

Міністерство освіти і науки України

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра біохімії,
мікробіології та фізіології харчування



«ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ»

Частина II

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

для бакалаврів галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності
204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» денної та
заочної форм навчання

Затверджено
методичною радою зі спеціальності
204 «Технологія виробництва
і переробки продукції тваринництва»
галузі знань 20 «Аграрні науки та
продовольство»
Протокол № 2 від 28.05.2021 р.

Лабораторний практикум з курсу «Технічна мікробіологія» для бакалаврів галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» денної та заочної форм навчання / Укл. Л.В. Капрельянц, Л.М. Пилипенко, А.В. Єгорова, Л.В. Труфкаті. – Одеса: ОНАХТ, 2021. – 80 с.

Укладачі Л. В. Капрельянц, д-р техн. наук, професор,
 Л. М. Пилипенко, д-р техн. наук, професор,
 А. В. Єгорова, канд. техн. наук, доцент,
 Л.В. Труфкаті, канд. техн. наук, доцент

Відповідальний за випуск завідувач кафедри біохімії, мікробіології і фізіології харчування Л. В. Капрельянц, доктор технічних наук, професор

Технічна мікробіологія є однією з фундаментальних дисциплін для студентів-технологів усіх спеціальностей харчових виробництв, тому що її знання є основою для забезпечення біологічної стабільності харчових продуктів, відсутності харчових інфекцій і отруєнь у споживачів, мікробіологічної безпеки і якості їжі. Мікробіологічні показники є критеріальними й основними при визначенні якості продуктів серед комплексу показників (органолептичних, фізико-хімічних, біохімічних і ін.). В курсі «Технічна мікробіологія» вивчаються методологічні основи реалізації системи НАССР на харчових підприємствах.

Основною **метою** курсу “Технічна мікробіологія” для студентів є глибоке вивчення морфології, анатомії, фізіології і біохімії мікроорганізмів, основ їх систематики, дії фізичних та хімічних факторів на життєдіяльність мікроорганізмів, їх екології, а також вивчення збудників шлунково-кишкових захворювань та токсикоінфекцій, механізму виникнення та симптомів протікання цих хвороб; вивчення основ мікробіологічного та санітарного контролю харчового виробництва, заходів, що покращують санітарний стан, способів попередження попадання сторонніх мікроорганізмів у сировину та готову продукцію. Кінцевою метою є знання умов, що сприяють кращому виробничому застосуванню мікроорганізмів та забезпечують відсутність браку, а також високу споживчу якість продуктів харчування.

Знання дисципліни «Технічна мікробіологія» є теоретичною базою при розробці технологічних процесів в харчовій промисловості.

В результаті вивчення дисципліни студенти повинні **знати**:

- історію розвитку дисципліни, сучасні принципи таксономії та номенклатури мікроорганізмів, форми клітинної організації, анатомію мікробної клітини, морфологію та фізіологію бактерій, грибів та дріжджів, загальну характеристику вірусів та значення цих груп мікроорганізмів в різних галузях харчових виробництв;

- роль мікроорганізмів в кругообігу речовин у природі, мікрофлору води та повітря (джерела мікроорганізмів для харчових продуктів) та вплив зовнішніх факторів на мікроорганізми, мікрофлору сировини та готової продукції;

- характеристику мікроорганізмів різних фізіологічних та таксономічних груп, що викликають псування продуктів;

- морфологію та фізіологію мікроорганізмів, що викликають псування харчової сировини та продуктів, а також мікроорганізмів, що застосовуються в технологічних процесах, патогенних мікроорганізмів, що викликають харчові захворювання;

- технологію приготування поживних середовищ та методи їх стерилізації, методи культивування мікроорганізмів, методи бактеріологічного аналізу повітря, води;

- роль мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі і підтриманні

біоценозу;

- мікрофлору, що викликає псування сировини та готової продукції, теоретичні основи бактеріологічного контролю на підприємствах харчової промисловості;

- санітарне, економічне та соціальне значення заходів профілактики мікробного псування продуктів, шлунково-кишкових інфекцій та харчових токсикоінфекцій.

В результаті вивчення курсу студенти повинні *вміти*:

- працювати з мікроскопом у всіх режимах,
- готувати бактеріологічні препарати,
- робити посіви мікроорганізмів та мікрофлори різних природних матеріалів на поживні середовища,
- виділяти чисту культуру мікроорганізмів та визначати групову належність мікроорганізмів,
- проводити мікробіологічний контроль води, повітря, обладнання, тари, інвентарю, визначати мікрофлору людини.

Курс дисципліни “Технічна мікробіологія” включає 2 модулі. Кожний модуль містить 1,5 кредити, у які входять лекції, лабораторні роботи й самостійна робота студентів. Вивчення дисципліни полягає у засвоєнні лекційного матеріалу й окремих розділів, які не виносяться на лекції, у виконанні лабораторних робіт, а рівень засвоєння знань контролюється написанням контрольної роботи й складанням іспиту.

Перший модуль включає теми:

- Вступ. Предмет і завдання технічної мікробіології.
- Морфологія й анатомія бактерій.
- Плісеневі гриби. Дріжджі.
- Віруси й фаги.
- Фізіологія мікроорганізмів. Обмін речовин мікроорганізмів.
- Культивування й ріст мікроорганізмів.

Другий модуль включає теми:

- Вплив факторів навколишнього середовища на життєдіяльність мікроорганізмів.
- Екологія мікроорганізмів. Кругообіг речовин у природі.
- Мікрофлора повітря, ґрунту, води.
- Інфекції й імунітет. Генетика мікроорганізмів.
- Патогенні мікроорганізми й аліментарні захворювання.
- Основи контролю харчових виробництв.

Одним із завдань курсу “Технічна мікробіологія” є підготовка студентів до вивчення курсів спеціальної мікробіології та профільюючих дисциплін.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

Мікробіологічна лабораторія повинна забезпечуватись відповідно до вимог ДСП 9.9.5.035.99, цих правил та інших чинних нормативних актів.

1. При виконанні робіт у лабораторії на працівників можуть впливати небезпечні та шкідливі виробничі біологічні фактори: мікроорганізми (бактерії, віруси, рикетсії, спірохети, хламідії, гриби), гельмінти, найпростіші та ін., а також продукти їх життєдіяльності.

2. Лабораторія повинна бути забезпечена водопровідною системою, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, газифікована.

3. Імунобіологічні препарати повинні бути зареєстровані, дозволені для використання в Україні, мати документи, що засвідчують їх якість, і зберігатися згідно з нормативною документацією (НД) про застосування.

4. Реактиви, що використовуються в лабораторіях, повинні бути кваліфікації ЧДА (чисті для аналізу), якщо в НД немає інших вказівок, зберігатися і використовуватися згідно вимог чинної НД.

6. Роботу із біологічними патогенними агентами (БПА) I-IV рівня небезпеки дозволяють лабораторіям, які мають дозвіл на роботу.

7. При роботі з культурами мікроорганізмів та в усіх інших випадках, пов'язаних з їх зберіганням і рухом в межах та поза межами лабораторії, працівники повинні керуватися "Положенням про порядок обліку, пересилки, зберігання, обігу, відпуску культур бактерій, вірусів, рикетсій, грибів, найпростіших, мікоплазм, бактеріальних токсинів, отрут біологічного походження", затвердженим МОЗ СРСР від 16.05. 1979 р.

8. Забороняється проведення в одному і тому ж приміщенні діагностичних і експериментальних досліджень, а також одночасна робота з діагностичним матеріалом і живими вакцинами, або музейними культурами, якщо це не передбачено методикою.

9. На ємностях з культурами (посівами), повинні бути чітко написані назва культури (матеріалу), реєстраційний номер, дата посіву або пересіву.

10. Після закінчення роботи з БПА об'єкти з посівами переносять у сховища (сейфи, холодильники, термостати, шафи і т. п.) і опечатують їх. Двері кімнат закриваються на замок (вимоги до зберігання об'єктів з культурами та посівами БПА I-II груп патогенності викладені у ДСП 9.9.5.03599, ст. 3.42). Проводять дезінфекцію робочих поверхонь у приміщенні, обробляють руки 70% етиловим спиртом. Проводять вологе прибирання і вмикають на 60 хвилин бактерицидні лампи.

11. Забороняється залишати після закінчення роботи на відкритих місцях або в неопечатаних сховищах незафіксовані мазки, об'єкти з посівами та інші об'єкти, які містять біологічний матеріал.

12. Всі заражені матеріали, зразки та культури повинні бути знезаражені перед видаленням з лабораторії.

13. Об'єкти з культурами збудників зберігають за окремими групами в металевих водостійких ємностях зі щільно закритими кришками, які поміщають в холодильники або залізні шафи (сейфи). Ємності та сховища повинні бути опечатані.

14. Облік БПА в лабораторії ведуть в журналах за затвердженими формами. Журнали повинні бути пронумеровані, прошнуровані, скріплені печаткою і зберігатися у фахівця, який відповідає за їх ведення.

15. Робочі кімнати (бокси), де проводиться робота із БПА III-IV груп патогенності, контролюються на наявність патогенних мікроорганізмів 1 раз на місяць до початку роботи методом змивів (в лабораторіях, що працюють з БПА I-II груп патогенності контроль проводять відповідно до ДСП 9.9.5.035-99).

16. В кожній лабораторії повинні бути складені власні «Правила техніки безпеки і протиепідемічного режиму», які враховують специфічні умови роботи, характерні для даної лабораторії, затверджені керівником установи і профспілковим комітетом і вивішені на помітному місці в лабораторії. З ними повинні бути ознайомлені усі працівники лабораторії.

ПРАВИЛА РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає, щоб приміщення лабораторії було ізольованим від інших кімнат. До мікробіологічної лабораторії належать:

- приміщення для бактеріологічних досліджень;
- стерильний бокс для виконання робіт в стерильних умовах;
- передбоксник, де знаходиться стерильний матеріал;
- автоклавна для стерилізації посуду, поживних середовищ та знешкодження відпрацьованого матеріалу;
- приміщення для миття посуду та приготування середовищ.

Бокс має бути обладнаним бактерицидною лампою, стіни і підлога вистелені плиткою або лінолеумом, що забезпечує можливість використання дезінфікуючих розчинів для прибирання кімнати. До необхідних інструментів та обладнання мікробіологічної лабораторії відносять: термостати, центрифуги, мікроскопи, шафи сушильні, спиртівки, піпетки, шпатель скляні та металеві, пінцети, ножиці, предметні та покривні скельця, петлі бактеріологічні, ваги, рН-метри.

Особливістю мікробіологічних робіт є постійний контакт працівників лабораторії з біологічно небезпечним матеріалом: культурами патогенних мікроорганізмів, тканинами, кров'ю і виділеннями живих організмів тощо. Тому всі працівники мікробіологічної лабораторії зобов'язані дотримуватись правил, які забезпечують стерильність в роботі і попереджують можливість зараження:

1. До приміщення мікробіологічної лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу-халату, волосся повинно бути підібране під шапочку або бавовняну хустинку, а не падати на плечі та на лоба.
2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.
3. Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
4. Двері мікробіологічної лабораторії повинні бути постійно зачиненими.

5. В приміщенні мікробіологічної лабораторії категорично заборонено палити, вживати їжу, зберігати продукти харчування.

6. Весь матеріал, який потрапляє до мікробіологічної лабораторії для аналізу, повинен трактуватися як інфікований.

7. При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезінфікуючим розчином.

8. Переливання рідин, які містять патогенні мікроорганізми, здійснюють над посудиною з дезінфікуючим розчином.

9. У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витікання слід негайно повідомити відповідальну особу і провести заходи для знезараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.

10. При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.

11. Після закінчення роботи зайвий біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.

12. Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук, після закінчення роботи руки треба вимити та продезінфікувати.

13. Мікробіологічний матеріал та культури мікроорганізмів, які потрібні для подальшої роботи, здаються відповідальній особі.

Кожен студент повинен вести журнал лабораторних робіт, який є документом, що дозволяє контролювати правильність засвоєння матеріалу. При оформленні лабораторної роботи слід вказувати:

- тему, номер лабораторної роботи, дату постановки і закінчення досліджу.

- об'єкт дослідження.

- умови проведення досліджу та методи досліджень.

- отримані результати та висновки.

Після роботи кожен студент прибирає своє робоче місце, залишаючи його чистим.

Лабораторна робота № 1. БУДОВА МІКРОСКОПА ТА ПРАВИЛА РОБОТИ З НИМ

Мета роботи. Засвоїти правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Вивчити будову мікроскопа та засвоїти правила роботи з ним. Познайомитися з основними оптичними характеристиками світлового мікроскопа і його можливостями.

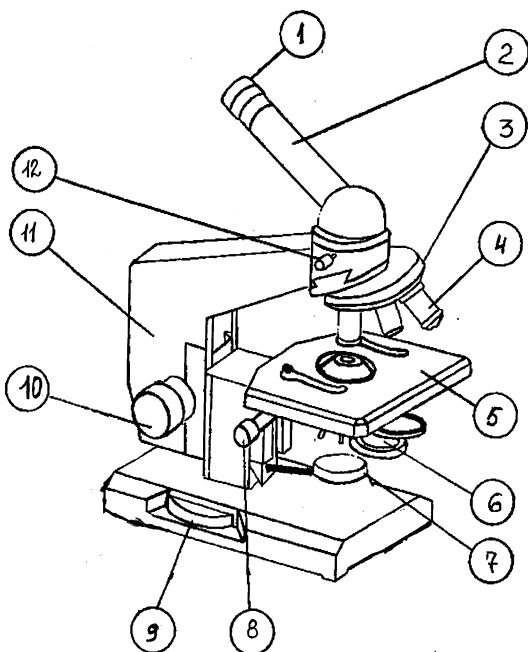
Завдання.

1. Ознайомитися з загальними правилами роботи і технікою безпеки в мікробіологічній лабораторії.
2. Ознайомитись із порядком оформлення протоколу лабораторної роботи.
3. Вивчити будову мікроскопа і правила мікроскопування (звернути увагу на особливості роботи з імерсійним об'єктивом).
4. Ознайомитися додатково з літературними джерелами [1, 5, 7].

Обладнання та матеріали. Біологічний мікроскоп, імерсійна олія, готові фіксовані та забарвлені препарати (бактерії, дріжджі, плісеневі гриби), фільтрувальний папір, плакати з зображенням ходу променів у мікроскопі.

Вивчення мікроорганізмів через їх малі розміри можливе тільки за допомогою оптичного приладу – мікроскопа. Мікроорганізми стають видимі тільки при збільшенні їх у 500-1000 разів, що досягається шляхом мікроскопування.

Мікроскоп (від грецьких слів *mikros* – малий, *skopeo* – дивитися, спостерігати) – це оптичний прилад для збільшення і вивчення препаратів мікроорганізмів у прохідному світлі (рис. 1).



- 1 – окуляр;
- 2 – тубус;
- 3 – револьверний механізм;
- 4 – об'єктив;
- 5 – предметний столик;
- 6 – конденсор Аббе;
- 7 – дзеркало;
- 8 – непарний макрометричний гвинт конденсора;
- 9 – парний мікрометричний гвинт;
- 10 – парний макрометричний гвинт;
- 11 – тубусотримач;

Рис. 1. – Будова оптичного мікроскопу

Конструктивно звичайний світловий мікроскоп складається з двох основних систем: оптичної та механічної.

I. Оптична система. Оптична система складається з двох частин: оптичної збільшувальної та оптичної освітлювальної.

Оптична збільшувальна система мікроскопу складається з об'єктивів та окуляру.

Об'єктив є найважливішою частиною мікроскопа, тому що забезпечує основне збільшення зображення предмета. Об'єктиви – це система лінз (від 2 до 12), вміщених в циліндричну оправу. Лінзи склеєні канадським бальзамом (спеціальний клей з соку хвойних дерев). Об'єктиви кріпляться у гнізді револьверного механізму. Усі лінзи, що розташовані вище фронтальної лінзи, називаються корекційними. Вони призначені для усунення дефектів зображення – хроматичної і сферичної аберації.

Хроматична аберация полягає в тому, що складне біле світло при проходженні через об'єктив, який може бути представлений як система призм, частково розкладається у спектр і виникає райдужне забарвлення контуру предмета.

Сферична аберация обумовлена тим, що промені світла, які потрапляють на різні точки двоопуклої лінзи, заломлюються неоднаково, тому що товщина лінзи по діаметру змінюється. В результаті цього зображення формується не у вигляді крапки, а у вигляді так званого кола розсіювання.

За принципом усунення дефектів зображення об'єктиви поділяються на:

- *ахромати*. Вони містять до 6 лінз, які практично повністю усувають сферичну аберацию і частково – хроматичну;

- *апохромати*. Це більш досконалі об'єктиви, які містять 10-12 лінз. Вони усувають сферичну аберацию, а хроматична аберация у них зменшена приблизно у 10 разів (у порівнянні з ахроматами). Це найбільш поширені об'єктиви;

- *планахромати* та *планапохромати*. Являють собою різновиди апохроматів, які повністю усувають кривизну поля зору. Цей тип об'єктивів використовують при мікрофотографуванні.

Об'єктиви мають такі основні оптичні характеристики:

- *ступінь збільшення* (завжди позначений на корпусі об'єктиву). Звичайно мікроскоп має три об'єктиви: 8^{\times} (слабкий), 40^{\times} (середній) та 90^{\times} або 100^{\times} (сильний).

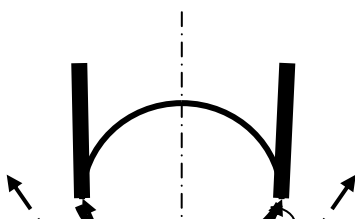
- *фокусна відстань* (F). В залежності від фокусної відстані об'єктиви поділяють на слабкі (F = 18-25 мм), середні (F = 5-12 мм), сильні (F = 1,31-2,0 мм). Так, об'єктив 8^{\times} має фокусну відстань 18-25 мм, об'єктив 40^{\times} – відповідно – 5-12 мм і т.п.

- *числова апертура*. Це добуток показника заломлення середовища (між лінзою та предметом) та синуса апертурного кута (α), який дорівнює половині отвірного кута (γ), утвореного крайніми променями, що потрапляють в об'єктив (рис 2). Числову апертуру визначають за формулою:

$$A = n \cdot \sin \alpha,$$

де n – показник заломлення середовища (наприклад для повітря n = 1, для скла, кедрової олії n \approx 1,5), α - апертурний кут.

Числова апертура завжди вказана на оправі об'єктива. Зокрема, об'єктиви 8^{\times} , 40^{\times} та 90^{\times} мають відповідно такі показники числової апертури: 0,20, 0,65 та 1,25.



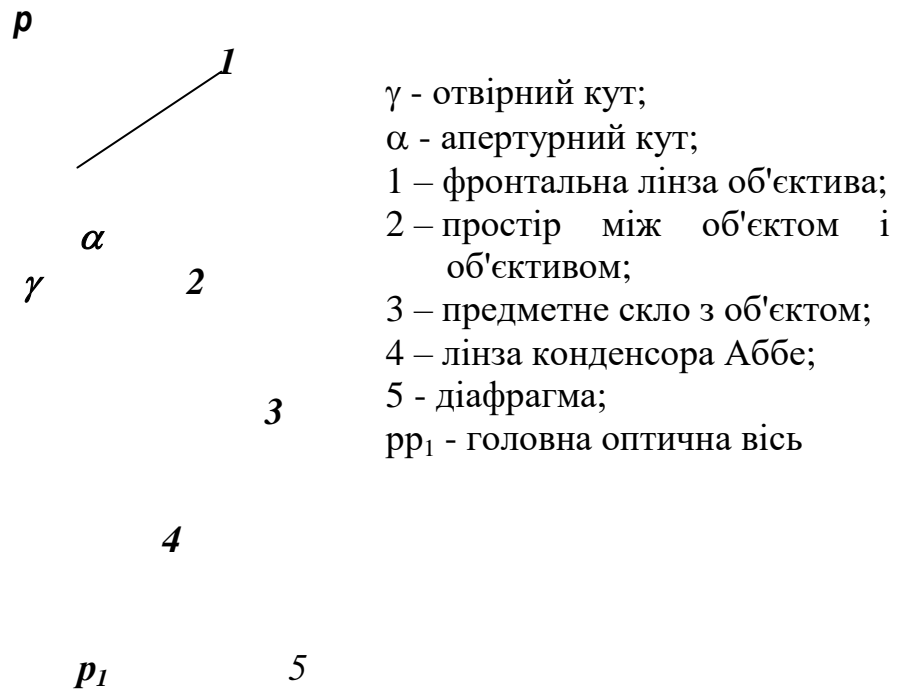


Рис. 2. Розташування апертурного (α) та отвірного (γ) кутів.

- *роздільна здатність*. Це мінімальна відстань між двома штрихами, при якій їх видно роздільно. Цей показник характеризує здатність об'єктива відображати найдрібніші деталі досліджуваного об'єкта. Таким чином, можна зробити висновок, що роздільна здатність є основним якісним показником роботи об'єктива. Для визначення роздільної здатності користуються формулою Аббе:

$$I = \frac{\lambda}{2A}$$

де λ - довжина хвилі світла, яка використовується при мікроскопіюванні ($\lambda \approx 550$ нм для сонячного світла), A - числова апертура.

Покращити роздільну здатність можна двома шляхами: використовувати світло з більш короткою довжиною хвилі, або збільшувати показник числової апертури. Але зменшення довжини хвилі призводить до того, що мікроскопування треба буде здійснювати в ультрафіолетовому світлі, яке людське око не бачить. Тому практично цей шлях підвищення роздільної здатності не використовується.

Більш перспективною виявилась можливість підвищення роздільної здатності за рахунок збільшення числової апертури. Для цього між лінзою та предметом розміщують апертурну (імерсійну) рідину, показник заломлення якої майже дорівнює показникові заломлення скла (1,52). Це дає можливість підвищити роздільну здатність у півтора рази. Крім того, коли між об'єктивом і об'єктом знаходиться повітря, то промені світла проходять через середовища різної густини, внаслідок чого частина променів заломлюється і не потрапляє в об'єктив (див. рис. 2). Це призводить до зменшення апертурного кута, числової

апертури і погіршення роздільної здатності. Лінза, спрямована до предмета, називається *фронтальною*. Чим більша її кривизна, тим коротша фокусна відстань, тим більше збільшення вона забезпечує, але чим більше кривизна лінзи, тим менше її діаметр, тому і менше світла проходить крізь неї.

Таким чином, при застосуванні імерсійної рідини промені світла майже не розсіюються, покращується ступінь освітлення об'єкта та підвищується апертурний кут. Як апертурну рідину використовують кедрову, рицинову олію, гліцерин, анізол та ін.

За способом роботи об'єктиви поділяють на сухоповітряні (сухі) та імерсійні. При сухій системі між препаратом та об'єктивом знаходиться повітря, а при імерсійній – імерсійна рідина. У звичайних світлових мікроскопах є два сухоповітряних об'єктиви (8^x та 40^x) і один імерсійний (90^x або 100^x). Фронтальна лінза імерсійного об'єктива під час мікроскопування занурюється в краплю імерсійної рідини. Тому й назва системи – імерсійна, а сам термін "імерсія" означає "занурення".

Максимальна роздільна здатність при роботі з сухоповітряними об'єктивами не перевищує 300 нм (0,3 мкм):

$$l_{\text{сух.}} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \alpha} = \frac{550}{2 \cdot 1 \cdot (0,2..0,8)} \approx 300 \text{ нм}$$

При використанні імерсійної системи роздільна здатність становить приблизно 200 нм (0,2 мкм), тобто з імерсійною системою можна роздивлятися ще дрібніші за розміром об'єкти:

$$l_{\text{ім.}} = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \alpha} = \frac{550}{2 \cdot 1,5 \cdot (1..1,25)} \approx 200 \text{ нм}$$

Таким чином, можна зробити висновок, що мінімальні розміри об'єкта, який вивчається за допомогою світлового мікроскопа, повинні бути більше, ніж 0,2 мкм.

Слід зазначити, що світлова мікроскопія має досить обмежені можливості, що залежить від природи білого світла ($\lambda \approx 550$ нм) та вирішальної здатності людського ока ($l_{\text{ок.}} \approx 0,25$ мм). Ці максимальні можливості характеризуються показником, який називається корисне збільшення (Z_k). Корисне збільшення – це таке збільшення, яке дозволяє виявити в об'єкті, що вивчається, нові дрібні деталі. Цей показник можна визначити за формулою:

$$Z_k = \frac{l_{\text{ок.}}}{l_{\text{об}}} = \frac{0,25 \text{ мм}}{0,0002 \text{ мм}} = 1250 \text{ разів}$$

Таким чином, світлові мікроскопи, які мають збільшення більше, ніж 1250, вже не дозволяють виявити нові дрібні деталі, тому збільшення, більш ніж 1250, називається некорисним.

Окуляр збільшує проміжне зображення, одержане від об'єктиву. Нових деталей об'єкту він не дає. Окуляр складається з двох плоско-опуклих лінз, які містяться в загальній металевій трубці. Верхня лінза називається *очною*, а нижня – *збиральною*. Між лінзами знаходиться діафрагма, яка затримує бокові

промені і пропускає лише близькі до оптичної вісі, що збільшує контрастність зображення. Окуляри, що використовуються в найбільш поширених типах світлових мікроскопів, дають збільшення 7^x , 10^x , 15^x , 20^x .

Загальне збільшення, яке дає оптична система мікроскопа, дорівнює добутку власного збільшення об'єктива та збільшення окуляра. Наприклад, найменше збільшення мікроскопа: $8 \times 7 = 56$ разів, а найбільше: $90 \times 20 = 1800$ або $100 \times 20 = 2000$ разів

Оптична освітлювальна система. Розташована під предметним столиком і складається з конденсора Аббе, ірис-діафрагми, дзеркала та системи світлофільтрів.

Конденсор Аббе призначений для освітлення об'єкта. Він збирає промені світла і конденсує їх на об'єкті. Конденсор складається з двох лінз: плоскоопуклої (верхня) та двоопуклої (нижня). Конденсор може пересуватися вгору і вниз за допомогою непарного макрогвинта. При цьому змінюється кут сходження променів, що падають на препарат, і внаслідок цього змінюється ступінь освітлення об'єкта. Максимальне освітлення досягається при піднятому у верхнє граничне положення конденсора. Слід зазначити, що при роботі з забарвленими препаратами конденсор повинен бути у крайньому верхньому положенні, а при мікроскопуванні незабарвлених препаратів, а також при роботі з лічильними камерами конденсор приспускають, щоб поле зору було дещо темнішим.

Ірис-діафрагма складається з ряду рухомих сегментів. Знаходиться під нижньою лінзою конденсора. Діаметр отвору діафрагми можна регулювати і змінювати інтенсивність потоку світла, покращувати контрастність зображення. При роботі з забарвленими препаратами ірис-діафрагма повинна бути повністю відкритою.

Дзеркало направляє промені світла на препарат, який вивчається. Дзеркало має дві поверхні – плоску та вгнуту. Плоска поверхня використовується при денному світлі, а вгнута – при штучному. Дзеркало можна обертати і встановлювати у будь-якій площині.

II. Механічна система.

Тубус (зорова труба) служить для встановлення об'єктива та окуляра на одній оптичній вісі. У верхній частині тубуса розміщується окуляр. Тубус прикріплюється до тубусотримача, а останній – до штативу.

Револьверний механізм прикріплюється до нижньої частини тубусотримача та складається з двох дисків. Нижній диск має 3-4 гнізда для закріплення об'єктивів. Під час обертання револьвера точне центрування об'єктива здійснюється пружиною-фіксатором. У вільне гніздо диска вставляється пластмасова заглушка. За допомогою револьверного механізму можна вибрати необхідний для роботи об'єктив.

Предметний столик служить для розміщення препарату, який досліджується. У центрі предметного столика є отвір для проходження променів, що освітлюють препарат. Для закріплення препаратів на предметному столику є зажими.

Тубусотримач, на якому розташовані гвинти.

Макрометричний гвинт (парний макрогвинт) служить для грубого наведення на препарат. При цьому, як правило, отримують нечітке зображення. При одному повному оберті макрогвинта об'єктив переміщується на 20 мм. Загальна висота його переміщення визначається довжиною рейки на тубусотримачі.

Мікрометричний гвинт служить для отримання чіткого зображення. При наведенні мікроскопа дозволяється робити 1,5-2 оберти мікрогвинта в один чи інший бік.

Непарний макрометричний гвинт (непарний макрогвинт) служить для регулювання ступеня освітлення препарату за допомогою конденсора. Він розташований під предметним столиком.

Техніка мікроскопування

1. Мікроскоп розміщують перед джерелом світла.
2. Повністю відкривають ірис-діафрагму і піднімають конденсор у верхній граничний стан за допомогою непарного макрогвинта (для забарвлених препаратів).
3. Регулюють освітлення. Для цього виставляють за допомогою револьверного механізму об'єктив 8^x і встановлюють його парним макрогвинтом на відстані 5-10 мм від предметного столика. Дивлячись в окуляр, обертають дзеркало, намагаючись забезпечити максимальне і рівномірне освітлення поля зору.
4. При роботі з незабарвленими препаратами використовують сухі об'єктиви і тоді конденсор дещо опускають. Між об'єктивом і предметним склом повинен залишатись шар повітря. При роботі з забарвленими препаратами користуються імерсійною системою.
5. На предметному столику розміщують препарат. Револьверним механізмом встановлюють необхідний об'єктив.
6. Якщо користуються імерсійним об'єктивом (90^x), то на предметне скло наносять краплю імерсійної рідини.
7. Дивлячись збоку, опускають об'єктиви за допомогою макрометричного гвинта. Якщо робота йде в імерсійній системі, то об'єктив опускають до занурення в олію.
8. Наведення на різкість (фокусування). Дивлячись в окуляр, обертають макрогвинт до себе до появи чітких або нечітких контурів зображення. Після цього обертають мікрогвинт і здійснюють остаточну наводку на різкість.
9. Розглядають і вивчають препарат.
10. Після закінчення роботи піднімають тубус мікроскопа, обережно протирають об'єктив 90^x фільтрувальним папером з метою прибирання залишків олії. Обертають револьверний механізм і встановлюють в таке положення, щоб заглушка була направлена в отвір предметного столика. Обертають макрогвинт і опускають об'єктиви в крайнє нижнє положення.

Проведення роботи.

1. Ознайомлення з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії.
2. Вивчення будови біологічного мікроскопа.
3. Вивчення правил мікроскопіювання.

Контрольні питання

1. Що таке роздільна здатність мікроскопа?
2. Яке збільшення забезпечує світловий мікроскоп?
3. Які найменші розміри об'єкта дозволяє побачити мікроскоп?
4. Чим відрізняється робота з сухо-повітряними та імерсійними об'єктивами?

Лабораторна робота № 2 МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ

Мета заняття. Ознайомитися з морфологічною різноманітністю бактерій і основними ознаками, необхідними для їх ідентифікації.

Завдання.

1. Ознайомитися з морфологічними типами мікроорганізмів на готових препаратах.
2. Ознайомитися додатково з літературними джерелами [1, 2, 3, 5].

Обладнання та матеріали. Мікроскоп, готові препарати мікроорганізмів різних морфологічних груп.

За формою клітини бактерії можна розділити на головні групи: сферичні або кулясті (коки, рис. 3, 4), паличкоподібні (циліндричні, рис. 3, 5) та спіралеподібні (звивисті) (рис. 7).

Сферичні бактерії, або коки за характером взаємного розташування у просторі розподіляють на:

- *мікрококи*,
- *диплококи*,
- *тетракоки*,
- *сарцини*,
- *стрептококи*,
- *стафілококи*.

Коки звичайно мають форму кулі, але бувають у формі боба чи трикутні.

Паличкоподібні бактерії бувають споротворні (бацили, клостридії,) і неспоротворні (бактерії). За взаємним розташуванням вони розподіляються на три підгрупи:

- *поодинокі палички* – розміщуються хаотично. Така форма взаємного розташування клітин характерна для переважної більшості паличкових;
- *диплобактерії та диплобацили* – клітини бактерій або бацил розташовані попарно;
- *стрептобактерії та стрептобацили* – клітини бактерій або бацил утворюють ланцюжки різної довжини.

За довжиною палички розподіляють на дрібні (до 1 мкм), середні (2-4 мкм), великі (більше 4 мкм). За товщиною паличкоподібні бактерії розподіляють на тонкі (діаметром до 1 мкм) і товсті. Форма кінців у паличкових буває заокруглена, загострена, обрубана.

Спори у клітині (рис. 6) можуть бути розташовані у центрі (центрально), на кінці (термінально), або між центром та кінцем клітини (субтермінально).

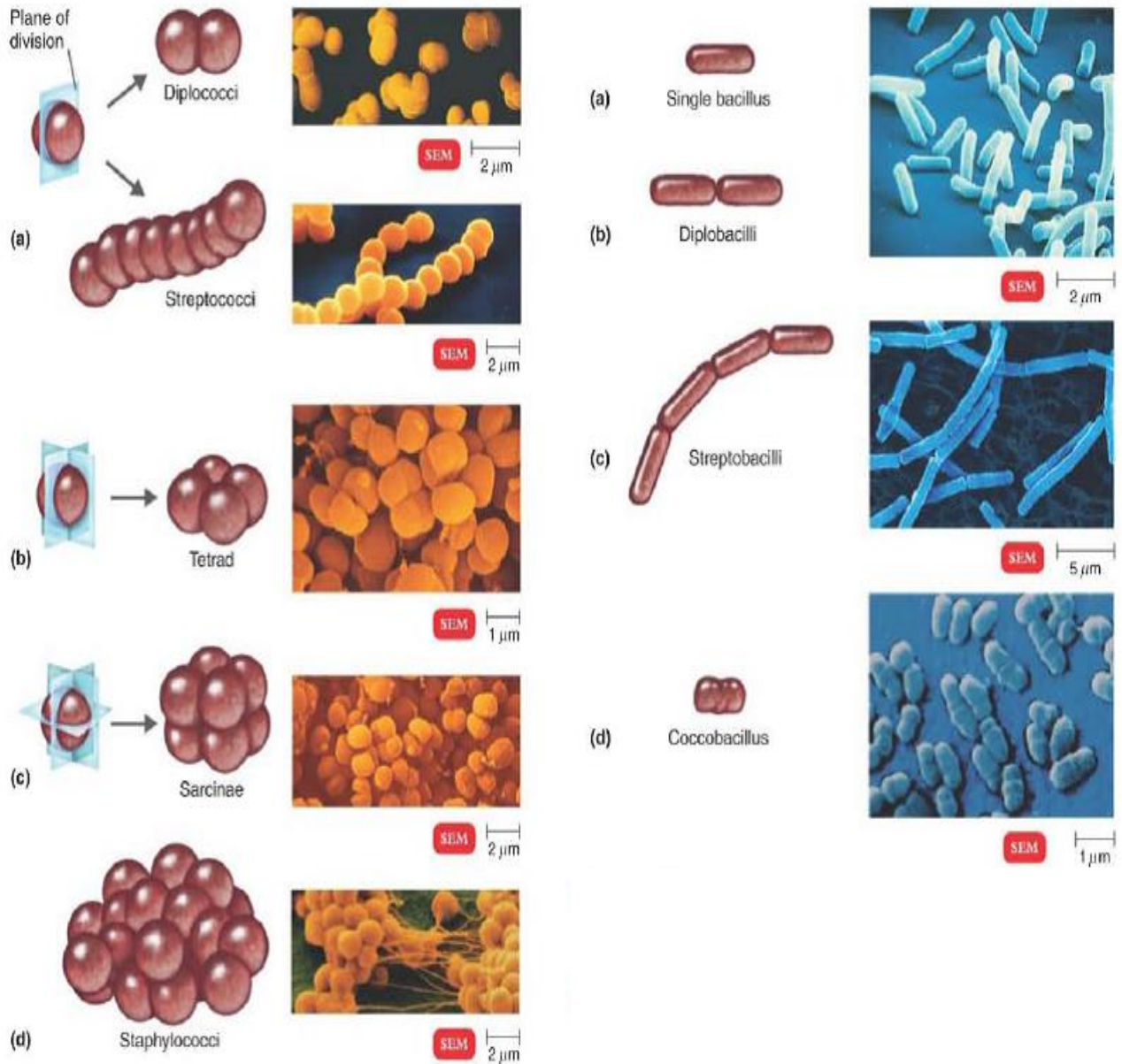


Рис. 3 – Основні форми бактерій у просторі

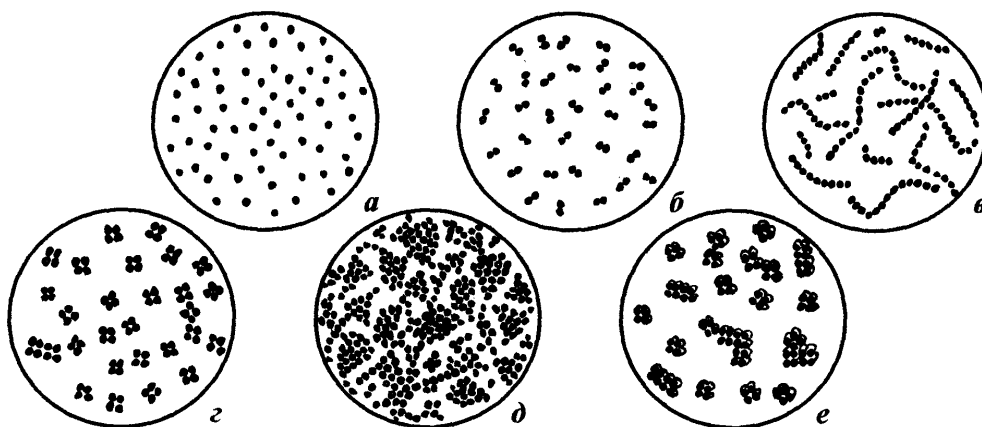


Рис. 4 – Основні форми сферичних бактерій:
а-мікрококи; б-диплококи; в-стрептококи; г-тетракоки; д-стафілококи; е-сарцини.

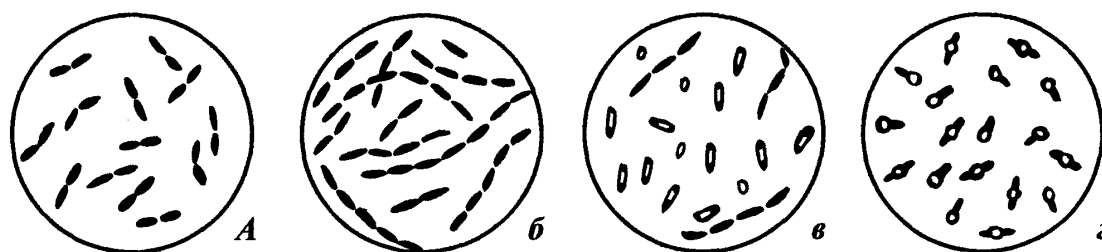


Рис. 5 – Морфологія паличковидних бактерій: а - диплобактерії;
б - стрептобактерії; в - бацили; г - клостридії

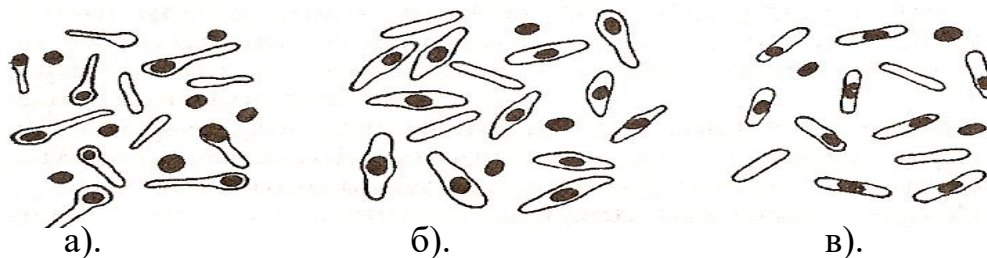


Рис. 6 – Типи спорування:
а- плектридіальний; б- клостридіальний; в- бацилярний

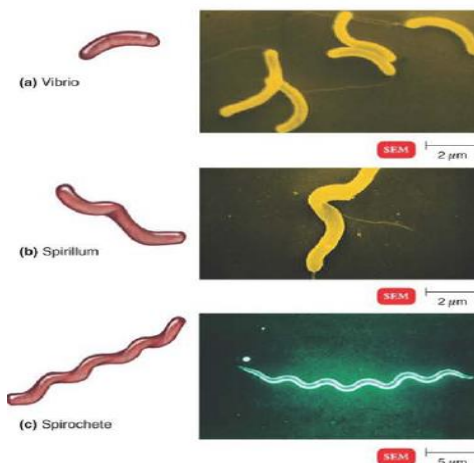


Рис. 7 – Морфологія звивистих мікроорганізмів: а – вібріони, б – спірили, в – спірохети

Бактерії бувають рухомі і нерухомі. Рухомість бактерій залежить від наявності джгутиків (рис. 8), а швидкість руху – від кількості та характеру розташування джгутиків, від віку клітини і факторів зовнішнього середовища.

В залежності від розташування джгутиків рухливі бактерії розподіляють на такі групи: *монотрихи*, *амфітрихи*, *лофотрихи*, *амфілофотрихи*, *перитрихи*. Рухомість бактерій визначають у препаратах «висяча» і «роздавлена» крапля.

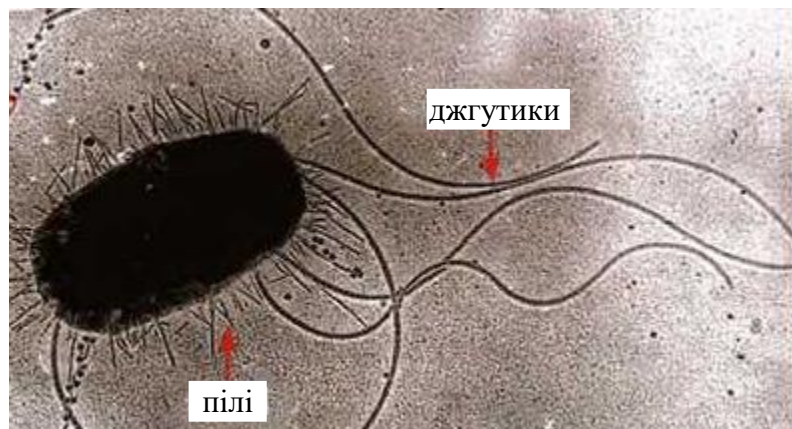


Рис. 8 – Мікрофотографія бактеріальної клітини із джгутиками та пілями

Проведення роботи.

1. Студенти знайомляться з основними ознаками, які враховуються при ідентифікації мікроорганізмів, звертаючи увагу на морфологічні ознаки коків і паличок.

2. Студенти отримують індивідуальні контрольні завдання – самостійно вивчають препарат під мікроскопом в імерсійній системі і в протоколі фіксують морфологію бактерій, роблять висновок стосовно їх форми та інших морфологічних ознак.

При вивченні морфології мікроорганізмів на готових фіксованих препаратах студенти повинні відзначити в робочому зошиті такі обов'язкові **морфологічні** ознаки бактеріальних клітин:

1. Форма та розміри.
2. Розташування в просторі.
3. Забарвлення за Грамом.
4. Спороутворення.
5. Рухомість – для живих мікроорганізмів.

Контрольні питання

1. На які групи за формою клітин поділяють бактерії?
2. Що таке спора? Охарактеризуйте їх розташування у клітині та властивості.
3. Які існують форми розташування джгутиків у бактерій?

Лабораторна робота № 3

ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ. ПРОСТІ МЕТОДИ ЗАБАРВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття. Засвоїти методику приготування фіксованого препарата-мазка та ознайомитись з технікою приготування препаратів «роздавлена» та «висяча» крапля для вивчення живих мікроорганізмів. Ознайомитись з способами фіксації препарату-мазка і методами забарвлення.

Завдання.

1. Ознайомитися з видами препаратів мертвих і живих мікроорганізмів.
2. Вивчити методику приготування фіксованого препарату-мазка.
3. Ознайомитися з способами фіксації препаратів.
4. Ознайомитись з простими методами забарвлення мікроорганізмів.
5. Ознайомитися додатково з літературними джерелами [4, 6].

Обладнання та матеріали. Біологічний мікроскоп, імерсійна олія, предметне та покривне скло, водопровідна вода, спиртівки, мікробіологічні петлі, фільтрувальний папір, пробірки з культурами різних видів бактерій на скошеному поживному середовищі МПА.

Дослідження живих мікроорганізмів. Для вивчення функцій мікроорганізмів, пов'язаних з їх життєдіяльністю (рухомість, розмноження, живлення), досліджують живі об'єкти. У цьому випадку готують препарати «роздавленої» краплі та «висячої» краплі. Для приготування препаратів використовують предметне та покривне скло. Це скло із звичайного кварцевого піску у вигляді тонких пластинок певного розміру: предметні – 76 x 26 x 1-1,2 мм, покривні 20 x 20 мм при товщині 0,15-0,17 мм.

Скло повинно бути абсолютно чистим, прозорим і добре знежиреним (для цього скло проходить спеціальну обробку – кип'ятіння у розчині соди, промивання у воді і НСІ, а зберігають його у 96% спирті). Для контролю чистоти скла на його поверхню наносять краплю води, при достатньому знежиренні крапля розтікається рівномірно. У зворотному випадку можна прожарити скло у полум'ї спиртівки або нанести на скло краплю спирту, а потім змити водою.

Виготовлення препарату «роздавлена» крапля. На середину обробленого предметного скла петлею наносять невелику краплю водопровідної води. Дистильована вода в мікробіологічній практиці практично не використовується, тому що відсутність солей обумовлює осмотичний тиск, який відрізняється від клітинного. Якщо мікробна клітина потрапляє у дистильовану воду, то вода починає поступати в клітину, клітина набрякає і гине (явище плазмолізу).

У краплю води вносять профламованою петлею невелику кількість досліджуваної культури з твердого середовища і обережно розмішують до одержання однорідної суспензії. Якщо досліджувані мікроорганізми знаходяться в рідкому середовищі, то їх переносять на предметне скло петлею

або пастерівською піпеткою без додавання води. Нанесену на предметне скло краплю досліджуваної рідини накривають покривним склом. Зайву рідину, яка виходить за край накривного скла, знімають смужками фільтрувального паперу. Виготовлений препарат негайно досліджують, бо з часом рідина під покривним склом холоне і висихає, і бактерії припиняють рухатися.

Виготовлення препарату «висяча» крапля. Для точнішого вивчення об'єкта використовують метод «висячої» краплі. Для цього використовують предметне скло з круглим відшліфованим заглибленням – лункою. Краї лунки предметного скла змащують вазеліном, а на центр покривного скла (не на предметне скло!) наносять петлею маленьку краплю зависі досліджуваних мікроорганізмів. Предметним склом з лункою прикривають покривне скло так, щоб крапля була в центрі лунки і не торкалася ані дна, ані його країв. Після цього препарат різко перевертають.

Досліджуючи препарати у вигляді «роздавленої» і «висячої» краплі, можна отримати уявлення про розмір, форму, структуру, рухливість мікробів, а також про характер розмноження та інші функції мікробної клітини. Вивчення мікроорганізмів у живому незабарвленому вигляді має ту перевагу, що мікробні клітини зберігають свою природну будову, яка частково втрачається під час висушування, а при забарвленні ще глибше руйнується нормальна будова клітини під впливом барвників.

Препарати «висяча» та «роздавлена» крапля мікроскопують за допомогою потужних сухих систем у затемненому полі зору, тому що живі мікроорганізми прозорі і яскраве світло проходить через них. Для того, щоб затемнити поле зору, можна припустити конденсор Аббе та звзити ірис-діафрагму.

Приготування фіксованого препарату-мазка

Для вивчення морфології мікроорганізмів застосовують мікроскопічний метод дослідження. Важливою умовою успішного використання цього методу є правильне приготування фіксованого препарату-мазка з досліджуваного матеріалу або бактеріальної культури. Культурою називаються мікроорганізми, які вирощені на поживних середовищах в лабораторних умовах.

Техніка приготування препарату-мазка включає декілька етапів (рис. 9):

1. Приготування мазка. На предметне скло петлею наносять краплю води. Запалюють спиртівку і в її полум'ї фламбують петлю. Охолодженою петлею беруть частинку біомаси мікроорганізмів з колонії, яка досліджується, вносять у краплю води і рівномірно розподіляють її на поверхні предметного скла. Слід уникати великої кількості мікробного матеріалу. Шар препарату повинен бути тонким, тому що тільки при цій умові мазок буде зручним для роботи. Краще, якщо мазок має округлу або овальну форму та площа його становить близько 1-2 см². Надлишок культури на петлі знищують в полум'ї спиртівки.

2. Висушування мазка. Проводиться зазвичай при кімнатній температурі на повітрі, але для прискорення висушування можна підігріти мазок, тримаючи його високо над полум'ям спиртівки.

3. Фіксація мазка. Фіксація буває фізичною та хімічною.

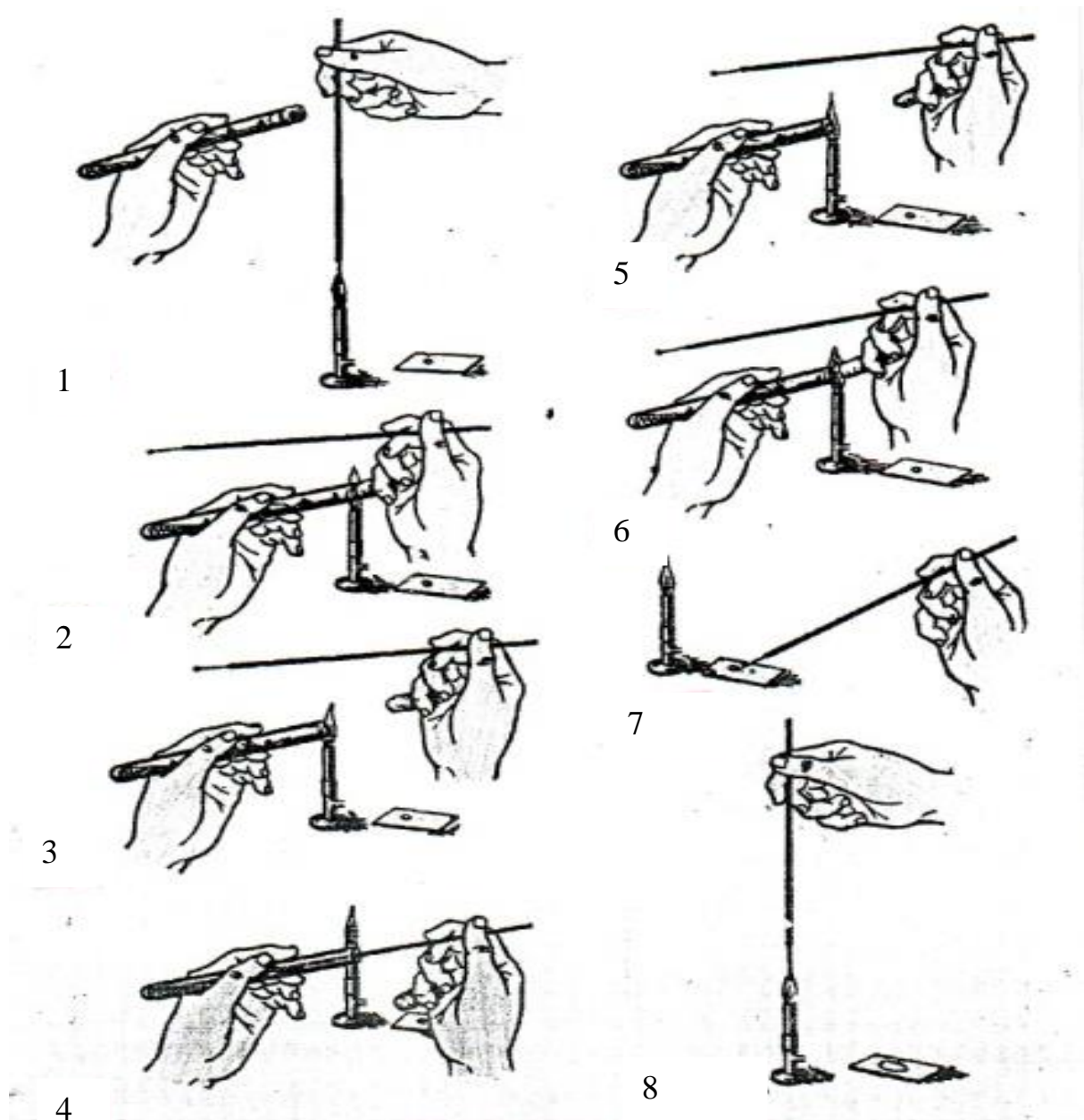


Рис. 9 – Послідовність приготування мазка

1. Мікробіологічну петлю фламбують у полум'ї спиртівки.
2. Мізинцем правої руки відкривають пробірку з досліджуваним матеріалом.
3. Отвір пробірки фламбують у полум'ї спиртівки.
4. Мікробіологічною петлею дістають досліджуваний матеріал.
5. Отвір пробірки знову фламбують у полум'ї спиртівки.
6. Закривають отвір пробірки.
7. Досліджуваний матеріал вносять у краплину води, що перед тим була нанесена на предметне скло.
8. Фламбують петлю.

Фізична фіксація зводиться до теплової обробки. Для цього скло з мазком тричі проносять у полум'ї спиртівки. Загальний час фіксації становить 5-6 секунд. Проводиться вона для того, щоб:

- а) вбити мікроорганізми і зробити їх безпечними;
- б) закріпити клітини на склі, щоб вони не змивалися при забарвленні;
- в) зробити мікробну клітину доступною забарвленню (вбиті клітини забарвлюються краще, ніж живі).

При хімічній фіксації предметне скло з мазком безпосередньо занурюють в органічний розчин (суміші спирту, ефіру, формаліну, ацетону) і витримують необхідний час. Потім мазок обережно промивають водопровідною водою. Після фіксації препарат забарвлюють.

Забарвлення фіксованих препаратів-мазків

Розрізняють прості та складні методи забарвлення мікроорганізмів. При простому забарвленні препарат забарвлюють одним барвником, при складному – двома або більшою кількістю. Наприклад, просте забарвлення фуксином: фуксин забарвлює всю клітину швидко (1-2 хвилини) та інтенсивно. Але усі види бактерій забарвлюються однаково в червоний колір. Просте забарвлення метиленовим синім: метиленовий синій забарвлює повільніше (3-5 хвилин), менш яскраво, але різні види мікроорганізмів забарвлюються з різною інтенсивністю.

Складні, або диференційні, методи забарвлення засновані на особливостях будови бактеріальної клітини. При складному забарвленні використовують два або більше барвників. Прикладом складного забарвлення є дуже поширений метод забарвлення за Грамом.

В основі забарвлення клітин мікроорганізмів лежать складні фізико-хімічні процеси, серед яких найбільшу роль відіграють адсорбція, капілярність та хімічна спорідненість барвника та об'єкта. Для забарвлення мікробів використовують анілінові барвники, головним чином основні та нейтральні. Найбільш уживані: фуксин основний, фуксин кислий, нейтраль-рот, конго-рот – червоні барвники; метиленовий синій, генціанвіолет, метилвіолет, кристалвіолет – сині та фіолетові барвники; везувин, хризоїдин – жовто-коричневі барвники.

Проведення роботи.

1. Демонстрація методики приготування препаратів «роздавлена» та «висяча» крапля для живих організмів. Вивчення рухомості мікроорганізмів.
2. Індивідуальне приготування фіксованого препарату-мазка і забарвлення його простим методом.
3. Вивчення препарату під мікроскопом в імерсійній системі і зарисовки бактерій в протоколі.

Контрольні питання:

1. Як готують фіксований мазок?
2. Які існують способи фіксації мазків?

3. Яка мета фіксації?
4. Які є методи забарвлення?
5. Яким чином вивчають рухомість мікроорганізмів?

Лабораторна робота № 4

БУДОВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. СКЛАДНІ МЕТОДИ ЗАБАРВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття. Ознайомитися із будовою клітини прокаріотичних і еукаріотичних організмів. Засвоїти методику забарвлення за Грамом та ознайомитися з іншими методами забарвлення і барвниками, що використовуються в мікробіології.

Завдання.

1. Ознайомитися з простими і складними методами забарвлення мікроорганізмів.
2. Вивчити механізм і методику забарвлення мікроорганізмів за Грамом.
3. Ознайомитися з експрес-методом визначення грам-типу мікроорганізмів.
4. Ознайомитися з методикою забарвлення спор і капсул.
5. Ознайомитися додатково з літературними джерелами [1, 2, 3, 4].

Обладнання та матеріали. Біологічний мікроскоп, імерсійна олія, фільтрувальний папір, набір барвників, предметне скло, вода, спиртівки, мікробіологічні петлі, пробірки з культурами різних видів бактерій на скошеному поживному середовищі МПА.

Мікробна клітина – складна жива система, яка характеризується високим ступенем впорядкованості складових структур. Структура та компоненти клітини виявляються за допомогою:

- мікроскопування живих клітин (метод «роздавленої» і «висячої краплі»), з використанням мікрокамер, негативного контрастування;
- прижиттєвого (вітального) забарвлення мікроорганізмів;
- приготування препаратів фіксованих клітин (фіксовані забарвлені препарати, метод відбитків);
- приготування ультратонких зрізів мікроорганізмів для електронної мікроскопії;
- комбінованих методів (негативні контрастування та прижиттєве забарвлення).

Основні структури клітин бактерій: клітинна стінка, цитоплазматична мембрана (ЦПМ), цитоплазма з органоїдами і включеннями, структурні елементи клітини (ядерний матеріал – нуклеоїд, рибосоми, мезосоми, плазмід, внутрішньоклітинні мембранні утворення, включення). Додаткові структури: капсульний шар, слиз, пілі, джгутики, фімбрії.

Забарвлення капсульного шару. За простих методів забарвлення капсули залишаються безбарвними. Для виявлення капсул використовують спеціальні негативні методи забарвлення.

Так, якщо забарвити розчином фуксину фіксовані клітини *Azotobacter*, у полі зору мікроскопа можна роздивитися червоні диплококи, оточені безбарвною зоною – капсулою. Погане сприйняття барвника пояснюється слабким спорідненням капсули до барвників.

Для того, щоб краще розглянути капсули, використовують складні методи (Клетта, Буррі-Гінса та ін.).

Негативний метод Буррі. Краплю спеціально підготовленої туші наносять на предметне скло, добре знежирене сумішшю спирту з ефіром. Туш змішують з краплиною культуральної рідини. За допомогою покривного скла розподіляють препарат тонким шаром на поверхні предметного скла. Після того, як препарат висохне на повітрі, його розглядають в імерсійній системі. На темно-димчастому фоні видно безбарвні капсули та клітини бактерій.

Клітинна стінка та забарвлення за Грамом.

Метод був запропонований датським лікарем Грамом ще у 1884 р. і набув значного поширення у мікробіологічній практиці, тому що здатність клітин забарвлюватись за Грамом має діагностичне значення при визначенні виду мікроорганізмів. В залежності від результатів забарвлення за Грамом усі мікроорганізми поділяють на дві великі групи:

- *грампозитивні* (Gp^+) – забарвлюються у фіолетовий колір.
- *грамнегативні* (Gp^-) – забарвлюються в червоний колір.

Різне відношення мікроорганізмів до забарвлення за Грамом обумовлено відмінностями у хімічному складі та будові клітинної стінки.

Методика забарвлення за Грамом:

1) На фіксований мазок кладуть шматочок фільтрувального паперу і наносять декілька краплин генціанвіолету, витримують 1-2 хвилини. Папір знімають, барвник зливають, але **не змивають водою.**

2) На мазок наносять розчин Люголя (суміш KI та I_2). Витримують 1-2 хвилини. Барвник зливають, але **не змивають водою.**

3) Наносять на мазок кілька крапель спирту (96 %) і проводять знебарвлення протягом 30-40 секунд. **Препарат ретельно промивають водою.**

4) Наносять фуксин і витримують 1-2 хвилини. Барвник зливають. **Препарат промивають водою.**

Препарат висушують за допомогою фільтрувального паперу, наносять імерсійну олію і вивчають під мікроскопом (об'єктив $90\times$). Мікроскопують фіксовані забарвлені препарати в імерсійній системі при повністю відкритій ірис-діафрагмі та максимально піднятому конденсорі Аббе, тобто при максимальному освітленні.

Забарвлення за Грамом є важливою таксономічною ознакою, з якою пов'язані й багато інших характеристик бактерій. Слід пам'ятати, що на

здатність сприймати забарвлення за методом Грама впливає не тільки вид мікроорганізмів, а й такі фактори, як склад середовища культивування, фаза росту мікроорганізмів, ступінь їх життєздатності.

Для забарвлення за Грамом бажано використовувати тільки молоді однодобові культури мікроорганізмів, тому що в старих культурах мертві клітини фарбуються як грамнегативні.

До грампозитивних мікроорганізмів відносять більшість коків, споротворні паличкові бактерії (р. *Bacillus*, *Clostridium*), неспоротворні молочнокислі паличкові бактерії (лактобацили, біфідобактерії).

До грамнегативних мікроорганізмів відносяться неспоротворні паличкові (ентеробактерії, псевдомонади та ін.) та звивисті бактерії.

Механізм забарвлення за Грамом.

У Gr^+ бактерій основу (50-80%) клітинної стінки складає глікопептид муреїн, який служить опорним каркасом стінки. Муреїнова сітка багат шарова. Ліпідів, як і білків, дуже мало; відсутня діамінопімелінова кислота, проте є тейхоеві кислоти та амінокислоти (лізин, β -аланін), а в цитоплазмі містяться магнієві солі РНК, відповідальні за забарвлення.

У разі грампозитивних мікроорганізмів барвник генціанвіолет (трифенілметанова структура) і йод утворюють міцний комплекс з магнієвими солями РНК, нерозчинний у воді та спирті. Під впливом спирту муреїн набрякає і зменшується діаметр пор клітинної стінки, що призводить до погіршення її проникливості. Тому грампозитивні мікроорганізми міцно утримують генціанвіолет, який обумовлює фіолетовий колір і маскує червоне забарвлення фуксином (рис. 10).

У Gr^- бактерій муреїнова сітка одношарова (складає біля 12 % всіх біохімічних сполук), в ній багато ліпідів – до 20 % (ліпопротеїди, ліпополісахариди, фосфоліпіди), відсутні магнієві солі РНК та тейхоеві кислоти, проте є діамінопімелінова кислота.

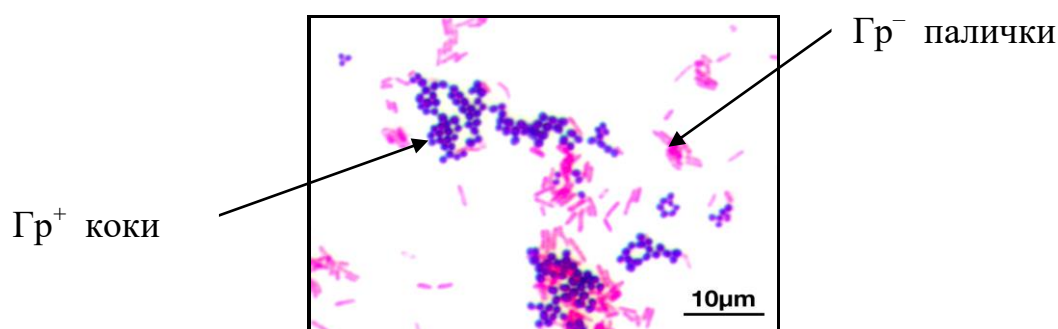


Рис. 10 – Забарвлений препарат з Gr^+ та Gr^- мікроорганізмами

Оскільки у грамнегативних мікроорганізмів відсутні магнієві солі РНК в клітинній оболонці, основний барвник генціанвіолет не утримується. Під впливом спирту цей барвник вимивається. Вимиваються також і ліпіди, вміст яких в клітинній стінці грамнегативних бактерій досить значний, це призводить до збільшення діаметра пор і підвищення проникності клітинної стінки. Тому

грамнегативні мікроорганізми втрачають фіолетовий барвник і забарвлюються фуксином в червоний колір.

Слід відзначити, що в мікробіологічній практиці використовується не тільки забарвлення фіксованих на склі бактерій (мертвих), а й вітальне забарвлення (тобто прижиттєве). Це, в основному, прості способи забарвлення з використанням найменш отруйних барвників: метиленової сині, нейтрального червоного, везувіну. Існують також негативні способи забарвлення. При цьому забарвлюються не самі мікроби, а тло, на якому вони знаходяться.

Експрес-метод визначення грам-типу мікроорганізмів.

Для швидкого визначення належності бактерій до грам-групи використовують експрес-метод Крегенса.

На предметному склі в краплі розчину КОН готується суспензія досліджуваної культури. При цьому грам-позитивні бактерії коагулюють, а грамнегативні перетворюються на в'язку тягучу масу, яка тягнеться при переміщенні мікробіологічної петлі, утворюючи слід довжиною 1-2 см.

Цитоплазматична мембрана має високу біохімічну активність та споріднення до основних барвників. Але вона дуже тонка (у середньому 7-10 нм) і її можна спостерігати або при темнопольній мікроскопії у вигляді тонкої смуги, яка світиться, або на ультратонких зрізах під електронним мікроскопом. Методи забарвлення цитоплазматичної мембрани складні і використовуються тільки для наукових досліджень.

Ядерна речовина бактерій. Ядерний апарат мікроорганізмів є носієм спадкової інформації. Ядерний апарат прокариотів відрізняється від ядер еукаріотів відсутністю ядерної мембрани та ядерця, а також гістонів. Нитка ДНК прокариотів – це аналог хромосом еукаріотів і називається бактеріальною хромосоною або нуклеоїдом. *Нуклеоїд* – це велика замкнута в кільце молекула ДНК різної довжини, в залежності від видових особливостей мікроорганізмів.

Морфологія нуклеоїду змінюється в залежності від фази росту культури, від умов культивування бактерій, у тому числі від вмісту катіонів у поживному середовищі. Як правило, для нуклеоїду характерна неправильна форма, іноді він має паличковидну або сферичну форму. Спостерігати ядерний апарат мікроорганізмів можна при електронному мікроскопуванні, а у світлопольному мікроскопі – при спеціальних способах забарвлення. У лабораторній практиці про наявність нуклеоїду судять за якісною реакцією на ДНК, використовуючи тест Фольгена та забарвлення за Романовським-Гімзою.

Включення мікробної клітини виявляють різними мікрохімічними методами, враховуючи їх хімічний склад. У процесі життєдіяльності у мікроорганізмів з'являються включення полісахаридів, жироподібних речовин, поліфосфатів та ін. Більша частина цитоплазматичних включень є внутрішньоклітинними запасними речовинами, утворення яких залежить від умов культивування мікроорганізмів.

Полісахариди представлені включеннями крохмалю (у ціанобактерій), гранулози, глікогену.

Забарвлення глікогену. Глікоген, або «тваринний крохмаль»,

накопичується у клітинах дріжджів та бактерій (сінної та кишкової паличок, сальмонел, сарцин, артробактерій).

На чисте предметне скло наносять невеличку краплину суспензії мікроорганізмів і додають краплину розчину йоду. Зверху розміщують покривне скло, надлишок рідини видаляють фільтрувальним папірцем. Препарат досліджують за допомогою імерсійного об'єктиву. Глікоген забарвлюється в коричневий колір.

Включення глікогену краще досліджувати на 1-2-добових культурах *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus mycoides*.

Забарвлення гранульози. Гранульоза – крохмалоподібна сполука. У великій кількості накопичується в клітинах маслянокислих бактерій *Clostridium butyricum* перед спороутворенням.

До невеликої краплини суспензії маслянокислих бактерій додають краплину розчину Люголя, накривають покривним склом, видаляють надлишок рідини фільтрувальним папірцем і роздивляються в імерсійній системі. Гранульоза забарвлюється в коричневий колір.

Як об'єкт дослідження слід використовувати накопичувальну культуру маслянокислих бактерій. Одержують її таким чином: за 3-4 доби до занять у пробірці розміщують дрібно нарізану неочищену картоплю або зерно пшениці. Додають крейду та заливають до верху водопровідною водою. Пробірку розміщують на водяній бані та нагрівають протягом 10 хвилин, потім охолоджують і культивують при 30°C 24-36 годин.

Забарвлення спор.

Спори – внутрішньоклітинні утворення круглої або овальної форми, які мають товсту оболонку і погано забарвлюються. При забарвленні за Грамом їх видно у вигляді самостійної одиниці або незабарвленої ділянки всередині забарвленої клітини (рис. 11, 12). Використовуючи спеціальні методи забарвлення, можна встановити вік споротворних мікроорганізмів.

Для фарбування спор можна використовувати різні методи (методи Пешкова, Златогорова, Ожешко і ін), які засновані на розрихленні малопроникних для барвників оболонок спор різними способами (шляхом нагрівання та обробки препарату кислотами, лугами) з одночасним або наступним їх фарбуванням концентрованим барвником. Після такої обробки препарат промивають водою (при цьому клітини знебарвлюються, а спори залишаються забарвленими) і дофарбовують клітини барвником контрастного кольору.

Метод Пешкова: мазок фіксують, фарбують метиленовою синню з підігрівом, змивають водою, дофарбовують розчином нейтрального червоного 10 секунд, змивають водою, висушують фільтрувальним папером. Спори – сині, клітина – червона.

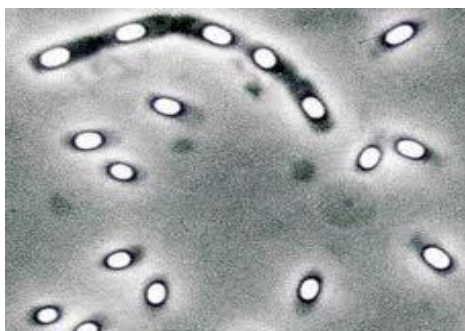


Рис. 11 – Забарвлення спор
бацил (негативне)

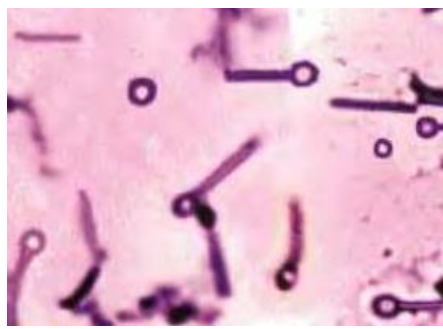


Рис. 12 – Забарвлення спор
кlostридій (негативне)

Проведення роботи.

1. Студенти отримують індивідуальні контрольні завдання – пробірки з культурою бактерій на поживному середовищі МПА. Самостійно готують препарат-мазок, фіксують його і забарвлюють за Грамом.

2. Вивчають препарат під мікроскопом в імерсійній системі і в протоколі відмічають результати забарвлення (Gr^+ або Gr^-), роблять висновок стосовно органел бактерій.

Контрольні питання

1. *Яке значення мають складні методи забарвлення бактерій? Які складні методи забарвлення бактерій вам відомі?*
2. *У чому суть методу забарвлення бактерій за Грамом?*
3. *Назвіть послідовність забарвлення фіксованих препаратів бактерій за методом Грама.*
4. *В чому суть методу забарвлення бактеріальних спор за Пшиковим?*

Лабораторна робота № 5

МОРФОЛОГІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ МІКРОМІЦЕТІВ

5.1. Міцеліальні гриби

Мета заняття. Ознайомитися з морфологічною різноманітністю мікроміцетів і основними ознаками, необхідними для їх ідентифікації.

Завдання.

1. Ознайомитися з морфологічними ознаками міцеліальних грибів на готових препаратах та рисунках.
2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 3, 4].

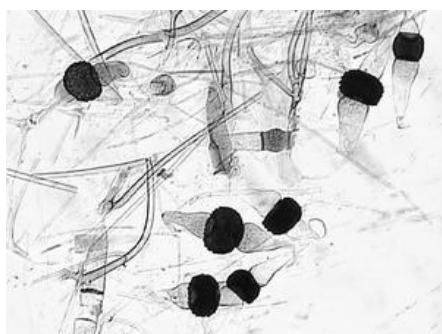
Обладнання та матеріали. Мікроскоп; готові препарати мікроміцетів різних класів, наочний матеріал.

Вегетативне тіло майже однакове у грибів різних видів (за винятком септованності), але структури і механізми, які забезпечують розвиток і розмноження, дуже різноманітні і є основою для класифікації грибів, тому вона

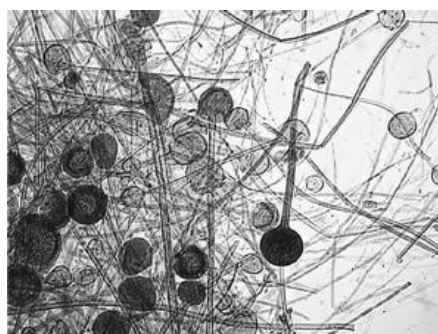
базується на будові органів розмноження.

Характеристика важливих для харчової промисловості мікроміцетів *Клас Зігоміцети (Zygomycetes)*

Окрім вегетативного розмноження у нижчих грибів здійснюється також статеве розмноження. При статевому розмноженні спочатку відбувається злиття двох багатоядерних гіфів міцелію, а потім попарне злиття ядер. Процес закінчується утворенням зігоспори (зіготи), яка згодом проростає і утворює органи плодоношення (рис. 13).



а).



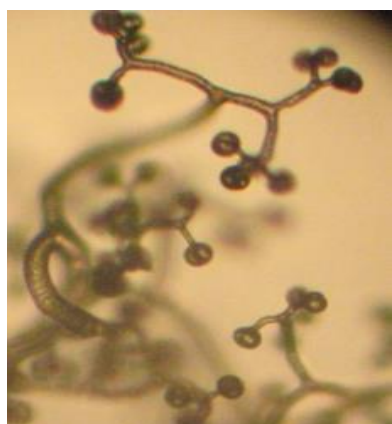
б).

Рис. 13 – Зігоміцети: формування зіготи (а) і спорангії з ендоспорами (б)



Спорангієносці поодинокі, прості, іноді розгалужені. Спорангії дрібні або великі, завжди однорідні, безбарвні або мають забарвлення.

Рис. 15 – Гриби роду *Mucor*



Кущуваті гілки розташовані мутовчато на головній осі спорангієносця в один або кілька ярусів. Спори циліндричні і еліпсоїдальної, безбарвні.

Рис. 16 – Гриби роду *Thamnidium*



Спорангієносці розташовані кущиками, які виростають на столонах з одного центру (як полуниця), з великими чорними голівками. Спори округлі, яйцеподібні, зморшкуваті.

Рис. 17 – Гриби роду *Rhizopus*

Клас Аскоміцети (Ascomycetes)

У вищих грибів статевий процес також відбувається шляхом злиття ядер і вмісту двох клітин різних гіф, а потім відбувається ділення ядра, навколо нових ядер концентрується цитоплазма і утворюється спорова оболонка. Материнська клітина покривається товстою оболонкою і перетворюється в аск (сумку), скупчення асків покривається переплетенням гіф, яке називають плодовим тілом (рис. 14).

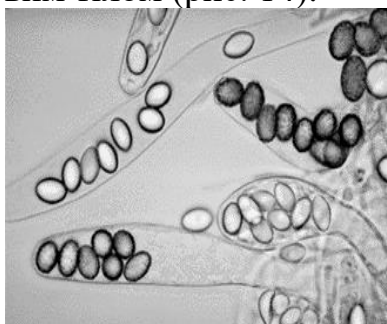
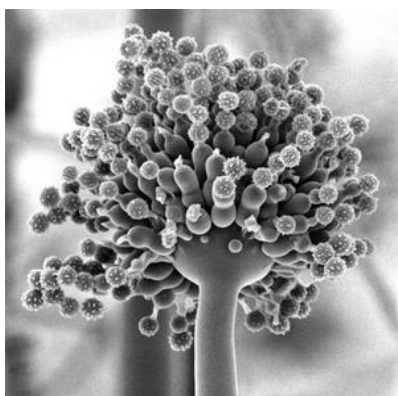
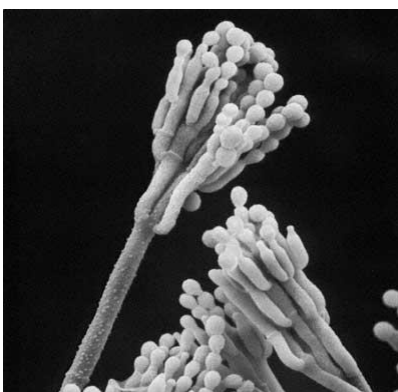


Рис. 14 – Сумки з аскоспорами



Стеригми, що покривають булавоподібні здуття конідієносців, – прості, нерозгалужені, несуть ланцюжки конідій. Конідії округлі гладкі або шипуваті, забарвлені або безбарвні. Конідієносець несептований.

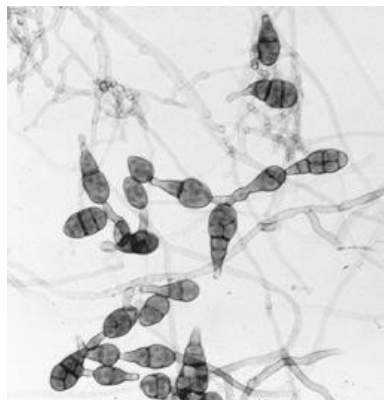
Рис. 18 – Гриби роду *Aspergillus*



Галуження кистевидне, конідії розташовуються ланцюжками, вони гладкі безбарвні або забарвлені, округлі. Конідієносець септований.

Рис. 19 – Гриби роду *Penicillium*

Клас Дейтероміцети (*Deuteromycetes*)



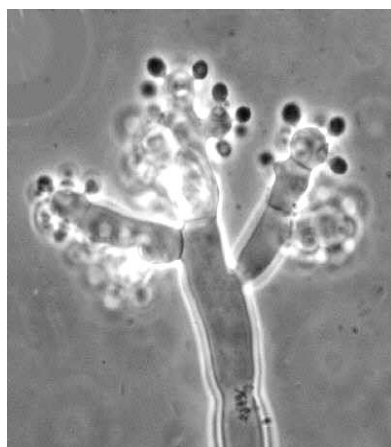
Великі багатоклітинні округло-грушоподібної або загострено-витягнутої форми конідії утворюються поодиночі або короткими ланцюжками на коротких бічних гілках вегетативних гіф, які грають роль конідієносців.

Рис. 20 – Гриби роду *Alternaria*



Конідії безбарвні, довгі, серповидні, багатоклітинні (з поперечними перегородками), іноді розташовані ланцюжком або прямо на міцелії. Колонії гриба забарвлені в рожевий колір, особливо знизу.

Рис. 21 – Гриби роду *Fusarium*



Конідієносці деревовидно-розгалужені, великі. Гілки розташовуються безладно, конідії на кінцях гілок розвиваються кущиками, безбарвні, яйцеподібні, гладкі.

Рис. 22 – Гриби роду *Botrytis*

Практична робота.

1. Вивчення морфологічних та культуральних ознак класів міцеліальних грибів на препаратах окремих представників.

2. У звіті студенти коротко конспектують теоретичний матеріал. Замальовують мікроскопічні картини досліджених культур грибів з урахуванням морфологічних особливостей кожного мікроорганізму. Під кожним малюнком підписують латинську назву. Описують культуральні властивості досліджуваних грибів.

Контрольні питання

1. Загальна характеристика плісневих грибів та їх значення в харчовій

промисловості.

2. Що таке мікотоксини? Їх властивості.

3. Наведіть приклади і охарактеризуйте представників з різних класів плісневих грибів.

4. Роль спороутворення у плісневих грибів.

Лабораторна робота № 6 МОРФОЛОГІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ МІКРОМІЦЕТІВ 5.2. Неміцеліальні гриби (дріжджі)

Мета заняття. Ознайомитися з морфологічною різноманітністю дріжджів і основними їх ознаками, необхідними для ідентифікації.

Завдання.

1. Ознайомитися з морфологічними ознаками дріжджів на готових препаратах. Визначити фізіологічний стан дріжджів.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 3, 4].

Обладнання та матеріали. Мікроскоп, готові препарати дріжджів різних родів, предметні та покривні скельця, дріжджі різного фізіологічного стану.

Загальна характеристика дріжджів:

- еукаріоти;
- тип живлення – хемогетеротрофи;
- тип дихання – факультативні анаероби, але зустрічаються й аероби;
- нерухомі;

Характеристика найважливіших для промисловості родів дріжджів

Дріжджі, які використовуються у харчовій промисловості, називають культурними, а ті, що мешкають у природі, називають дикими.

Культурні дріжджі

1. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Saccharomyces*

Вид *Saccharomyces cerevisiae* (рис.23).

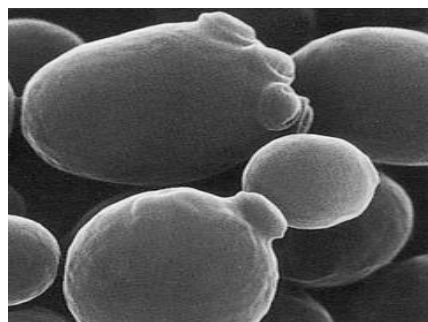
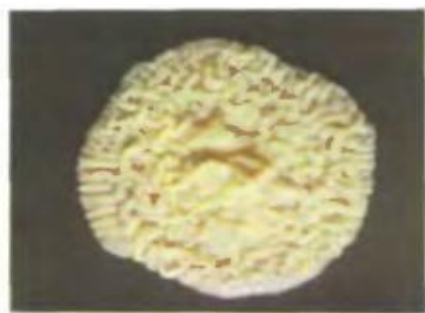


Рис. 23 – Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*: колонія на сусло-агарі (ліворуч), брунькування клітин (праворуч)

Форма – яйцеподібна, округла.

Розмноження – брунькування, спороутворення (аскоспори).
Застосування у харчовому виробництві – хлібопечіння.

2. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Saccharomyces*

Вид *Saccharomyces vini* (рис. 24)

Форма – еліптична.

Розмноження – брунькування, спороутворення (аскоспори).

Застосування у харчовому виробництві – виноробство.



Рис. 24 – Дріжджі *Saccharomyces vini*

3. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Saccharomyces*

Вид *Saccharomyces oviformis* (рис. 25)

Форма – еліптична, овальна, округла.

Розмноження – брунькування, спороутворення (аскоспори).

Застосування у харчовому виробництві – виноробство.

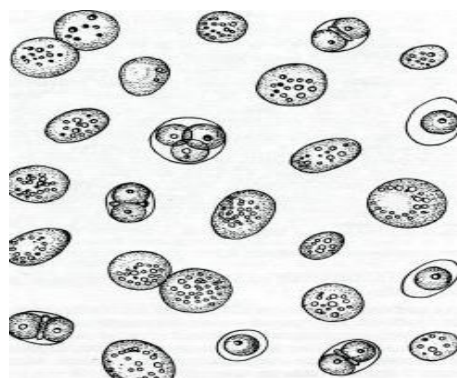


Рис. 25 – Дріжджі *Saccharomyces oviformis*

4. Родина *Schizosaccharomycetaceae*

Рід *Schizosaccharomyces*

Вид *Schizosaccharomyces pombe* (рис. 26)

Форма – циліндрична із заокругленими кінцями.

Розмноження – поділом.

Застосування у харчовому виробництві – отримання пива та рому.



Рис. 26 – Дріжджі *Schizosaccharomyces*

5. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Rhodotorula*

Вид *Rhodotorula aurantiaca* (рис. 27)

Форма – куляста, овальна, яйцеподібна або видовжена.

Розмноження – брунькування.

Застосування у харчовому виробництві – виробництво кисломолочних продуктів та каротиноїдів.

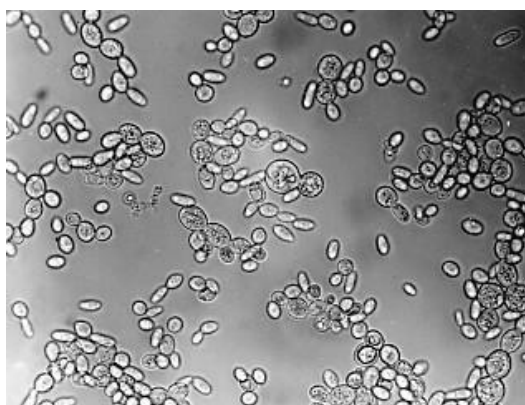


Рис. 27 – Дріжджі *Rhodotorula aurantiaca*

Дикі дріжджі

1. Родина *Saccharomycodaceae*

Рід *Saccharomyces*

Вид *Saccharomyces ludwigii* (рис. 28)

Форма – овальна, у зрілому стані лимоноподібна.

Розмноження – брунькування поділом.

У харчовому виробництві – шкідники.



Рис. 28 – Дріжджі *Saccharomyces ludwigii*

2. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Zygosaccharomyces*

Вид *Zygosaccharomyces bailii* (рис. 29)

Форма – округла, овальна.

Розмноження – брунькування.

У харчовому виробництві – шкідники (осмофіли).

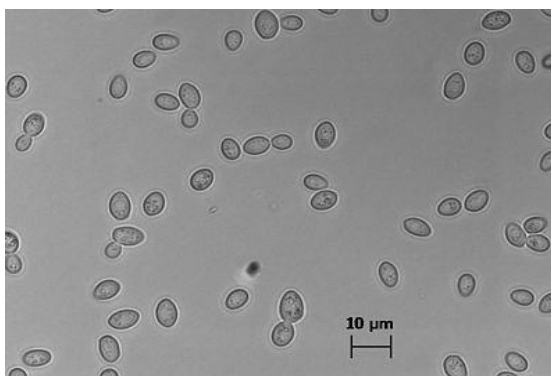


Рис. 29 – Дріжджі *Zygosaccharomyces bailii*

3. Родина *Saccharomycetaceae*

Рід *Candida*

Вид *Candida albicans* (патогенний, рис. 30)

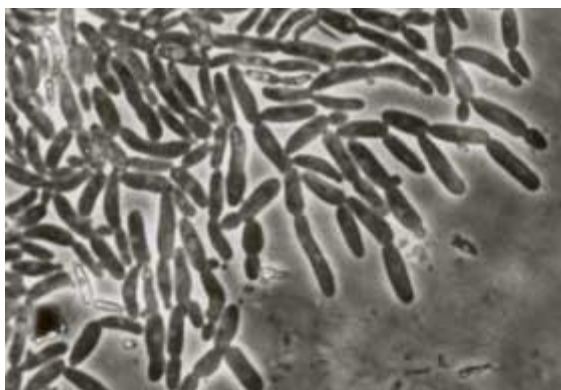


Рис. 30 – Утворення плівок псевдоміцелію дріжджами роду *Candida*
Форма – округла, яйцеподібна або подовжена.

Розмноження – брунькування.

У харчовому виробництві:

- отримання кормового білка та білково-вітамінних концентратів;
- шкідники.

4. Родина *Cryptococcaceae*

Рід *Torulopsis*

Вид *Torulopsis bacillaris* (рис. 31)

Форма – куляста, овальна.

Розмноження – численне брунькування.

У харчовому виробництві:

- отримання кормового білка;
- шкідники.

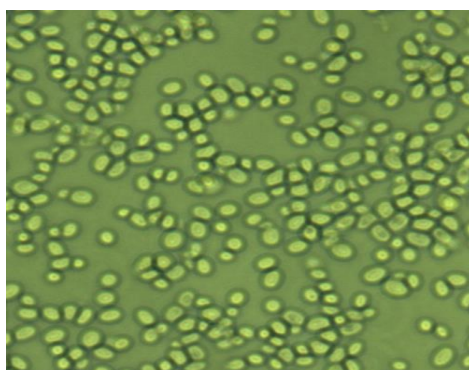


Рис. 31 – Дріжджі *Torulopsis bacillaris*

Стадії життєдіяльності дріжджів під час бродіння

В процесі життєдіяльності дріжджі послідовно проходять такі стадії розвитку.

1. Розмноження брунькуванням (рис. 32).

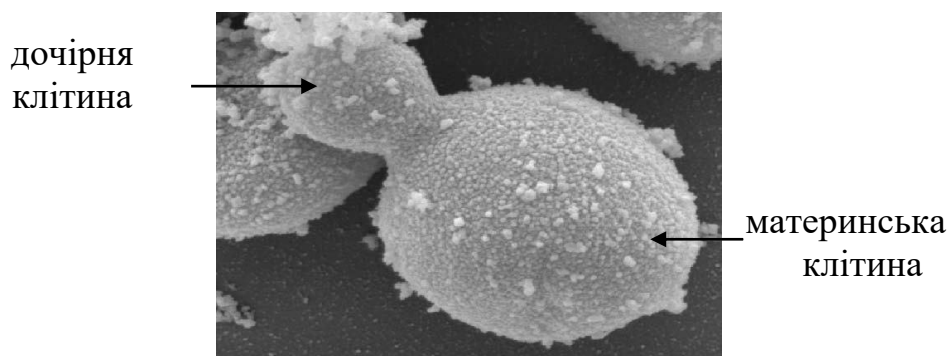


Рис. 32 – Брунькування дріжджів

Дочірня клітина менша за материнську, від якої вона відбрунькувалася, має однорідну плазму і тонку оболонку, в клітині немає глікогену, тому йодом (розчин Люголя) вона забарвлюється в жовтий колір (відсутня характерна якісна реакція). Після стадії розмноження настає стадія бродіння.

2. Бродіння. Дріжджі добре угодовані, переважно поодинокі, цитоплазма

зерниста, вакуолі дрібні. У клітинах багато глікогену і жиру, йодом клітини забарвлюються в червоно-бурий колір (якісна реакція).

3. Голодування. Стадія починається після зброджування цукру. Дріжджі осідають на дно рідини і починають витрачати глікоген, тому йодом клітини забарвлюються в жовтий колір. При тривалому зберіганні в осаді без доступу кисню повітря клітини починають відмирати.

4. Відмирання. Клітини деформуються, цитоплазма відстає від оболонки. Оболонка мертвих клітин легко пропускає барвник, тому розчином метиленового синього 1:10000 вони забарвлюються в синій колір.

5. Автоліз (розкладання клітин). Наступає після стадії відмирання. Оболонка клітин набрякає, цитоплазма стає грубозернистою, потім оболонка розпадається і цитоплазма виходить назовні у вигляді дуже дрібних зернини – продуктів автолізу. При мікроскопуванні їх можна сплутати з бактеріями. Відрізняються від бактерій вони тим, що знаходяться в стані постійного тремтіння і розчиняються в розчині їдкого натру.

Описані п'ять стадій послідовно змінюють одна одну. За певних умов спостерігаються ще дві стадії розвитку.

6. Стадія спокою (клітини в стані спокою). Наступає, якщо дріжджі довго знаходяться в осаді при доступі кисню повітря. У цій стадії дріжджі живляться органічними кислотами. Вони мають жир, глікоген, міцну оболонку. У стадії спокою дріжджі стійкі до зовнішніх несприятливих умов.

7. Стадія спороутворення. Наступає при різкому переході від оптимального живлення до голодування за умови достатньої вологості і наявності кисню повітря. У клітинах утворюються від 2 до 8 спор. До несприятливих умов спори стійкіші, ніж вегетативна клітина.

Проведення роботи.

1. У звіті студенти коротко конспектують теоретичний матеріал. Замальовують мікроскопічні картини досліджених культур з урахуванням морфологічних особливостей кожного мікроорганізму. Під кожним малюнком підписують латинську назву. Описують культуральні властивості досліджуваних дріжджів.

2. На готових препаратах («роздавлена крапля») студенти вивчають фізіологічний стан дріжджів.

У протоколі слід зазначити результати забарвлення дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку розчином Люголя, метиленовим синім, фуксином Циля. Зробити необхідні зарисовки морфології і відзначити у висновках характерні відмінності кожної фізіологічної стадії.

Контрольні питання

1. Загальна характеристика дріжджів та їх значення в харчовій промисловості.

2. Які дріжджі називають культурними, а які – дикими? Наведіть приклади.

3. Бродіння якого типу проводять дріжджі?
4. Як визначити фізіологічний стан дріжджів?

Лабораторна робота № 7 ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ

Мета заняття. Познайти студентів з роботою, пов'язаною з підготовкою до посівів – підбором та приготуванням необхідних поживних середовищ, методами та режимами стерилізації, які використовуються для поживних середовищ, посуду та іншого інвентарю, а також з технікою посівів на різні поживні середовища.

Завдання.

1. Ознайомитися з різними типами поживних середовищ та вимогами, які до них висуваються. Навчитися робити посіви на найбільш вживані середовища та оцінювати культуральні ознаки росту мікроорганізмів на них.

2. Ознайомитись з методами стерилізації

3. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 3, 4].

Обладнання та матеріали. Чашки Петрі, пробірки, спиртівки, набір поживних середовищ (МПА, МПБ, МПЖ, середовища Ендо, Кітта-Тароцці, сусло-агар та ін.) та загусників (агар-агар, желатин). Обладнання для стерилізації (свічки Шамберлана, фільтри Зейтца, мембранні фільтри, бактерицидні лампи).

Поживні середовища (ПС) – це особливі субстрати, призначені для культивування мікроорганізмів у штучних умовах. ПС є основою мікробіологічної роботи, тому що у більшості випадків дослідження мікроорганізмів здійснюють шляхом посіву (внесення досліджуваного матеріалу) у стерильне середовище. На ПС мікроорганізми повинні мати можливість здійснювати усі фізіологічні функції (дихання, живлення, розмноження та ін). Таким чином, ПС повинні відтворювати для життєдіяльності мікроорганізмів оптимальні умови. Тому до ПС висувається низка вимог:

1. ПС повинні містити необхідні поживні речовини.

Мікроорганізмам для розвитку потрібні різноманітні мінеральні елементи та органічні речовини. Одні у великих кількості – *макроелементи* (С, О, Н, N, S, P, Ca, Na, Mg, Cl, Fe), серед них С, О, Н, N – *органогени*, бо входять до складу усіх органічних сполук, а інших достатньо лише у кількості слідів (Cu, Br, I, Zn, Co, F), вони відносяться до *мікроелементів*.

Для нормального росту мікробів потрібні ще так звані додаткові *фактори росту*, які відносяться до групи вітамінів (група В, вітаміни С, К, провітамін D та ін), деякі органічні кислоти та амінокислоти, пуринові, піримідинові основи та їх похідні.

2. ПС повинні бути стерильні, тому що сторонні мікроорганізми змінюють властивості середовища та ускладнюють культивування і

дослідження певних мікроорганізмів.

3. ПС повинні мати оптимальний рН. Щоб рН в процесі росту мікроорганізмів підтримувався на постійному рівні, середовища повинні мати певну буферність (містити речовини, що нейтралізують продукти обміну клітин мікроорганізмів).

4. ПС повинні бути ізотонічними для мікробної клітини (осмотичний тиск у середовищі повинен бути таким самим, як і всередині клітини). Як правило, оптимальне середовище відповідає 0,9% розчину солі NaCl.

5. Тверді ПС повинні мати оптимальну вологість і консистенцію.

6. ПС повинні мати певний окисно-відновний потенціал (RH_2). Цей показник характеризує насиченість середовища киснем (або співвідношення речовин, що віддають та приймають електрони). Для певних видів мікроорганізмів необхідний високий потенціал, для інших – низький. Наприклад, для анаеробів RH_2 повинен бути не більше 5, а для аеробів – не менше 10. Більшість ПС задовольняє вимогам аеробів і факультативних анаеробів.

7. ПС повинні бути уніфікованими (кількісний і якісний склад інгредієнтів повинен бути постійним).

8. ПС повинні бути прозорими (але є винятки, наприклад для середовищ, що містять індикатор, молоко, кров).

ПС класифікують за рядом ознак:

I. За походженням і складом ПС поділяють на дві групи:

а) *природні середовища*, тобто такі, на яких мікроорганізми розвиваються в природі (молоко, солодове сусло, кров, фруктові та овочеві соки, тканини тварин). Їх готують з продуктів рослинного та тваринного походження, тому хімічний склад цих ПС точно встановити неможливо. Він не є постійним і залежить від партії сировини. До природних середовищ належать:

МПБ – м'ясопептонний бульйон,

МПА – м'ясопептонний агар,

РПБ – рибопептонний бульйон,

РПА – рибопептонний агар,

МПЖ – м'ясопептонний желатин,

СА – сусло-агар та ін.

б) *синтетичні (штучні) середовища*. Їх готують з різних органічних і неорганічних речовин (з врахуванням потреби мікроорганізмів). Оскільки вони складаються з хімічно чистих інгредієнтів, які взято в певних концентраціях, їх точний хімічний склад дуже легко встановити. На таких середовищах вивчають обмін речовин мікроорганізмів. Наприклад: середовище Чапека використовують для культивування мікроміцетів, середовище Ешбі – нітрифікуючих бактерій, середовище Рідера – для дріжджів.

До синтетичних середовищ належать ще так звані напівсинтетичні середовища (інколи їх виділяють в окрему третю групу). Їх компонентами є продукти невизначеного хімічного складу (відвар м'яса, дріжджовий автолізат та ін.).

II. За консистенцією ПС бувають:

а) *Рідкі*. Використовують для накопичення маси мікроорганізмів або продуктів їх обміну. Прикладами є молоко, вино, соки, МПБ – м'ясопептонний бульйон (до м'ясної води додають 1% пептону – білковий гідролізат, який підвищує калорійність, і 0,5% NaCl – для утворення потрібного осмотичного тиску).

б) *Сипучі*. Розварене пшоно, висівки, насичені живильним розчином, силікагель.

в) *Тверді* готують з рідких додаванням загусників. Найбільш часто використовують такі загусники, як агар-агар або желатин.

Агар-агар отримують з морських водоростей, за хімічною природою це – полісахарид. Буває декількох типів: архангельський та японський (або далекосхідний) мають волокнисту структуру та відзначаються найкращою здатністю гелеутворення, а одеський (чорноморський), так званий агароїд, має пластинчасту структуру і гіршу здатність до гелеутворення.

Середовище МПА отримують шляхом додавання 1,5-3% агар-агару до м'ясопептонного бульйону. МПА має температуру плавлення 96-100°C, а температуру застигання 40-45°C.

Желатин – речовина білкової природи, яку одержують шляхом виварювання кісток і хрящів. Середовище МПЖ готують шляхом додавання 5-25% желатину до м'ясопептонного бульйону. МПЖ має температуру плавлення 30°C, а температуру застигання 23°C. При температурі 37°C (оптимальна температура для розвитку більшості мікроорганізмів) середовище МПЖ рідке, тому використовується дуже рідко, до того ж більшість мікроорганізмів синтезують ферменти, які гідролізують желатин, що робить неможливим застосування желатинових середовищ для культивування.

III. За призначенням ПС поділяють на:

а) *Універсальні* (або середовища загального призначення), тобто придатні для більшості мікроорганізмів. Ці середовища використовують, наприклад, для визначення загальної кількості мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі (звичайно в 1 г продукту або в 1 см³ розчину, або на 1 см² площі, або на 1 м³ повітря, тобто в одиниці будь якої речовини).

б) *Спеціальні* середовища призначені для виявлення біохімічних властивостей мікроорганізмів або для одержання культур бактерій, що мають особливі властивості. Серед спеціальних середовищ розрізняють:

– *елективні* (виборчі), на яких можуть розвиватись лише певні групи мікробів (інші види ростуть погано або не ростуть зовсім).

Ці середовища використовують для виділення мікроорганізмів із місця їх природного існування для отримання накопичувальних (збагачених) культур мікроорганізмів із матеріалу, який містить змішану мікробіоту. При посіві суміші різних мікробів на елективне ПС розвиватимуться ті мікроорганізми, фізіологічним властивостям і потребам яких це середовище найбільше сприятиме. Інші мікроорганізми зовсім не будуть розвиватися або ж розвиток їх відбуватиметься дуже повільно. При подальших повторних пересівах на одне й

те ж ПС (у разі створення умов, сприятливих для певного мікроорганізму) у матеріалі поступово збільшується кількість цієї форми мікроорганізму і зменшується кількість супутньої мікробіоти.

Завдяки елективним середовищам можна визначити рід мікроорганізму або виділити певну групу мікроорганізмів. Так, сусло-агар (СА) застосовують для виявлення мікроміцетів, середовище Кітта-Тароцці – облигатних анаеробів (кlostридій).

- *диференційно-діагностичні середовища* застосовують для визначення видової належності мікроорганізмів на основі різниці в обмінних процесах. Ці середовища використовують для ідентифікації невідомих видів мікроорганізмів. Наприклад, середовища Ендо, Кеслер використовують для виявлення кишкової палички (*Escherichia coli*).

Звичайно до складу диференційно-діагностичних середовищ входять речовини, які дозволяють вивчити особливості ферментів досліджуваних культур. Диференційно-діагностичні середовища часто містять певний індикатор, зміна забарвлення якого свідчить про наявність в середовищі досліджуваного виду мікроорганізмів.

Співробітники мікробіологічних лабораторій харчових підприємств використовують готові поживні середовища з торгової мережі, але за певних обставин готують їх самостійно.

Для контролю стерильності ПС витримують у термостаті 48 год при температурі 30-55°C (залежно від температурного оптимуму мікроорганізмів, які досліджуються). При відсутності ознак росту мікроорганізмів їх вважають стерильними і здійснюють хімічний контроль (рН, вміст азоту, пептону, хлоридів та ін.).

Зберігання середовищ здійснюють у спеціальних шафах, а деякі середовища (наприклад, ті, що містять кров, вітаміни та ін.) слід зберігати у холодильниках.

Методи стерилізації

Поживні середовища, посуд та будь-який інвентар, що використовується для посіву, повинні бути стерильними. Під стерилізацією у мікробіологічній практиці розуміють знищення вегетативних клітин та спор мікроорганізмів. Методи стерилізації поділяють на дві групи: термічна стерилізація, холодна стерилізація.

Термічні методи стерилізації.

1. *Фламбування (прожарювання)*. Використовують для стерилізації металевих приладів та інвентаря. Метод гарантує повне знищення усіх форм мікрофлори.

2. *Кип'ятіння*. Здійснюється у стерилізаторах, використовують тільки дистильовану воду. Стерилізують шприци, пінцети, шпатель, гумові рукавички та гумові пробки. При температурі 100°C знищується вегетативна мікробіота, а спори бактерій залишаються життєздатними.

3. *Стерилізація текучою парою*. Здійснюється у кип'ятильниках Коха. Режим стерилізації: середовища по 30 хвилин три рази витримують у

кип'ятильнику, а в проміжках між кип'ятінням середовища по одній добі витримують у термостаті при температурі 30-37°C. Цей метод називають ще роздрібною стерилізацією. Повторна стерилізація сприяє знищенню спорових форм, які проростають у вегетативні клітини в проміжках між високотемпературною обробкою.

4. *Стерилізація в автоклаві.* Стерилізують скляний посуд та агарові поживні середовища протягом 12-50 хвилин при температурі 120-140°C (при надмірному тиску 0,1 мПа), вуглеводні середовища стерилізують при 110-112°C і зниженому тиску. Желатинові середовища автоклавувати не можна, тому що желатин при температурі більше 100°C втрачає здатність до гелеутворення. Для желатинових середовищ використовують роздрібну стерилізацію. Метод автоклавування дуже ефективний, тому що пара при підвищеному тиску викликає плазмоплиз клітин.

5. *Стерилізація сухим жаром.* Відбувається в звичайних сушильних шафах при 150-180°C протягом 1,5-2 год, стерилізують тільки скляний або металевий посуд. Такий режим забезпечує знищення як вегетативної, так і спорової мікробіоти.

6. *Пастеризація.* Використовується для термічної обробки молока, пива, фруктових соків; режими обробки – при температурі 50-60°C протягом 18-20 хвилин, або при температурі 70-80°C протягом 5-10 хвилин. Знищуються тільки вегетативні клітини бактерій (в першу чергу неспоротворні бактерії, дріжджі, мікроміцети). Але метод набув значного поширення через те, що він забезпечує збереження біологічно активних речовин в харчових продуктах.

7. *Тиндалізація (переривистий нагрів).* Являє собою роздрібну пастеризацію при низькій температурі. Використовується для рідких середовищ, які не можна кип'ятити (наприклад, білкові рідини). Режим: температура 60-80°C, 30-60 хвилин, 5 діб поспіль. Прогрівання здійснюють на водяній бані або в спеціальних приладах з терморегулятором. В проміжках між термічною обробкою субстрат витримують у термостаті як для контролю стерильності.

Холодні методи стерилізації:

1. *Фільтрація (механічна стерилізація).* Застосовують для рідких середовищ, які не можна нагрівати. Бактеріальні фільтри мають дрібні пори (до 1 мкм), що забезпечує механічну затримку бактерій. Крім того, бактерії мають, переважно, негативний заряд, а матеріал фільтра – позитивний, що забезпечує адсорбцію за рахунок електростатичної взаємодії. Методом фільтрування стерилізують поживні середовища, що містять білок, сироватки, відокремлюють бактерії від вірусів і фагів. З цією метою використовують фільтри Зейтца, фільтри (свічки) Шамберлана, мембранні фільтри.

Фільтри Зейтца виробляють із суміші асбесту з целюлозою.

Фільтри Шамберлана виготовляють з кераміки. Вони являють собою порожнисті циліндри, закриті з одного кінця. Мембранні фільтри виготовляють з нітроцелюлози. Вони являють собою диски, трубки, волокна з діаметром пор меншим ніж розмір мікробної клітини. В залежності від розміру пор вони мають певні номери. Мембранні фільтри розраховані тільки на одноразове

використання.

2. *Стерилізація опроміненням.* Найчастіше використовуються ультрафіолетові промені (бактерицидні лампи типу БУВ). Застосовують для стерилізації повітря та інструментів. Інколи використовують рентгенівські промені, γ -промені (радуризація), ультразвук.

3. *Дезинфекція (хімічна стерилізація).* Дезинфікуючими агентами можуть бути розчини фенолу, хлораміну, лізолу, пероксиду водню, формаліну, спирту (70 %). Поживні середовища консервують шляхом додавання хлороформу, толуолу, ефіру.

Техніка посіву та пересіву мікроорганізмів на поживні середовища

Посіви та пересіви мікроорганізмів на поживні середовища проводять поруч з полум'ям спиртівки (але не в полум'ї), швидко, щоб не забруднити культури сторонніми мікроорганізмами. Не можна робити різких рухів, ходити, кашляти та ін. поблизу працюючого з чистою культурою, тому що рух повітря збільшує небезпеку випадкового зараження культури і середовища. Саме тому посіви і пересіви мікроорганізмів слід проводити в боксі.

Посів на тверді середовища.

На тверді середовища можна сіяти двома способами: поверхневим або глибинним.

Поверхневий посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб: тверде поживне середовище в пробірках або колбах розплавляють на водяній бані, охолоджують до 48-50°C і, дотримуючись правил асептики, розливають рівним шаром завтовшки 3-5 мм в стерильні чашки (рис. 33). Посів роблять скляним шпателем Дригальського (рис. 34) або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних штрихів.

Поверхневий пересів на тверді поживні середовища в пробірках. Техніка посіву (рис. 35).

1. Пробірки з культурою та поживним середовищем поміщають на два пальці лівої руки в нахиленому положенні. У правій руці великим і вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю і стерилізують її в полум'ї спиртівки.

2. Виймають ватні пробки з обох пробірок, притискають їх до долоні мізинцем і безіменним пальцем правої руки і обпалюють краї пробірок. Стежать за тим, щоб пробки не торкалися сторонніх предметів.

3. Петлю вводять в пробірку з пересівом. Для охолодження петлі спочатку слід доторкнутися до поверхні агару, де немає культури, після чого беруть невелику кількість мікробної маси зі скошеного поживного середовища.

4. Вводять петлю з матеріалом в стерильну пробірку зі скошеним поживним середовищем майже до дна, де скупчується невелика кількість конденсаційної води. Злегка торкаючись петлею поверхні твердого середовища, але не розпушуючи її, проводять від дна вгору штрих.

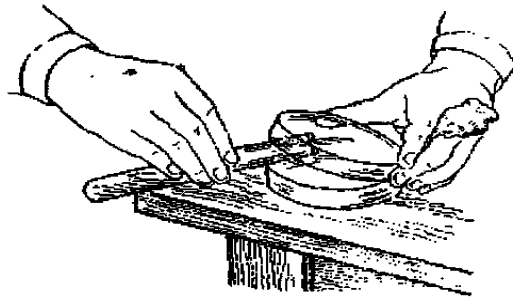


Рис. 33 – Правила розливання поживного середовища в чашки Петри

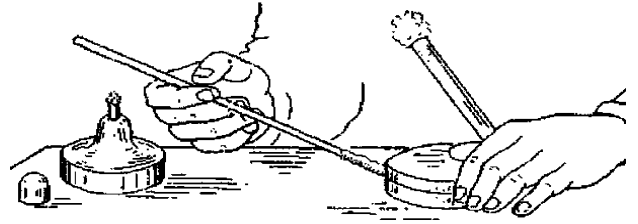


Рис. 34 – Поверхневий посів в чашки Петрі шпателем Дригальського

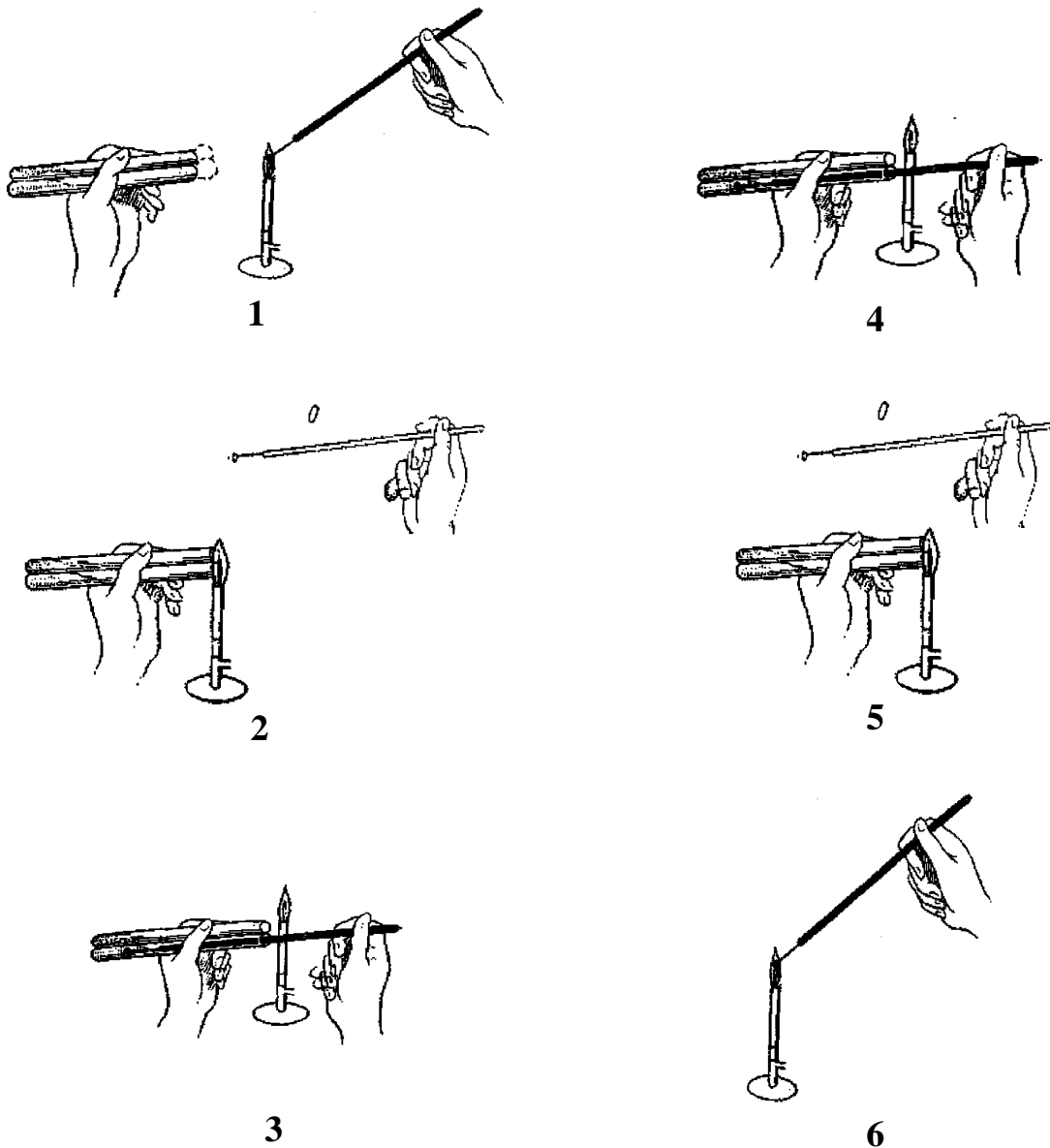


Рис. 35 – Пересів культури мікроорганізмів у пробірки

5. Петлю виймають, обпалюють края пробірок і внутрішні кінці пробок, після чого пробірки закривають.

6. Петлю знову фламбують в полум'ї спиртівки.

2. Посів у рідкі поживні середовища. Посів у рідке середовище можна робити бактеріологічною петлею або піпеткою поблизу полум'я спиртівки. Обидві пробірки тримають в злегка нахиленому положенні, щоб не замочити ватно-марлеві пробки. Петлю з мікробним матеріалом опускають безпосередньо в стерильне середовище і ополіскують. При внесенні клітин, взятих петлею з твердого середовища, матеріал ретельно розтирають по стінці пробірки біля верхнього краю рідкого середовища, весь час змиваючи його середовищем.

Проведення роботи.

1. Студенти знайомляться з класифікацією поживних середовищ, методами стерилізації середовищ, посуду, інвентарю та коротко конспектують викладений у теоретичній частині матеріал.

2. Для підготовки до стерилізації упаковують чашки Петрі у папір, готують ватно-марлеві пробки. Піпетки на 1 см³ закривають ватними тампонами і також загортають в папір. Колби закривають ватно-марлевими пробками і зверху роблять ковпачки з пергаментного паперу.

Контрольні питання

1. Які вимоги висувають до поживних середовищ?
2. Як класифікують середовища за вихідними компонентами?
3. Чим відрізняються диференційно-діагностичні середовища від елективних?
4. Що таке стерилізація?
5. Який метод стерилізації знищує тільки вегетативні форми мікрофлори?

Лабораторна робота № 8-9

МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВІТРЯ

Мета роботи. Ознайомитися з методами дослідження повітря. Оволодіти технікою дослідження мікробіоти повітря чашковим методом та за допомогою апарата Кротова.

Завдання.

1. Визначити вміст мікроорганізмів у повітрі лабораторних приміщень методом седиментації. Вивчити культуральні ознаки колоній мікроорганізмів на поверхні МПА та морфологічні ознаки представників мікробіоти повітря. Зробити кількісний облік мікроорганізмів у повітрі за формулою Омелянського.

2. Зробити пересів обраної колонії на МПА у пробірці.

3. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 3, 4, 5].

Обладнання та матеріали. Мікроскоп, апарат Кротова, чашки Петрі,

МПА, предметне скло, бактеріологічні петлі, кристалізатори, спиртівки, барвники за Грамом, фільтрувальний папір, колби з водопровідною водою.

Для виділення мікроорганізмів з повітря використовують такі методи.

Седиментаційний метод дослідження повітря (метод Коха) зазвичай використовують для встановлення складу мікрофлори в закритих приміщеннях. Фільтраційний метод дослідження повітря: пропускають струмінь забраного повітря через шар води, потім проводять виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, що потрапили у воду.

Методи, засновані на ударній дії струменя повітря: спеціальні апарати (наприклад, конструкції Кротова) дозволяють точно визначити кількісне обмінення повітря мікроорганізмами.

Проведення роботи.

1. Седиментаційний (чашковий) метод Коха.

Найпростіший метод бактеріологічного дослідження повітря – метод осідання часточок і краплин з мікробіотою під дією сили тяжіння на поверхню агарового середовища у відкритій чашці Петрі.

У стерильну чашку Петрі асептично (біля спиртівки) вносять стерильне розплавлене тверде поживне середовище, охолоджене до температури 40-45°C (близької до температури застигання). Для визначення загального числа бактерій у повітрі використовують середовище загального призначення – МПА, для обліку грибів – СА, для обліку специфічної мікробіоти, в тому числі патогенної – спеціальні елективні або диференційно-діагностичні середовища. Після затвердіння середовища чашки загортають у стерильний папір, в якому до цього знаходилася порожня чашка, і переносять у приміщення, в якому буде відбуватися дослідження. Там чашку розгортають, папір стелять на горизонтальну поверхню (стіл, обладнання та інше), ставлять на неї чашку, відкривають кришку, яку не перевертаючи кладуть на стерильний папір, або одним кінцем на бортик чашки, а другим – на папір, не закриваючи при цьому поверхню поживного середовища. Чашки з МПА тримають відкритими 5-30 хв залежно від передбачуваного бактеріального забруднення, обов'язково фіксуючи у журналі час витримки.

При цьому люди повинні звільнити приміщення, в якому проводиться дослідження, потрібно закрити усі двері та вікна, вимкнути усе обладнання, тобто необхідно виключити будь-який протяг та рух повітря. Тому цей метод можна застосовувати у приміщеннях, але не на відкритому повітрі.

Чашки закривають, перевертають догори дном (щоб на кришці не збирався конденсат, який може змивати колонії) і кладуть в термостат: чашки з МПА – при температурі 30°C на 24-48 годин, чашки з СА – при 27°C на 5-7 діб.

Під час культивування у термостаті в результаті розмноження мікробних клітин, які осіли на поверхню середовища, утворюються колонії мікроорганізмів. Колонію буде видно неозброєним оком, коли кількість клітин у ній сягне близько 10^9 . Припускається, що кожна колонія складається з

нащадків однієї клітини, але на одне і теж місце могло осісти декілька клітин і дати спільне потомство – колонію. Тому при обліку посівів, підраховуючи кількість колоній, говорять не про кількість клітин, а користуються терміном колонієутворююча одиниця (КУО). При посіві на МПА визначають загальне мікробне число зразка, який досліджується, або кількість МАФАНМ (мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів) – це показник санітарного стану об'єкта. Облік посівів проводять за двома напрямками: кількісним і якісним.

Кількісний облік посівів. Метод осідання не дає об'єктивного уявлення про кількість мікроорганізмів у повітрі, тому що на відкритих чашках погано фіксуються тонкодисперсні фракції бактеріальних крапель та пилових часточок, які осідають або прибиваються потоками повітря до поверхні середовища. Але професор В. Л. Омелянський встановив експериментальним шляхом, що на поверхню 100 см² осідає за 5 хв така кількість бактерій, яка знаходиться в 10 дм³ повітря. Тому розрахунок за формулою Омелянського є прийнятним для кількісного вивчення мікрофлори приміщень і абсолютно не придатний для атмосферного повітря, де мають місце великі коливання у швидкості його руху. Тим не менш, метод осідання може бути використаний у тих випадках, коли відсутні більш точні прилади й методи або коли відсутнє джерело енергії для приладів. Для розрахунку мікробного числа повітря за Омелянським використовують формулу:

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

де X – кількість мікробів в 1 м³ повітря (КУО), a – кількість колоній на чашці, b – площа чашки (см², табл. 1), t – час експозиції (хв), 5 – час експозиції за Омелянським (хв), 100 – число для перерахунку площі чашки на 100 см², 100 – число для переліку 10 дм³ повітря у м³.

Таблиця 1 – Площа чашок Петрі

Діаметр, см	Площа, см ²	Діаметр	Площа
8,5	56,7	9,3	67,9
8,6	58,1	9,4	69,3
8,7	59,4	9,5	70,9
8,8	60,8	9,6	72,4
8,9	62,2	9,7	73,7
9,0	63,1	9,8	75,5
9,1	65,0	9,9	76,9
9,2	66,7	10,0	78,6

2. Аналіз повітря за допомогою апарата Кротова

Серед приладів для мікробіологічного дослідження повітря найбільш поширеним є прилад Кротова. Механізм вловлювання мікрофлори базується на

ударній дії повітряного потоку, який проходить крізь вузьку клиноподібну щілину та з великою швидкістю б'ється об вологу поверхню поживного середовища. У результаті удару аерозоль, який знаходиться в повітрі, разом з бактеріями і часточками пилу прилипає до поверхні поживних середовищ.

Під час відбору чашка Петрі обертається разом зі столиком, що забезпечує рівномірний розподіл мікроорганізмів по поверхні середовища. Велика перевага цього методу – можливість посіву певного об'єму повітря на будь-якому об'єкті.

Апарат Кротова складається із основи, корпусу й кришки. У корпусі вертикально встановлено електромотор, який обертається після включення в мережу. Вгорі на вісі мотора знаходиться горизонтальний столик, на якому прикріплюється відкрита чашка Петрі з поживним середовищем. Кришка приладу закривається герметично.

Ширина клиноподібної щілини в кришці біля центру – 0,1 мм, а біля краю – 1,2 мм. Вентилятор затягує повітря в апарат через клиноподібну щілину в кришці. Обертання чашки (приблизно 60 об/хв) забезпечує рівномірний розподіл мікроорганізмів на поверхні середовища.

Для замірювання кількості повітря, яке проходить через прилад, в апарат вмонтовано ротаметр.

За 1 хв через прилад можна пропустити 25-50 дм³ повітря. Звичайно використовують режим 25 дм³/хв і вмикають апарат на 5-10 хв.

Прилад Кротова характеризується високою ефективністю вловлювання мікрофлори в пиловій фазі аерозолі, дає чіткі співставимі результати, простий в експлуатації, дозволяє за короткий час здійснити відбір проб повітря безпосередньо у чашки Петрі з середовищами. Зараз існують більш досконалі прилади, але принцип їх роботи такий же.

Розрахунок чисельності мікроорганізмів у повітрі здійснюють за формулою:

$$X = \frac{a}{v} \cdot 1000 \text{ (КУО/м}^3\text{)}$$

де a – кількість колоній на чашці, v – об'єм повітря, який пройшов через апарат (дм³).

У цій формулі $\frac{a}{v}$ відповідає кількості мікробів в 1 дм³ повітря, а для перерахунку на 1 м³ (1000 дм³) цю величину потрібно помножити на 1000.

В лабораторній роботі з дослідження повітря студенти після всіх розрахунків описують колонії бактерій, які виростили на твердому поживному середовищі. Вивчають культуральні ознаки, які є важливим етапом на шляху ідентифікації виду мікроорганізму.

Якісний облік посівів – це вивчення групового складу мікрофлори об'єкту, тобто підрахування чисельності груп однакових колоній, які найбільше виділяються серед інших за зовнішнім виглядом. Підраховують кількість колоній і мікроскопують по одній колонії з кожної групи. Відзначають, яким мікроорганізмом вони утворені, а потім підраховують їх відсоткове

співвідношення. Наприклад, зі 105 колоній бактерій на чашці виявлено 65 колоній, утворених споротворними Gr^+ бактеріями, 9 колоній – неспоротворними Gr^- , 22 колонії – коками. Тоді якісний склад мікрофлори такого повітря буде мати вигляд (%):

Споротворні бактерії Gr^+	65
Аспорогенні Gr^-	9
Коки	22
Інші	4

Окремими посівами враховують наявність плісневих грибів, дріжджів, актиноміцетів, тощо. Всі ці групи мікроорганізмів характеризують якісний склад мікробіоти об'єкту.

Для якісної оцінки посівів треба вміти розрізняти колонії за культуральними ознаками.

Культуральні ознаки – це *характер росту* мікроорганізмів в певному поживному середовищі.

На поверхні твердого поживного середовища окремі бактеріальні клітини при розмноженні утворюють скупчення, які називаються колоніями. Кожна колонія утворюється в результаті розмноження однієї або декількох клітин.

Зовнішній вигляд колоній характерний для кожного бактеріального виду і може служити його діагностичною ознакою.

Розрізняють поверхневі, глибинні і донні колонії в залежності від того, де вони розвивались: на поверхні твердого поживного середовища, в середині його або на дні посудини.

При характеристиці колонії необхідно вказати вік культури (тривалість культивування), склад середовища і температуру культивування.

Вирощені на твердому поживному середовищі колонії розглядають спочатку неозброєним оком або через лупу. Для більш якісного дослідження колоній використовують мікроскоп. При дослідженні чашку поміщають догори дном на столик мікроскопа, переглядають всю площу і олівцем відзначають колонію, що цікавить.

Колонії бактерій, які виростили на твердому поживному середовищі, мають певний зовнішній вигляд (форма, розмір, колір та ін), який є важливою характеристикою мікроорганізмів і називається культуральними ознаками. Вивчення культуральних ознак є суттєвим етапом на шляху ідентифікації виду мікроорганізму. Серед них важливі такі:

1. Колонія поверхнева або глибинна. При дослідженні повітря усі колонії є поверхневими, тому що посів у чашки проводили поверхневим методом, на тверде поживне середовище. Поверхневі колонії утворюють аероби і факультативні анаероби (рис. 36).

При посіві глибинним методом у чашках поряд з поверхневими можуть вирости і глибинні колонії. Звичайно вони мають форму човника – тобто, це диск, який ребром вріс у середовище. Такі колонії на чашках утворюють факультативні анаероби.

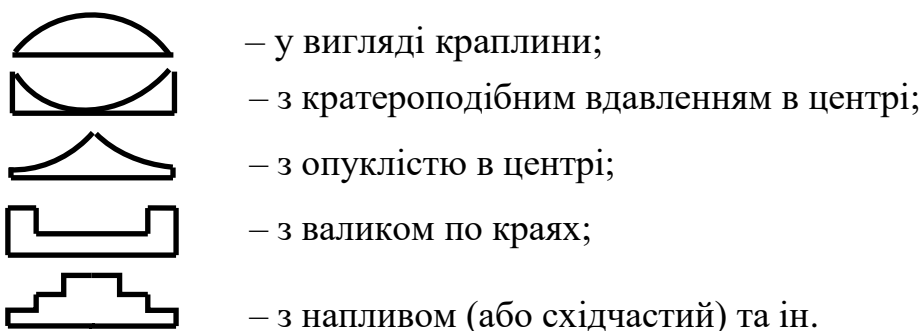
Облігатні анаероби у чашках при доступі кисню не ростуть. Для того, щоб ці мікроорганізми вирости, чашки потрібно помістити в герметичні апарати, з яких повітря відкачують вакуум-насосами, або зв'язують кисень повітря хімічними реактивами, або кисень поглинають аеробні мікроорганізми, які ростуть разом з облігатними анаеробами в герметичному посуді.

2. Форма колонії. Може бути правильна кругла або неправильна.

3. Розмір. Якщо розмір до 1 мм, колонія вважається дрібною. Колонії розміром 2-3 мм – середні, понад 3 мм – великі.

4. Форма краю колонії. Край може бути: рівний, звивистий, хвилястий, фестончастий, волосистий, ризоїдний (тобто подібний корінню рослин), мереживний.

5. Макрорельєф. Колонія може бути опуклою або плоскою. При дуже малій висоті ріст називається пливчастим. У опуклих колоній може бути характерний профіль росту, який можна описати, зробивши уявно розріз через колонію. Профіль росту може бути:



6. Мікрорельєф, або поверхня росту. Колонія може бути гладенькою або зморщеною, губчастою. Іноді складки розташовуються з деякою закономірністю: концентричними кільцями або радіально.

7. Блиск. Поверхня колонії може бути блискучою або матовою. Блиск може бути жирним, вологим та ін. Матовий ріст може бути сухим, борошністим та ін.

8. Прозорість. Якщо всі попередні ознаки колоній вивчають з поверхні, роздивляючись її з боку кришки чашки, то прозорість вивчають в прохідному світлі – роздивляючись колонію на просвіт з боку дна чашки. Колонія може бути прозорою, непрозорою, напівпрозорою.

9. Консистенція. Візуально цю ознаку вивчати неможливо. Її вивчають під час взяття матеріалу з колонії петлею. Консистенція може бути слизька, пастоподібна, кашоподібна, шкіряста (колонія знімається з поверхні середовища у вигляді шкірястої плівки), хрящувата (яка вросла в середовище) та ін.

10. Колір. Колонія може бути забарвленою або безбарвною. Забарвлення забезпечується за рахунок пігментів.

Вказують колір колонії, а також – чи є пігмент ендо- або екзопігментом. Ендопігмент міститься всередині мікробної клітини, в зовнішнє середовище не виділяється, тому забарвлена тільки колонія. Екзопігмент клітина виділяє

назовні, тому забарвлюється не тільки колонія, але і середовище навколо неї (якщо пігмент в цьому середовищі розчинний).

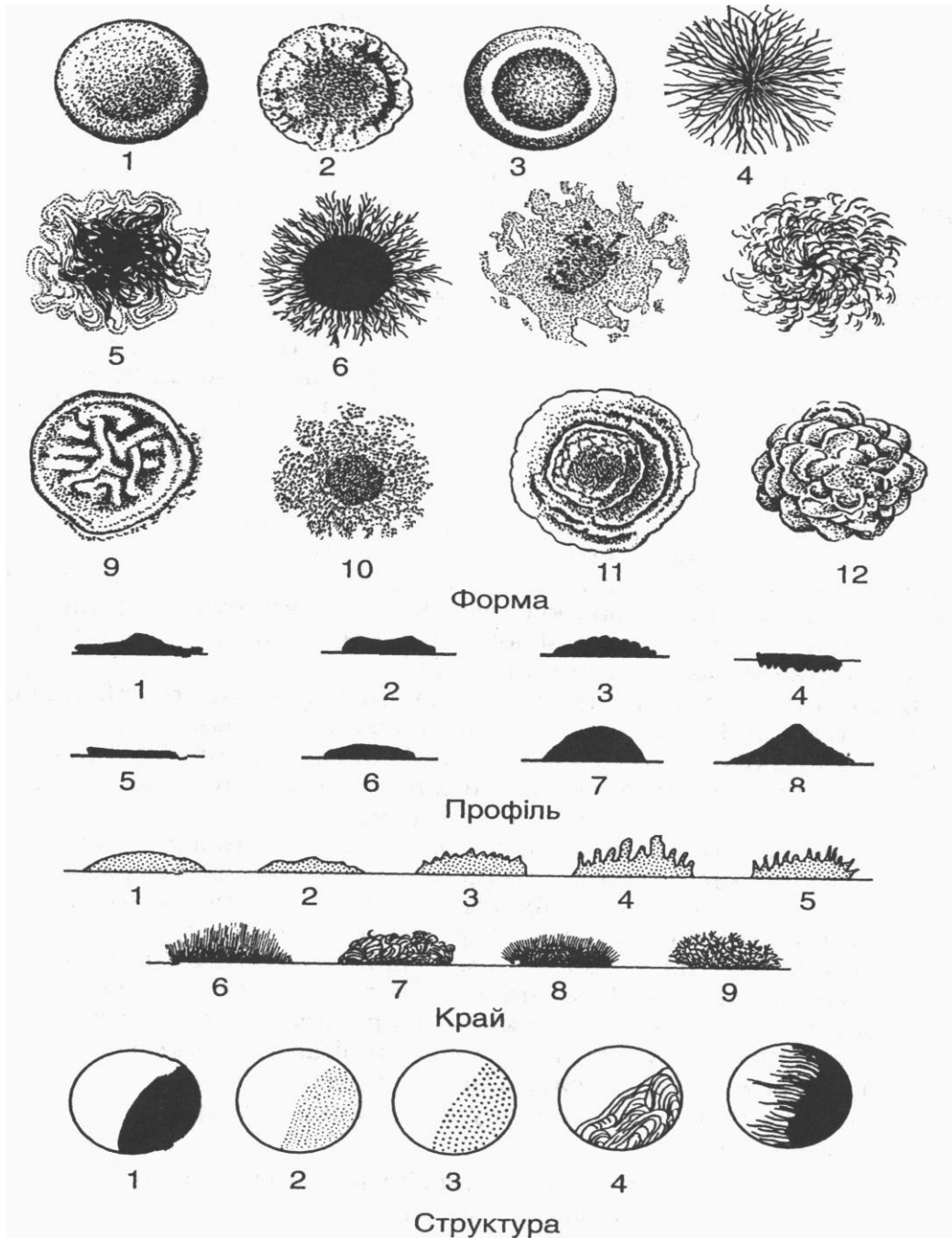


Рис. 36 – Характеристика колоній мікроорганізмів

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

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

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

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

Багато бактерій і грибів в процесі життя виділяють кольорові речовини – пігменти, що додають культурам різноманітних кольорів і відтінків (білий, жовтий, червоний, рожевий, золотистий, чорний, зелений, фіолетовий).

Утворення пігменту для ряду мікроорганізмів є стійкою видовою ознакою, яку використовують при їх ідентифікації. Якщо пігмент розчинний у воді, то поживне середовище, на якому ростуть пігментовані бактерії, також забарвлюється у відповідний колір.

За відношенням до розчинників – води, спирту, ефіру – розрізняють:

- пігменти, розчинні у воді (наприклад, синій пігмент піоціанін, що виділяється мікроорганізмом *Pseudomonas aeruginosa*);

- пігменти, що розчиняються у спирті (наприклад, червоний пігмент – продігіозан, що виділяється бактерією *Serratia marcescens*);

- пігменти, нерозчинні ані у воді, ані в спирті (наприклад, чорний пігмент грибів).

Пігменти у мікроорганізмів відіграють захисну роль проти дії сонячного світла. Крім того, вони беруть участь у процесі дихання.

Колонії можна описувати в будь-якій послідовності ознак. Наведені приклади не вичерпують величезної різноманітності культуральних ознак, які зустрічаються у світі мікроорганізмів. Що до посівів в рідкі поживні середовища, то на них теж визначають певні культуральні ознаки росту мікроорганізмів – помутніння, газоутворення, випадання осаду, утворення плівки на поверхні, зміну забарвлення та ін.

Контрольні питання

1. Назвіть основні джерела забруднення і фактори самоочищення повітря. В якому вигляді мікроорганізми можуть знаходитися у повітрі?

2. Які засоби профілактики забруднення та очищення повітря застосовують на харчових підприємствах?

3. Які є методи дослідження мікрофлори повітря?

4. За якими ознаками характеризують зовнішній вигляд колоній?

Лабораторна робота № 10-12 ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ ТА МЕТОДИ ЇХ КУЛЬТИВУВАННЯ

Мета роботи. Ознайомитися з методами отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів. Освоїти техніку посіву мікроорганізмів на тверді та у рідкі поживні середовища. Освоїти методи виділення чистих культур мікроорганізмів з різних об'єктів навколишнього середовища. Навчитися описувати культуральні властивості мікроорганізмів.

Завдання.

1. Ознайомитись з методами виділення і накопичення чистих культур мікроорганізмів та освоїти техніку посіву досліджуваного матеріалу в чашки Петрі методом Коха. Провести ідентифікацію обраної культури після її

культивування за морфологічними та культуральними ознаками.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [2, 3, 4, 5].

Обладнання та матеріали. Спиртівка, бактеріологічна петля і препарувальні голки, пробірки зі скошеним МПА, чашки Петрі з МПА, пробірки зі стерильним знежиреним молоком з додаванням 5% етилового спирту, сире молоко, бактеріальна суміш № 1 (чисті культури стафілокока і кишкової палички) і бактеріальна суміш № 2 (чисті культури бактерій роду *Vacillus* і неспортворних бактерій), мікроскоп, імерсійна олія, фільтрувальний папір, набір барвників для забарвлення за Грамом.

Змішана культура – це сукупність двох або більше різних видів мікроорганізмів, між якими можуть існувати різні форми взаємовідносин.

Для вивчення певного мікроорганізму його необхідно ізолювати від інших, тобто виділити в чисту культуру.

Чистою культурою (ЧК) називають культуру мікроорганізмів одного виду, іноді представлену потомством однієї мікробної клітини або спори.

Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

Для одержання чистої культури використовують методи Пастера, Коха, Дригальського, Лінднера. Всі вони засновані на виділенні з популяції однієї клітини.

Метод розбавлення Пастера. В основі методу лежить принцип просторового роз'єднання мікроорганізмів. Для цього з суміші або накопичувальної культури роблять ряд послідовних розведень у стерильне рідке поживне середовище: набирають невелику кількість елективної культури, дотримуючись асептичних умов, і вносять у пробірку або колбу зі стерильним МПБ (10 см³), з неї відбирають 1 см³ і переносять в наступну з 9 см³ МПБ і т. д., до 5-10 пробірок (рис. 37). З кожним розведенням кількість мікробних клітин зменшується в 10 разів, і можна таким чином отримати таке розведення, коли в пробірці буде знаходитися тільки одна клітина, з якої і одержують чисту культуру. Всі посіви культивують в необхідних умовах, після чого визначають пробірки, у яких спостерігаються ознаки росту: помутніння, випадіння осаду, поява плівки на поверхні поживного середовища та інші. Останню пробірку, в якій виявлені ознаки росту (перед пробіркою, в якій ознак росту немає) вважають пробіркою з чистою культурою.

Метод Пастера в наш час для виділення чистої культури не використовується, тому що в рідких середовищах мікроорганізми часто перебувають у вигляді скупчень, а це не дає впевненості, що в останню пробірку потрапила лише одна клітина. Але ним користуються для зменшення загальної чисельності мікробних клітин шляхом послідовного розведення.

Метод Коха (метод глибинного посіву) заснований на методі Пастера, але вдосконалений використанням твердих поживних середовищ. Це найбільш розповсюджений у мікробіологічній практиці метод виділення чистої культури.

Метод полягає в одержанні чистої культури від окремої колонії, яка вирощена на твердому поживному середовищі у результаті розмноження однієї клітини (рис. 38).

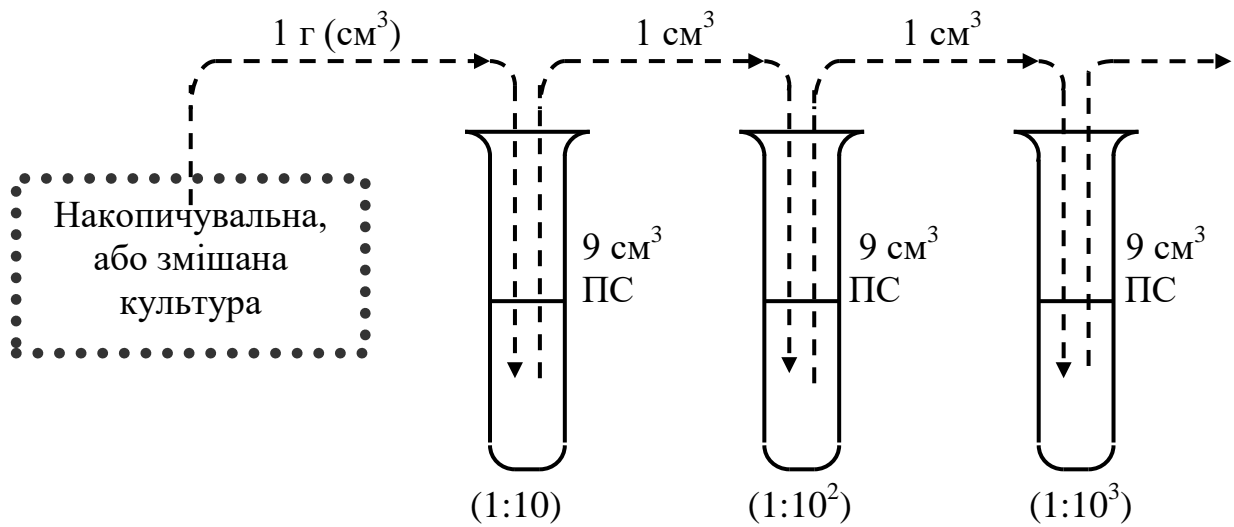


Рис. 37 – Ряд послідовних розведень у стерильному рідкому поживному середовищі.

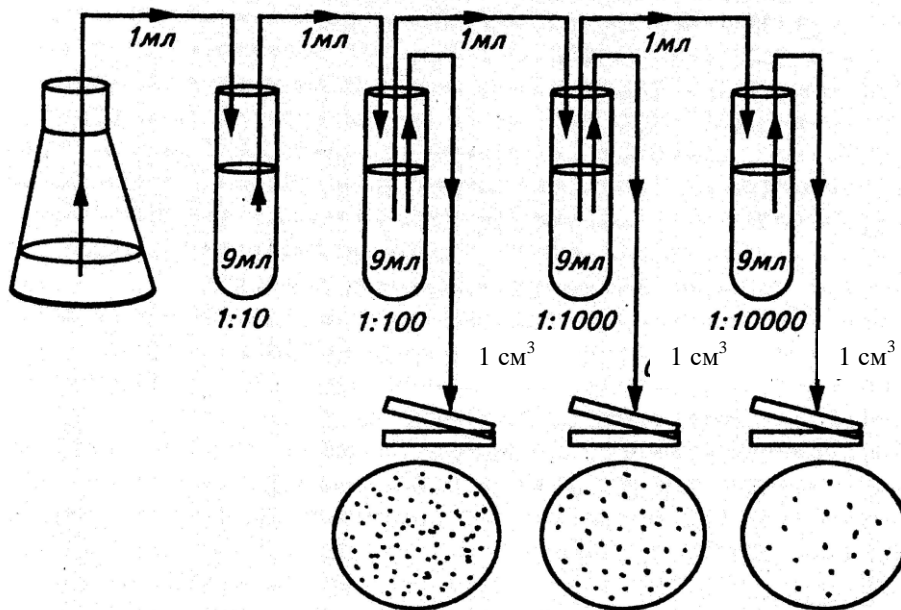


Рис. 38 – Схема виділення чистої культури методом Коха

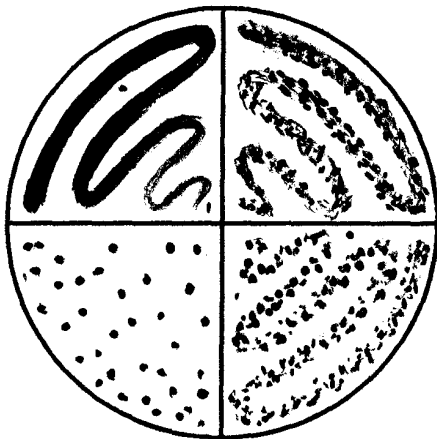
Досліджуваний матеріал вносять бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою у пробірку з розплавленим твердим поживним середовищем при температурі не вище 45°C. Рівномірно розмішують вміст пробірки, обертаючи її між долонями. По 1 см³ розведеного матеріалу переносять у другу пробірку, з другої – в третю і т. д. Вміст кожної пробірки, починаючи з першої, виливають у стерильні чашки Петрі. Посіви культивують і з чашок з найбільш відокремленими колоніями відсівають потрібну в чисту чашку.

Для виділення анаеробних мікроорганізмів за методом Коха обмежують доступ кисню до культури.

Метод Дригальського заснований на механічному розподілі мікробних клітин на поверхні твердого поживного середовища в чашках Петрі.

Для посіву за методом Дригальського використовують декілька чашок Петрі, залитих твердим поживним середовищем. На поверхню середовища в першу чашку вносять 1 см³ досліджуваного матеріалу. За допомогою стерильного шпателя цей матеріал розподіляють всією поверхнею поживного середовища (посів газомом) першої чашки, потім другої, а якщо потрібно, то і третьої.

Аналогічний посів можна зробити штрихом, використовуючи бактеріологічну петлю. Цією ж петлею здійснюють посів у другу, третю і т.д. чашки. Як правило, у першій чашці після культивування посіву з'являється ріст мікробів у вигляді суцільного нальоту, в подальших чашках вміст мікроорганізмів знижується і виявляються ізольовані колонії, з яких відсівом можна легко виділити чисту культуру. З метою економії середовищ і посуду можна користуватися однією чашкою, розділивши її на сектори, і послідовно засівати їх штрихом (метод потоншеного штриха, рис. 39).



Для цього матеріал беруть петлею і проводять нею ряд штрихів спочатку по поверхні першого сектора, а потім послідовно засівають всі інші сектори. (рис. 39). За такий спосіб у перших секторах виходить суцільний ріст, а з наступних штрихів виростуть відокремлені колонії, які є потомством однієї клітини.

Рис. 39 – Посів методом Дригальського

Контроль чистоти культури проводять:

- 1) візуально – визначають культуральні ознаки росту мікроорганізмів;
- 2) мікроскопуванням – вивчають морфологічні ознаки;
- 3) пересівами на різні поживні середовища – визначають фізіолого-біохімічні ознаки.

При візуальній перевірці найчастіше виявляють характер росту виділених мікроорганізмів на поверхні твердих поживних середовищ в чашках Петрі, скошеного агару в пробірках або, якщо посів ведеться в анаеробних умовах, – у трубках Віньял-Вейона. Якщо на поверхні твердого середовища в чашках Петрі або в трубках будуть однакові за культуральними ознаками колонії або штрих на поверхні скошеного агару є однорідним, то культура вважається чистою.

У разі мікроскопування обирають одну колонію з однорідним характером росту, чітко ізольовану від інших. З цієї колонії виготовляють фіксований препарат, фарбують за Грамом і вивчають його під мікроскопом за допомогою імерсійної системи для вивчення морфологічних властивостей, досліджують

рухомість бактерій у «висячій» чи «роздавленій» краплі. Живі клітини розглядають за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Якщо у полі зору всі клітини виявляються морфологічно однорідними (допускається тільки невелика відмінність у розмірах клітин), то роблять висновок, що культура чиста.

Ідентифікація чистої культури. Після виділення культури і перевірки чистоти за зовнішнім виглядом та мікроскопуванням визначають, до якого виду вона належить. При ідентифікації виду беруть до уваги морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки бактерій, а у актиноміцетів зважають і на хімічний склад клітинної оболонки. Визначення виду бактерій за їх морфологічними ознаками називається *морфологічною ідентифікацією*. Визначення виду бактерій за їх культуральними ознаками називають *культуральною ідентифікацією*.

Для остаточного висновку про вид виділених мікроорганізмів вивчають біохімічні властивості бактерій. Вони досить різноманітні. Найчастіше досліджують цукролітичні, протеолітичні, пептолітичні, гемолітичні властивості, утворення ферментів оксидаз, каталази, декарбоксілаз та інших, перетворення нітратів у нітрити, у актиноміцетів – утворення антибіотиків тощо. Для цього існує ціла низка спеціальних поживних середовищ, які засівають мікроорганізмами (строкатий ряд Гісса, сусло-агар, сироватка, молоко, картопляний агар та інші). Чиста культура при культивуванні на спеціальних поживних середовищах виявляє постійні біохімічні властивості. Визначення виду бактерій за їх біохімічними властивостями називається *біохімічною ідентифікацією*.

Чисті культури анаеробних мікроорганізмів ідентифікують подібно до аеробних за морфологічними культуральними, біохімічними та біологічними ознаками. Обов'язково використовують визначення токсичних властивостей збудників харчових захворювань у біологічній пробі та реакції нейтралізації на лабораторних тваринах. У деяких випадках визначають антигенні властивості мікроорганізмів.

Проведення роботи.

1. Студенти знайомляться з методами виділення і накопичення чистих культур мікроорганізмів. Освоюють техніку посіву досліджуваного матеріалу в чашки Петрі методом Коха. Далі чашки поміщають в термостат при 30°C для культивування протягом 1-2 діб.

2. Студенти розглядають посіви, виділяють ізольовані колонії, що відрізняються за зовнішнім виглядом, описують культуральні властивості виділених чистих культур мікроорганізмів, готують з описаних колоній фіксовані мазки і фарбують їх за Грамом (див. лаб. роботу № 8-9). Розглядають препарати з об'єктивом 90x при максимальному освітленні. Визначають морфологію. Далі замальовують мікроскопічну картину і роблять висновок про якісний склад мікробіоти, з якої була відсіяна чиста культура.

Контрольні питання

1. Що таке чисті культури мікроорганізмів і для чого їх виділяють з об'єктів навколишнього середовища?
2. Яким чином можна виділити накопичувальну культуру анаеробних бактерій?
3. Охарактеризуйте методи виділення чистих культур мікроорганізмів, засновані на їх механічному розділенні.
4. За якими ознаками описують культуральні властивості мікроорганізмів, які виростили на твердих середовищах в чашках Петрі?
5. Перерахуйте основні етапи пересіву мікроорганізмів з пробірки в пробірку.

Лабораторна робота № 13-14

ВИВЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБІОТИКІВ

Мета заняття. Засвоїти методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків та перевірити чутливість до антибіотиків музейних культур.

Завдання.

1. Ознайомитися з методами визначення чутливості одного виду мікроорганізму до багатьох антибіотиків та багатьох видів мікроорганізмів до одного антибіотика. Провести дослідження, зробити висновки та оформити протокол лабораторної роботи.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 3, 4].

Обладнання та матеріали. Стерильні чашки Петрі, МПА, диски антибіотиків, музейні культури мікроорганізмів, термостат, спиртівки, лінійки.

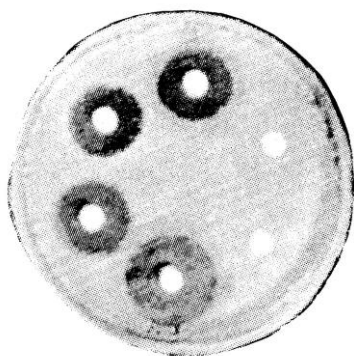
Для вибору антибіотика, необхідного для лікування інфекційного захворювання, визначають спектр його антимікробної дії або чутливості мікроорганізмів до нього. Для цього використовують методи, які ґрунтуються на здатності антибіотика проникати за рахунок дифузії у поживне середовище.

Одним із таких методів є *метод індикаторних дисків* (метод дифузії в агар).

Проведення роботи.

В чашку Петрі з підсушеним МПА висівають «газоном» або глибинним методом культуру мікроорганізма, яку потрібно дослідити. Стерильним пінцетом на поживне середовище, на однаковій відстані один від одного і на відстані біля 2,5 см від центру чашки викладають паперові диски (4-5 штук), насичені розчинами різних антибіотиків. Чашки позначають та культивують у термостаті при температурі 30 °С протягом 2-3 діб.

Антибіотики дифундують в поживне середовище, попереджують або затримують ріст чутливих до них культур мікроорганізмів. Навколо дисків виникають так звані «зони затримки росту» бактерій (рис. 40), які добре видно на фоні суцільного росту культури. Ступінь чутливості бактерій до антибіотиків визначається розміром зони затримки росту.



Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості до антибіотика
більше 25	високочутливі
15–24	чутливі
10–14	малочутливі
менше 10	стійкі

Рис. 40 – Зони затримки росту *Escherichia coli*.

Таким же методом можна визначати чутливість мікроорганізмів до фітонцидів часнику, цибулі та інших рослин.

Після культивування розглянути чашки, відмітити наявність зон затримки росту навколо індикаторних дисків. Виміряти лінійкою діаметри стерильних зон, результати занести в таблицю, зробити висновки про чутливість кожної з тест-культур до різних антибіотиків.

Таблиця 2 – Ступінь чутливості мікроорганізмів

Назва антибіотиків	Величина зони затримки росту бактерій, мм								Висновок про ступінь чутливості
	<i>Staphylococcus aureus</i>								
Гентаміцин									

Контрольні питання:

1. Які сполуки називають антибіотиками?
2. Що таке антагонізм?
3. На які групи поділяють антибіотики за спектром дії та походженням?
4. Яким вимогам повинні відповідати антибіотики, які використовують в харчовій промисловості?
5. У чому полягає сутність методу індикаторних дисків?

Лабораторна робота № 15-16

МІКРОФЛОРА І МЕТОДИ САНІТАРНО-БАКТЕРІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ПИТНОЇ ВОДИ

Мета заняття. Вивчити характеристики води як середовища для розвитку мікроорганізмів. Ознайомитися з методами та оволодіти технікою бактеріологічного дослідження мікробіоти води.

Завдання.

1. Ознайомитися з методами бактеріологічного дослідження питної води. Зробити посів водопровідної води для визначення загальної кількості мікроорганізмів.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 4, 5].

Обладнання та матеріали. Мікроскопи, прилад для фільтрації води, фільтри мембранні, чашки Петрі стерильні, стерильні МПА, елективні та диференційно-діагностичні середовища для кишкової палички, предметне скло, мірний посуд, кристалізатори, імерсійна олія, водопровідна вода (яка досліджується), спиртівки, мікробіологічні петлі, фільтрувальний папір, набір барвників для забарвлення за Грамом.

Проведення роботи

1. Відбір проб води

У залежності від задачі дослідження визначають місце й час відбору проби. При відборі проби з водопровідного крану його попередньо стерілізують полум'ям палаючого тампону, просякненого спиртом. Воду спускають протягом 10 хвилин і тільки після цього відбирають пробу. Для цього користуються стерильним посудом місткістю 500 см³ з ватно-марлевими пробками. Бактеріологічні дослідження відібраних проб повинні проводитися не пізніше 2 годин з моменту відбору або не пізніше 6 годин при зберіганні проби за температури 1-5°C.

2. Визначення загальної кількості бактерій

З води, яку відібрали для аналізу, 1 см³ вносять у стерильну чашку Петрі і заливають розплавленим МПА, який перед тим охолоджують до температури 40-45°C.

Коли МПА застигне, чашку кладуть в термостат при температурі 30°C на 24-48 годин. Після культивування підраховують колонії на чашці та перераховують на кількість КУО в 1 см³ води за формулою:

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

де a – кількість колоній на чашці, n – ступінь розведення води.

Враховують результати тільки тих чашок, де число колоній знаходиться в межах від 30 до 300.

Методи визначення колі-індексу і колі-титру.

Виявити кишкову паличку у воді та розрахувати колі-індекс і колі-титр можна двома найпоширенішими методами: *методом мембранних фільтрів* (рис. 41) та *бродильним*.

Метод мембранних фільтрів дає більш достовірні результати.

Мембранні фільтри – це плівки з нітроцелюлози з такими розмірами пор, що мікроорганізми затримуються на їх поверхні. Розміри пор відповідають номеру фільтра (0–6). Використовують, як правило три фільтри. Фільтри зберігають сухими, перед вживанням кип'ятять в дистильованій воді по 10 хвилин, тричі змінюючи воду. Фільтрувальний апарат фламбують ватним тампоном зі спиртом або стерилізують в автоклаві.

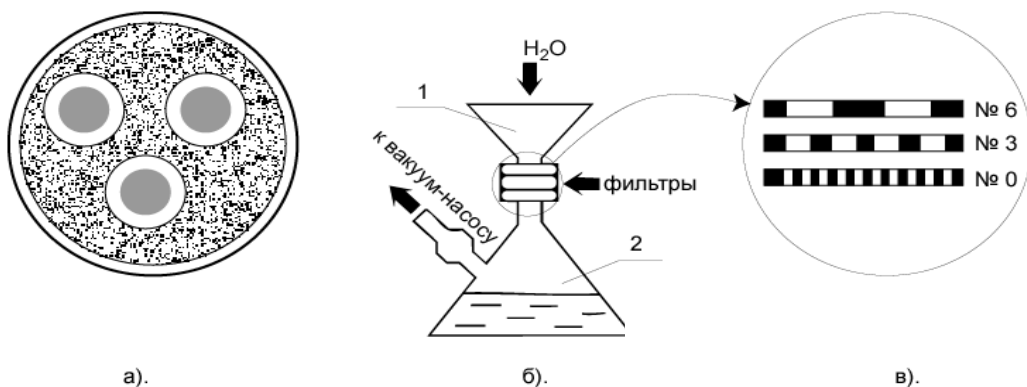


Рис. 41. а – фільтри на чашці Петрі з середовищем Ендо, б – прилад для фільтрування води (1 – лійка металева, 2 – колба Бунзена), в – розташування фільтрів всередині металевого корпусу

Аналіз ведеться у чотири етапи.

I етап. Об'єм води 333 см³ пропускають через фільтри, які потім викладають на чашку Петрі на диференціально-діагностичне середовище Ендо. Вирощування триває 24 години, при температурі 37°C.

До складу середовища входить лактоза, основний фуксин і сірчистоокислий натрій Na₂SO₃. Натрієва сіль функсинсірчистої кислоти безбарвна. Розвиваючись на середовищі Ендо, кишкова паличка зброджує лактозу. Один з проміжних продуктів реакції – альдегід – відщеплює сірчистоокислий натрій від безбарвної функсинсірчистої кислоти, в результаті чого виділяється вільний фуксин у вигляді дрібних блискучих кристалів темно-червоного кольору.

II етап. Вивчають культуральні та морфологічні ознаки колоній на фільтрах. *Культуральні ознаки кишкової палички.* Колонії кишкової палички на середовищі Ендо мають характерний вигляд – круглі з рівними краями, діаметром 2–4 мм, темно-червоні з металевим блиском. Якщо таких колоній немає, дають відповідь, що коли індекс менше трьох. Якщо такі колонії є, з

кожної з них роблять фіксований препарат, забарвлюють за Грамом і вивчають морфологічні ознаки мікроорганізму, який утворив таку колонію.

За морфологічними ознаками Escherichia coli – це дрібні палички (2–3 мкм) з заокругленими кінцями, G^- , неспоротворні.

Облік ведеться кожної характерної колонії окремо.

III етап. Лактозу можуть зброджувати і бактерії роду *Pseudomonas*. Щоб впевнитися, що обрані колонії утворені *E. coli*, стерильним пінцетом на них накладають папір, змочений спеціальним реактивом на продукти оксидази, тобто виконують оксидазний тест. Через 2–4 хвилини оксидазопозитивні псевдомонади окислюють фенілєндіамінові сполуки до індофенола, який має темно-синє забарвлення. Якщо посиніння є, це означає, що колонії належать до псевдомонад, і надалі їх не враховують. Якщо посиніння не спостерігається, то вважається, що колонії утворені кишковою паличкою, і підтверджують це наступним етапом.

IV етап. З колоній, які не посиніли при виконанні оксидазного тесту, але мають нехарактерне червоне або рожеве забарвлення або безбарвні, роблять пересів на напіврідке середовище з індикатором ВР (водним розоловим) і глюкозою або лактозою і вирощують, як при першому етапі дослідження.

Діагностичними ознаками росту *E. coli* є:

1. Кислотоутворення (K^+), що встановлюється за зміною кольору індикатора в середовищі (від жовто-рожевого до зеленого або синьо-зеленого);

2. Газоутворення (G^+), що встановлюється за пухирцями газу в поплавку або за розривами стовпчиків агаризованного середовища в пробірці.

Результат вважають позитивним, якщо спостерігається одночасно кислото- і газоутворення.

На всіх фільтрах підраховують колонії кишкової палички, тобто тільки такі колонії, які мали характерний колір і блиск, утворені G^- дрібними паличками з заокругленими кінцями, рухомими, оксидазонегативними, які зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу.

Пам'ятаючи, що одержані при фільтрації 333 см³ води колонії, які відповідають цим ознакам, походять від однієї клітини, обчислюють колі-індекс множенням їх числа на три:

$$\text{колi-iндекс} = a \cdot 1000 / 333,$$

де a – число паличок, належність яких до *E. coli* підтверджена всіма етапами аналізу (рис. 42).

Приклад. Розрахувати колі-індекс і колі-титр, якщо на трьох фільтрах виявлено 5 червоних колоній, а об'єм пропущеної води $V = 333$ см³.

$$\text{колi-iндекс} = 5 \cdot 1000 / 333 = 15,$$

$$\text{тоді колi-титр} = 1000 / 15 = 67.$$

Така вода не відповідає вимогам стандарту на питну воду.



Рис. 42 – Хід дослідження води методом мембранних фільтрів

Бродильний метод має також назву «метод кратних пробірок» або метод (НВЧ) (рис. 43).

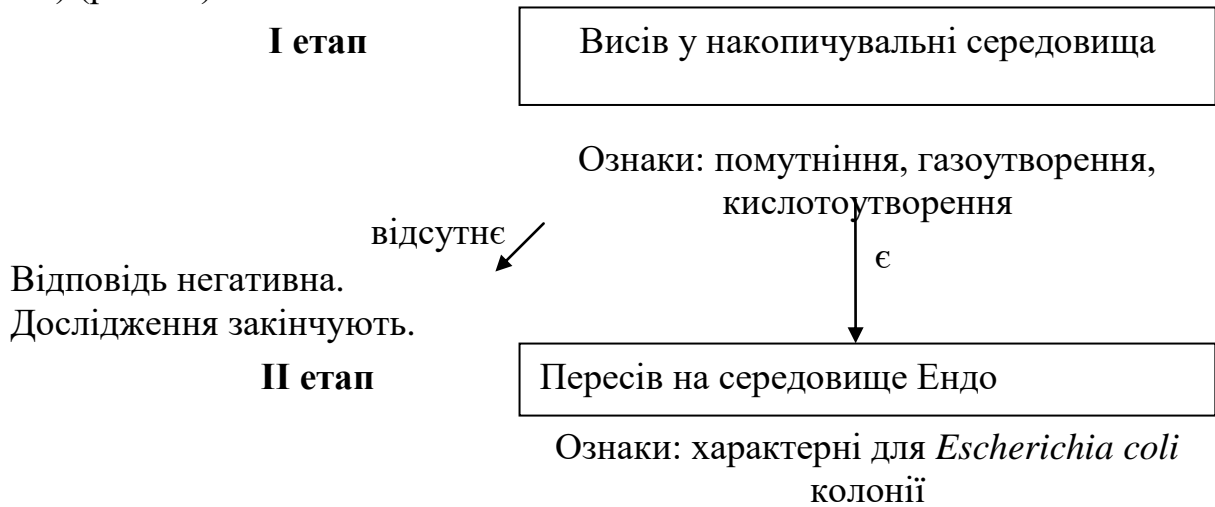
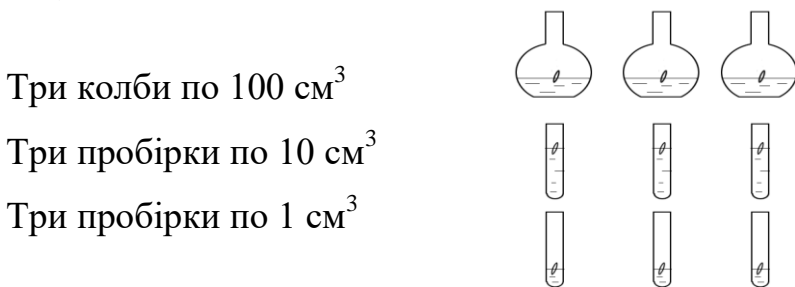


Рис. 43 – Хід дослідження води бродильним методом (початок)

I етап. Об'єм води, рівний колі-титру питної водопровідної води (333 см³), ділять на кілька об'ємів відповідно до прийнятої схеми:



Ці об'єми висівають у накопичувальне середовище – глюкозо- або лактозо-пептонне з індикатором Андреде. Індикатор Андреде (бромтимоловий синій з фуксином, який при рН 7,2–7,4 безбарвний, а при підкисленні червоніє). Спочатку готують концентровані середовища, а потім розбавляють їх до потрібного об'єму водою, яка досліджується. Так, об'єми води по 100 см³ висівають у колби з 10 см³ концентрованого середовища, об'єми по 10 см³ – у пробірки з 1 см³ концентрованого середовища. Таким чином, в кожній ємності концентрація поживного середовища буде однаковою.

Для об'ємів 1 см³ використовують 10 см³ розведеного середовища. Витримують посіви у термостаті при 30±1°C протягом 24 год. Спостерігають ознаки росту: помутніння середовища, кислотоутворення, газоутворення.

II етап. При наявності ознак росту з проби, що забродила, роблять пересіви на середовище Ендо, посіви витримують у термостаті протягом 16–18 годин при температурі 37±5°C.

З усіх колб і пробірок з характерними ознаками росту роблять пересіви на середовище Ендо і культивують їх 16-18 годин при температурі 30°C. Відзначають ті об'єми, в пересівах з яких одержані характерні колонії. Облік кожного такого об'єму ведеться окремо.

Подальші дослідження проводять аналогічно дослідженням води методом мембранних фільтрів. Різниця з методом мембранних фільтрів полягає в тому, що бродильним методом число кишкових паличок підрахувати не можна, коли-індекс визначають по таблицях, складених на основі численних дослідів. В них наводяться найбільш імовірні числа (НЧ) кишкових паличок залежно від числа позитивних об'ємів води (тобто таких, де наявність кишкової палички доведена мікроскопуванням, оксидазним тестом, кислото- і газоутворенням). Тому цей метод також має назву табличного, або метода НЧ.

Контрольні питання:

1. Від чого залежить розподіл води за зонами сапробності?
2. Фактори самоочищення води у природі.
3. Яким чином відбувається очищення та знезаражування стічних вод?
4. Способи очищення питної води.
5. Які показники визначають при санітарно-бактеріологічному дослідженні питної води і чому?
6. Наведить етапи дослідження води методом мембранних фільтрів.

**Самостійна робота
БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ҐРУНТУ**

Мета роботи. Ознайомитися з методами мікробіологічного контролю ґрунту.

Розрізняють повний та скорочений бактеріологічний аналіз ґрунту.

Скорочений бактеріологічний аналіз включає визначення кишкової палички та загального числа сапрофітних бактерій ґрунту (МАФАНМ).

Повний бактеріологічний аналіз ґрунту включає крім зазначених вище пунктів визначення наявності анаеробів, протею та патогенних мікроорганізмів (сальмонел, шигел).

Всі показники визначаються загальноприйнятними методами кількісного внесення спеціально підготовленої середньої проби ґрунту у відповідні середовища, термостатування зразків, візуального огляду і кількісного підрахунку посівів.

У результаті повного бактеріологічного дослідження визначають показники, які свідчать про:

- загальну кількість сапрофітних бактерій на 1 г ґрунту – ступінь забрудненості ґрунту;
- коли-індекс – число кишкових паличок в 1 г ґрунту;
- коли-титр – найменша маса ґрунту (г), яка містить одну кишкову паличку – ступінь забруднення фекальними відходами;
- титр анаеробів *Clostridium perfringens* (крайне розведення, яке дає ознаки росту) – ступінь забруднення патогенними анаеробними мікроорганізмами, серед яких можуть бути збудники сибірки, ботулізму, газової

гангрені та ін.;

- титр *Proteus vulgaris* – (останнє розведення, яке дає ознаки росту) – ступінь забруднення аеробними патогенними гнильними мікроорганізмами;

- присутність характерних колоній сальмонел і шигел – ступінь забруднення ґрунту відходами тваринницьких ферм;

- титр нітрифікуючих бактерій (найменша маса ґрунту, в якій вони присутні) – ступінь забруднення ґрунту нітратами;

- загальна кількість термофільних бактерій – забруднення ґрунту перегноєм і компостом.

Проведення роботи

Підготовка ґрунту для аналізу. Зразки ґрунту звільняють від великих включень і просіюють крізь стерильне сито. Зразок ґрунту перемішують і відбирають наважку не менше 30 г. Перше розведення наважки ґрунту готують в посуді із 270 см³ стерильної водопровідної води (схема 1). Після перемішування із одержаної ґрунтової суспензії без відстоювання готують перше розведення. Для цього з первинно приготовленої зависі (1:10) готують кілька десятикратних розведень: для чистих ґрунтів до 3-4 (1:1 000; 1:10 000), для забруднених до 4-6 (1 : 10 000; 1:100 000).

Визначення загального числа бактерій. З кожної проби ґрунту повинно бути використано для посіву не менше двох різних розведень в залежності від ступеня передбачуваного забруднення ґрунту, який досліджується. З кожного розведення відбирають по 1 см³ суспензії в дві чашки Петрі і заливають МПА (глибинний спосіб посіву). Після загуснення агару чашки з висівом вкладають у термостат на 18 годин при 28–30 °С. Після інкубації посівів підраховують кількість колоній і роблять перерахунок на 1 г ґрунту за формулою:

$$X = a \cdot 10^n$$

де X – кількість мікроорганізмів (КУО/г);

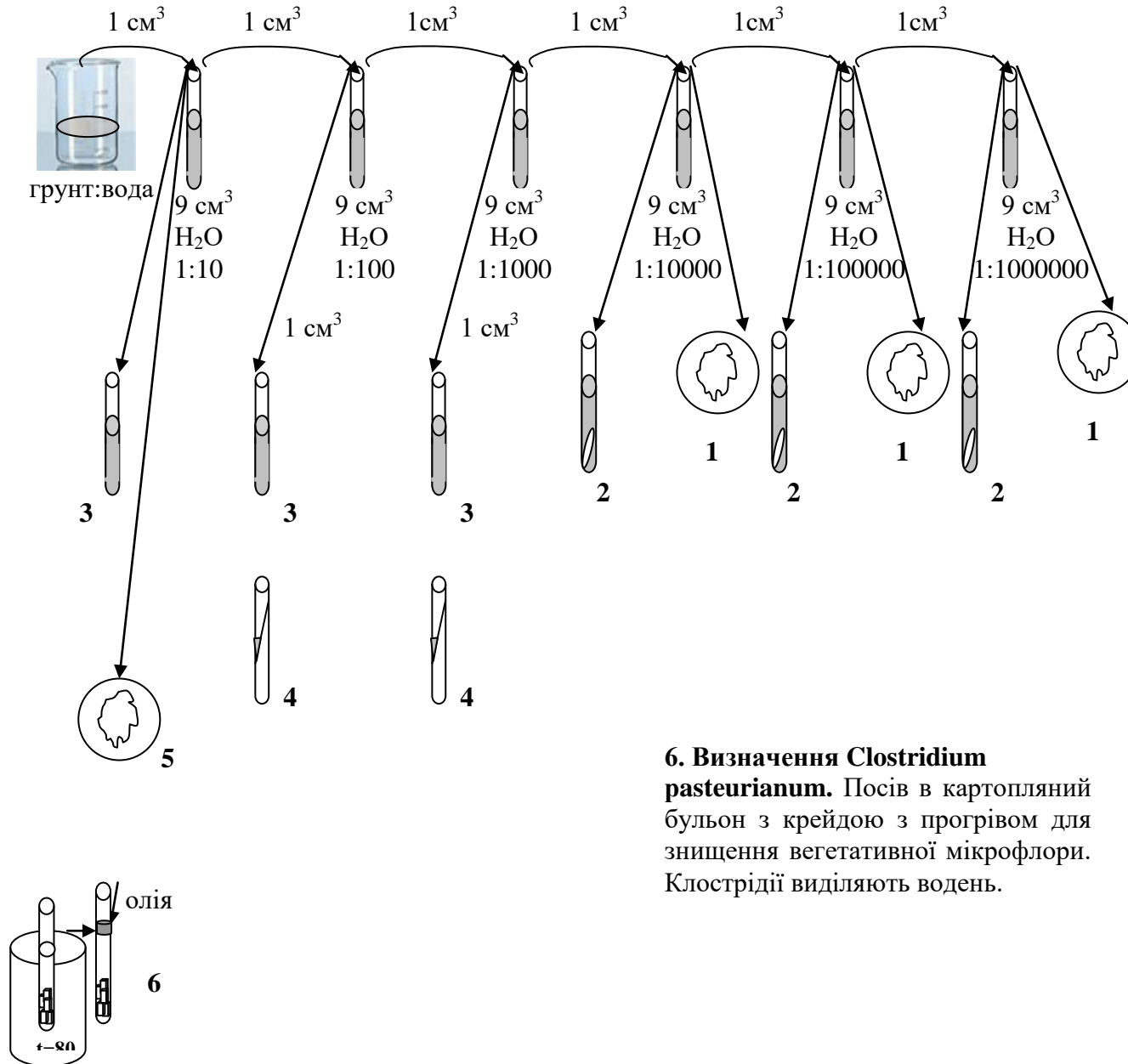
a – кількість колоній на чашці;

n – ступінь розведення наважки ґрунту.

Визначення титру *E. coli*. Для оцінки ступеня фекального забруднення необхідно визначити не тільки групу кишкових паличок, але і різновиди, які здатні викликати газоутворення на рідких середовищах із глюкозою при 43–45 °С.

Присутність кишкової палички виявляють посівом різної кількості ґрунту в модифіковане середовище Кеслер (бродильна проба, перший етап). При аналізі чистих ґрунтів роблять посів з розведень від 1:10 до 1:1 000, при роботі із забрудненими ґрунтами обирають розведення до 1:10⁶. Із первинного розведення (1:10) стерильною піпеткою беруть 10 см³ і засівають в колбу з 50 см³ середовища Кеслер, що відповідає 1 г ґрунту. З подальших розведень роблять посів по 1 см³ ґрунтової суспензії в пробірки з 9 см³ того ж середовища.

Схема мікробіологічного аналізу ґрунту



1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 г ґрунту. Посів 1 см³ зависі під МПА.

2. Визначення титру *E. coli* Посів 0,0001 г, 0,00001 г, 0,000001 г в середовище Кесслер, Ейкмана тощо. Прискорений метод: посів 1 г ґрунту на середовище Хейфеца. Пересів на середовище Ендо.

3. Визначення *Clostridium perfringens*. Посів 0,1 г, 0,01 г, 0,001 г в молоко з прогрівом для знищення вегетативної мікрофлори.

4. Визначення бактерій роду *Proteus* методом Шукевіча. Посів 0,1 см³ в конденсат скошеного МПА.

6. Визначення *Clostridium pasteurianum*. Посів в картопляний бульон з крейдою з прогрівом для знищення вегетативної мікрофлори. Клострідії виділяють водень.

5. Визначення бактерій роду *Salmonella*. Посів 25 г ґрунту в рідке середовище накопичення. Пересів на диференційно-діагностичні середовища (Плоскірева, вісмут-сульфітний агар).

Посіви вирощують в термостаті при 43 °С (при відсутності термостата на 43 °С можна вирощувати при 37 °С). При відсутності через 18-24 години газоутворення і скаламучення видають заключну відповідь про відсутність кишкової палички. При наявності газоутворення та муті або ж тільки муті проводять висів петлею на середовище Ендо або на розоловий диференційний агар (другий етап). Посіви культивують 24 години при температурі 37 °С.

При відсутності росту на чашках видають заключну негативну відповідь. При наявності колоній, характерних для кишкової палички (темно-червоні з металевим блиском і безколірні колонії на середовищі Ендо або жовті та оранжеві колонії на розоловому середовищі) із них готують мазки, красять за Грамом і досліджують під мікроскопом.

Виявлення в мазках грамнегативних коротких неспорових паличок вказує на необхідність переходу до третього етапу аналізу – пересіву характерних колоній на глюкозо-пептонне середовище. Якщо виявляється газоутворення, видають заключний позитивний висновок про присутність кишкової палички (вторинна бродильна проба, третій етап).

Результати аналізу вносять в таблицю 2:

Таблиця 3 – Результати мікробіологічного аналізу БГКП ґрунту

Дата дослідження	№ проби	Місце відбору проб ґрунту	Ферментація в розведеннях ґрунту				Колі-титр	Колі-індекс
			10:10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴ і т.д.		

Результати бактеріологічного дослідження БГКП ґрунту виражаються колі-індексом або колі-титром. Під колі-індексом мають на увазі число кишкових паличок в 1 г ґрунту, під колі-титром – найменшу масу ґрунту, в якому виявляється кишкова паличка.

Визначення ґрунту *Clostridium perfringens*. Для визначення *C. perfringens* у ґрунті використовують залізо-сульфідний агар (середовище Вільсона-Блера). Посів ґрунту проводять із тих же розведень ґрунтової суспензії, що і для визначення колі-титру. Для звільнення від неспоронної мікрофлори всі висіви з розведеннями основної ґрунтової суспензії прогривають до 80 °С на протязі 15 хв. Із відповідного розведення 1 см³ вносять в пробірку з розплавленим і охолодженим до 45 °С агаровим середовищем і рівномірно розподіляють матеріал у ньому. Посіви вирощують у термостаті при 37 °С, а краще при 43 °С.

Поява на протязі перших 18 годин в глибині агару чорних колоній, які нерідко розривають середовище внаслідок газоутворення, вказує на присутність *C. perfringens*. Чорне забарвлення середовища залежить від відновлення бактеріями сульфату натрію до сірчистого натрію (Na₂S), котрий, взаємодіючи з хлорним залізом, утворює чорне сірчисте залізо (FeS).

Для більш простої і швидкої індикації *C. perfringens* у ґрунті рекомендується використовувати посіви досліджуваного матеріалу в стерильне молоко – 1 см³ кожного розведення ґрунтової суспензії засівають в пробірки з молоком. Далі посіви прогрівають і вирощують в термостаті, як описано вище. Наявність *C. perfringens* реєструють по швидкому за 5-6 годин згортанню молока з повним відділенням сироватки і відкиданням пористого згустка на поверхню в зв'язку з енергійним газоутворенням. Присутність *C. perfringens* підтверджується бактеріологічним знаходженням в мазках із вмісту пробірок типових великих товстих грампозитивних паличок. Останнє розведення ґрунтової суспензії, котре дає на обраних середовищах розвиток *C. perfringens*, показує титр цього мікроба в ґрунті.

Визначення титру нітрифікуючих бактерій. Титр нітрифікаторів визначають посівом розведень ґрунтової суспензії від 1:100 до 1:10 000 у флакони з рідким мінеральним середовищем Виноградського. Посіви інкубують при температурі 28 °С на протязі 14-15 діб. Утворення азотистої або азотної кислоти можна перевірити за допомогою якісної проби з дифеніламіном. Синє забарвлення вказує на присутність нітратів.

Визначення термофільних бактерій. Ступінь фекального забруднення ґрунту можна визначити за кількістю термофільних бактерій, температурний оптимум яких 58-60 °С. Термофіли представлені в основному спороутворюючими грампозитивними бактеріями і актиноміцетами, які активно розмножуються в компостних купах, гноєві. Тому можна зробити висновок, що ґрунти, в яких виявляють велику кількість ешерихій і термофілів, були удобрені гноєм або компостом. Ґрунт, що містить багато ешерихій і незначну кількість термофілів, вважається забрудненим фекаліями, оскільки флора кишечника людини і тварин дуже бідна на термофіли.

Для виявлення термофілів роблять посів розведень ґрунтової суспензії (від 1:10 до 1:1 000 000) на МПА. Інкубують при температурі 60 °С на протязі 24 годин. Кількість колоній підраховують, як при визначенні загальної чисельності сапрофітів у ґрунті.

Виявлення протеїв. При дослідженні ґрунту на присутність в ньому протеїв готують розведення із основної ґрунтової суспензії до 1:10 000 включно. З кожного розведення стерильною піпеткою одну краплину суспензії вносять в конденсаційну воду скошеного МПА (за методом Шукевича). При цьому поверхня поживного середовища не повинна забруднюватися ґрунтом, який вноситься. Пробірки ставлять в термостат при 30 °С. Через 24–28 годин ріст протеїв виявляють у вигляді тонкої вуалеподібної плівки на поверхні агару.

Виявлення сальмонел і шигел. Для дослідження використовують наважку ґрунту масою не менше 30 г. Після накопичування на спеціальному середовищі по 0,2 см³ висівають петлею або шпателем Дригальського на тверді селективні середовища (Плоскірева, Вільсона-Блера та ін.). Посіви вирощують в термостаті при 37 °С.

Подальше вивчення морфологічних, ферментативних та серологічних властивостей виділених культур проводять за загальноприйнятою методикою.

Санітарно-мікробіологічна оцінка ґрунту. Її проводять за комплексом показників, наведених в таблиці 6.

Таблиця 4 – Оцінки санітарного стану ґрунту за деякими бактеріальними показниками

Ступінь забруднення ґрунту	Титр бактерій, г			Кількість термофілів (в 1 г)
	<i>E. coli</i>	<i>Cl. perfringens</i>	нітрифікуючих	
Чистий	10 і вище	0,01 і вище	0,1 і вище	до 1000
Забруднений	0,9–0,01	0,009–0,0001	0,09–0,001	до 1000000
Сильно забруднений	0,009 і нижче	0,00009 і нижче	0,0009 і нижче	до 4000000

Контрольні питання:

1. На які групи поділяються мікроорганізми ґрунту?
2. Які мікроорганізми зустрічаються в ґрунті? Яку роль вони відіграють у природі та харчовій промисловості?
3. Які показники включає мікробіологічне дослідження ґрунтів?

Лабораторна робота № 17-18

САНІТАРНО-БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ОБЛАДНАННЯ, ІНВЕНТАРІЮ, ТАРИ ТА РУК ЦЕХОВОГО ПЕРСОНАЛУ

Мета роботи. Ознайомитися з методами санітарно-бактеріологічного контролю в харчовій промисловості на прикладі контролю обладнання, інвентарю, тари та рук методом змивів.

Завдання.

1. Провести змиви з об'єктів, які досліджуються, посіви у відповідні поживні середовища, культивування та облік посівів. Зробити висновки.
2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [4, 5, 6].

Обладнання та матеріали. Стерильні ватяні тампони, стерильна водопровідна вода, пінцети, металеві трафарети, поживні середовища, мікроскопи, барвники для забарвлення препаратів, імерсійна олія.

Головною умовою функціонування харчових підприємств є високий рівень культури виробництва, в тому числі мікробіологічного та санітарно-гігієнічного контролю. Санітарно-мікробіологічні дослідження входять до однієї з найглибше регламентованих сфер діяльності підприємства. Проведення санітарно-мікробіологічних досліджень можливо тільки при наявності на підприємстві чинної нормативної документації.

Лабораторний контроль поділяється на *плановий* та *позаплановий*, останній проводиться у випадках виникнення харчових отруєнь та кишкових

інфекцій за епідемічними показниками.

Для оцінки санітарного стану діючого підприємства широко використовують прямий мікробіологічний контроль через посіви змивних рідин з поверхні приладів, обладнання, інвентаря, одягу, рук цехового персоналу, або сучасні експрес-методи дослідження.

Основними показниками мікробної забрудненості предметів є загальна кількість мікроорганізмів на одиницю поверхні досліджуваного предмета (МАФАНМ) та наявність на предметах санітарно-показових мікроорганізмів як показників фекального забруднення.

Проведення роботи

Мікробіологічний контроль обладнання та інвентарю здійснюють методом змиву мікроорганізмів з подальшим посівом на відповідні середовища. Поверхню змиву обмежують металевим трафаретом з вирізаною серединою, площа якої 25 см². Трафарет фламбують в полум'ї спиртівки і кладуть його на поверхню, яку досліджують, фламбованим боком догори. Беруть фламбованим пінцетом стерильний тампон, змочують його стерильною водопровідною водою в колбі (100 см³), та віджимають надлишок води, притискаючи тампон до шийки колби. Змоченим тампоном роблять змив з поверхні обладнання або інвентарю. Змивають мікроорганізми з досліджуваної поверхні, обмеженої трафаретом, протираючи її у взаємно перпендикулярних напрямках, а потім – периметром. Тампон кидають назад в колбу. Змив роблять 4 рази з різних місць, використовуючи 4 тампони. Вміст колби збовтують 5-10 хвилин для змиву мікроорганізмів з тампонів, після чого роблять посіви змивної води.

Для контролю якості миття і дезінфекції інвентаря проби для бактеріологічного аналізу відбирають у той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. З дрібного інвентаря мазки беруть стерильним тампоном зі всієї поверхні предмета.

Для **визначення МАФАНМ** 1 см³ змиву вносять в чашку Петрі під МПА і витримують в термостаті 24 години при 30°C. Чисельність МАФАНМ на поверхні досліджуваного устаткування (КУО/см²) визначають за формулою:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 10^n}{F \cdot g} \quad (1)$$

де a – кількість колоній в чашці Петрі, V – загальний об'єм змивної води (см³), 10^n – коефіцієнт розведення, F – площа змиву (см²), g – об'єм змивної води, який висівають у чашку Петрі (см³).

Рівень МАФАНМ на поверхні обладнання на деяких виробництвах не регламентується, але повинен бути мінімальним. Бактеріолог підприємства в результаті багаторазових досліджень виводить середні показники та визначає гранично допустиму кількість бактерій у даних умовах підприємства.

Для **виявлення кишкової палички** висівають 1 см³ змивної води у пробірку з середовищем Ейкмана (ГПС або ЛПС) з поплавком або у пробірку з

середовищем Кеслер з поплавком, або у середовище Кода. Посів витримують у термостаті 24 години при 30°C. При наявності ознак росту (помутніння середовища та газоутворення або пожовтіння середовища Кода) з проби, яка забродила, для ідентифікації кишкової палички роблять пересів на середовище Ендо і вивчають біохімічні і морфологічні ознаки культури.

Вимоги: кишкова паличка не повинна виявлятися у змиві зі 100 см² поверхні обладнання.

Мікробіологічний контроль рук персоналу. Цей контроль проводять не рідше 1 разу на місяць, тому що руки цехового персоналу безпосередньо контактують з харчовими продуктами. Контролюють МАФАНМ і наявність кишкової палички як показника фекального забруднення. У персоналу, що працює в кондитерських цехах хлібозаводів і у бісквітно-кремових цехах кондитерських підприємств, в змивах з рук контролюють наявність золотистого стафілокока.

Виконують змиви з шкіри рук послідовно трьома стерильними ватними або марлевими тампонами. Їх беруть профламованим пінцетом, змочують у колбі зі 100 см³ стерильної водопровідної води, протирають долоні, тильні боки рук, між пальцями, під нігтями і в складках шкіри.

Тампони повертають у колбу зі стерильною водою, збовтують 5-10 хв і 1 см³ змивної води висівають у чашку Петрі під МПА для визначення МАФАНМ. Чисельність бактерій у змивах з рук визначають за формулою:

$$X=a \cdot V, \quad (2)$$

де a – кількість колоній, що вирости на чашці Петрі, V - загальний об'єм змивної води у колбі (см³).

Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 100 см³ змиву:

відмінно	до 1000
добре	1000-5000
задовільно	5000-10000
погано	більше 10000

На руках кишкову паличку визначають також посівами змивної води спочатку в середовище Ейкмана або Кеслер, а при наявності ознак росту – на середовище Ендо. При масових обстеженнях рук робітників у цехах зручно використовувати пробірки з 10 см³ стерильної води з пробкою, крізь яку пропускається металевий дріт з тампоном на кінці.

При дослідженні тільки на наявність кишкової палички змив можна робити безпосередньо накопичувальним середовищем Кеслер (лише для рук), Ейкмана, Кода або іншим.

Наявність бактерій групи кишкових паличок в змивах з рук (і одягу) не дозволяється.

При масовому бактеріологічному контролі рук персоналу та технологічного обладнання використовують ряд прискорених методів для ідентифікації кишкової палички. Широке розповсюдження одержав метод використання індикаторного паперу для виявлення кишкової палички.

Індикаторний папір зберігають у поліхлорвінілових пакетах. Папір повинен мати білий або блідий кремовий колір. Смужку паперу виймають з пакета, тримаючи за перфорований кінець, і змочують у змиві з обладнання або рук на протязі 3 хвилин. Смужка вбирає $0,5 \text{ см}^3$ рідини. Потім цю смужку знов кладуть у поліхлорвініловий пакет, відділивши перфорований кінець. Пакет слід ретельно прогладити, щоб він щільно прилягав до змоченої смужки і все повітря було видалене з пакета. Розрізаний бік пакета запаюють на полум'ї спиртівки. Пакет з індикаторною смужкою кладуть в термостат при 43°C на 11-12 годин. Не можна тримати індикаторний папір у термостаті більше 12 годин. Наявність червоних плям (колоній *E. coli*) на обох боках індикаторного паперу свідчить про наявність кишкової палички та поганий санітарно-бактеріологічний стан об'єкта, який досліджується. Контроль хлорування рук проводять йодо-крохмальним розчином. На наявність хлорних речовин вказує синє забарвлення.

Дослідження тари. Банки жерстяні або скляні і жерстяні кришки контролюють після миття один раз на добу. Методи контролю – візуальний і бактеріологічний.

У досліджувану банку наливають певний об'єм стерильної водопровідної води (зазвичай 50 см^3), закривають кришкою і струшують 5 хвилин для змивання мікроорганізмів. Змивну воду об'ємом 1 см^3 вносять у чашку Петрі і заливають МПА для визначення загального числа МАФАНМ або СА для визначення плісневих грибів та дріжджів. Розраховують кількість мікроорганізмів, які містяться в загальному об'ємі змивної води за формулою (2).

Змиви з кришок роблять стерильним тампоном і поміщають його в колбу із стерильною водопровідною водою. Забруднення мікроорганізмами розраховують на всю поверхню однієї кришки.

На внутрішній поверхні банки не повинно бути більше 500 КУО.

Пергамент, фольгу, плівку для пакування, комбіновані матеріали для пакування харчових продуктів розгортають і з внутрішнього боку роблять змив стерильним ватним чи марлевым тампоном зі 100 см^2 поверхні. Визначають наявність плісневих грибів, БГКП і МАФАНМ, як на обладнанні.

Для контролю якості миття і дезінфекції такої тари, як бочки, бідони, лотки, цистерни, проби останньої змивної води висівають на відповідні поживні середовища. Чисельність МАФАНМ в 1 см^3 змивної води не повинна перевищувати показники водопровідної води більше ніж у 2-3 рази.

У разі виявлення стійкого підвищення загальної кількості мікроорганізмів у готовій продукції санепідслужба здійснює додатковий мікробіологічний контроль сировини, напівфабрикатів, допоміжних матеріалів та обладнання і тари, з'ясовує, чи відповідають вони чинній нормативно-технічній документації. На основі одержаних результатів роблять висновки: закрити харчовий об'єкт на генеральне прибирання, на санітарний день, здійснити реконструкцію чи провести капітальний ремонт, а персоналу – скласти іспит на знання санітарних вимог.

Контрольні питання:

1. Як роблять аналіз мікробіоти обладнання, за якими показниками?
2. Мікробіологічний контроль рук цехового персоналу.
3. Основні показники і рівень допустимого мікробного забруднення обладнання, тари, рук.

Лабораторна робота № 19-20

ДОСЛІДЖЕННЯ НОРМАЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ ТІЛА ЛЮДИНИ

Мета роботи. Ознайомитися з локалізацією та функцією нормальної мікробіоти людини.

Завдання.

1. Дослідити власну мікробіоту ротової порожнини, волосся та рук шляхом посіву на середовище МПА. Виготовити та розглянути під мікроскопом препарати з окремих колоній бактерій, що вирости. Охарактеризувати їх морфологію.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [2, 3, 4, 5].

Обладнання та матеріали. Чашки Петрі, МПА, пінцети, ножиці, мікроскопи, спиртівки, мікробіологічні петлі, набори для мікроскопування.

Сукупність мікроорганізмів, які пристосувалися до життя в організмі людини і тварин і за звичайних умов не викликають яких-небудь порушень фізіологічних функцій макроорганізму, називають його *нормальною мікробіотою*.

Нормальну мікробіоту людини і тварин поділяють на *облігатну* та *факультативну*. *Облігатна мікробіота* – це сапрофітні та умовно патогенні мікроорганізми, які пристосувалися до існування в організмі хазяїна. *Факультативна мікробіота* – це випадкові мікроорганізми, які потрапили з навколишнього середовища і живуть у макроорганізмі відповідно до стану його імунної системи.

Локалізується нормальна мікробіота у ротовій порожнині (здебільшого – зубний наліт, ясневі кишені), шлунково-кишковому тракті (тонкий та товстий кишечник), верхніх дихальних шляхах, на шкірі та у/на статевих органах, у кон'юнктивах очей і зовнішньому вусі.

Проведення роботи

Стерильний МПА розлити у чашки Петрі. Після того, як поживне середовище застигне, чашку з боку дна розділити маркером або склаграфом на чотири частини. На поверхню однієї частини асептично покласти кілька волосин, на другу штрихом висіяти наліт з зубів, взятий заздалегідь простерилізованим сірником. На третьому та четвертому секторах зробити відповідно відбиток будь-якого пальця немитої руки та добре вимитої (з милом та щіткою) і висушеної на повітрі (але не під сушаркою) руки.

Чашки підписати і поставити у термостат для культивування при

температурі 30°C на 24-48 годин.

Візуально оцінити розвиток мікроорганізмів у різних частинах чашки, порівняти кількість колоній, які виростили у третьому та четвертому секторах. Приготувати препарати-мазки з колоній, які переважають кількісно або викликали певні підозри, забарвити їх за Грамом, розглянути імерсійною системою мікроскопа та описати морфологію.

Зробити висновки та оформити протокол.

Контрольні питання:

1. Яка мікробіота макроорганізму є нормальною?
2. Як впливає неконтрольоване вживання антибіотиків на нормальну мікробіоту людини?

Лабораторна робота № 21-22
ВПЛИВ УМОВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ НА
ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ГНИЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ

Мета роботи. Визначити вплив умов шлунка (рН 3,5) та кишечника (рН 7,2-7,4) на здатність виживання гнильної мікробіоти.

Завдання.

1. Через посіви на середовище МПА дослідити, як на життєздатність гнильних бактерій впливає кисле та лужне середовища, що відповідають умовам шлунка та кишечника людини, а також сумісне культивування з молочнокислими бактеріями (МКБ), які є представниками нормальної мікробіоти кишечника людини. Виготовити та розглянути під мікроскопом препарати з окремих колоній бактерій, що виростили. Охарактеризувати їх морфологію.

2. Додатково ознайомитися з літературними джерелами [1, 2, 3, 5].

Обладнання та матеріали. Чашки Петрі, МПА, суспензія гнильних бактерій, пробірки з 9 см³ стерильної водопровідної води, пробірки з 1 см³ кислого розчину (рН 3,5), пробірки з 1 см³ лужного розчину (рН 7,2-7,4), пробірки з 1 см³ суспензії молочнокислих бактерій, піпетки, мікроскопи, спиртівки, мікробіологічні петлі, набори для мікроскопування.

Проведення роботи

У день виконання дослідження необхідно приготувати суспензію гнильних бактерій у стерильній водопровідній воді, таку, щоб у великому квадраті камери Горяєва було не більше 10 клітин мікроорганізмів. Підготувати розчини соляної кислоти, луку та молочнокислих бактерій.

Посів вихідної суспензії гнильних бактерій (перший стіл). У стерильну чашку Петрі вносять 1 см³ суспензії. У випадку, коли суспензія гнильних бактерій містить надлишок клітин мікроорганізмів, необхідно зробити десятикратне розведення. У цьому випадку на столі має бути пробірка з 9 см³ стерильної водопровідної води, дві чашки Петрі та дві піпетки.

Суспензію передають на другий стіл.

Визначення впливу кислого розчину (другий стіл). В пробірку з 1 см³ кислого розчину (рН 3,5) вносять 1 см³ вихідної суспензії. Перемішують суміш піпеткою, після чого цією ж піпеткою вносять 1 см³ суміші у чашку Петрі.

Слід пам'ятати, що при цьому у чашці Петрі буде лише 0,5 см³ вихідної суспензії.

Вихідну суспензію передають на третій стіл.

Визначення впливу лужного розчину (третій стіл). В пробірку з 1 см³ лужного розчину (рН 7,2-7,4) вносять 1 см³ вихідної суспензії. Перемішують суміш піпеткою, після чого цією ж піпеткою вносять 1 см³ суміші у чашку Петрі (при цьому у чашці Петрі буде лише 0,5 см³ вихідної суспензії).

Вихідну суспензію передають на четвертий стіл.

Визначення впливу сумісного культивування з молочнокислими бактеріями (четвертий стіл). У пробірку з 1 см³ суспензії молочнокислих бактерій вносять 1 см³ вихідної суспензії. Перемішують суміш піпеткою, після чого цією ж піпеткою вносять 1 см³ суміші в чашку Петрі (при цьому у чашці Петрі буде лише 0,5 см³ вихідної суспензії).

Вихідну суспензію гнильних бактерій, її суміш з кислим та лужним середовищами та з молочнокислими бактеріями залишають на столах у чашках Петрі протягом 20-40 хв для взаємодії мікроорганізмів між собою та з розчинами. Після цього у чашки Петрі заливають поживне середовище МПА та культивують мікроорганізми у термостаті при 37°C на протязі 24 годин.

Результати дослідження впливу умов шлунково-кишкового тракту на життєздатність гнильної мікробіоти

Об'єкт дослідження	Кількість вихідної суспензії у чашці, см ³	Число КУО	
		у чашці Петрі	в 1 см ³ вихідної суспензії
Вихідна суспензія	1		
Кисла суміш			
Лужна суміш	0,5		
Суміш з МКБ			

Роблять висновок про вплив умов шлунково-кишкового тракту людини на гнильну мікробіоту.

Контрольні питання:

1. Які мікроорганізми відносяться до гнильних?
2. Як впливають умови шлунково-кишкового тракту людини на життєздатність гнильної мікробіоти?

Лабораторна робота № 23

СУЧАСНІ МЕТОДИ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ СИРОВИНИ ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Мета роботи. Ознайомитися із сучасними методами мікробіологічних досліджень в харчовій промисловості.

Завдання.

Засвоїти, на чому основані сучасні методи мікробіологічних досліджень, чим вони відрізняються від класичних методів, які з них найбільш поширені, якими з них користуються на харчових підприємствах України.

Обладнання та матеріали. Мікробіологічний експрес-аналізатор VasTrac 4300, демонстраційні матеріали.

Головні питання, на які потрібно відповісти при проведенні мікробіологічного контролю, можуть бути сформульовані таким чином:

1. Чи є в досліджуваному зразку живі мікроорганізми (скринінговий аналіз)?

2. Якщо встановлено наявність живих мікроорганізмів у об'єкті, то яка їх кількість та які саме ці мікроорганізми (підтверджуючі ідентифікаційні аналізи)?

У наш час, коли гостро стоїть питання забезпечення стійкої якості та безпечності харчових продуктів, використання харчовими підприємствами традиційних методів мікробіологічного контролю стає недостатньо ефективним. Традиційні класичні методи мікробіологічного контролю, як правило, трудомісткі, тривалі і неуніверсальні. Вони можуть бути реалізовані тільки за наявності на підприємстві якісної лабораторної бази та професійних кадрів. Для швидкого одержання достовірних результатів постійно йде удосконалення поживних середовищ, приладів, методів аналізу.

Методи мікробіологічної оцінки чистоти та безпеки харчових продуктів розподіляються на *якісні* та *кількісні*.

У наш час нормування мікробіологічних показників безпеки харчових продуктів проводять за альтернативним принципом двокласової системи.

По-перше, безпечність та якість харчових продуктів за мікробіологічними показниками оцінюють за відсутністю у певних об'ємах продукту санітарно-показових мікроорганізмів: бактерій групи кишкових паличок, потенційно патогенних (*E. coli*, коагулазопозитивних стафілококів, сульфітредукуючих клостридій, бактерій роду *Proteus*, *Bacillus cereus*) та патогенних мікроорганізмів. Тобто нормується маса продукту, в якій не допускається присутність санітарно-показових, умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Наприклад, у багатьох харчових продуктах широкого вжитку сальмонели не повинні виявлятися у 25 г, у продуктах дитячого харчування – у 50 г. Такі аналізи є *якісними*.

По-друге, для мікроорганізмів псування, закваскової та пробіотичної мікробіоти норматив регулює кількість колонієутворюючих одиниць в 1 г (см³)

продукту. Наприклад, в 1 г м'якого морозива кількість МАФАНМ не має перевищувати $1 \cdot 10^5$ КУО, ліверної ковбаси – $2 \cdot 10^3$ КУО. Такі аналізи відносяться до *кількісних*.

Сучасні нові кількісні методи визначення чисельності мікроорганізмів у харчових продуктах засновані на реєстрації люмінесценції, електричних явищ або на мікроскопії.

Для визначення чисельності мікроорганізмів шляхом вимірювання їх люмінесценції існують спеціальні мікроскопи, в яких ініціюється люмінесценція мікроорганізмів за допомогою УФ- та короткохвильових променів видимої частини спектру. Спричинити люмінесценцію бактерій можна обробкою спеціальними барвниками.

Люмінесценція біологічних об'єктів найчастіше буває спричинена наявністю АТФ. Методи, засновані на *АТФ-люмінесценції*, дозволяють відрізнити живі клітини від мертвих, полегшують і прискорюють прижиттєвий кількісний облік мікробіоти.

Але АТФ – це основне джерело енергії для біохімічних реакцій у всіх живих клітинах, і тому у кожному харчовому продукті він міститься у великій кількості. Це є недоліком кількісного обліку бактерій у продуктах, тому що потребує відділення мікробного АТФ від фонового.

Поряд з цим принцип реєстрації люмінесценції АТФ та його похідних використовується для визначення рівня контамінації технологічного обладнання та робочих поверхонь на харчових виробництвах. Візуальний контроль тут недостатній, а мікробіологічний потребує багато часу. Чистоту поверхонь легко перевірити за допомогою нескладних портативних приладів, які реєструють люмінесценцію як мікроорганізмів, так і часток продуктів на устаткуванні. Це дає змогу вжити негайних заходів (якщо треба) ще до запуску технологічної лінії і попередити появу браку.

Як ще один приклад експрес-методів з використанням люмінесценції можна назвати люмінесцентно-серологічну ідентифікацію бактерій роду *Listeria* за допомогою полівірулентної лістеріозної аглютинуючої сироватки. Визначення роду *Listeria* – збудника гострого інфекційного захворювання, яке передається з м'ясом та яйцями птахів та молочними продуктами, – проводять у спеціальних препаратах на люмінесцентному мікроскопі.

Новим напрямом у цій галузі є виявлення санітарно-показових мікроорганізмів, яке базується на наявності в них *специфічних ферментів*. Наприклад, облік ентеробактерій можна вести завдяки наявності у них ферментів β -Д-глюкуронідази та β -Д-галактозидази, які розщеплюють певні субстрати з утворенням продуктів, що забарвлюють *E. coli* в один колір, а коліформні бактерії – в інший. Інші грамнегативні бактерії забарвлюються в третій колір або не забарвлюються зовсім. Таким чином, на одній чашці Петрі через 18-24 години можна підрахувати окремо різних представників групи *Enterobacteriaceae*.

Вдосконаленням цього методу є контроль таких посівів в УФ-променях (366 нм). Оригінальність методу полягає в тому, що, за винятком декількох

штамів *Salmonella* та *Shigella*, кишкова паличка є єдиним видом сімейства *Enterobacteriaceae*, який має фермент β -Д-глюкуронідазу. Цей фермент гідролізує субстрат МУГ (4-метилумбеліферіл- β -Д-глюкуронід) з утворенням 4-метилумбеліферона, який має яскраву блакитну флуоресценцію при $\lambda = 366$ нм. Присутність у посіві колоній з такою флуоресценцією – доказ наявності *E. coli*.

Субстрат МУГ можна додавати до різних стандартних поживних середовищ. Цей принцип покладено в основу створення поживних середовищ багатьма фірмами зарубіжжя, наприклад, низки середовищ Fluorocult (фірма Merck, Німеччина), середовища Violet Red Bile Agar w/MUG (фірма Difco), тестових наборів Colilert R-18, QuantiDisk та SimPlate (США) та ін.

В Україні з таких продуктів Міністерством охорони здоров'я рекомендовано системи Colilert R-18, QuantiDisk та SimPlate. Вони призначені для застосування в установах державної санітарно-епідемічної служби та в організаціях, які здійснюють виробничий контроль питної води. Ці методи дозволяють виявити присутність загальних БГКП за реакцією β -Д-галактозидази, яку вони мають з патентованим субстратом ONPG. Наявність цих бактерій підтверджується пожовтінням культурального середовища. А присутність типової *E. coli* підтверджується яскраво-блакитною флуоресценцією культурального середовища завдяки утворенню метилумбеліферона, який вивільняється при взаємодії індикатора Colilert R-18 MUG з ферментом β -Д-глюкуронідазою, який, як вже говорилося, має лише кишкова паличка.

Ці методи мають велику перевагу перед класичними тим, що стандартизують процеси санітарно-бактеріологічного аналізу води, прискорюють одержання чітких і точних результатів, знижують собівартість аналізів.

Настанови щодо використання таких наборів містяться в методичних рекомендаціях: МР 10.10.2.1-137-2007 «Застосування тестових наборів Colilert R-18 для санітарно-бактеріологічного контролю якості води» (затверджено наказом МОЗ №24 від 24.01.2007), МР 10.10.21-155-2008 «Визначення найбільш імовірного числа мікроорганізмів у воді з використанням тестів діагностичних QuantiDisk та SimPlate» (затверджено наказом МОЗ №138 від 14.03.2008).

Методи, які засновані на вимірюванні змін сили струму та опору середовища при розмноженні мікроорганізмів, використовуються для санітарно-бактеріологічного дослідження будь-яких об'єктів навколишнього середовища.

При цьому враховується той факт, що мікроорганізми у процесі метаболізму у будь-якому середовищі змінюють його електропровідність. Середовища, які використовуються для цього, називають *імпедансними*. Вони можуть бути і загального вжитку, і селективними, тобто використовуються для всіх мікроорганізмів або тільки для конкретних родів бактерій, дріжджів, плісневих грибів і т. д.

На цьому методі основана робота мікробіологічного аналізатора VacTrac

4300, який використовують для прискореного кількісного визначення мікроорганізмів у відповідності до вимог чинної нормативно-технічної документації.

Імпеданс – це загальний опір середовища-провідника. Зміни імпеданса поживного середовища зазвичай відбуваються під час росту та метаболічної активності мікроорганізмів. Експоненційні зміни імпедансу можуть спостерігатися, коли кількість мікроорганізмів досягає порогу біля 10^6 – 10^7 клітин/см³. Час, необхідний для досягнення значущої зміни імпеданса, називається часом визначення імпеданса. Значення цього показника зворотно пропорційне концентрації мікроорганізмів у матеріалі, який досліджується: чим вищий ступінь забруднення зразка мікроорганізмами, тим менший час визначення імпедансу. Хід кривої змін імпедансу відображає динаміку росту мікроорганізмів у зразку (рис.).

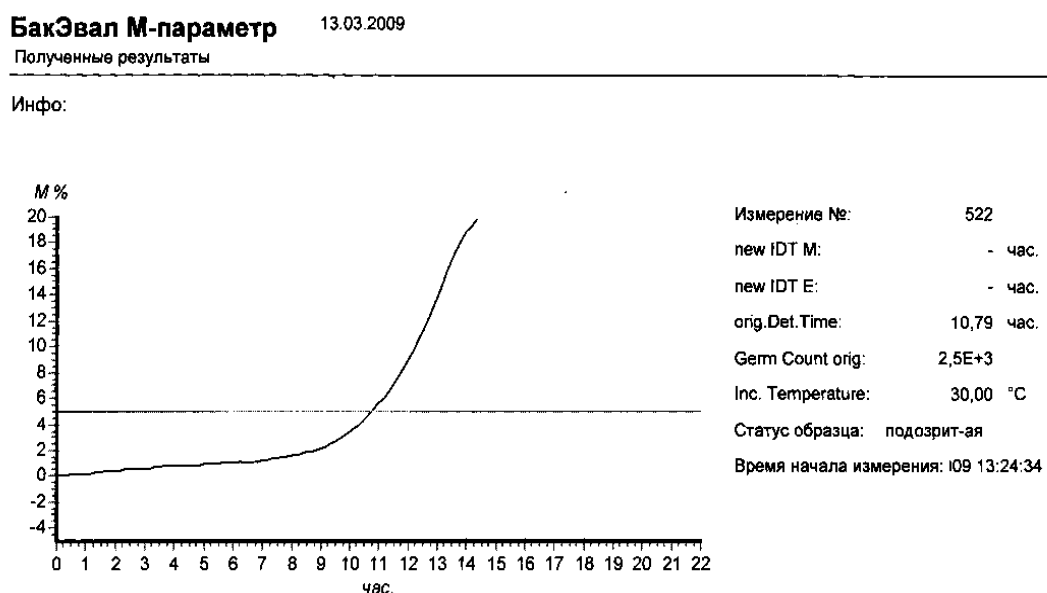


Рис. 44 – Крива змін імпедансу, побудована BacTrac 4300 за 15 годин при 30°C

Незважаючи на те, що імпедансний аналіз заснований на процесі росту культур мікроорганізмів, він суттєво відрізняється від стандартних методів визначення чисельності мікроорганізмів методом посіву в чашки. Оскільки у стандартному методі немає можливості об'єктивно оцінити, скільки окремих клітин мікроорганізмів утворило колонію на поверхні середовища, результат завжди виражають в колонієутворюючих одиницях (КУО). Таким чином, результат чашкового методу являє собою деяку стандартизовану величину, яка характеризує ступінь мікробного забруднення зразка, а не абсолютне число здатних до розмноження мікроорганізмів. Суттєвими особливостями класичного методу є необхідність проведення серійних десятикратних розведень мікроорганізмів у матеріалі, що досліджується, до ступеня, при якому вони можуть бути достовірно підраховані з використанням агаризованих поживних середовищ. Тривалість класичного методу з періодом інкубації до

підрахунку колоній – 24–72 години.

Імпедансний аналіз є динамічним процесом і відображає метаболічну активність мікроорганізмів у часі. Тому не має значення, чи присутні мікроорганізми у вигляді окремих клітин, чи цілими групами, оскільки їх сумарна метаболічна активність складається з активності окремих клітин, які змінюють іонний склад поживних середовищ. Це дає можливість визначати рівень мікробного забруднення зразка без проведення серійних десятикратних розведень, що значно скорочує час пробопідготовки.

Таким чином, даний метод не тільки дає можливість визначати кількість мікроорганізмів в зразку, а й дозволяє також визначати рівень їх активності, який в решті решт є вирішальним в процесі псування сировини і готової продукції.

Загальний час дослідження зразка імпедансним методом не перевищує 24 години. Але у більшості випадків результати бувають вже через кілька годин. Чим більше у зразку мікроорганізмів, тим швидше буде отримано результат дослідження.

Процес дослідження автоматизований, зменшено витрати робочого часу та матеріалів, одночасно можуть аналізуватися 64 зразки, документування проводиться в автоматичному режимі, але аналізатор потребує попередньої калібровки.

Контрольні питання:

1. На які дві групи поділяють методи мікробіологічного контролю якості та безпеки харчових продуктів?

2. На чому засновані сучасні кількісні методи визначення чисельності мікроорганізмів у харчових продуктах?

3. Які системи рекомендовано Міністерством охорони здоров'я України для санітарно-бактеріологічного контролю якості води?

4. В чому полягає принцип дії імпедансного методу визначення мікробіологічних показників, які у нього переваги перед класичними методами?

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Капрельянц Л. В. Технічна мікробіологія [вид. 2–е, доп. і перероб.] [Текст] / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова, Я. Б. Пауліна, О. М. Кананихіна, Т. О. Величко, Л. В. Труфкаті, О. О. Килименчук, Т. В. Шпирко // Підручник. – Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. – 432 с.
2. Технічна мікробіологія. Лабораторний практикум: Навчальний посібник / Л.В.Капрельянц, Л.М.Пилипенко, А.В.Єгорова, О.М.Кананихіна, Т.О.Величко, О.О.Килименчук, Т.В.Шпирко, Л.В.Труфкаті; За редакцією Л.В.Капрельянца. – Одеса: Сімекс-прінт, 2012. – 144с.
3. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
4. Мудрецова-Висс К. А., Кудряшова А.А., Дедюхіна В.П. Микробиология, санитария и гигиена. – М.: Изд. дом «Делова литература», 2001. – 388 с.
5. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.
6. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология.– М.: Агропромиздат, 1987. – 368 с.
7. Емцев В.Т., Шильникова В.К. Микробиология. – М.: Агропромиздат, 1990. – 191 с.

ЗМІСТ

Техніка безпеки	5
Правила роботи в мікробіологічній лабораторії	6
Лабораторна робота № 1. Будова мікроскопа та правила роботи з ним	8
Лабораторна робота № 2. Морфологія бактерій	14
Лабораторна робота № 3. Приготування препаратів. Прості методи забарвлення мікроорганізмів	18
Лабораторна робота № 4. Будова бактеріальної клітини. Складні методи забарвлення мікроорганізмів	22
Лабораторна робота № 5. Морфологія і фізіологія мікроміцетів. Міцеліальні гриби	27
Лабораторна робота № 6. Неміцеліальні гриби. Дріжджі	31
Лабораторна робота № 7. Поживні середовища. Методи стерилізації	37
Лабораторна робота № 8-9. Мікробіологічні методи дослідження повітря	44
Лабораторна робота № 10-12. Виділення чистих культур мікроорганізмів та методи їх культивування	51
Лабораторна робота № 13-14. Вивчення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків. Визначення спектру антимікробної дії антибіотиків	56
Лабораторна робота № 15-16. Мікрофлора і методи санітарно-бактеріологічного контролю води	58
Самостійна робота. Бактеріологічний аналіз ґрунту	63
Лабораторна робота № 17-18. Санітарно-бактеріологічний контроль обладнання, тари та рук цехового персоналу	68
Лабораторна робота № 19-20. Дослідження нормальної мікрофлори тіла людини	72
Лабораторна робота № 21-22. Вплив умов шлунково-кишкового тракту на життєздатність гнильної мікрофлори	73
Лабораторна робота № 23. Сучасні методи мікробіологічних досліджень сировини та харчових продуктів	75
Список літератури	79