довгі, скривлені, часто розгалужені. На звичайних поживних середовищах утворюють жовті гладенькі блискучі колонії із рівними границями. Зброджування вуглеводів (рис. 23) відбувається в основному з утворенням пропіонової кислоти, рідше – оцтової і CO₂, дестрини і крохмаль не утворюються. Температурний оптимум 25–30°C.

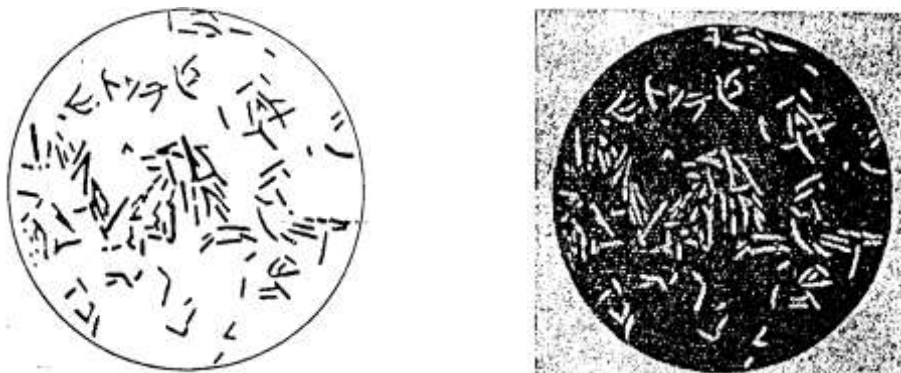


Рис. 23. Пропіоновокислі бактерії

У виробництві сиру рокфор використовують мікроскопічний гриб *Penicillium roqueforti*, який у вигляді сухого порошку плісняви розпилують або у вигляді суспензії розбризкують над поверхнею сирів.

Для виробництва сирів використовують лише те молоко, яке дає позитивні реакції на сичужно-бродильну пробу і пробу на бродіння. Ці проби дозволяють за характером згустку стверджувати про присутність різних груп мікробів у молоці.

Молоко вважається якісним, якщо при пробі на бродіння воно не згорнулось або тільки почало згортатись через 12 год. Не можна використовувати в сировиробництві молоко, яке дає згусток із спученням або бульбашками газу (таблиця 3). Молоко оцінюють, поділяючи на 4 класи. Для виробництва сиру використовують молоко 1 і 2 класів; молоко 3 і 4 класів вважається непридатним, оскільки в такому молоці можуть бути присутні газоутворювальні бактерії групи кишкової палички.

За сичужно-бродильною пробою молоко поділяють на 3 класи. Якісне молоко після додавання сичужного ферменту згортається протягом 20 хв, а через 12 год дає абсолютно однорідний щільний згусток із прозорою сироваткою. Проби розглядають через 12 год після додавання ферменту і відносять молоко до одного із 3 класів відповідно до таблиці 4.

Таблиця 3 – Оцінка якості молока за органолептичними властивостями згустку

Клас	Якість молока	Характеристика згустку
1	Добра	Спостерігається початок згортання без виділення сироватки і бульбашок газу; незначні смужки на згустку
2	Задовільна	Згусток зі смужками і порожнинами, які заповнені сироваткою; структура згустку дрібнозерниста; згусток стягується із слабким виділенням сироватки
3	Погана	Згусток із великим виділенням зеленуватої або білуватої сироватки; згусток великозернистий; спостерігаються бульбашки газу в згустку або у вершковому шарі
4	Дуже погана	Згусток розірваний і пронизаний бульбашками газу, спучений, як губка

Таблиця 4 – Оцінка якості молока за сичужно-бродильною пробою

Клас	Якість молока	Характеристика згустку
1	Добра	Згусток з гладенькою поверхнею, пружний на дотик, без вічок на поздовжньому розрізі, плаває в, прозорій сироватці
2	Задовільна	Згусток з поодинокими вічками (1–10), м'який на дотик, розірваний, але не спучений (не піднявся нагору)
3	Погана	Згусток із чисельними вічками, губчастий, м'який на дотик, спучений, вплив нагору або замість згустку спостерігається маса, подібна до пластівців

Завдання

1. Визначити якість молока за характером згустків у пробі на бродіння і сичужно-бродильній пробі.
2. Виконати мікроскопію мазків сиру на присутність молочнокислих бактерій.
3. Ознайомитися із мікрофлорою сирів і заквасок.

Хід виконання роботи

1. Проба на бродіння.

У стерильні пробірки на 30–40 мл наливають молоко, закривають ватяними корками і ставлять у термостат або водяну баню при температурі 38°C. При використанні бані слід враховувати, що температура нагріву води повинна бути вища на 5–10°C

Через 12 і 24 год здійснюють спостереження, відмічаючи час згортання, запах, смак, кислотність (°T). Молоко вважається доброякісним; якщо воно починає згортатися лише через 12 год або й пізніше. Утворений згусток повинен бути без бульбашок газу і спучувань.

Через 24 год від початку бродіння здійснюють остаточну оцінку якості молока, використовуючи таблицю 3.

2. Сичужно-бродильна проба.

У пробірку наливають 30 мл молока, додають до нього 1 мл сичужного ферменту, перемішують і витримують протягом 12 год при температурі 38–40°C. Якісне молоко згортається протягом 20 хв, через 12 год утворює однорідний щільний згусток із прозорою сироваткою. Отримані результати з огляду згустку порівнюють із даними із таблиці 2 і роблять висновок щодо якості молока.

Розчин сичужного ферменту готують шляхом розчинення 0,05 г готового сичужного порошку в 10 мл теплої дистильованої води.

3. Мікробіологічне дослідження сиру.

Для мікробіологічного дослідження сиру готують мазки з будь-якого твердого сиру наступним методом: здавлюють між двома предметними скельцями тонкий шматочок сиру, потім скельця роз'єднують. Мазок-відбиток на предметному скельці фіксують спиртом, знежирюють діетиловим ефіром, фарбують і розглядають під мікроскопом. Побачену картину замальовують.

Запитання для контролю знань

1. Описати порядок постановки проби на бродіння.
2. Які закваски використовують для приготування різних видів твердих сирів?
3. Як готується мазок із сиру для мікроскопування?
4. За якими показниками оцінюють якість сирого молока, що поступає для виготовлення твердого сиру?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Вивчення патогенної мікрофлори та санітарно-мікробіологічний контроль обладнання, інвентарю, тари та рук робітників харчового виробництва

Мета роботи: ознайомитися із основною патогенною мікрофлорою та її властивостями, а також з методами санітарно-мікробіологічного контролю технічного обладнання і рук працівників харчових виробництв.

Прилади і матеріали: вата, дерев'яні палички, цупкий картон, ножиці, леза, пробірки, вода, чашки Петрі.

Методичні вказівки

1. Збудники харчових токсикозів

До збудників харчових токсикозів належать ентеротоксигенні стафілококи, стрептококи і збудники ботулізму.

Стафілококи.

Це аероби і факультативні анаероби, досить невимогливі до поживних середовищ, оптимальна температура для розвитку 32–37°C. Дуже добре розвиваються в слабколужному середовищі (рН=7,2–7,6).

На поживних середовищах вже через 12–24 год з'являються круглі, діаметром 2–4 мм, колонії білого, оранжевого або лимонно-жовтого кольору. Деякі штами утворюють колонії золотисто-жовтого кольору.

Патогенні і сапрофітні стафілококи мають однакові морфологічні і частково біологічні властивості, тому диференціація патогенних стафілококів від непатогенних має велике практичне значення.

Для патогенних стафілококів характерною властивістю є здатність ферментувати манніт, розріджувати желатин, виробляти ферменти – коагулазу, лецитиназу, фібринолізин.

Токсигенні стафілококи виділяють токсини, які мають такі властивості:

- лейкоцидин – руйнує лейкоцити;
- некротоксин – викликає некроз тканин;
- летальний токсин – призводить до загибелі тварини;
- ентеротоксин – викликає харчові отруєння. Ентеротоксин – найстійкіший із усіх відомих екзотоксинів – витримує кип'ятіння протягом 2 год.

За сучасною класифікацією стафілококи поділяють на 3 види: *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. saprophyticus*. Деякі штами *Staph. epidermidis* мають патогенні властивості, деякі нетоксичні. В лабораторних умовах використовують для визначення їх патогенності здатність стафілококів виділяти фермент коагулазу (найважливіша ознака патогенності).

Стрептококи. На поживних середовищах стрептококи формують сірувато-білі колонії діаметром до 1 мм.

Патогенні стрептококи в процесі життєдіяльності виділяють еритрогенний токсин, гемолізін, стрептолізін, а також токсин, що призводить до харчових отруєнь. Харчові токсикози найчастіше виникають після використання продуктів, які виготовлені з молока маститних корів, у яких мастит викликаний *Str. agalactiae*.

Cl. botulinum (рис. 24). Велика паличка, розміром 4–8 мкм, рухлива, утворює спору овальної форми, яка розміщена на кінці палички; спора перевищує діаметр вегетативної клітини, в результаті чого має вигляд тенісної ракетки.

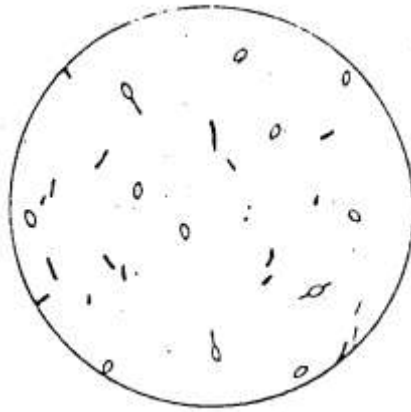


Рис. 24. *Cl. Botulinum*

Cl. botulinum – анаероб, найкраще розвивається на середовищах з рН=7,2–7,4. Оптимальна температура росту і токсиноутворення для 4-х типів (А, В, С, D) = 35°C, а для інших двох (Е, F) 28-30°C. *Cl. botulinum* продукує сильнотоксичний екзотоксин, який значно сильніший за хімічні отрути.

2. Збудники харчових токсикоінфекцій

Сальмонели (рис. 25). Дрібні короткі палички із заокругленими кінцями, досить рухливі, спор і капсул не утворюють. Належать до факультативних анаеробів, культивуються на простих поживних середовищах при рН=7,2–7,6, оптимальна температура для розвитку 37°C, але розвиватися можуть і при температурах від 5°C до 46°C. Для швидкого визначення належності культури мікроба до роду сальмонел ставлять так звану реакцію аглютинації із спеціальними сироватками за спеціальною методикою. Якщо реакція позитивна, то в краплині із сироваткою на предметному скельці з'являється чітко виражена і видима неозброєним оком зернистість на темному фоні. В контрольній краплині бактеріальна, суспензія залишається без змін.

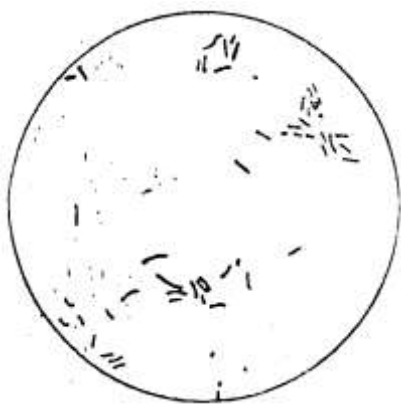


Рис. 25. *Salmonella*

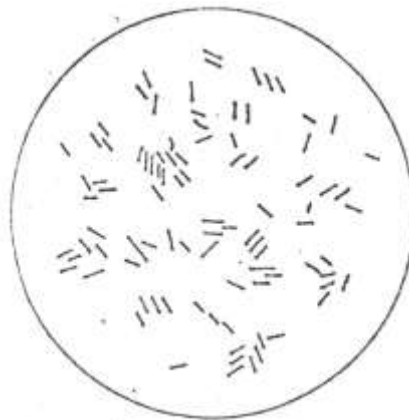


Рис. 26 *Escherichia coli*

Бактеріальні групи кишкової палички. До бактерій кишкової палички відносять роди *Escherichia* (*E. coli*) (рис. 26), *Citrobacter* (*C. freundii*), *Enterobacter* (*E. aerogenes*). Це дрібні короткі палички, рухливі, грамнегативні, спор і капсул не утворюють.

Бактерії групи кишкової палички – факультативні аероби, культивуються на простих поживних середовищах (рН=7,2–7,4). Оптимальна температура розвитку +37°C.

Диференціацію бактерій групи кишкової палички виконують за специфічними тестами, за допомогою яких відрізняють бактерії групи кишкової палички фекального походження від кишкових паличок, які перебувають у навколишньому середовищі.

***Bac. cereus*.** Велика спороутворююча грампозитивна рухлива паличка, під час мікроскопування має вигляд ланцюжків або пакетоподібних скупчень, рідше – окремо один від одного. Це аероб, оптимальна температура якого для розвитку 30–32°C при рН=9–9,5; у кислому середовищі (рН=4,5–5) припиняє розвиток.

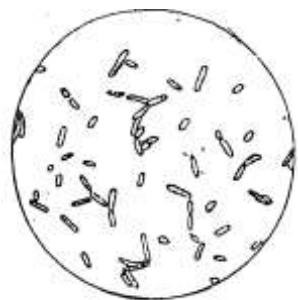
При вживанні продуктів, які містять велику кількість мікроорганізмів *Bac. Cereus* виникає харчове отруєння.

3. Збудники псування харчових продуктів

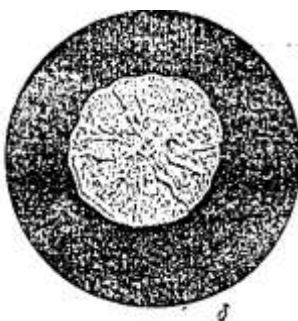
Псування харчових продуктів тваринного походження викликають гнильні бактерії, мікрококи, ентерококи, мікроскопічні гриби, дріжджі, актиноміцети, збудники деяких видів бродіння (маслянокислі, оцтовокислі та ін.).

Спороутворювальні аероби. Ця група гнильних бактерій представлена паличкоподібними мікробами, які викликають псування продуктів під час їх зберігання в аеробних умовах: *Bac. Subtilis* (сінна паличка) (рис. 27), *Bac. Megatherium* (капустяна паличка) (рис. 28), *Bac. Mycoides* (грибоподібна паличка) (рис. 29), *Bac. mesentericus* (картопляна паличка) (рис. 30). Великі палички розміром від 3 до 6 мкм, спори розміщені в центрі клітини, рухливі, капсул не утворюють, грампозитивні. В мазках, які виготовлені із культури бактерій, палички розміщені по 1–2 особині або утворюють ланцюжки.

Культивуються на простих поживних середовищах, оптимальний рН середовища 7,2–7,6. Гнильні аероби виділяють ферменти із групи протеаз, розкладають білки з виділенням смердючих речовин. Бактерії зріджують желатин, згортають і пептонізують молоко.

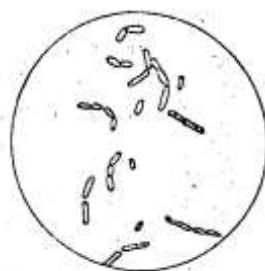


а

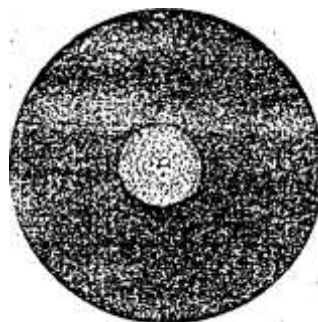


б

Рис. 27. *Bac. Subtilis*:
а – палички і овальні спори; б – колонії

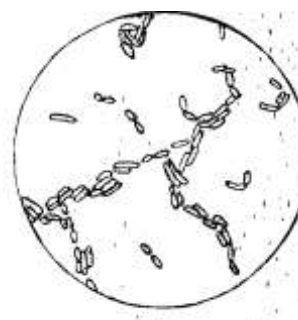


а

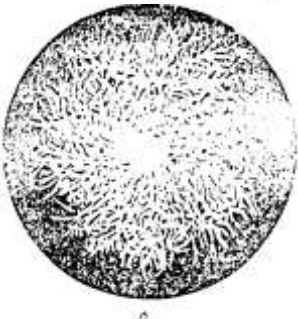


б

Рис. 28. *Bac. Megatherium*:
а – паличкоподібні клітини; б – колонії

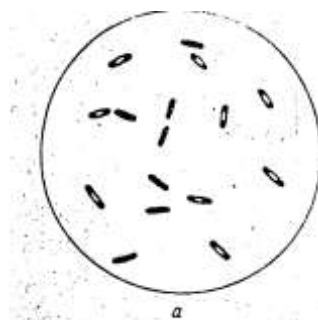


а

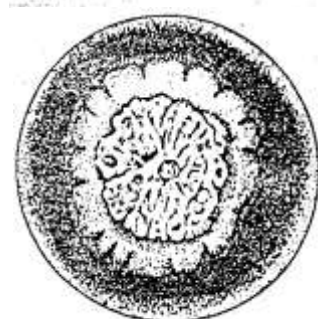


б

Рис. 29. *Bac. Mycoide:s*
а – клітини на початку утворення спор;
б – колонії на агарі



а



б

Рис. 30. *Bac. Mesentericus*:
а – клітини; б – колонії

Спороутворювальні анаероби. Із анаеробів найчастіше псування харчових продуктів тваринного походження викликають бактерії з роду *Clostridium*: *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum*. Бактерії великих розмірів, паличкоподібної форми, утворюють спори, які перевищують діаметр вегетативної клітини, рухливі, капсул не утворюють, грампозитивні.

Анаероби мають виражені протеолітичні властивості. Вони розріджують желатин, згортають і пептонізують молоко, утворюють сірководень, аміак, індол. Можуть розкладати жири.

Ентерококи. Псування харчових продуктів можуть викликати стрептококи кишкового походження (ентерококи). До них належать: *Str. liquefaciens* (*Mammococcus*), *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. zymogenes*, *Str. bovis*. Бактерії кулясті, утворюють короткі ланцюжки або розміщуються попарно, нерухомі, спор і капсул не утворюють, грампозитивні. Можуть розвиватися як при низькій (10°C), так і при високій (45°C) температурі, стійкі до NaCl (6,5%), лужного середовища (рН 9,6), до пеніциліну, термостійкі (витримують температуру 65°C протягом 30 хв).

Маммокок (*Str. liquefaciens*) псує молочнокислі продукти – при розмноженні в них маммококів продукти стають гіркими і непридатними для споживання в результаті накопичення значної кількості пептонів.

Маслянокислі бактерії (рис. 31). До маслянокислих бактерій належать *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* та ін. Бактерії великого розміру, паличкоподібні, утворюють спори, які розміщені в центрі клітини, спори перевищують розмір клітини. Палички рухливі, грампозитивні, капсул не утворюють.

Маслянокислі бактерії термостійкі, є збудниками псування різних консервів (м'ясних, рибних, овочевих) і молочних продуктів (сиру звичайного і твердого, вершків, масла та ін.) під час тривалого зберігання.

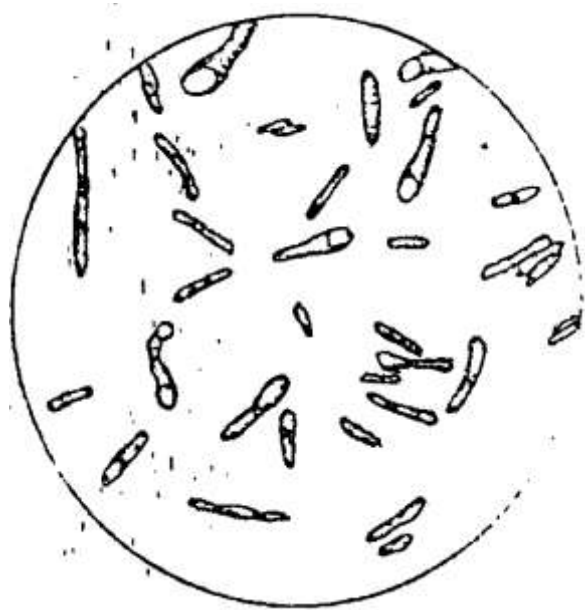


Рис. 31. Маслянокислі бактерії

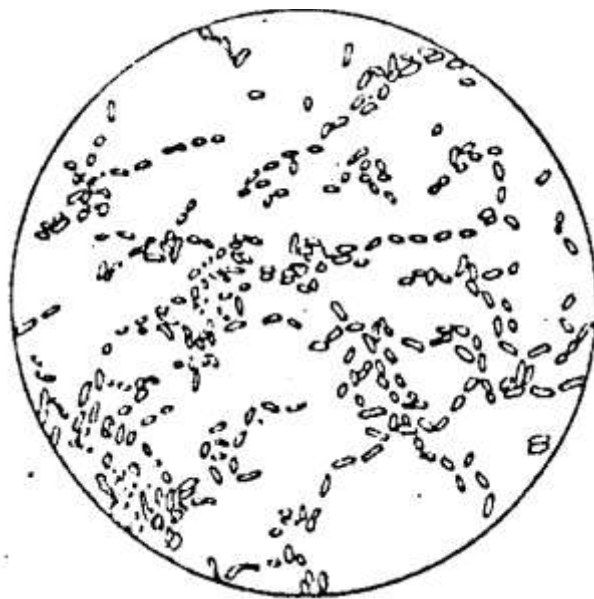


Рис. 32. *Acetobacter aceti*

Оцтовокислі бактерії (рис. 32). Ці бактерії відносяться до роду *Acetobacter*, який включає декілька видів: *A. aceti*, *A. ogleans* та ін. Оцтовокислі бактерії – аероби; оптимальна температура розвитку в межах 25–30°C. У середовищі накопичується велика кількість оцтової кислоти. Оцтовокислі бактерії призводять до кислотного бродіння, викликаючи псування напівфабрикатів і готової сировини.

4. Санітарно-мікробіологічний контроль обладнання, інвентарю і тари виробництва

Для виконання мікробіологічного дослідження готують стерильні марлеві (ватні) тампони (рис. 33), закріплюють їх на дерев'яному стержні. Кожен тампон помішують у пробірку з 10 мл води (стержнем у гору) і стерилізують під тиском 0,1 МПа протягом 20 хв.

Для виміру площі досліджуваного об'єкту використовують спеціальні трафарети розміром 1 см², 3 см² і 5 см² із нержавіючої сталі. Перш ніж взяти пробу, трафарет протирають: спиртом, обпалюють і лише після цього накладають на поверхню об'єкту. Стерильним тампоном протирають поверхню, обмежену трафаретом і занурюють тампон у ту ж пробірку, з якої його вийняли.

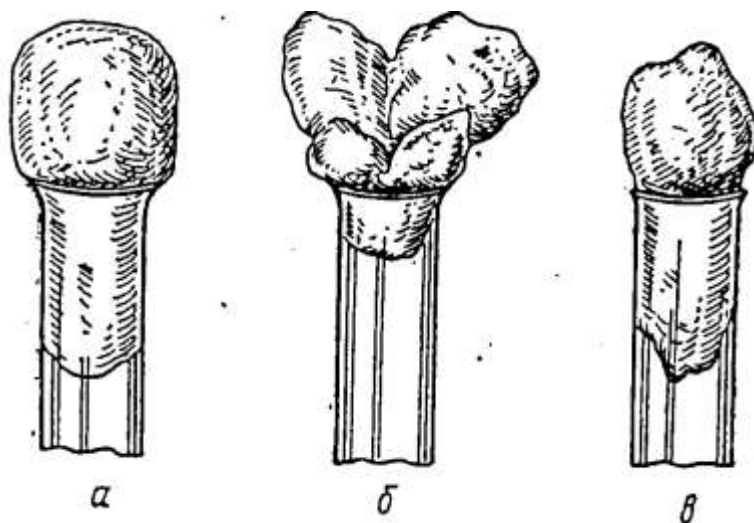


Рис. 33. Ватяні корки:

а – правильно виготовлені; б, в – неправильно виготовлені

Проби з рук. Проби з рук беруть без трафарету. Для цього стерильним вологим тампоном ретельно, протирають долоню, пальці, між пальцями і під нігтями; тампони кладуть у пробірку.

Подальше дослідження викоують у лабораторії. В доставлену пробірку з пробою наливають 9 мл стерильної води, отримуючи розведення 1:10 (рис. 34)

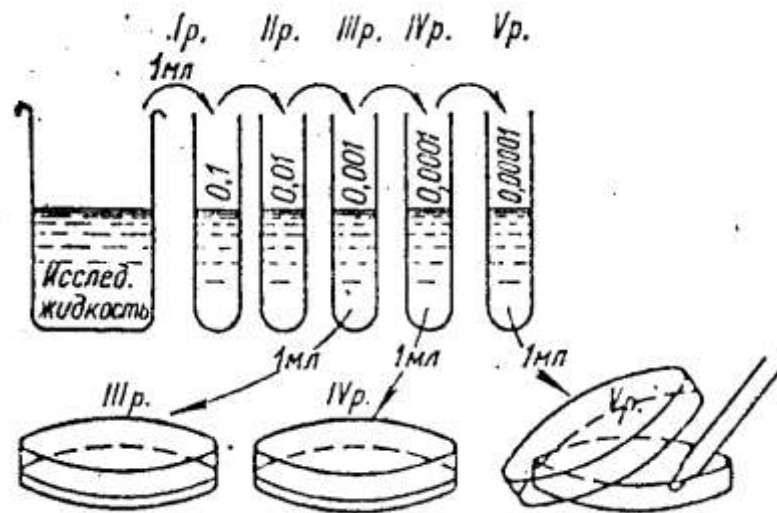


Рис. 34. Приготування розведень і висівання в чашки Петрі

Пробірку ретельно струшують протягом 3–5 хв. Далі роблять висівання на поживне середовище за встановленою методикою і термостатують при температурі 37°C протягом 48 год (рис. 35).

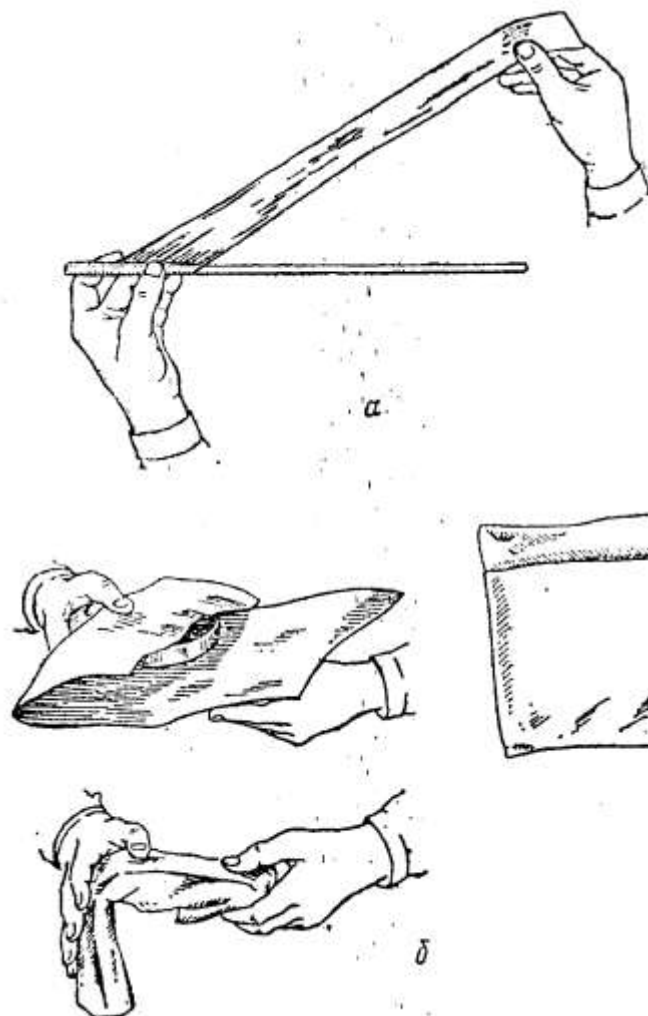


Рис. 35. Загортання піпеток (а) і чашок Петрі (б)

Число колоній, які вирости на поживному середовищі, множать на розведення і судять про степінь забрудненості об'єкту. Санітарно-гігієнічне благополуччя об'єкту встановлюють за відсутністю кишкової палички. Виявлення кишкової палички проводять методом для визначення колі-титру. У змивах з рук не повинні бути присутні бактерії групи кишкових паличок.

Завдання

1. Зробити змиви з обладнання лабораторії, вказаного викладачем.
2. Зробити змиви з рук.

Хід виконання роботи

На вказаному викладачем обладнанні або інших предметах лабораторії виконати тренувальні змиви, відпрацювати техніку їх виконання. Для цього приготувати 2 ватні тампони, закріпити їх на дерев'яному стержні. Кожен з тампонів помістити в заздалегідь підготовлені пробірки з 10 мл води – обов'язково стержнем догори (щоб не братися за стерильний тампон руками). Оскільки заняття тренувальне, то пробірки із тампонами не стерилізують.

Приготувати самостійно трафарети розміром 1 см², 3 см² і, 5 см² із цупкого картону. Вологим тампоном протерти поверхню на обладнанні лабораторії, вказане викладачем. Тампон вкласти в пробірку. Взяти вологий тампон, ретельно ним витерти долоню, пальці, між пальцями, під нігтями. Тампони покласти у пробірку. В пробірки із "пробами" доливають 9 мл води і ретельно струшують 3–5хв. Надалі демонструють висівання проб на поживне середовище. Відповідають на запитання викладача і запитання, наведені нижче.

Запитання для контролю знань

1. Як диференціюють токсичні стафілококи від сапрофітних?
2. Які ви знаєте основні властивості *CI. botulinum*?
3. Які види ентерококів, маслянокислих і оцтовокислих бактерій викликають псування харчових продуктів?
4. Які методи використовують для бактеріологічного дослідження обладнання, тари і рук робітників?
5. За якими критеріями здійснюється санітарно-гігієнічна оцінка чистоти рук робітників?

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Асонов, Н.Р. Микробиология [Текст] / Н.Р. Асонов. – М.: Колос. 1997, – 352с.
2. Емцев, В.Г. Микробиология [Текст] / В.Г. Емцев, В.К. Шильникова. – М.: Агропромиздат, 1990. – 191 с.
3. Воробьева, Л.И. Промышленная микробиология [Текст] / Л.И. Воробьева. – М.: МГУ, 1989. – 237 с.
4. Техника безопасности в микробиологической промышленности [Текст] / Под ред. Цигальниченко В.М. – М.: Лесная промышленность. 1988.– 128 с.
5. Жвирблянская, А.Ю. Микробиология в пищевой промышленности [Текст] / А.Ю. Жвирблянская, О.А. Бакушинская – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 500 с.
6. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія [Текст] / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
7. Векірчик, К.М. Мікробіологія з основами вірусології [Текст] / К.М. Векірчик. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.
8. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии [Текст] / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин. – М.: Мастерство, 2001. – 224 с.
9. Векірчик, К.М. Практикум з мікробіології [Текст] / К.М Векірчик. – К.: Либідь, 2001. – 144 с.
10. Панкратов, А.Я. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии [Текст] / А.Я Панкратов, В.С Григоров. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 216 с.
11. Жвирблянская, А.Ю. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности [Текст] / А.Ю. Жвирблянская, О.А. Бакушинская. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 312 с.
12. Нецепляев, С.В. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения [Текст] / С.В Нецепляев, Л.Я. Панкратов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 224 с.
13. Слюсаренко, Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств [Текст] / Т.П. Слюсаренко – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 207 с.
14. Практикум по биохимии [Текст] / Под ред. С.Е. Северина и Г.Н. Соловьевой. – М.: МГУ, 1989. – 510 с.
15. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений [Текст] / Г.В. Лазурьевский. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
16. Биотехнология: учебное пособие для вузов [Текст] / Под ред. И.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.
17. Панкратов, А.Я. Терминологический словарь по технической микробиологии [Текст] / А.Я. Панкратов, Е.С. Анюшкин. – Воронеж: Издат. Воронеж. ун-та, 1989. – 69 с.