

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський Політехнічний Інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних робіт з курсу
«Промислова мікробіологія та санітарія»

для студентів спеціальності
226 «Фармація, промислова фармація»

Харків
2021

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський політехнічний інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних робіт з курсу
«Промислова мікробіологія та санітарія»

для студентів спеціальності
226 «Фармація, промислова фармація»

Затверджено
вченою радою
навчально-наукового інституту
хімічних технологій та інженерії
НТУ «ХПІ»,
протокол № 3 від 30.11.2021

Харків
НТУ «ХПІ»
2021

Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Промислова мікробіологія та санітарія» для студентів спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація» / Укладачі: Т.О. Овсяннікова, Є.О. Посохов – Харків: НТУ «ХП», 2021. – 72 с.

Укладачі: Т. О. Овсяннікова
Є.О. Посохов

Рецензент Доцент кафедри
біотехнології, біофізики та аналітичної хімії
кандидат технічних наук
Варанкіна О.О.

Кафедра органічного синтезу та нанотехнологій

ВСТУП

Методичні вказівки призначені для виконання лабораторних робіт з дисципліни курсу «Промислова мікробіологія та санітарія» і допоможуть оволодіти основними навичками проведення мікробіологічних досліджень у практичній діяльності.

У методичних вказівках описано обладнання мікробіологічної лабораторії, обладнання мікроскопа та правила роботи з ним, види мікроскопії, наведені методи відбору та підготування проб для мікробіологічного аналізу, методи аналізу зразків, довідкова інформація.

Лабораторні роботи включають мету, загальні положення, порядок виконання роботи та питання для самоперевірки.

Промислова мікробіологія – це наука про найважливіші мікробіологічні процеси і їх практичне застосування для одержання промисловим способом коштовних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, їх біомаси, як найважливішого білкового продукту, про одержання окремих речовин (препаратів), які використовуються у різних галузях промисловості та медицині.

Мікроорганізми, завдяки широкому набору різноманітних ферментних систем, здатні утворювати в процесі життєдіяльності різні продукти обміну, а також модифікувати природні або хімічно синтезовані сполуки та речовини.

До процесів, які здійснюють мікроорганізми, та відносяться до промислової мікробіології, належать ряд виробництв: хлібопечення, виноробство, пивоварство, одержання оцту, кисломолочних продуктів, антибіотиків, амінокислот, ферментів, вітамінів, гормонів і інших біологічно активних речовин.

До проблем промислової мікробіології відносяться питання захисту високоактивних продуцентів продуктів метаболізму мікроорганізмів від сторонньої мікрофлори. Дану проблему вирішує санітарна мікробіологія.

Санітарна мікробіологія – медико-біологічна наука, що досліджує закономірності існування потенційно небезпечних для людини мікроорганізмів у навколишньому середовищі, а також процеси, які ними й обумовлені, та можуть безпосередньо або побічно впливати на промислові мікробіологічні процеси та здоров'я людей.

Санітарна мікробіологія відноситься до групи профілактичних наук і перебуває на стику мікробіології, гігієни та епідеміології.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Виконуючи мікробіологічні дослідження, необхідно дотримуватися наступних правил:

1. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі, класти на столи сумки, пакети та інші особисті речі;
2. У лабораторії дозволяється працювати тільки в халатах;
3. На кожному занятті призначаються чергові, які стежать за порядком і за виконанням кожним студентом правил роботи та поведінки в лабораторії;
4. За кожною групою студентів (3 людини) закріплюється постійне робоче місце, яке повинне втримуватися в порядку на протязі всього заняття;
5. У лабораторії категорично забороняється споживати їжу;
6. Не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів);
7. Перед роботою ретельно перевіряти цілість скляного посуду, прохідність голок і надійність поршнів шприців;
8. З мікробіологічним матеріалом працювати тільки за допомогою інструментів (пінцети, петлі, корнцанги та ін.);
9. Забороняється доторкатися руками до досліджуваного матеріалу та конденсату в засіяних чашках;
10. При посіві матеріалу необхідно робити напис на пробірках, чашках Петри, колбах, флаконах з назвою номера аналізу (культури) і дати посіву;
11. У пробірки й чашки Петрі матеріал висівати поблизу від вогню пальника з прожарюванням бактеріологічної петлі, шпателя, країв пробірки в ході роботи над полум'ям для знезараження; предметні стекла та піпетки після роботи містяться в каструльку з дезінфікуючим розчином;
12. Під час роботи всі чашки з посівами поміщати в кювети або на підношення, пробірки – у штативи;
13. Розчини, що містять мікроорганізми, набирати піпеткою за допомогою гумового балона; не можна засмоктувати ротом або переливати розчини з посудини в посудину через край;
14. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторії;
15. По закінченню роботи робоче місце необхідно упорядкувати, а лотки ретельно помити з порошком або пемоксоллю до безбарвної змивної води.

У лабораторії повинна бути укомплектована аптечка для екстреної профілактики та надання медичної допомоги. В аптечці необхідно мати: етиловий спирт, настойку йоду, сухий марганцовокислий калій, перев'язні засоби, сухі навішення протарголу та азотнокислого срібла, а також необхідний набір антибіотиків.

ОБЛАДНАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Сучасна мікробіологічна лабораторія являє собою комплекс приміщень, устаткування та приладів, що дозволяють використовувати різні прийоми для вирощування мікроорганізмів, виділення їх чистих культур, вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей.

1 Приміщення лабораторії і необхідне встаткування

Лабораторія включає кімнати для проведення досліджень і підсобні приміщення.

Під *робочі кімнати* відводять світлі просторі приміщення, стіни яких на висоту до 170 см від підлоги офарблюють у світлі тони олійною фарбою або викладають кахельною плиткою, а підлогу покривають лінолеумом. Такого роду обробка дозволяє проводити вологе збирання із застосуванням розчинів дезінфікуючих речовин. Кімнати лабораторії повинні добре провітрюватися. У число робочих кімнат входять: бокс (для посіву мікроорганізмів), термостатна, кімната для проведення мікроскопічних і біохімічних досліджень. Бокс – спеціальне ізольоване приміщення, розділене на дві частини: робоче приміщення та передбоксік, що виключає різку циркуляцію повітря й занесення мікроорганізмів ззовні. У боксі встановлюють стіл, стільці, на стіни підвішують бактерицидні лампи на висоті 2 м від підлоги. Перед роботою приміщення боксу миють і дезінфікують, а після вологого збирання протягом 30-60 хв проводять стерилізацію повітря бактерицидними лампами. У термостатній установлюються термостати, які призначені для вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах за умов постійної температури. У лабораторії встановлюють кілька термостатів з різною температурою, сприятливою для розвитку окремих груп мікроорганізмів.

Велике значення для успішної роботи має правильна організація *робочого місця мікробіолога*. Лабораторний стіл повинен бути добре освітленим сонячним або штучним світлом. За кожною групою студентів закріплюється постійне робоче місце. Залежно від теми заняття робоче місце оснащується необхідними матеріалами та устаткуванням: спиртівкою; штативом під пробірки; бактеріологічною петлею або препарувальною голкою; набором фарб і реактивів для фарбування препаратів; мікроскопом; лотком з рейками для розміщення предметних стекол при фарбуванні препаратів; промивалкою або колбою з водою та трубкою (для промивання пофарбованих препаратів); предметними й покривними стеклами; флаконом з імерсійним маслом; фільтрувальним папером; олівцем або маркером по склу і т.д.

До *підсобних приміщень* відносяться: автоклавна або стерилізаційна, мийна, приміщення для варки живильних середовищ, приміщення для зберігання посуду та живильних середовищ. У стерилізаційній установлюється паровий стерилізатор, у якому парю під тиском

відбувається стерилізація живильних середовищ і лабораторного посуду. У стерилізаційній звичайно встановлюють також сушильна шафа з терморегулятором температури від 40 до 200° С (для сушіння й стерилізації лабораторного посуду).

2 Посуд для проведення мікробіологічних досліджень

Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд. *Чашки Петрі* (діаметр 10 см, висота 1,5 см) застосовують для виділення чистих культур, кількісного обліку мікроорганізмів, аналізу якісної сполуки мікрофлори на щільних живильних і середовищах інших досліджень; *скляні поплави* – для вивчення процесів бродіння; *пробірки біологічні* – для зберігання чистих культур і проведення мікробіологічних досліджень; *пастеровські піпетки* з відтягнутим капіляром. Крім спеціального посуду широко використовують звичайний *хімічний посуд*: колби плоскодонні конічні Ейлермейера, круглодонні, мірні, піпетки, градуйовані на 1 мл, піпетки Мору, мензурки, мірні циліндри, бюкси, склянки і т.д.

Колби та пробірки, які використовуються для готування та стерилізації живильних середовищ і вирощування мікроорганізмів, закривають ватно-марлевими пробками, які виготовляють вручну або за допомогою спеціальної машини. Правильно виготовлена пробка для пробірок повинна: мати довжину 3-4 см, помірковано туго входити в пробірку, бути щільною і не міняти своєї форми при багаторазовому застосуванні.

3 Інвентар

У мікробіологічній практиці застосовують петлі, голки, пінцети, ножиці, пластмасові й металеві штативи для пробірок, металеві лотки та ін.

Петлі та голки виготовляють із платинового, нікелевого або хромонікелевого дроту та закріплюють у металевому петлеутримувачі.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1

ОБЛАДНАННЯ МІКРОСКОПА ТА ПРАВИЛА РОБОТИ З НИМ. ВИДИ МІКРОСКОПІЇ

Ціль роботи: Вивчити обладнання світлового біологічного мікроскопа та освоїти правила роботи з ним. Ознайомитися з різними видами мікроскопії. Придбати навички по готуванню фіксованих препаратів бактерій і освоїти техніку фарбування препаратів бактерій простими методами.

1.1 Обладнання мікроскопа та правила роботи з ним

Мікроскоп (від греч. *micro* – малий і *scopio* – дивлюся) – це оптичний прилад, що складається із трьох основних частин: механічної, оптичної та освітлювальної.

Механічна частина або штатив складається з ніжки, підстави, тубусоутримувача, предметного столика, монокулярної насадки (тубуса), револьверного обладнання, рукоятки грубого фокусування (макрометричного гвинта), рукоятки тонкого фокусування (мікрометричного гвинта).

Тубус – зорова труба мікроскопа. У верхній отвір тубуса вільно вставляється окуляр, на нижньому кінці тубуса перебуває обертове навколо своєї осі револьверне обладнання (револьвер), у яке вгвинчуються об'єктиви. Обертаючи револьвер, можна швидко перемінити об'єктиви під час роботи з мікроскопом, підводячи будь-який об'єктив під тубус. Об'єктив повинен бути центрований, тобто встановлений на оптичну вісь мікроскопа. Для цього револьвер повертають навколо своєї осі до появи клацання.

Предметний столик служить для розміщення на ньому досліджуваного препарату. Препарат закріплюють на столику затисками (клемами). У центрі предметного столика перебуває отвір для проходження променів світла та висвітлення препарату. У деяких конструкціях мікроскопа предметний столик може пересуватися за допомогою гвинтів, розташованих по периферії предметного столика. Це дає можливість розглянути препарат у різних полях зору.

Схема світлового біологічного мікроскопа представлена на рис. 1.

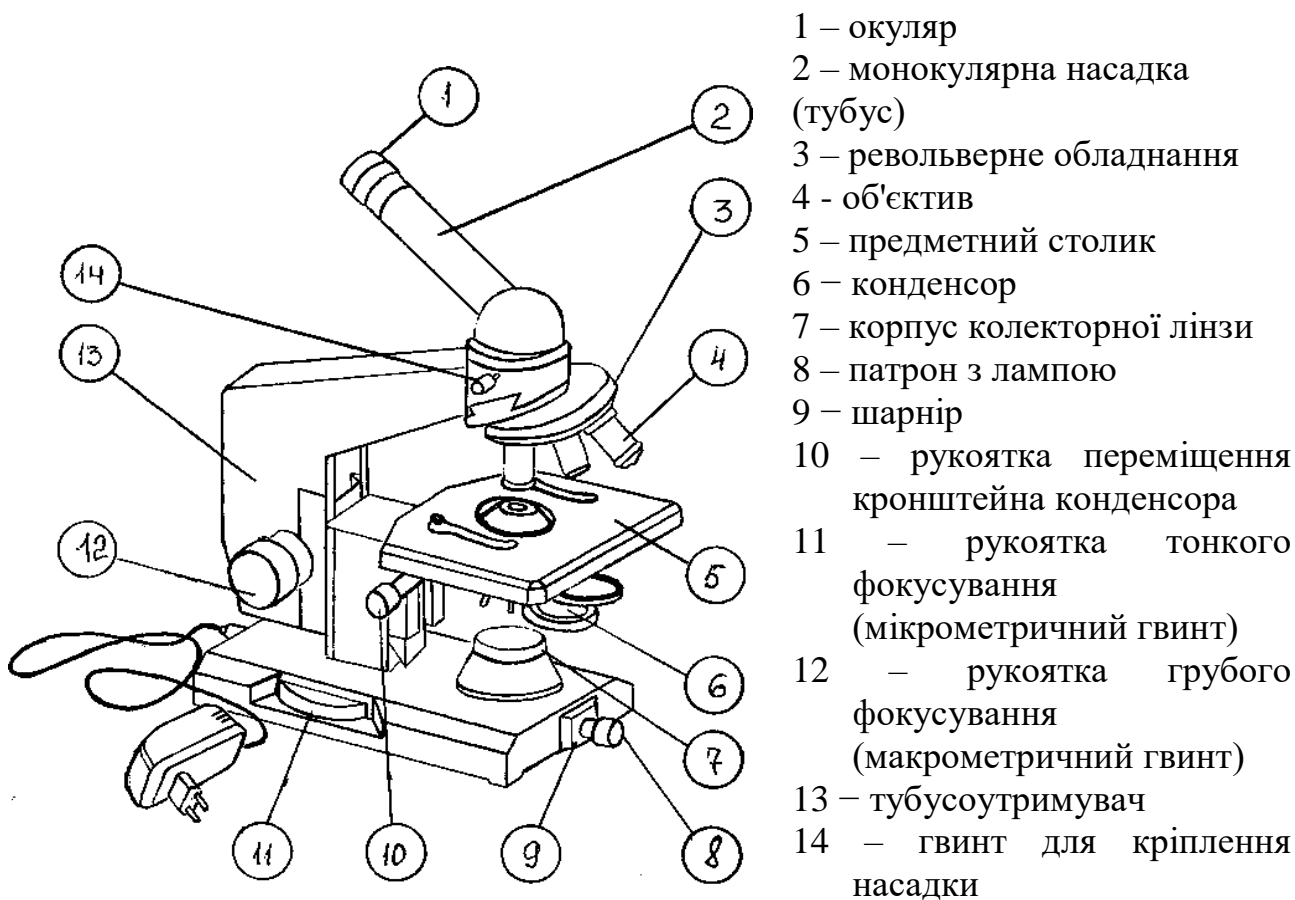


Рис. 1 Схема обладнання світлового біологічного мікроскопа

Рукоятки грубого та тонкого фокусування (макро- і мікрогвинти) служать для переміщення тубуса нагору та вниз, що дозволяє встановити його на необхідній відстані від препарату. При обертанні гвинтів за годинниковою стрілкою тубус опускається, а при обертанні проти годинникової стрілки – піднімається. При обертанні макрометричного гвинта об'єктив орієнтовно встановлюється на фокус, тобто на ту відстань від препарату, при якому він робиться видимим. Обороти макрогвинта дозволяють перемістити тубус на 20 мм. Мікрометричний гвинт служить для точної установки на фокус. Повний оборот його переміщує тубус на 0,1 мм. З мікрогвинтом слід працювати дуже обережно: припустиме обертання мікрогвинта не більше ніж на 180 °С у ту або іншу сторону.

Оптична частина є найціннішою частиною мікроскопа. Вона складається з об'єктивів і окуляра.

Окуляр (від лат. *oculus* – око) полягає із двох пласковипуклих лінз, укладених у загальну металеву оправу. Верхня лінза – очна (та, що збільшує), нижня – та, що збирає. Відстань між лінзами дорівнює напівсумі їх фокусної відстані. В окулярів з великим збільшенням фокус коротше, тому менше й довжина окуляра. Між лінзами є діафрагма, що обмежує поле зору та затримує крайові промені світла. Вітчизняні мікроскопи обладнані трьома змінними окулярами, збільшення яких зазначено на корпусі окуляра (x7; x10; x15).

Об'єктиви вгвинчуються в гнізда револьверного обладнання та складаються із системи лінз, які укладені у металеву оправу. Передня (фронтальна) лінза об'єктива є самою маленькою і єдиною, що дає збільшення. Інші лінзи в об'єктиві тільки виправляють недоліки отриманого зображення (явища сферичної і хроматичної аберації) і називаються корекційними.

У гнізда револьверного обладнання вгвинчуються чотири об'єктиви, збільшення яких зазначено на корпусі об'єктива (x8; x20; x40; x90 або 100). Кожний об'єктив характеризується своєю фокусною відстанню (відстанню між предметним склом і фронтальною лінзою): об'єктив x8 має фокусну відстань близько 9 мм, об'єктив x40 – 0,65 мм, об'єктив x90 – 0,15 мм.

Об'єктиви підрозділяються на *сухі* та *імерсійні*.

При роботі із *сухими об'єктивами* (x8, x20, x40) між фронтальною лінзою та препаратом перебуває повітря. У цьому випадку промені світла проходять середовища з різними показниками переломлення (покривне скло, повітря), частина їх відхиляється та не попадає в об'єктив.

При роботі з *імерсійними об'єктивами* (x90 або x100) для усунення світлорозсіювання відстань між фронтальною лінзою об'єктива та препаратом заповнюють імерсійним (кедровим) маслом, показник переломлення променів світла якого близький до показника переломлення променів світла, що проходить через скло.

Загальне збільшення мікроскопа визначається як множення збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Наприклад, якщо в роботі використовують

окуляр $\times 15$, а під тубусом перебуває об'єктив $\times 90$, то збільшення розглянутого за допомогою мікроскопа об'єкта складе $\times 1350$.

Освітлювальна частина мікроскопа складається із двохлінзового конденсора, ірис (IRIS) - діафрагми та патрона з низьковольтною лампочкою накалювання, що живиться через понижувальний трансформатор від мережі напруги 120-220 В.

Конденсор служить для кращого освітлення препарату. Він збирає світлові промені в пучок і направляє їх через отвір предметного столика на препарат. За допомогою рукоятки для переміщення кронштейна конденсора його можна переміщати вгору і вниз, завдяки чому змінюється кут збіжності променів і, отже, ступінь освітлення об'єкта. Чим вище положення конденсора, тим краще освітлений препарат.

Ірис (IRIS) - діафрагма розташовується під конденсором і служить для регулювання потоку світла, що надходить у конденсор. Вона складається з металевих серпоподібних пластинок. Розширити або звузити отвір діафрагми можна за допомогою спеціального важільця. При обертанні його за годинниковою стрілкою отвір ірис (IRIS) – діафрагми збільшується й, отже, збільшується ступінь висвітлення об'єкта.

При роботі з імерсійними об'єктивами ступінь освітлення препарату повинна бути максимальної, тому шторку ірис (IRIS) – діафрагми відкривають, а конденсор піднімають у крайнє верхнє положення.

При роботі із сухими об'єктивами, як правило, розглядають незабарвлені об'єкти. Для досягнення контрастності конденсор опускають униз, а отвір ірис (IRIS) - діафрагми зменшують.

Правила роботи з мікроскопом

1. На робочому столі мікроскоп ставлять тубусоутримувачем до себе на відстані 3-5 см від краю стола;
2. Включають мікроскоп у мережу й установлюють правильне освітлення;
3. На предметний столик поміщають досліджуваний препарат і закріплюють його клемами;
4. Під тубус поміщають потрібний об'єктив і за допомогою макро та мікрогвинтів установлюють фокусну відстань. Так, при роботі з імерсійними об'єктивами на препарат попередньо наносять краплю імерсійного масла та обережно опускають тубусоутримувач макрогвинтом до зіткнення зі склом. Потім, уважно дивлячись в окуляр, дуже повільно піднімають тубусоутримувач, обертаючи його проти годинникової стрілки, доти, поки не побачать зображення. Точне наведення об'єктива на фокус роблять мікрометричним гвинтом. При роботі із сухими об'єктивами препарат спочатку розглядають із об'єктивом $\times 8$. Піднімаючи за допомогою макрогвинта тубусоутримувач і уважно дивлячись в окуляр, установлюють фокусну відстань (близько 9 мм) і домагаються чіткості зображення, використовуючи мікрометричний гвинт. Далі, рухаючи предметний столик або предметне скло, установлюють у центр поля той ділянки препарату, у

якій найкраще видний досліджуваний об'єкт. Потім, обертаючи револьверне обладнання навколо своєї осі, під тубус поміщають об'єктив на х20 або х40. При цьому під тубус не повинен потрапити об'єктив х90. У револьверному обладнанні об'єктиви розташовуються таким чином, що якщо знайдене зображення з об'єктивом х8, то при розгляді препарату з об'єктивами більшого збільшення потрібно злегка підрегулювати чіткість зображення за допомогою макро- і мікрометричних гвинтів;

5. Під час мікроскопування необхідно тримати обоє ока відкритим і користуватися ними поперемінно;

6. Після закінчення роботи слід забрати препарат із предметного столика, вилучити вниз конденсор, поставити під тубус об'єктив х8, вилучити імерсійне масло м'якою тканиною або марлею, яка змочена в спирті, із фронтальної лінзи об'єктива х90, під об'єктив покласти марлеву серветку, вилучити тубусоутримувач.

1.2 Види мікроскопії

Основними характеристиками мікроскопа є загальне збільшення та роздільна здатність.

Загальне збільшення не характеризує якості зображення, яка може бути чітким і нечітким.

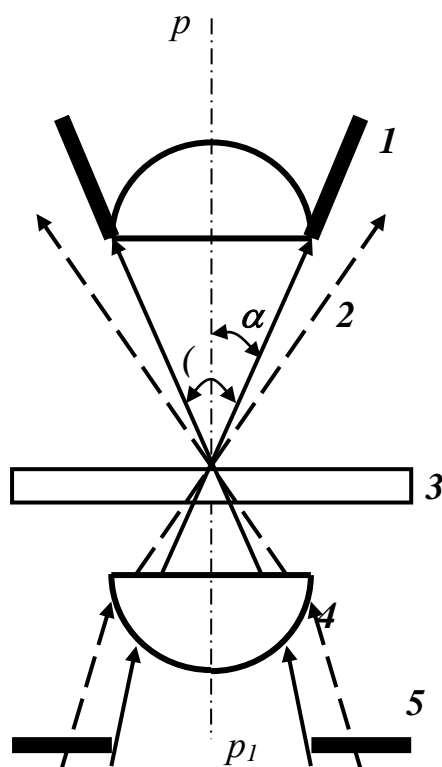
Чіткість одержуваного зображення визначається роздільною здатністю мікроскопа, тобто тієї найменшою величиною об'єктів або їх деталей, які можна побачити за допомогою цього приладу. Роздільна здатність залежить від довжини минаючого через об'єкт світла, показника заломлення оптичного середовища (показник заломлення повітря рівний 1,0; імерсійного масла – 1,516; скла – 1,520) і апертурного кута об'єктива. Цю залежність вивів німецький фізик Ернст Аббе в другій половині XIX століття (1.1):

$$d = \lambda / 2 n \sin \alpha, \quad (1.1)$$

де: d – мінімальна відстань між двома крапками, видимими роздільно;
 λ – довжина хвилі світла, що проходить через досліджуваний об'єкт;

$n \sin \alpha$ – числова апертура, де n – показник переломлення світлом оптичного середовища, α – апертурний кут об'єктива.

На рис. 2 представлена схема, що ілюструє поняття апертурного кута мікроскопа (стрілками позначений хід світлових променів).



- γ – отвірний кут;
- α – апертурний кут;
- 1 – фронтальна лінза об'єктива;
- 2 – простір між об'єктом і об'єктивом;
- 3 – предметне скло з об'єктом;
- 4 – конденсор;
- 5 – діафрагма;
- pp_1 – головна оптична вісь

Рис. 2 Схema, що ілюструє поняття апертурного кута

Е. Аббе довів, що нема рації безмежно підвищувати збільшення світлового мікроскопа. Мінімальна відстань між двома крапками при висвітленні об'єкта світлом з довжиною хвилі 550 нм, до якого найбільш чутливе око, при використанні мікроскопа, апертурний кут якого 900 (це граничний кут для якого $\sin \alpha = 1$), для сухої системи становить близько 300 нм, а для імерсійної системи – близько 200 нм.

Таким чином, підвищити роздільну здатність мікроскопа можна шляхом:

- зниження довжини хвилі світла, що проходить через об'єкт;
- використання імерсійної системи;
- підвищення апертурного кута до граничного (до 900).

1.2.1 Мікроскопія в темному полі

Використовується для дослідження занадто малих і слабкоконтрастних живих об'єктів. При мікроскопії цим методом використовують спеціальний конденсор темного поля, центр якого затемнений. Тому центральний пучок світлових променів не попадає в об'єктив і поле зору мікроскопа залишається темним. Об'єкт висвітлюється тільки променями, що попадають на нього під кутом. Розсіюючись на об'єкті, частина променів змінює напрямок і попадає на об'єктив. Об'єкт стає видимим як світла крапка на темному тлі. Метод темного поля дозволяє одержати уявлення про зовнішню форму живих незабарвлених об'єктів і їх рух.

Мікроскопія в темному полі дозволяє підвищити роздільну здатність об'єктива приблизно в 10 раз і розглядати об'єкти, розміри яких перебувають

за межами звичайного мікроскопа. Підвищення роздільної здатності досягається за рахунок збільшення апертурного кута.

1.2.2 Фазово-контрастна мікроскопія

Дає можливість вивчати живі об'єкти без фарбування та фіксування. Очі людини реагують на зміни амплітуди світлової хвилі (інтенсивність, контрастність) і її довжини (колір), але не сприймає відмінностей по фазі. У біологічних препаратах чергуються місця, які в різному ступені поглинають світло. Проходячи через них, світлові хвилі змінюють свою амплітуду. Такі ділянки об'єкта називають амплітудними, і під мікроскопом вони виглядають більш темними. Прозорі у видимому світлі структурні елементи об'єктів пропускають промені однакової довжини та амплітуди, але зміщають їх фазу. Величина зсуву залежить від товщини та показника переломлення структур, але видимих змін практично не дає. Такі препарати є неконтрастними.

За допомогою фазово-контрастного обладнання фазові зміни світлових хвиль, що проходять через прозорі об'єкти, перетворюються в амплітудні, завдяки чому деталі розглянутих об'єктів стають видимими та контрастними.

Фазово-контрастне обладнання дає можливість вивчати структури клітин: жгутики та оболонки бактерій, ядра та мітохондрії дріжджів і грибів.

Таким чином, хоча роздільна здатність при використанні фазово-контрастної мікроскопії не міняється при порівнянні з мікроскопією в світлому полі зору, якість зображення поліпшується за рахунок підвищення контрастності.

1.2.3 Люмінесцентна мікроскопія

Люмінесцентна мікроскопія дозволяє вивчати клітини в живому виді, виявляти мембранні структури та одержувати висококонтрастні кольорові зображення мікроорганізмів.

Сутність явища люмінесценції полягає в тому, що деякі молекули структурних елементів клітини (пігменти, вітаміни, алкалоїди та ін.) здатні поглинати частину енергії падаючого світла певної довжини хвилі, переходити в електронно-збуджений стан і випромінювати світло з іншою довжиною хвилі. Джерелом порушення можуть бути ультрафіолетові промені (300-400 нм) і видиме світло короткохвильової області спектра (400-460 нм).

Клітини мікроорганізмів мають слабку власну (первинну) люмінесценцію. Її можна підсилити попереднім фарбуванням препаратів нетоксичними барвниками – флуорохромами (акридин жовтогарячий, нейтральний червоний, аурамін, флуоресцеїн і ін.). У результаті виникає вторинна люмінесценція. Для її збудження досить використовувати синьо-фіолетову частину спектра. У результаті виникає висококонтрастне кольорове зображення розглянутого об'єкта.

Таким чином, при використанні люмінесцентної мікроскопії роздільна здатність мікроскопа зростає в порівнянні зі світлопольною мікроскопією за рахунок зменшення довжини хвилі минаючого через об'єкт світла.

1.2.4 Електронна мікроскопія

Максимальна роздільна здатність оптичних мікроскопів становить близько 0,2 мкм і залежить від довжини хвилі використовуваних променів світла. Побільшати роздільну здатність в 100 і більш раз можна, якщо замість світлових або ультрафіолетових променів застосовувати потік електронів, що рухаються, володіють хвильовими властивостями (довжина хвилі близько 0,04 нм).

Потік електронів рухається в безповітряному просторі від джерела електронів (розпечена нитка вольфрамової гармати) у напрямку до флуоресцентного екрана та викликає рівномірне світіння його. Якщо ж на шляху електронів помістити який-небудь об'єкт, то залежно від його щільності електрони будуть більше або менше затримуватися, а відповідні місця на екрані виявляться більш-менш затемненими. Цей простий принцип роботи сучасного електронного мікроскопа доповнений принципом відхилення електронних променів у магнітному полі подібно тому, як світлові промені відхиляються скляними лінзами, що збільшують. При цьому використовуються електромагнітні лінзи.

Висока роздільна здатність сучасних електронних мікроскопів дозволяє спостерігати та вивчати об'єкти, невидимі в оптичних мікроскопах: віруси та фаги, мікоплазми, будову клітин прокариотів і еукариотів, їх макро- і мікроструктурні елементи. Препарати для електронної мікроскопії готують у вигляді дуже тонких зрізів на спеціальних ультрамікротомах або на найтонших плівках – підложках з коллодію. Отже, в електронних мікроскопах мікроорганізми досліджують не в живому стані, а у вигляді фіксованих препаратів.

Контрольні питання:

1. Яке обладнання біологічного мікроскопа?
2. З яких частин і механізмів полягає механічна частина мікроскопа?
3. Назвіть основні характеристики мікроскопа.
4. Що розуміють під роздільною здатністю мікроскопа? Як вона визначається?
5. Що становить оптичну систему мікроскопа?
6. Об'єктиви бувають сухі та імерсійні. Що це значить?
7. Як визначається загальне збільшення мікроскопа?
8. Що входить до складу освітлювальної системи мікроскопа?
9. Як слід настроїти освітлювальну систему при роботі з імерсійним об'єктивом?
10. Які існують правила роботи з мікроскопом?

11. Які особливості обладнання та принципи роботи темнопольного, фазово-контрастного, люмінесцентного та електронного мікроскопів?
12. Чим визначається чіткість одержуваного зображення?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

ГОТУВАННЯ ФІКСОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІЙ І ФАРБУВАННЯ ЇХ ПРОСТИМИ МЕТОДАМИ

Ціль роботи: Придбати навички по готуванню фіксованих препаратів бактерій і освоїти техніку фарбування препаратів бактерій простими методами.

2.1 Техніка відбору чистих культур мікроорганізмів

Відбір проб чистих культур бактерій і дріжджів, які виростають на поверхні щільного середовища у вигляді мазеподібного нальоту або в рідкому середовищі ведуть у наступній послідовності:

1. Запалюють спиртівку.
2. Пробірку з культурою поміщають у ліву руку між великим і вказівним пальцями в похилому положенні. Поверхня з нальотом мікроорганізмів повинна бути звернена нагору та добре видна.
3. Петлю тримають вертикально в полум'ї пальника та прожарюють до червоного кольору, потім нахиляють і обпалюють частину, що примикає до петлеутримувача.
4. Мізинцем і підмізинним пальцем правої руки притискають до долоні зовнішню частину ватної пробки, виймають її із пробірки та тримають в такому положенні не торкаючись навколишніх предметів.
5. Краю відкритої пробки обпалюють у полум'ї пальника.
6. Обережно вводять стерильну петлю в пробірку з культурою та прохолоджують її доторкнувшись стінки пробірки або доторкнувшись до живильного середовища, там, де воно вільне від мікроорганізмів. Відсторонивши пробірку з культурою від полум'я пальника, легким рухом обережно відбирають невелику кількість мікробної маси з поверхні середовища або краплю рідини із клітинами. Виймаючи петлю із пробірки, стежать за тим, щоб відібраний матеріал не торкався стінок і петля не виявилася над полум'ям пальника.
7. Знову обпалюють у полум'ї пальника край пробірки, потім, легким круговим рухом обпалюють ватно-марлеву пробку та закривають пробірку.
8. Пробірку з культурою ставлять у штатив, а витягнутий матеріал використовують для готування препарату.
9. Клітки мікроорганізмів, що залишилися у петлі, спалюють у полум'ї пальника.

Відбір чистих культур мікроскопічних грибів ведуть із використанням препарувальної голки в тій же послідовності, що й відбір одноклітинних організмів. Із пробірки відбирають шматочок міцелію, злегка занурюючи голку в живильне середовище таким чином, щоб не порушити структуру міцелію.

2.2 Готування препаратів фіксованих клітин

Фіксованими вважають клітини мікроорганізмів, у яких перервані життєві процеси, але повністю збережена тонка структура.

Для одержання фіксованих препаратів важливо правильно підготувати предметні стекла. Вони повинні бути чистими та ретельно знежиреними. Для цього стекла, що були у вживанні, витримують 1-2 години на хромовій суміші (в 1 л води вносять 50 г біхромату калію та 100 г технічної сірчаної кислоти), після чого обполіскують теплою водою та спиртом. Можна також кип'ятити стекла протягом 15 хв у розчині соди або мильної води. Для перевірки чистоти скла на його поверхню наносять краплю води. При достатньому знежиренні крапля розтікається рівномірно та не збирається в опуклі пухирці, які повільно висихають. Беруть стекла пінцетом або акуратно за грані, тому що пальці залишають на поверхні жирні плями.

Готування фіксованих препаратів ведуть у наступній послідовності:

1. На середину чистого знежиреного предметного скла стерильною петлею наносять невелику краплю води. В неї вносять досліджуваний матеріал, який відібраний за методикою, описаної вище. Отриману суспензію рівномірно розподіляють по поверхні скла тонким шаром таким чином, щоб препарат розподілився на площі приблизно 2-3 см².

2. Отриманий мазок висушують при кімнатній температурі на повітрі.

3. Роблять фіксацію мазка. Для цього скло з висохлим мазком проводять 3-4 рази над полум'ям пальника тою стороною, де мазок відсутній. Ціль фіксації:

- умертвити клітини мікроорганізмів і зробити їх безпечними (що особливо важливо при роботі з патогенними мікроорганізмами);

- зафіксувати (закріпити) мазок на склі (щоб вони не змивалися при фарбуванні);

- поліпшити фарбування, оскільки мертві клітини краще адсорбують на своїй поверхні різні барвники.

Готування фіксованих препаратів із природніх місць проживання мікроорганізмів проводиться так само, як і із чистих культур.

Крім термічної обробки, застосовують також фіксацію хімічними речовинами: занурюють предметне скло з мазком у мензурку з 96 %-им етанолом на 15-20 хв, з ацетоном – на 5 хв, із сумішшю 96 % -ого етанолу та 40 %-ного формаліну (співвідношення 95:5) – на 2 хв і ін.

2.3 Фарбування фіксованих препаратів мікроорганізмів простими методами

Фіксовані препарати не можна розглянути під мікроскопом, тому що вони є безбарвними та пропускають світлові промені. Тому їх офарблюють, використовуючи прості або складні методи.

При фарбуванні фіксованих мазків простими методами використовують один барвник (фуксин, фарба Муромцева, генціанвіолет, метиленова синь і ін.).

Послідовність фарбування мазка простими методами наступна:

1. На фіксований препарат наносять декілька крапель барвника таким чином, щоб він покривал усю поверхню мазка та витримують протягом певного часу. Так, при фарбуванні фуксином на мазок наносять декілька крапель барвника та витримують його на мазку 2-3 хв. Під час фарбування препарату з кефіру фарбу Муромцева наносять на мазок через смужку фільтрувального паперу на 3-5 хв.

2. Фарбу змивають із мазка слабким струменем до безбарвної змивної води. При цьому скло тримають у похилому положенні над лотком.

3. Мазок підсушують фільтрувальним папером, який обережно прикладають до скла, і досушують на повітрі.

4. На пофарбований мазок наносять краплю іммерсійного масла та розглядають препарат з об'єктивом х90 або х100.

Контрольні питання

1. Яким чином проводять відбір чистих культур мікроорганізмів?
2. Які клітини мікроорганізмів вважаються фіксованими?
3. Яким чином готують препарати фіксованих препаратів?
4. Які барвники можуть застосовуватися під час фарбування фіксованих препаратів простими методами?
5. Назвіть основні етапи готування фіксованого пофарбованого препарату.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ПО ГРАМУ

Ціль роботи: Ознайомитися з методами фарбування бактерій і їх структур. Освоїти техніку фарбування бактерій по Граму.

Розрізняють прості, складні та диференціальні методи фарбування бактерій. При простому фарбуванню використовують один барвник і профарбовують усю клітину. *Складне фарбування* передбачає застосування двох або декількох барвників (наприклад, при визначенні відносини бактерій до фарбування по Граму). *Диференціальне фарбування* засноване на

індивідуальному відношенні біологічних структур клітки до різних барвників (фарбування спор, оболонки, капсул, метахроматину та ін.). При цьому так само, як і в складних методах, як правило, використовується кілька барвників.

Складні методи фарбування дозволяють розподілити бактерії на групи, що має важливе діагностичне значення при їхній ідентифікації. Серед складних методів найбільш широке застосування знайшов метод фарбування бактерій по Граму, що дозволяє розділити бактерії залежно від хімічного складу й структури клітинної стінки на дві основні групи: грампозитивні (грам+; Гр⁺) і грамнегативні (грам-; Гр⁻). Грампозитивні бактерії по цьому методу офарблюються в синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні – у рожевий. До складних методів відноситься метод фарбування по Цілю-Нільсену, що дозволяє диференціювати бактерії на дві групи по кислотостійкості. Цей метод дозволяє виявити туберкульозну паличку, бактерії паратуберкульозного ентериту великої рогатої худоби й інші кислотостійкі мікроорганізми.

При використанні *диференціальних (спеціальних) методів* можна офарбити спори, визначити наявність у клітинах запасних живильних речовин, виявити клітинні структури.

Фарбування бактерій по методу Грама

Сутність методу полягає у відмінності хімічного складу та будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Клітинна стінка Гр⁺ бактерій товста, але одношарова, містить багато пептидоглікану – муреїну, а також тейхоеві кислоти, які утворюють міцну сполуку з барвниками – генціанвіолетом і йодом і тому залишаються пофарбованими після обробки мазка спиртом. Таким чином, Гр⁺ бактерії по методу Грама офарблюються в синьо-фіолетовий колір.

У Гр⁻ бактерій клітинна стінка тонка, але двошарова. Муреїну мало, причому він утримується у внутрішньому шарі клітинної стінки, тейхоеві кислоти відсутні. Зовнішній шар клітинної стінки містить, головним чином, речовини, що володіють гідрофобними властивостями – ліпополісахариди та ліпопротеїди. Ці речовини не утворюють міцного комплексу з фарбами генціанвіолетом і йодом і тому клітки знебарвлюються після обробки 96 %-м етиловим спиртом і після додаткового фарбування барвником фуксином офарблюються в блідо-рожевий колір.

Техніка фарбування по Граму

1. На предметному склі готують фіксований мазок досліджуваної чистої культури;

2. Мазок офарблюють барвником генціанвіолетом через смужку фільтрувального паперу. Можна також використовувати заздалегідь приготовлені фільтрувальні папірці, змочені 1 %-м спиртовим розчином кристалвіолету та висушені (метод Грама в модифікації А.В. Синєва). У

цьому випадку папірці поміщають на фіксований мазок і змочують декількома краплями води. Фарбування препарату проводять протягом 2-3 хвилин;

3. Фільтрувальний папір знімають із мазка, фарбу зливають і наносять на мазок розчин Люголю на 2 хвилини;

4. Розчин Люголю зливають із мазка та обробляють 96 %-м спиртом протягом 30-60 сек. Потім препарат промивають водою й підсушують фільтрувальним папером;

5. Мазок офарблюють барвником фуксином 2-3 хвилини, другий раз промивають водою та підсушують фільтрувальним папером.

Потім на скло наносять краплю імерсійної олії і розглядають препарат з об'єктивом x90 або x100 при максимальному висвітленні.

Контрольні питання:

1. Які існують методи фарбування бактерій?
2. Яке призначення складних методів фарбування бактерій? Навести приклади складних методів фарбування?
3. Для чого використовуються диференційні (спеціальні) методи фарбування бактерій? Навести приклади.
4. У чому полягає сутність методу фарбування по Граму?
5. Яким чином проводять фарбування по методу Грама?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Ціль роботи: Ознайомитися з вимогами, пропонованими до живильних середовищ, з різними класифікаціями та хімічним складом живильних середовищ, правилами їх готування та метою використання.

Різноманітні харчові речовини, яких потребують мікроорганізми і які використовуються ними для синтезу основних компонентів клітини, росту, розмноження та для одержання енергії, називаються живильними речовинами, а середовище, що містить живильні речовини, є живильним середовищем.

4.1 Вимоги, які висуваються до живильних середовищ:

1. У середовищі повинні бути всі необхідні для росту та розвитку мікроорганізмів хімічні елементи;
2. Середовище повинна бути збалансована по хімічному складу.
3. Середовища повинні мати достатню вологість, що забезпечує можливість дифузії живильних речовин у клітку. Для грибів ця вологість

забезпечується змістом вологи в субстраті не менше 12 %, для бактерій – не менше 20 %.

4. Середовище повинна мати певне значення рН середовища. Серед мікроорганізмів розрізняють ацидофіли (мікроорганізми, що люблять кислоту), алкалофіли (мікроорганізми, що люблять луг), і нейтрофіли (найкраще ростуть у нейтральному середовищі із рН близько 7,0). До ацидофілів відносяться гриби та дріжджі. Більшість бактерій – нейтрофіли, для яких активна кислотність середовища близько 4 од. рН є згубною. Слід пам'ятати, що при стерилізації середовища та у процесі культивування мікроорганізмів, кислотність середовища може сильно змінюватися. Щоб уникнути зміни рН у середовище додають буферні системи (наприклад: фосфатний буфер), CaCO_3 (для нейтралізації органічних кислот, що утворюються в результаті культивування), речовини органічної природи, що володіють буферними властивостями (наприклад: амінокислоти, поліпептиди, білки) і ін.;

5. Середовища повинні бути ізотонічними для мікробної клітки, тобто осмотичний тиск у середовищі повинен бути таким же, як усередині клітки.

6. Середовища повинні мати певний окисно-відновний потенціал (gh_2), що визначають насичення їх киснем. Оцінка проводиться за шкалою індексів від 0 до 41, цим індексом можна позначити будь-який ступінь аеробності: насичений киснем розчин позначають $gh_2=41$, насичений воднем $gh_2=0$. Облігатні анаероби розмножуються при gh_2 не вище 5, аероби – не нижче 10.

7. Середовища повинні бути стерильними, що забезпечує ріст чистих культур мікроорганізмів.

4.2 Класифікація живильних середовищ

За *консистенцією* живильні середовища діляться на рідкі, щільні та сипучі.

Рідкі середовища застосовуються для накопичення біомаси або продуктів обміну мікроорганізмів, для відновлення культур, що довго зберігаються, для підтримки та зберігання тих чистих культур, які погано ростуть на щільних середовищах.

Щільні середовища необхідні для виділення та опису культуральних властивостей чистих культур мікроорганізмів, тому що на них можна одержати ізольовані колонії (колонія – популяція мікроорганізмів, що вирости з однієї клітини). Щільні живильні середовища використовуються також для кількісного обліку мікроорганізмів у харчових продуктах, інших об'єктах зовнішнього середовища й для зберігання чистих культур.

Щільні середовища готуються з рідких шляхом додавання гелеутворюючих речовин: агар-агару, желатину, гелю кремнекислого (силікагелю).

Кращою гелеутворюючою речовиною є агар-агар, який одержують з водоростей. Це складний полісахарид, який утворює гель із крапкою плавлення 96-100 °С и температурою застигання близько 40 °С. Тому на

агаризованих середовищах можна культивувати майже всі мікроорганізми. Крім того, агар-агар дуже рідко використовується мікроорганізмами в якості живильного субстрату. Для ущільнення рідкого середовища в нього вносять залежно від ступеня очищення від 1,5 до 2,5 % агар-агару.

На відміну від агар-агару, желатин – це речовина білкової природи, яка виходить із костей і хрящів тварин при виварюванні, тому багато мікроорганізмів використовують желатин як живильний субстрат і до кінця культивування середовище з желатином розріджується. Обмежене використання желатину як ущільнювача для щільних живильних середовищ зв'язане також з тим, що в порівнянні з агар-агаром він утворює менш міцний гель, який плавиться при 23-25 °С и застигає при 20 °С, у той час як більшість мікроорганізмів розвиваються при температурі від 25 до 37 °С.

Якщо потрібно одержати щільні середовища, що не містять органічних компонентів, або синтетичні середовища з певною кількісною і якісною сполукою, то в якості ущільнювача застосовують гель кремнекислий. Одержують його шляхом змішування рівних об'ємів соляної кислоти з питомою масою 1,1 і рідкого скла (Na_2SiO_3 або K_2SiO_3) з наступним розливанням по 25-30 см³ у чашки Петрі та витримкою 1-2 год.

Сипучі середовища застосовують в основному в промисловій мікробіології. До таких середовищ відносять розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, змочений живильним розчином. Такі середовища використовуються для культивування аеробних мікроорганізмів.

За походженням та складом живильні середовища діляться на натуральні (природні), синтетичні (штучні) і напівсинтетичні.

Натуральні середовища готуються із продуктів тваринного та рослинного походження. Вони містять усі інгредієнти, необхідні для росту та розвитку мікроорганізмів. Основним недоліком цих середовищ є те, що вони мають складний і непостійний склад. Натуральні середовища використовують для вирощування мікроорганізмів, накопичення біомаси, зберігання чистих культур, але вони мало придатні для вивчення обмінних процесів мікроорганізмів. Такими середовищами є відвари злаків, трав, овочеві та фруктові соки, різні екстракти, м'ясний бульйон, автолізат дріжджів, молоко, молочна сироватка, гідролізати з рослинної сировини і т.д. Найбільше часто застосовуваними натуральними живильними середовищами являються м'ясо пептонний агар (МПА) і м'ясопептонний бульйон (МПБ), призначені для культивування бактерій, а також неохмелене пивне сусло, сусло-агар. Такі середовища використовують для вирощування та накопичення біомаси грибів і дріжджів.

Синтетичні середовища мають у своєму складі хімічно чисті органічні та неорганічні сполуки в строго зазначених концентраціях. По набору компонентів синтетичні живильні середовища можуть бути складними (середовища для вирощування молочнокислих бактерій) і досить простими. Такі середовища застосовуються для дослідження обміну речовин, з'ясування закономірностей росту або біосинтезу якого-небудь метаболіту і т.д.

Найбільше часто в практичній роботі використовують синтетичне середовище Чапека для вирощування грибів і середовище Рідер для дріжджів. Склад цих середовищ наведено в додатку. Основним недоліком синтетичних середовищ є те, що на таких середовищах мікроорганізми дуже довго ростуть.

Напівсинтетичні середовища у своєму складі містять хімічно чисті органічні та неорганічні речовини, (як і в синтетичних середовищах) і речовини рослинного або тваринного походження, як факторів росту для прискорення росту та розвитку мікроорганізмів. Ціль використання напівсинтетичних середовищ та ж, що й синтетичних. Тому що натуральні компоненти вносяться в невеликих кількостях, то їх хімічний склад не враховується при вивченні обмінних процесів тих або інших мікроорганізмів.

За *призначенням* середовища діляться на універсальні (основні), виборчі (накопичувальні, елективні) і диференційно-діагностичні.

Універсальні середовища використовуються для вирощування багатьох видів мікроорганізмів. До універсальних середовищ, які використовуються для вирощування бактерій, відносяться м'ясопептоний агар і бульйон (МПА, МПБ), середовище для визначення кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (середовище для визначення КМАФАнМ). Гриби та дріжджі добре ростуть на неохмеленому пивному суслі, сусло-агарі (СА), середовищі Сабуро.

Виборчі середовища забезпечують розвиток тільки певних мікроорганізмів або групи родинних видів і непридатні для росту інших. У такі середовища, як правило, додають речовини, що вибірково пригнічують розвиток супутньої мікрофлори. Виборчі середовища застосовують для виділення певних мікроорганізмів з місць їх природнього проживання та для одержання накопичувальних культур. У якості накопичувальних живильних середовищ використовують, наприклад, рідкі середовища Кесслера (використовується для накопичення бактерій групи кишкової палички), Мюллера та Кауфмана (для виявлення сальмонел). Елективними середовищами можуть бути щільні живильні середовища, такі як молочно-сольовий агар (МСА) і жовтково-сольовий агар (ЖСА) – для виявлення та кількісного обліку в продуктах коагулазопозитивних стафілококів, кров'яний агар – для виявлення гемолітичних стрептококів.

Диференційно-діагностичні середовища використовуються для визначення видової приналежності досліджуваного мікроба, ґрунтуючись на особливостях його обміну речовин. Склад цих середовищ дозволяє чітко виділити найбільш характерні властивості досліджуваного мікроорганізму. Прикладом таких середовищ є щільне середовище Ендо, яке застосовується для визначення бактерій групи кишкової палички, до складу середовища входить лактоза, насичений спиртової розчин фуксину, знебарвленого перед додаванням у середовище 10 %-им водяним розчином сульфату натрію (утворюється безбарвна фуксин-сірчиста кислота). Кишкова паличка на такому середовищі ферментує лактозу з утвором альдегідів, внаслідок чого

безбарвна фуксин-сірчиста кислота переходить у фуксин-сірчисту сполуку з утвором фуксину, який офарблює колонії кишкової палички в червоний колір з металевим блиском.

4.3 Готування живильних середовищ із сухих середовищ, які випускаються промисловістю

полягає в розчиненні певної кількості порошку у воді, доведення отриманої суміші до кипіння та кип'ятінні протягом 5 хвилин. Далі (при необхідності) середовище фільтрується через ватно-марлевий фільтр і розливається в пробірки або колби, які закриваються ватно-марлевими пробками. Далі середовища стерилізують в автоклаві. З використанням сухих середовищ готують м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), середовище Сабуро, середовище Кесслера, середовище для визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (середовище для визначення КМАФАнМ), середовище Ендо та ін.

4.4 Готування живильних середовищ із окремих компонентів

проводиться за методиками, які описані у додатку даних методичних вказівок для лабораторних робіт.

Контрольні питання:

1. Які вимоги висуваються до живильних середовищ?
2. Які існують живильні середовища за консистенцією?
3. За допомогою яких речовин готуються щільні середовища з рідких середовищ?
4. Чому обмежене використання желатину як ущільнювача для щільних живильних середовищ?
5. Які існують живильні середовища за походженням та складом?
6. Які існують живильні середовища за призначенням?
7. Яка функція диференційно-діагностичних середовищ? Наведіть приклади.
8. Яким чином готують живильні середовища із сухих середовищ, які випускаються промисловістю?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5

КУЛЬТИВУВАННЯ. ОТРИМАННЯ ЧИСТИХ І НАКОПИЧУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

Ціль роботи: Ознайомитися з поняттями про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів, з методами виділення накопичувальних і чистих культур мікроорганізмів, провести механічний поділ мікроорганізмів з

використанням щільних живильних середовищ методом Коха та методом Дригальського.

5.1 Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів

Культивування – вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах. При культивуванні на живильних середовищах виростають *культури* мікроорганізмів. *Ріст культури* – фізіологічний процес, у результаті якого збільшується *біомаса* – маса клітинної речовини даного мікроорганізму.

Чистою культурою мікроорганізму називають культуру мікроорганізмів одного виду, яка представлена потомством однієї клітки. Для виділення чистої культури використовують, як правило, щільні живильні середовища, на яких кожна клітка виростає у вигляді *ізольованої колонії* – потомства мікроорганізмів, що утворювалося з однієї клітки.

Виділення чистої культури мікроорганізму є основою бактеріологічної роботи, тому що найчастіше досліджуваний матеріал містить суміш різних видів мікробів. Чисті культури потрібні для вивчення властивостей мікроорганізмів і встановлення їх видової приналежності. Крім того, чисті культури мікроорганізмів (дріжджів, мікроскопічних грибів, молочнокислих, оцтовокислих, пропіонововокислих і інших бактерій) мають промислово цінні властивості та потрібні для одержання різних продуктів і речовин, які знайшли застосування в харчовій, фармацевтичній промисловості та інших галузях народного господарства.

Перед виділенням чистої культури з різних об'єктів навколишнього середовища (косметичних засобів, харчового продукту, з поверхні плодів і овочів, із ґрунту, води та ін.), у яких перебуває безліч мікроорганізмів, спочатку одержують накопичувальні культури, проводячи культивування в *елективних умовах* – умовах, що сприяють розвитку однієї культури та обмежуючих розвиток супутніх мікроорганізмів. Забезпечити елективні умови для мікроорганізмів можна тільки в тому випадку, якщо відомі особливості обміну речовин мікроорганізму, який планується виділити. Тому що різні мікроорганізми використовують різні джерела харчування, то елективні умови легше всього забезпечити, підбираючи певні сполуки живильних середовищ. Можна створити елективні умови, забезпечуючи відповідну температуру, рН, освітлення та ін.

Накопичувальні культури складаються переважно із клітин мікроорганізмів одного виду. Для одержання накопичувальних культур використовують рідкі накопичувальні живильні середовища, різні методи обробки матеріалу, що містить суміш мікробів, а також ураховують інші особливості мікроорганізмів, які будуть виділяти з об'єкта.

Для виділення чистих і накопичувальних культур з різних об'єктів у лабораторіях використовують методи посіву та пересівання. *Посівом* називається внесення частини досліджуваного матеріалу в стерильне живильне середовище, *пересіванням* – перенос частини виростаючої на

живильному середовищі культури мікроорганізмів на інше свіже живильне середовище.

5.2 Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів

До таких методів відносяться методи збагачення, метод нагрівання досліджуваного матеріалу для виділення спороутворюючих бактерій, метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича) і ін.

5.2.1 Методи збагачення

Їх часто застосовують для виділення чистих культур мікроорганізмів (наприклад, бактерій групи кишкової палички (БГКП), сальмонел і ін.) з матеріалів, у яких мало виділюваних мікроорганізмів, але втримується велика кількість супутньої мікрофлори. Для збільшення чисельності виділюваного виду мікроорганізмів спочатку роблять посів досліджуваного матеріалу в накопичувальні живильні середовища, які містять речовини, що стимулюють його ріст і гнітючі або затримуючі розмноження супутньої мікрофлори. Наприклад, для виділення сальмонел проводять посів у середовища збагачення Кауфмана, Мюллера та ін., для виділення БГКП – на середовище Кесслера.

5.2.2 Метод нагрівання

застосовують для виділення чистих культур спорових форм бактерій (бацил, клостридій). У цьому випадку перед посівом досліджуваний матеріал прогривають на водяній бані при температурі 75-85 °С протягом 20-30 хв. Вегетативні форми гинуть під час прогривання, а спори мікробів залишаються живими, й при наступних висівах на щільне середовище проростають, формуючи колонії.

5.2.3 Метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича)

полягає в посіві досліджуваного матеріалу в конденсаційну воду скошеного м'ясопептонного агару. При розмноженні рухливі форми мікроорганізмів з конденсаційної води поширюються на агарі, як би вповзаючи на його поверхню.

5.2.4 Методи виділення анаеробних мікроорганізмів

засновані на вирощуванні мікроорганізмів у середовищах з низькою концентрацією кисню або в безкисневому середовищі, що досягається:

- посівом досліджуваного матеріалу в середовища, що містять, редуруючі та легко окиснювані речовини. У якості таких речовин найчастіше використовують тіогліколят натрію, солянокислий цистеїн, шматочки тваринних і рослинних тканин;

- посівом досліджуваного матеріалу в глибину щільних живильних середовищ. Посів робиться уколом препарувальної голкою в пробірку зі

стовпчиком щільного середовища або в розплавлене щільне або напіврідке живильне середовище із наступним перемішуванням;

- механічним видаленням повітря з посудин при вирощуванні анаеробних мікроорганізмів (створюють вакуум);

- культивуванням анаеробних мікроорганізмів у рідких середовищах під шаром масла;

- культивуванням анаеробних мікроорганізмів в атмосфері інертного газу, диоксиду вуглецю, азоту.

5.3 Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

5.3.1 Метод Пастера (метод граничних розведень)

полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень у рідкому живильному середовищі. Для цього краплю посівного матеріалу вносять у пробірку зі стерильним рідким середовищем, з неї краплю переносять у наступну пробірку й так засівають до 8-10 пробірок. З кожним розведенням кількість мікробних кліток, що попадають у середовище, буде зменшуватися, таким чином можна одержати таке розведення, у якому у всій пробірці із середовищем буде перебувати тільки одна мікробна клітина, з якої розів'ється чиста культура мікроорганізму. Тому що в рідких середовищах мікроби ростуть дифузно, тобто легко розподіляються у всьому середовищі, то ізолювати одну мікробну клітину від інший важко.

Таким чином, метод Пастера не завжди забезпечує одержання чистої культури. Тому цей метод використовується, головним чином, для попереднього зменшення концентрації мікроорганізмів у матеріалі перед посівом його в щільне середовище для одержання ізольованих колоній.

5.3.2 Методи механічного поділу мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ

До таких методів відносяться метод Коха та метод Дригальського.

5.3.2.1 Метод Коха (метод глибинного посіву)

Досліджуваний матеріал вносять бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою в пробірку з розплавленим щільним живильним середовищем. Рівномірно розмішують вміст пробірки, обертаючи її між долонями. Краплю розведеного матеріалу переносять у другу пробірку, із другою – у третю і т.д. Вміст кожної пробірки, починаючи з першої, виливають у стерильні чашки Петрі. Після застигання середовища в чашках, їх поміщають у термостат для культивування.

Для виділення анаеробних мікроорганізмів по методу Коха необхідно обмежити доступ кисню до культури. Із цією метою поверхню глибинного посіву в чашці Петрі заливають стерильною сумішшю парафіну та вазеліну (1:1). Можна також залишати посівний матеріал, ретельно перемішаний з агаризованим середовищем, безпосередньо в пробірці. Ватяну пробку при

цьому заміняють гумової або заливають поверхню агару сумішшю парафіну та вазелінового масла. Щоб витягти вирості колонії анаеробних мікроорганізмів, пробірки злегка нагрівають, швидко обертаючи над полум'ям пальника. Агар, що прилягає до стінок, розплавляється, і стовпчик легко вислизає в підготовлену чашку Петрі. Далі стовпчик з агаром розрізають стерильним скальпелем, колонії витягають стерильною петлею та переносять у рідке середовище.

5.3.2.2 Метод Дригальського

Цей метод заснований на механічному поділі мікробних клітин на поверхні щільного живильного середовища в чашках Петрі. Кожна мікробна клітина, фіксуючись у певному місці, починає розмножуватися, утворюючи колонію (рис.3).

Для посіву по методу Дригальського використовують кілька чашок Петрі, залитих щільним живильним середовищем. На поверхню середовища вносять краплю досліджуваного матеріалу. Потім за допомогою стерильного шпателя цю краплю розподіляють по всій поверхні живильного середовища (посів газonom).

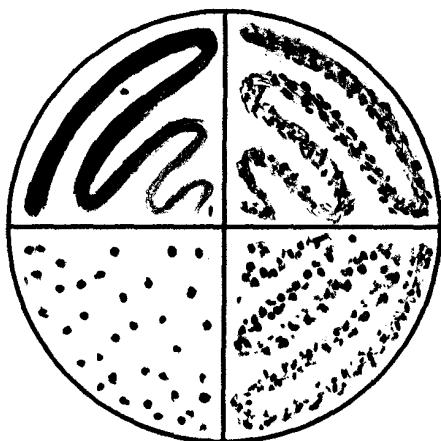


Рис. 3 Механічний поділ мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ

Посів також можна проводити штрихом, за допомогою бактеріологічної петлі. Цим же шпателем або 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, у наступних чашках ріст мікроорганізмів знижується та утворюються ізольовані колонії, з яких відсіванням можна легко виділити чисту культуру.

Таким чином, у перших секторах виходить суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростуть відособлені колонії, що представляють собою потомство однієї клітки.

З метою економії середовищ і посуду можна користуватися однією чашкою, розділивши її на сектори, і послідовно засівати їх штрихом (метод штриха, що виснажує). Для цього матеріал беруть петлею та проводять нею ряд паралельних штрихів спочатку по поверхні першого сектору, а клітинами, що потім послідовно залишилися на петлі, засівають усі інші сектори. При кожному наступному штриху відбувається зменшення кількості кліток, що засіваються.

5.3.3 Метод виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин використовується при ізолюванні культур мікроорганізмів, стійких до певних хімічних речовин. Наприклад, за допомогою цього методу можна виділити чисту культуру туберкульозних мікобактерій, стійких до дії кислот, лугів і спирту. У цьому випадку досліджуваний матеріал перед посівом заливають 15 % розчином кислоти або антиформіном і витримують у термостаті протягом 3-4 годин. Після впливу кислоти або луку клітини туберкульозної палички залишаються живими, а всі інші мікроорганізми, що втримуються в досліджуваному матеріалі, гинуть. Після нейтралізації кислоти або луку оброблений матеріал висівають на щільне середовище й одержують ізольовані колонії збудника туберкульозу.

5.3.4 Біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів засновані на зараженні досліджуваним матеріалом лабораторних тварин, сприйнятливих до даного виду збудника. Якщо патогенний мікроорганізм утримується в досліджуваному об'єкті, то лабораторна тварина занедужує та гине. Після розкриття полеглої тварини із внутрішніх органів роблять посіви на спеціальні середовища, на яких виростають чисті культури виділюваних мікробів.

Контрольні питання:

1. Що таке культивування мікроорганізмів?
2. Для чого виділяють чисту культуру мікроорганізмів?
3. Що таке накопичувальні культури мікроорганізмів?
4. Які існують методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів?
5. Які особливості виділення анаеробних мікроорганізмів?
6. Які існують методи виділення чистих культур мікроорганізмів?
7. Яким чином проводять механічний поділ мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ?
8. У яких випадках застосовуються методи виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин?
9. В чому полягають біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6

ТЕХНІКА ПОСІВУ ТА ПЕРЕСІВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Ціль роботи: Освоїти техніку посіву мікроорганізмів на щільні та рідкі живильні середовища, методики виділення чистих і накопичувальних культур з різних об'єктів навколишнього середовища

Посіви та пересівання мікроорганізмів на живильні проводять середовища близько полум'я пальника (але не в полум'ї), по можливості швидко, щоб не забруднити культури сторонніми мікроорганізмами. Не можна робити різких рухів, ходити, кашляти та ін. близько працюючого із чистою культурою, тому що рух повітря збільшує небезпеку випадкового зараження культури та середовища. Тому посіви та пересівання мікроорганізмів слід проводити в боксі.

6.1 Посів на щільні середовища в чашки Петрі

Посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб: щільне живильне середовище в пробірках або колбах розплавляють на киплячій водяній бані, прохолоджують до 48-50° С та, дотримуючися правил асептики, розливають рівним шаром товщиною 3-5 мм у стерильні чашки (рис. 4). Посів роблять скляним шпателем Дригальського (рис. 5) або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних (метод посіву, що виснажує) штрихів.

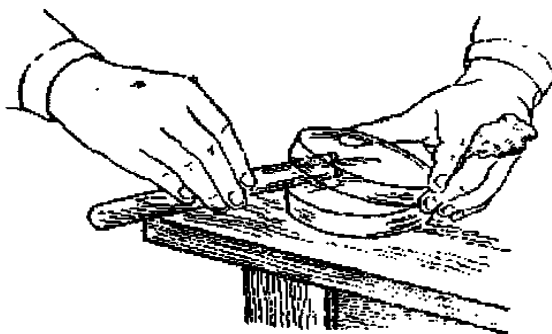


Рис. 4 Правила розливання живильного середовища в чашки Петрі

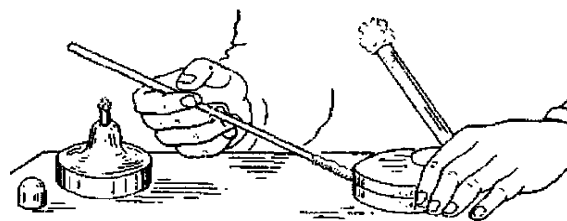


Рис. 5 Посів на агар у чашки Петрі шпателем Дригальського

6.2 Посів у рідке живильне середовище

Посів у рідке середовище можна робити бактеріологічною петлею або піпеткою поблизу полум'я пальника. Обидві пробірки тримають у злегка похилому положенні, щоб не замочити ватно-марлеві пробки. Петлю з мікробним матеріалом опускають безпосередньо в стерильне середовище та обполіскують. При внесенні кліток, узятих петлею із щільного середовища, матеріал ретельно розтирають по стінці пробірки у верхнього краю рідкого середовища, увесь час змиваючи його середовищем.

6.3 Пересівання на щільні живильні середовища в пробірках

Техніка посіву по етапах показана на рисунку 6.

1. Пробірки з культурою та живильним середовищем поміщають на два пальці лівої руки в похилому положенні. У правій руці великим і вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю та стерилізують у полум'ї пальника;

2. Виймають ватяні пробки з обох пробірок, притискають їх до долоні мизинцем і підмізинним пальцями правої руки та обпалюють краю пробірок. Стежать за тим, щоб пробки не торкалися сторонніх предметів;

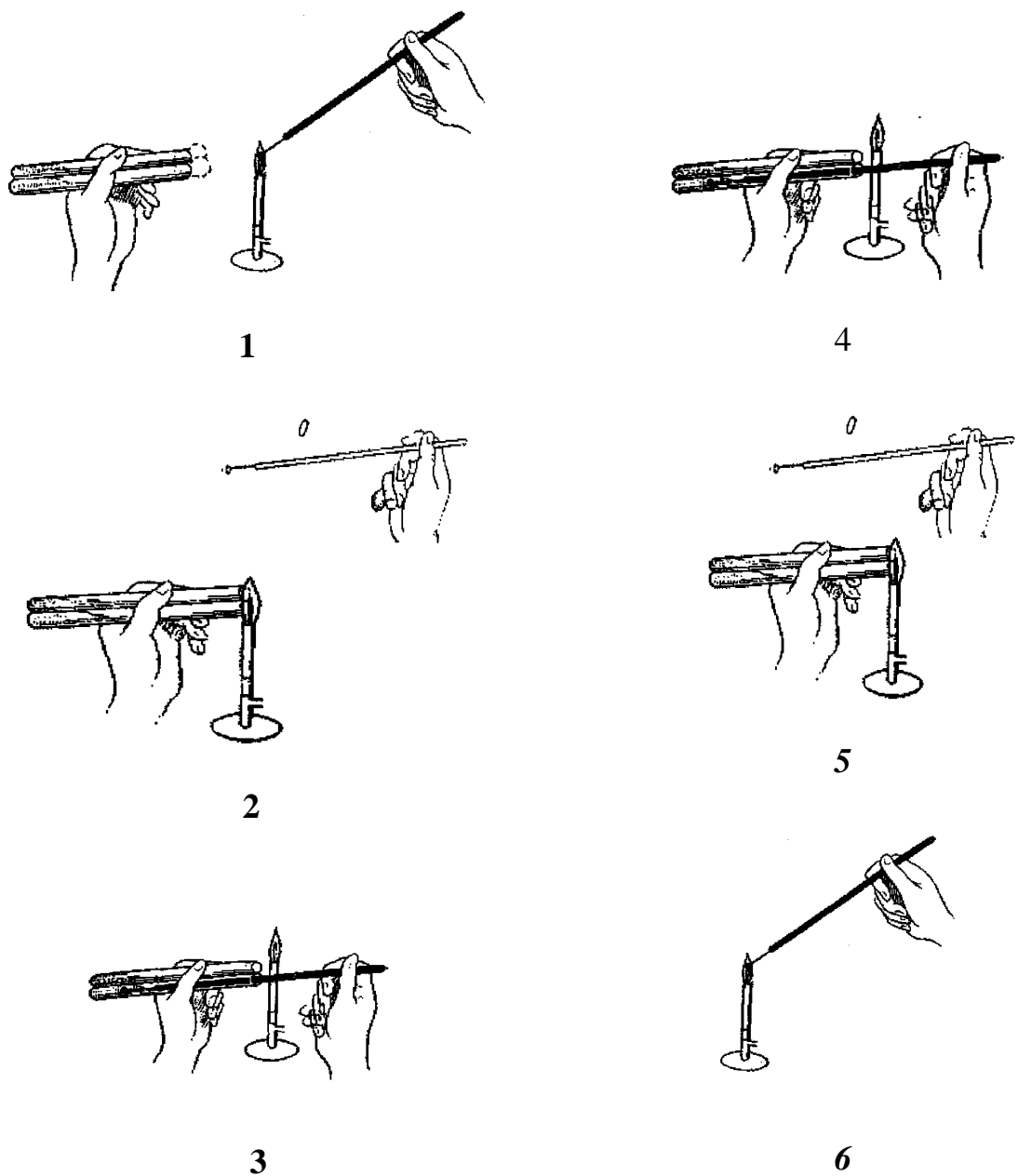


Рис. 6 Пересівання культури мікроорганізмів у пробірки

3. Петлю вводять у пробірку з мікробною культурою, що пересівається. Обережно, не торкаючись стінок, відбирають краплю рідкої культури. Якщо роблять пересівання з косою шару агару, то для охолодження петлі спочатку слід доторкнутися до поверхні агару де немає культури, після чого беруть невелику кількість мікробної маси зі скошеного живильного середовища;

4. Уводять петлю з матеріалом у пробірку зі стерильним рідким середовищем, намагаючись не зачіпати стінок пробірки. При посіві на скошені живильні середовища із клітками мікроорганізмів петлю опускають

майже до дна, де накопичується невелика кількість конденсаційної води. Злегка стосуючись петлею поверхні щільного середовища, але не розпушуючи її, проводять від дна нагору штрих;

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

6. Петлю знову прожарюють у полум'ї пальника.

Контрольні питання:

1. Яким чином проводять посів мікроорганізмів на щільні середовища в чашки Петрі?

2. Яким чином проводять посів мікроорганізмів у рідке живильне середовище?

3. Як проводять пересівання мікроорганізмів на щільні живильні середовища в пробірках?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

СХЕМА РОЗВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ПРОДУКТУ ТА ПРОВЕДЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Ціль роботи: Ознайомитися із принципами проведення мікробіологічного контролю сировини, напівфабрикатів і готової продукції. Освоїти методи визначення мікроорганізмів у харчових продуктах відповідно до вимог нормативної документації. Вивчити якісний склад мікрофлори досліджуваного продукту.

Завдання мікробіологічного контролю – як можливо швидко виявлення та визначення шляхів проникнення мікроорганізмів-шкідників у виробництво, вогнищ і ступеня розмноження їх на окремих стадіях технологічного процесу, запобігання розвитку сторонньої мікрофлори шляхом використання різних профілактичних заходів.

Мікробіологічний контроль проводиться заводськими лабораторіями систематично. Він здійснюється на всіх етапах технологічного процесу, починаючи із сировини та закінчуючи готовим продуктом на підставі затверджених державних стандартів (ДСТУ), технічних умов (ТУ), інструкцій, медико-біологічних вимог і санітарних норм якості продовольчої сировини та харчових продуктів, а також іншої нормативної документації. Для окремих виробництв є свої схеми мікробіологічного контролю, у яких визначені об'єкти контролю, крапки відбору проб, періодичність контролю, зазначені мікробіологічні показники, які необхідно визначати, приводяться нормативи по цих мікробіологічних показниках.

Багато харчових продуктів є сприятливим середовищем для росту та розвитку сторонніх мікроорганізмів. Недотримання та порушення

технологічних режимів переробки сировини, санітарно-гігієнічних умов на виробництві, порушення режимів зберігання та строків реалізації харчової продукції може привести до інтенсивного накопичення в них мікроорганізмів, які здатні утворювати токсини, що є причиною харчових отруєнь.

Крім того, при недотриманні санітарних правил і норм працівниками харчового підприємства в продукти можуть потрапити патогенні мікроорганізми – збудники харчових інфекцій. Тому найважливішими характеристиками продовольчих товарів є їхня *безпека* та *мікробіологічна стійкість*.

Під безпекою розуміють відсутність шкідливих домішок хімічної і біологічної природи, у тому числі патогенних мікроорганізмів і отрутливих продуктів їх життєдіяльності. Поняття «мікробіологічна стійкість» має на увазі потенційні можливості збереження продукту без псування.

Мікрофлора харчових продуктів являє собою складну динамічну систему, яка пов'язана із зовнішнім середовищем. Це значно ускладнює способи її дослідження та трактування отриманих результатів.

Для оцінки якості харчових продуктів, а також умов їх виробництва та зберігання користуються кількісними і якісними показниками. *Кількісні показники* вказують загальне число мікроорганізмів певних груп в 1 г (см³) продукту. *Якісні показники* вказують на відсутність (присутність) мікробів конкретних видів у певній масі продукту.

7.1 Групи мікробіологічних критеріїв безпеки харчових продуктів

7.1.1 Група показників санітарного стану

Безпосереднє виявлення патогенних мікроорганізмів (збудників харчових інфекцій) у харчових продуктах неможливо через їх низький вміст у продукті в порівнянні зі вмістом сапрофітної мікрофлори. Тому при санітарній оцінці харчових продуктів використовують непрямі методи, що дозволяють визначити рівень забруднення продукту виділеннями людини. Чим вище цей рівень, тем імовірніше влучення в об'єкт патогенних мікроорганізмів – збудників кишкових інфекцій.

Санітарна оцінка харчових продуктів проводиться за двома мікробіологічним показникам: загальною бактеріальною забрудненістю (КМАФАнМ) і наявністю бактерій групи кишкової палички (БГКП).

Загальна бактеріальна забрудненість (КМАФАнМ) – кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів в 1 г або 1 см³ продукту. У нормативній документації вказують граничний вміст цих мікроорганізмів в одиницях КУО (колонієутворюючих одиницях).

Висока бактеріальна забрудненість харчових продуктів свідчить про недостатню термічну обробку сировини, недостатню ретельну мийку та дезінфекцію встаткування, незадовільні умови зберігання та транспортування продукції.

Загальну бактеріальну забрудненість визначають у продуктах, у яких відсутня технічно корисна мікрофлора (мікрофлора заквасок). Для визначення цього показника використовують універсальні живильні середовища: м'ясопептонний агар (МПА) або середовище для визначення кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

Наявність бактерій групи кишкової палички (БГКП) визначається у всіх рідких продуктах, у всіх продуктах тваринного походження (за винятком стерилізованих), у багатьох продуктах рослинного походження. БГКП поєднують представників нормальної мікрофлори кишечника людини та відносяться до сімейства *Enterobacteriaceae* родів *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. БГКП виконують функцію індикатору фекального забруднення та відносяться до санітарно-показових мікроорганізмів.

Вибір БГКП у якості санітарно-показових мікроорганізмів для оцінки санітарного стану харчових продуктів не випадковий. Санітарно-показові мікроорганізми повинні відповідати наступним вимогам:

- ці мікроорганізми повинні бути представниками нормальної мікрофлори організму, у ньому розбудовуватися та розмножуватися;
- вони повинні в великих кількостях виділятися з організму;
- у навколишньому середовищі вони повинні тривалий час зберігати свою життєздатність, але не розмножуватися;
- вони не повинні змінюватися під дією факторів зовнішнього середовища, пригнічуватися або стимулюватися іншими мікроорганізмами;
- ці мікроорганізми повинні рівномірно розподілятися в досліджуваних об'єктах зовнішнього середовища;
- визначення цих мікроорганізмів повинно здійснюватися простими методами.

У нормативних документах звичайно вказується кількість продукту, у якому БГКП не допускаються. При високому рівні забруднення продукту БГКП зростає ймовірність знаходження в ньому патогенних мікроорганізмів – збудників кишкових інфекцій (дизентерії, черевного тифу, холери та ін.). Для визначення БГКП застосовують накопичувальне середовище Кесслера, а ідентифікацію цих бактерій проводять із використанням диференційно-діагностичного середовища Ендо.

7.1.2 Група умовно-патогенних мікроорганізмів

До цієї групи відносяться мікроорганізми – збудники харчових отруєнь, таких як *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *aureus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus*.

Умовно-патогенні мікроорганізми є мікроорганізмами, які постійно присутні в навколишньому середовищі та у живих макроорганізмах. Сприятливим середовищем для росту та розвитку цих мікроорганізмів є м'ясо та м'ясопродукти, тому саме ці продукти найчастіше є причиною харчових

отруєнь. Таким чином, багато з перерахованих вище мікроорганізмів нормуються в ковбасних виробках і інших м'ясних продуктах.

У м'ясних і багатьох рослинних консервах нормують зміст сульфїтредукуючих клострїдїй, які розвиваються в анаеробних умовах.

У молочних продуктах, багатих білком (наприклад, сирі, сирі) нормується зміст коагулазопозитивного золотавого стафілокока (*Staphylococcus aureus*) – збудника харчової інтоксикації.

При визначенні умовно-патогенних мікроорганізмів використовують елективні живильні середовища. Наприклад, наявність золотавого стафілокока виявляють за допомогою молочно-сольового (МСА) або жовтково-сольового (ЖСА) агару.

7.1.3 Група патогенних мікроорганізмів

З патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах визначають сальмонели. Звичайно, сальмонели не допускаються в 25 г (см³) продукту. У деяких продуктах дитячого та дієтичного харчування не допускається наявність сальмонелл в 50 і навіть в 100 г (см³).

Для визначення сальмонел використовують накопичувальні живильні середовища (селенітове, Кауфмана, Мюллера) і диференційно-діагностичні середовища (Плоскірева, Левіна).

7.1.4 Група показників мікробіологічної стабільності продукту

До цієї групи відносяться мікроскопічні гриби та дріжджі, які, як відомо, є збудниками псування продукту. Цей показник нормується у багатьох продуктах з рослинної сировини, а також у продуктах тваринного походження з рослинними добавками. Динаміку росту грибів і дріжджів обов'язково досліджують при встановленні строків придатності та режимів зберігання нових видів продуктів. Цвілі та дріжджі визначають із використанням сусло-агару або середовища Сабуро, причому кількість колоній грибів і дріжджів, що виростили на щільних середовищах підраховують окремо.

7.1.5 Представники технічно корисної і технічно шкідливої мікрофлори

Крім перерахованих вище нормованих мікробіологічних показників для прогнозування якості харчової продукції, що випускається, доцільно визначати окремі групи мікроорганізмів, які є представниками технічно корисної і технічно шкідливої мікрофлори.

Так, у виробництві сирів періодично визначають гнильні бактерії, які є основними збудниками псування сирів, а також стежать за розвитком корисних мікроорганізмів (молочнокислих і пропіоновокислих бактерій) у процесі вироблення сирів.

7.2 Мікробіологічний контроль якості деяких харчових продуктів

При проведенні мікробіологічного дослідження харчових продуктів у можна керуватися наказом МОЗ України «Про затвердження Мікробіологічних критеріїв для встановлення показників безпечності харчових продуктів»: основні відмінності та пояснення актуальних питань роботи по документу; Державними санітарними нормами та правилами «Медичні вимоги до якості та безпечності харчових продуктів та продовольчої сировини», наказом МОЗ України «Про затвердження Гігієнічних вимог до продуктів дитячого харчування, параметрів безпечності та окремих показників їх якості».

7.2.1 Кремові кондитерські вироби

Креми, які використовують для виготовлення тортів і тістечок, є швидкопсувною продукцією, яка може послужити причиною харчових отруєнь. Крім різних спорових і неспорових бактерій, дріжджів, спор плісняв, у кремах можуть бути присутнім патогенні мікроорганізми. Особливо небезпечний заварний крем, який відрізняється від інших кремів низькою концентрацією цукру, підвищеною вологістю та вмістом борошна. Крім того, що заварний крем швидко закисає в результаті розвитку кислотоутворюючих бактерій, у ньому можуть розмножуватися токсигенний золотавий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) і деякі умовно-патогенні мікроорганізми (наприклад, ентеропатогенні кишкові палички). Слід пам'ятати, що накопичення токсинів у кремових виробах відбувається при температурі від 15 до 22 °С.

Причинами інфікування крему може бути сировина (молоко, вершки, цукор, масло, яйця). Порушення технологічного режиму та санітарних правил при виготовленні та зберіганні крему та кремових виробів приводить до інтенсивного розвитку мікроорганізмів, внесених із сировиною та мікроорганізмів, що попадають у крем у процесі його виробництва, зберігання.

Готові кремові вироби піддають мікробіологічному контролю. КМАФАнМ залежно від виду крему повинно бути не вище значення $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ КУО/г; БГКП не допускаються в 0,01 г; золотавий стафілокок – в 1 г заварного та в 0,01 г вершкового крему. Патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели повинні бути відсутні в 25 г крему.

7.2.2 Маргарин і майонез

Маргарин. Мікроорганізми у виробництві маргарину відіграють двояку роль. Молочнокислі бактерії, які входять до складу водно-молочної фази є корисною мікрофлорою маргарину, тому що надають йому специфічний смак і аромат. Усі інші мікроорганізми, які попадають із сировиною, із зовнішнього середовища є шкідниками виробництва, що знижують якість маргарину і його стійкість при зберіганні. Основними джерелами сторонньої мікрофлори маргарину є компоненти водно-молочної фази, тому що жири та

рослинні олії є несприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів. Мікробне псування маргарину викликають гнильні бактерії, які попадають у маргарин з молоком (викликають відчуття гіркого смаку), гриби, дріжджі, флуоресціюючі бактерії (викликають прогірклий смак і неприємний запах, гриби також є причиною утвору пігментних плям на маргарині), термостійки молочнокислі бактерії (викликають зайво кислий смак). Якість маргарину оцінюється по наявності БГКП – не допускаються в 0,01 г, по вмісту в маргарині дріжджів (не більш 5×10^3 КУО/г) і плісняви (не більш 20 КУО/г). Сальмонели не допускаються в 25 г маргарину.

Майонез. У виробництві майонезу не використовуються промислово корисні мікроорганізми. У цьому продукті може перебувати тільки технічно шкідлива мікрофлора, що попадає в майонез із поверхні встаткування, і залишкова мікрофлора компонентів майонезу. Представники технічно шкідливої мікрофлори майонезу викликають його газоутворення (збудники псування – гетероферментативні молочнокислі бактерії і дріжджі), бомбаж (вздуття) банок (збудник – маслянокислі бактерії роду *Clostridium*), гіркий смак (збудники псування – гнильні бактерії). У маргарині нормується наявність БГКП (не допускаються в 0,1 см³), вміст дріжджів (не більш 5×10^2 КУО/см³), кількість плісень (не більш 10 КУО/см³), наявність сальмонел (не допускаються в 25 см³).

7.2.3 Питне молоко

Мікрофлора питного молока складається із залишкової мікрофлори пастеризованого молока (представлена суперечками бацил і клостридій, а також термостійкими молочнокислими паличками) і мікрофлори вторинного забруднення (бактеріями групи кишкової палички, психрофільними гнильними бактеріями, мезофільними молочнокислими стрептококами та паличками, дріжджами та ін.). Мікроорганізми, що попадають у питне молоко, можуть викликати пороки консистенції, смаку та кольору молока. Для пастеризованого молока в пляшках і пакетах групи А загальна бактеріальна забрудненість (КМАФАнМ) не повинна перевищувати значення 5×10^4 КУО/см³, БГКП і золотавий стафілокок не допускаються в 1 см³ молока, а патогенні мікроорганізми, у т.ч. сальмонели – в 25 см³.

7.2.4 Ковбасні вироби

Ковбаси відносяться до продуктів, які вживаються в їжу без попередньої термічної обробки. У зв'язку із цим ковбаси повинні відповідати високим санітарним вимогам. Джерелами мікрофлори ковбасних виробів є сировина та мікрофлора вторинного забруднення, що попадає в ковбасні вироби в процесі переробки сировини. Тому технологічні процеси вироблення ковбасних виробів спрямовані на додання їм відповідних властивостей і на знищення мікроорганізмів.

Кількісний і якісний склад мікрофлори ковбас залежить від виду та сорту ковбаси. У варених ковбасах, підданих дії високих температур (68-

70 °С усередині батона), гинуть безспоріві бактерії, але залишаються непошкодженими спори та частково кокові форми та одиничні палички, тому що вони бувають захищені шаром жиру. Стійкість ковбасних виробів при зберіганні залежить від вмісту в них вологи, харчової солі, ступені просочення антисептичними речовинами диму, а головне – від мікробного забруднення ковбас. При дотриманні в ковбасному виробництві санітарно-гігієнічних вимог і використанні доброякісної сировини бактеріальна забрудненість свіжовиготовлених готових виробів становить: варених ковбас – 10^3 в 1 г, напівкопчених – 10^2 , ліверних – 10^4 - 10^5 . Псування ковбас викликають молочнокислі бактерії (прокисання ковбас), гнильні не спороутворюючі паличкоподібні бактерії та мікрококи (ослизнення оболонки), цвілі (пліснявіння ковбас) і інші мікроорганізми.

Нормованими мікробіологічними показниками ковбасних виробів є КМАФАнМ, наявність БГКП, золотавого стафілокока, сульфітредукуючих клостридій і патогенних мікроорганізмів, у т.ч. сальмонел.

7.2.5 Сусло та пиво

Виробництво пива ведеться в нестерильних умовах. Тому не виключене попадання в сусло, молоде та готове пиво різноманітних мікроорганізмів.

Мікроорганізми, що розмножуються в суслі та пиві, належать до різних груп – до бактерій, мікроскопічних грибів і дріжджів. По кількості представників і по заподіюваному збиткові перше місце належить бактеріям. Це суслові бактерії (родів *Flavobacterium*, *Zygomonas* і ін.), бактерії, які можуть розмножуватися в суслі та пиві (молочнокислі, оцтовокислі бактерії, пивні сарцини та ін.). Потрапивши у виробництво, вони поступово адаптуються до умов технологічного процесу, видозмінюються й так пристосовуються, що боротьба із цими мікроорганізмами скрутна, а шкода, що ними завдається, може виражатися не тільки в погіршенні стійкості пива, але й у псуванні його смаку аж до повної непридатності. Широке поширення, як шкідники, у вітчизняному пивоварстві також одержали дріжджі. Ці мікроорганізми також, як і бактерії, знижують біологічну стійкість пива та погіршують його смак і аромат. Мікроскопічні гриби, на відміну від бактерій і дріжджів, хоча й часто зустрічаються в пивоварному виробництві, однак рідко викликають його псування. Це пов'язане з тим, що гриби відносяться до аеробних мікроорганізмів, а в процесі зброджування сусла, створюються анаеробні умови.

При оцінці якості пива прийнято проводити мікробіологічний контроль пива на загальну бактеріальну забрудненість (КМАФАнМ) і наявність БГКП.

7.2.6 Овочеві консерви

Залежно від рН і хімічного складу овочеві консерви можна віднести до чотирьох груп:

1. До групи А відносяться консерви, які зазнають стерилізації. До цієї групи відносяться низькокислотні натуральні овочеві консерви із рН 4,2-5,2

(зелений горошок, стручкова квасоля, кукурудза, кольорова капуста та ін.). У консервуємих продуктах групи А допускається присутність невеликої кількості спор непатогенних мікроорганізмів за умови, що ці спори не розвиваються в консервах під час зберігання.

2. До групи Б відносяться неконцентровані томат-продукти, які стерилізуються, та концентровані томат-продукти з нерегульованою кислотністю, які пастеризуються. Технологічний процес термічної обробки томат-продуктів повинен бути відрегульований таким чином, щоб число спор мезофільних клостридій не перевищувало в них 1 спори в 2 см^3 , а термофільних анаеробів було не більше ніж одна спора в 1 см^3 .

3. До групи В відносяться кислотні консерви із рН від 3,7 до 4,2. Такі консерви піддають термічній обробці при $100-110 \text{ }^\circ\text{C}$. Термічна обробка повинна забезпечити загибель газотвірних мезофільних бацил – збудників псування.

4. До групи Г відносяться висококислотні овочеві консерви. Такі консерви піддають пастеризації при $75-100 \text{ }^\circ\text{C}$, тому в залишковій мікрофлорі цих консервів можуть бути присутні мікроскопічні гриби, молочнокислі бактерії, дріжджі та інші мікроорганізми. Пастеризація цих продуктів повинна гарантувати загибель БГКП і сальмонел.

Таким чином, перед тем як проводити мікробіологічне дослідження овочевих консервів потрібно визначити до якої з перерахованих вище груп вони відносяться. Особливо ретельно перевіряють консерви із рН більше 4,2-4,4 у яких можливий розвиток збудників харчових отруєнь.

Припустима загальна бактеріальна забрудненість (КМАФАнМ) консервів перед їх стерилізацією нормується. Загальне число бактерій в 1 г (1 см^3) продукту не повинно перевищувати 10 000-50 000 (залежно від виду продукту), а в консервах для дитячого харчування – 200. Клостридії повинні бути відсутні в $0,5 \text{ см}^3$ вмісту банки. Мезофільних бацил допускається не більше 100-300/г.

При дослідженні готових консервів перевіряють банки на герметичність, термостатують банки при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 5 діб, далі відбирають проби з банок і проводять мікробіологічне дослідження. Збереження нормального зовнішнього вигляду тари після термостатування є одним з показників мікробіологічної стабільності консервів. Вміст дефектних банок з ознаками мікробного псування (кількість таких банок допускається не більш 0,2 %) аналізують для встановлення природи дефекту.

7.2.7 Сухі дитячі суміші

До продуктів дитячого та лікувального харчування пред'являються більш тверді вимоги, чим до продуктів масового споживання. Відповідно, до промислової сировини та компонентів, які використовуються для виготовлення продуктів дитячого харчування, також пред'являються підвищені мікробіологічні вимоги.

Так, у сухих молочних продуктах, призначених для дітей грудного віку, нормуються КМАФАнМ (від 2×10^3 до $2,5 \times 10^4$ КУО/г), кількість плісняви (від 5×10 до 1×10^2 КУО/г), вміст дріжджів (від 10 до 5×10 КУО/г), кількість спор *Vacillus cereus* (не більш 1×10^2 - 2×10^2 КУО/г), не допускається наявність БГКП в 1г, *E. coli* – в 10 г, золотавого стафілококу – в 1-10 г, патогенних мікроорганізмів, у т.ч. сальмонели – в 50-100 г.

7.3 Готування розведень досліджуваного продукту

Для готування розведень використовують пробірки з 9 см^3 стерильної води. Іноді для готування розведень використовуються стерильні розчини розведеного фосфатного буферу, ізотонічного розчину хлориду натрію, пептонної води або лимоннокислого натрію. У першу пробірку стерильною піпеткою вносять 1 см^3 продукту. Новою стерильною піпеткою ретельно перемішують уміст пробірки (розведення 1:10). Потім цією ж піпеткою із пробірки з розведенням 1:10 відбирають 1 см^3 рідини й переносять у другу пробірку з водою (розведення 1:100) (рис. 7).

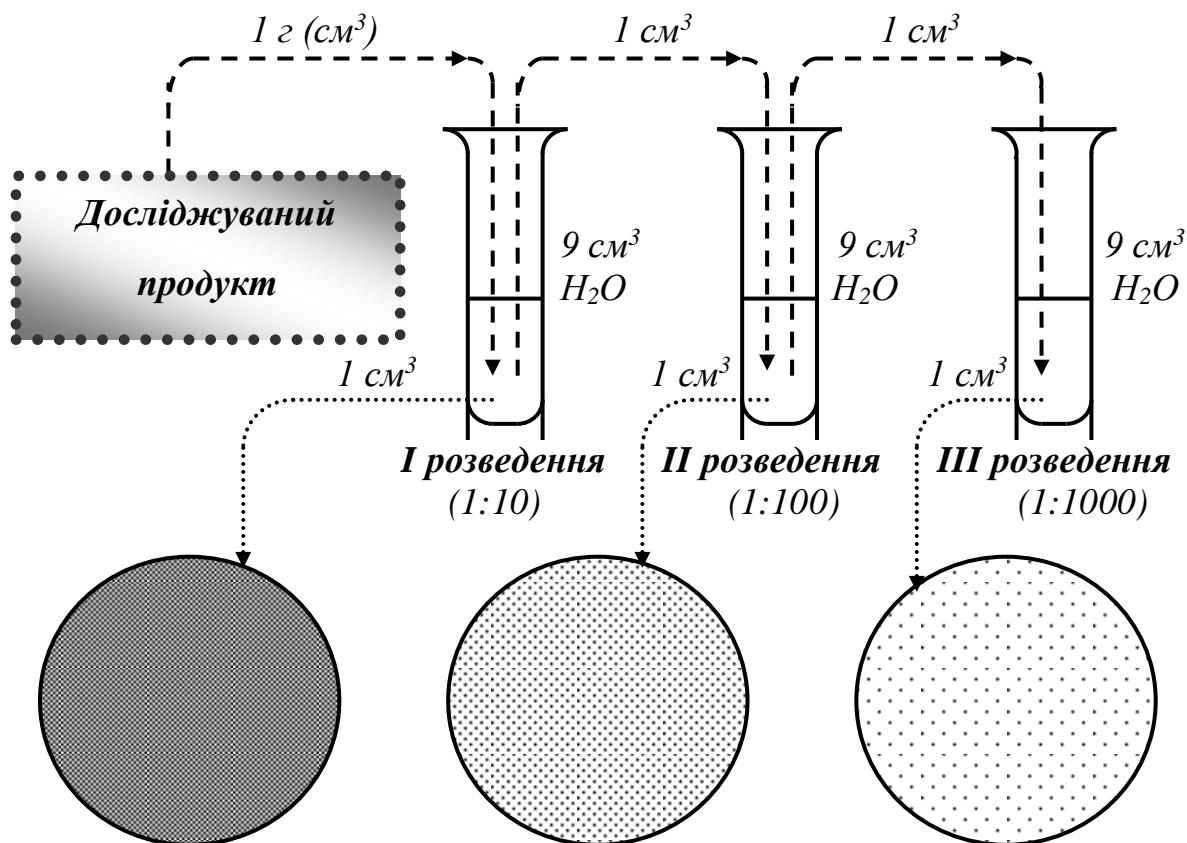


Рис. 7 Схема виготовлення розведення продукту та посіву його в чашки Петрі

Кількість розведень розраховують так, щоб у чашках Петрі виростило від 30 до 300 колоній.

Так, при дослідженні пастеризованого молока рекомендується готувати I, II і III розведення продукту, тому що нормоване значення кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів у питному молоці не більш 50-200 тис. КУО/см³.

Рекомендації при готуванні I розведення (1:10):

– з кондитерських виробів із кремом, з маргарину

1 г крему або маргарину зважують із дотриманням правил асептики та вносять у пробірку з 9 см³ води. Потім пробірку поміщають у водяну баню з температурою 50-55 °С. Витримують пробірку на водяній бані до повного розплавлювання крему. Вміст пробірки ретельно перемішують і для наступних розведень відбирають 1 см³ рідини, що перебуває під шаром масла;

– із продуктів, що мають щільну та неоднорідну консистенцію (наприклад, з ковбасних виробів, овочевих консервів)

1 г середньої проби досліджуваного продукту зважують із дотриманням правил асептики, поміщають у стерильну ступку. У ступку також вносять 9 см³ стерильної води, і матеріал розтирають із піском протягом 10-15 хв поблизу полум'я пальника до одержання однорідної маси. Далі дають суспензіям осісти та відбирають 1 см³ надосадової рідини для готування розведення 1:100.

7.4 Чашкові методи кількісного обліку мікроорганізмів

Сутність чашкових методів кількісного обліку мікроорганізмів полягає в посіві розведень продукту на стерильні щільні живильні середовища в чашки Петрі з наступним культивуванням і підрахунком вирослих у чашках колоній. При цьому вважається, що кожна колонія є результатом розмноження однієї клітки.

Облік результатів при використанні чашкових методів

Кількість вирослих колоній підраховують у кожній чашці, помістивши її нагору дном на темному тлі, користуючись лупою зі збільшенням від 4 до 10 разів. При великій кількості колоній і рівномірному їхньому розподілі дно чашки ділять на сектори, підраховують число колоній в 2-3 секторах, знаходять середньоарифметичне число колоній і множать на розведення (10 – при першому розведенні продукту, 100 – при другому розведенні і т.д.).

Якщо чашки з першим розведенням (1:10) не містять колоній, то результат виражають так: менше 1x10 КУО/см³ (КУО – колонієутворюючі одиниці);

Якщо в чашках Петрі з I розведенням (1:10) знаходиться менше, чим 15 колоній, то результат виражається так: кількість мікроорганізмів менш Mx10 КУО/г, де M – число вирослих колоній;

Якщо кількість колоній більш 15, то підраховують кількість колоній у чашках, множать на розведення й отриманий результат округляють відповідно:

- до числа, кратного 5, якщо кількість колоній у чашці менш 100;
- до числа, кратного 10, якщо кількість колоній у чашці більш 100.

Приклад: Посіяне і розведення продукту 1:10. У чашці Петрі виросло 194 колонії. Отриманий результат округляємо до 200.

Кількість мікроорганізмів у продукті: $200 \times 10 = 2,0 \times 10^3$ КУО/г.

Чашковими методами визначають наступні мікробіологічні показники: КМАФАнМ, кількість спор грибів і дріжджів, вміст гнильних бактерій, коагулазопозитивних стафілококів.

Контрольні питання:

1. Як готуються розведення досліджуваних продуктів?
2. У чому полягає сутність чашкових методів кількісного обліку мікроорганізмів?
3. Як проводиться облік результатів при використанні чашкових методів?
4. В чому сутність методів, які засновані на накопиченні мікроорганізмів з їх наступною ідентифікацією?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №8

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ МЕЗОФІЛЬНИХ АЕРОБНИХ І ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

Ціль роботи: Ознайомитися з методом глибинного посіву та двошаровим агаровим методом для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій, опанувати методику обробки результатів.

При мікробіологічному контролі харчової продукції використовують стандартизовані методи мікробіологічного посіву. Визначають наступні групи мікроорганізмів: мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми; дріжджі, дріжджоподібні та цвілеві гриби; бактерії сімейства *Enterobacteriaceae*; бактерії виду *Staphylococcus aureus*; бактерії виду *Pseudomonas aeruginosa*.

Методи засновані на виявленні та кількісному підрахунку всіх вирослих колоній мікроорганізмів при культивуванні посівів в аеробних умовах при температурі 30 °С протягом 72 ± 3 години у перерахуванні їх кількості на 1 г (см³) досліджуваного продукту.

Для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій вибирають ті розведення, при посіві яких на чашках виростає не менш 15 і не більш 300 колоній.

Посів здійснюють глибинним або двошаровим агаровим методами.

8.1 Метод глибинного посіву

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.3, висівають паралельно у дві чашки Петрі для кожного розведення.

При посіві кришку чашки Петрі злегка відкривають і посівний матеріал вносять на дно чашки. Не пізніше ніж через 15 хвилин після внесення матеріалу, його заливають 15-20 см³ одним із середовищ (м'ясо-пептонним агаром із глюкозою або живильним агаром "МК" із глюкозою), попередньо розплавленим й охолодженим до температури 45 °С. Чашки з посівами, залитими живильним середовищем обережно обертають, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всьому живильному середовищу. Потім чашки з посівами залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання живильного середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 72±3 годин.

8.2 Двошаровий агаровий метод

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.1, вносять у кожну із двох пробірок з 4 см³ одного із середовищ (м'ясо-пептонним агаром із глюкозою або живильним агаром "МК" із глюкозою), попередньо розплавленого та охолодженого до температури 45 °С. Швидко перемішують вміст пробірок і переносять у чашки Петрі із застиглим середовищем, розподіляючи його рівномірно по поверхні середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 72±3 годин.

Перегляд посівів здійснюється щодня.

Результати оцінюються по кожній пробі окремо.

Підраховують кількість колоній на тих чашках, де їх виростало від 15 до 300, підсумують і знаходять середнє арифметичне з них.

Допускається враховувати колонії за допомогою лупи з 5-им збільшенням.

Отримане середнє арифметичне число колоній округляють у такий спосіб:

- якщо число менше 100, то його округляють до найближчого числа, кратного 5;

- якщо число більше 100 і його остання цифра 5, то його округляють до найближчого числа, кратного 20;

- якщо число більше 100 і його остання цифра не 5, то його округляють до найближчого числа, кратного 10.

Кількість мікроорганізмів в 1 г продукту (X) обчислюють за формулою (8.1):

$$X = a \cdot 10^N / q, \quad (8.1)$$

де: a – округлене середнє арифметичне число колоній;

q – обсяг посівного матеріалу, внесеного в чашку, см³;

N – ступінь десятикратного розведення продукту.

Результати аналізу виражаються числом від 1,0 до 9,9, помноженим N на 10, де N – відповідний ступінь десятикратного розведення продукту.

Якщо на чашках з розведенням 1:10 не виявлене росту бактерій, то результат записують так: менш 1,0 x 10 клітин на 1 г (см³).

Якщо на чашках виросло більш 300 колоній, то посіви повторюють, використовуючи більш високі розведення продукту.

Контрольні питання:

1. Які групи мікроорганізмів визначають при мікробіологічному контролі продукції?

2. Які методи використовують при визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?

3. У чому полягає сутність методу глибинного посіву для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?

4. У чому полягає сутність двошарового агарового методу для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?

5. Яким чином оцінюють результати, які отримані при дослідженні?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ДРІЖДЖІВ, ДРІЖДЖОПОДІБНИХ І ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ

Ціль роботи: Ознайомитися з методом глибинного посіву та двошаровим агаровим методом для визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів, опанувати методику обробки результатів.

Методи засновані на виявленні та кількісному підрахунку всіх вирослих колоній мікроорганізмів, типових по макро- і (або) мікроскопічній морфології, на селективному агаризованому живильному середовищі Сабуро, при культивуванні посівів при температурі 30 °С протягом 120±3 годин.

Для визначення кількості дріжджів і цвілевих грибів вибирають ті розведення, при посіві яких на чашках виростає не менш 15 і не більш 150 колоній для дріжджів і не менш 5 і не більш 50 – для плісняви.

Посів здійснюють глибинним або двошаровим агаровим методами.

9.1 Метод глибинного посіву

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.3, висівають паралельно у дві чашки Петрі для кожного розведення.

При посіві кришку чашки Петрі злегка відкривають і посівний матеріал вносять на дно чашки. Не пізніше ніж через 15 хвилин. після внесення матеріалу його заливають 15-20 см³ попередньо розплавленої й охолодженої до температури 45 °С. з агаризованого середовища Сабуро. Чашки з посівами, залитими живильним середовищем, обережно обертають, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всій живильній. середовищу. Потім чашки з посівами залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання живильного середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і інкубують при температурі 30 °С протягом 120±3 годин.

9.2 Двошаровий агаровий метод

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.3, вносять у кожну із двох пробірок з 4 см³ попередньо розплавленого та охолодженого до температури 45 °С агаризованого середовища Сабуро. Швидко перемішують уміст пробірок і переносять у чашки Петрі із застиглим агаризованим середовищем Сабуро, розподіляючи його рівномірно по поверхні середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 120±3 годин.

Результати оцінюються по кожній пробі окремо.

Перегляд посівів здійснюється щодня, попередній облік типових колоній проводять через 72±3 години після витримання посівів у термостаті, а остаточний – через 120±3 годин.

На поверхні щільного середовища ріст і розвиток дріжджів і дріжджоподібних грибів характеризується появою плоских або опуклих колоній білого або кремового, іноді сіро-білого кольору. У глибині агару дріжджі утворюють сочевицеподібні колонії.

Розвиток цвілевих грибів характеризується появою сметаноподібних, слизових колоній різного фарбування з наступним опушенням.

Підраховують усі вирослі колонії, підсумують і знаходять середнє арифметичне з них.

Допускається враховувати колонії за допомогою лупи з 5-м збільшенням.

Отримане середнє арифметичне число колоній, якщо необхідно, округляють як описано в п. 8.2.

Кількість дріжджів і цвілевих грибів в 1 г (см³) продукту обчислюють за п. 8.2.

Контрольні питання:

1. На чому засновані методи визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?
2. Яке середовище використовують для визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?
3. Якими методами здійснюють визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?
4. Які колонії характерні для розвитку дріжджів і дріжджоподібних грибів при використанні двошарового методу посіву?
5. Які колонії характерні для розвитку цвілевих грибів при використанні двошарового методу посіву?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №10

МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ЯКІ ЗАСНОВАНІ НА НАКОПИЧЕННІ БАКТЕРІЙ СІМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE ТА САЛЬМОНЕЛ З ЇХ НАСТУПНОЮ ІДЕНТИФІКАЦІЄЮ

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявленні бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій. Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявленні сальмонел.

Ці методи використовуються для виявлення мікроорганізмів, вміст яких незначний у порівнянні із загальною кількістю мікроорганізмів.

Сутність цих методів полягає в посіві продукту або його розведень на накопичувальні рідкі середовища. Якщо після культивування виявляють ріст мікроорганізмів (утвір осаду, помутніння середовища, накопичення газу в поплавцях), то надалі проводять пересівання із пробірок, у яких помічений ріст на диференційно-діагностичні середовища для ідентифікації виростилих на накопичувальному середовищі мікроорганізмів.

До таких методів відносять визначення наявності БГКП, сальмонел.

10.1 Виявлення та ідентифікація бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*

До сімейства *Enterobacteriaceae* відносяться Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають негативну оксидазную реакцію, ферментують глюкозу з утвором кислоти та відновлюють нітрати в нітроти.

Метод заснований на виявленні бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій за нижченаведеними біохімічними тестами.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ середовища для вирощування бактерій сім. *Enterobacteriaceae* або середовища Мак-Конкі. Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 годин.

При наявності ознак росту на накопичувальних середовищах (помутніння середовища, зміна її кольору) роблять пересівання петлею на чашки Петрі із середовищем Ендо. Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 години.

На середовищі Ендо бактерії сімейства *Enterobacteriaceae* утворюють колонії круглі, малинові з металевим блиском або без нього, рожеві, безбарвні, блискучі, опуклі, діаметром 1-4 мм.

При фарбуванні по Граму спостерігаються Гр⁻ неспорутворюючі палички.

При відсутності росту на середовищі Ендо типових для сімейства *Enterobacteriaceae* колоній вважають, що в зразку немає представників даного сімейства.

Колонії, підозрілі по морфології (кожну окремо), пересівають петлею на одне зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою).

Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 годин. Культури перевіряють на чистоту.

Чисті культури досліджують на наявність ферменту цитохромоксидази, для чого смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на виявлення цитохромоксидази і наносять бактеріологічною петлею або скляною паличкою добову чисту культуру досліджуваних бактерій. Синє фарбування, що з'являється через 2-5 хвилин, свідчить про позитивну оксидазну реакцію.

При негативній оксидазній реакції культури пересівають петлею на середовище для визначення ферментації глюкози і в середовище для визначення здатності відновлювати нітрати в нітрити.

У половину пробірок із середовищем для визначення ферментації глюкози вносять по 0,5 см³ стерильного вазелінового масла. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год. При наявності росту ферментацію глюкози встановлюють по зміні кольору середовища із червоного в жовтий у пробірках з маслом і без нього.

При проведенні О/Ф-тесту посів роблять уколом у два стовпчики із середовищем Х'ю-Лейфсена, один з яких заливають 1 см³ стерильного вазелінового масла. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год. При позитивній реакції відбувається зміна кольору середовища при культивуванні як в аеробних, так і в анаеробних умовах.

Про наявність нітритів у середовищі судять по появі червоного фарбування при внесенні в середовище реактиву Грісса. Для чого до добової досліджуваної культури на середовищі для визначення наявності нітритів доливають 0,2-0,3 см³ реактиву Грісса, занурюючи піпетку до дна пробірки. Поява червоного фарбування свідчить про наявність нітритів.

Якщо в досліджуваному зразку виявлені Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають негативну оксидазну реакцію, ферментують глюкозу з утвором кислоти та відновлюють нітрати в нітроти, це значить, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано бактеріями сімейства *Enterobacteriaceae*.

10.2 Виявлення та ідентифікація сальмонел

Клітини сальмонели – це рухливі (завдяки жгутикам – перитрихіям), аспорогенні грамнегативні прямі палички (0,5-1x1-3 мкм) із закругленими кінцями. Зустрічаються також нерухливі особини та штами, капсулу не утворюють.

Асептично зважені навішення сухих компонентів або стерильно відміряні об'єми рідких компонентів (звичайно 25 г або 25 см³) засівають у колби з магнієвим середовищем або середовищем Мюллера (накопичувальні середовища для сальмонел), дотримуючися співвідношення продукту та середовища не менш 1:9.

Для рідких продуктів допускається використання середовища з подвійною концентрацією інгредієнтів при співвідношенні продукту та середовища 1:1.

Колби з посівами поміщають у термостат з температурою 37 °С на 18-24 години.

Після інкубації в термостаті з колб із накопичувальними середовищами роблять висів на поверхню диференційно-діагностичних середовищ (середовище Плоскірева або вісмут-сульфідний агар). Для одержання окремих колоній петлею беруть мінімальну кількість посівного матеріалу та роблять посів штрихом. Чашки з посівами поміщають у термостат з температурою 37 °С. Перевірку посівів здійснюють двічі: через 24 і 48 год послі інкубації в термостаті.

На середовищі Плоскірева колонії сальмонел безбарвні, прозорі, плоскі, на вісмут-сульфідному агарі – чорні, з характерним металевим блиском, зеленуваті із чорним ободком, при цьому спостерігається профарбовування ділянки середовища під колонією в чорний колір.

При відсутності типових колоній сальмонел на кожній із середовищ кінцевий результат аналізу записують як «негативний», тобто в досліджуваній масі продукту сальмонели відсутні.

При наявності на кожній з живильних середовищ на чашках Петрі типових або підозрілих колоній на сальмонели, продовжують їх подальше вивчення за біохімічними та іншими ознаками.

Контрольні питання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*?
2. Наведіть приклади накопичувальних живильних середовищ для виявлення бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*?
3. Яке селективне живильне середовище використовується для виявлення бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*?
4. Які колонії характерні для бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* вирощених на середовищі Ендо?
5. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації цих бактерій?
6. Які накопичувальні живильні середовища використовують для виявлення сальмонел?
7. Які диференційно-діагностичні середовища використовують для виявлення сальмонел?
8. Які колонії характерні для сальмонел на середовищі Плоскірева та на вісмут-сульфітному агарі?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №11

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявлення бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa* та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій.

Мікроорганізми виду *Pseudomonas aeruginosa* являють собою Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають позитивну оксидазну реакцію, утворюють проникаючий у субстрат пігмент феназинового ряду, що має буруватий відтінок з варіантами від синьо-зеленого (піоціанін) до коричнево-червоного, і здатні до росту при температурі 42 °С.

Метод заснований на виявленні бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa* з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій по нижченаведених біохімічних тестах.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, приготовленого по п. 7.3, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ одного з живильних середовищ (м'ясо-пептонний бульйон із глюкозою, живильний бульйон "МК" із глюкозою, середовище для вирощування *P. aeruginosa*). Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

При наявності ознак росту в накопичувальному середовищі роблять пересівання петлею на чашки з одного з живильного середовища (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою).

Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

При наявності росту зеленуватих, флуоресціюючих колоній, що володіють характерним запахом і офарблюють середовище, з них роблять мазки й офарблюють по Граму.

Колонії, підозрілі по морфології (кожну окремо), пересівають петлею на одну зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою). Посіви інкубують при 37±1 °С протягом 24±3 год. Культури перевіряють на чистоту.

Чисті культури колоній досліджують на наявність цитохромоксидази. Для чого смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на виявлення цитохромоксидази і наносять бактеріологічною петлею або скляною паличкою добову чисту культуру досліджуваних бактерій. Синє фарбування, що з'являється через 2-5 хвилин, свідчить про позитивну оксидазну реакцію.

Оксидазопозитивні колонії пересівають петлею на середовище А і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

На середовищі А культура *Pseudomonas aeruginosa* утворює пігмент феназинового ряду, що має буруватий відтінок з варіантами від синьо-зеленого (піюціанін) до коричнево-червоного й проникаючий у субстрат.

Для додаткового підтвердження приналежності до виду *Pseudomonas aeruginosa* чашки із середовищем А інкубують при температурі 42 °С протягом 24±3 год.

Культура *Pseudomonas aeruginosa* росте у вищевказаних умовах з утвором синьо-зеленого пігменту.

Якщо в результаті досліджень виявлені колонії Гр⁻ неспороутворюючих паличок, що дають позитивну оксидазну реакцію, що утворюють пігмент або без нього, що й дають ріст при 42 °С, вважають, що продукт контаміновано *Pseudomonas aeruginosa*.

Контрольні питання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Які колонії характерні для бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa*?
3. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації цих бактерій?
4. Які результати досліджень дають підставу вважати, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано *Pseudomonas aeruginosa*?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №12

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявлення бактерій виду *Staphylococcus aureus* та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій.

Мікроорганізми виду *Staphylococcus aureus* являють собою G_r^+ коки, що володіють лецитиназною активністю, зброджують манніт в аеробних і анаеробних умовах або мальтозу в анаеробних умовах, дають позитивну реакцію плазмокоагуляції.

Метод заснований на виявленні бактерій виду *Staphylococcus aureus* з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій по нижченаведених біохімічних тестах.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, приготовленого по п. 7.3, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ одного з живильних середовищ (сольовий бульйон, жовтково-сольовий агар). Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 годин.

При наявності ознак росту роблять пересівання петлею на чашки з одним із середовищ: жовтково-сольовий агар або Байрд-Паркер агар, або маннітно-сольовий агар. Посіви на жовтково-сольовий і Байрд-Паркер агар інкубують при температурі 37 °С протягом 48±3 год, а посіви на маннітно-сольовий агар – протягом 24-48±3 год.

При рості на жовтково-сольовому агарі *Staphylococcus aureus* утворює круглі колонії, що злегка піднімаються над поверхнею агару, діаметром 2-2,5 мм з рівними краями, пофарбовані в жовтий, золотавий, кремовий, палевий або білий цвіт, оточені зоною лецитиназної активності.

На середовищі Байрд-Паркер *Staphylococcus aureus* росте у вигляді чорних блискучих колоній діаметром 1-1,5 мм, оточених зоною лецитиназної активності.

Наявність на маннітно-сольовому агарі колоній, оточених жовтими зонами, свідчить про здатність цих мікроорганізмів ферментувати манніт.

З підозрілих по морфології колоній роблять мазки та офарблюють по Граму. Стафілококи по Граму офарблюються позитивно, мають кулясту або близьку до неї форму з діаметром 0,6-1,0 мкм і розташовуються звичайно у вигляді скупчень, що нагадують грону винограду.

При виявленні G_r^+ коків роблять пересівання на одну зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою). Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год.

Виділену чисту культуру пересівають у середовище Гісса з маннітом або мальтозою, розлиту високим стовпчиком (посів роблять уколом). Інкубують при 37 °С протягом 24±3 годин.

У випадку росту стафілококів на середовищі Гісса з манітом або мальтозою спостерігається ферментація або окиснення вуглеводу, що супроводжуються зміною кольору середовища.

Виділену чисту культуру досліджують на наявність ферменту плазмокоагулази.

Для проведення реакції в стерильну пробірку з 0,5-1,0 см³ плазми крові кролика, розведеної в 3-4 рази або приготовленої із сухого препарату промислового виробництва, вносять одну петлю добової агарової культури. Одну пробірку із плазмою крові залишають незасіяною для контролю. Вміст пробірок перемішують і інкубують при 37 °С протягом 24±3 год. Результат ураховують через 2, 4, 6 і 24 год.

При відсутності згортання плазми через 24 години досліджувану культуру відносять до коагулазонегативної.

Реакцію вважають позитивною при утворі навіть невеликого згустку.

Якщо в результаті досліджень виявлені колонії Гр⁺ коків, що ферментують манніт в аеробних і анаеробних умовах або мальтозу в анаеробних умовах, володіють лецитиназною активністю, дають позитивну реакцію плазмокоагуляції, вважають, що продукт контаміновано *Staphylococcus aureus*.

Контрольні питання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій виду *Staphylococcus aureus*?
2. Які колонії характерні для бактерій виду *Staphylococcus aureus* при рості на жовтково-сольовому агарі?
3. Які колонії характерні для бактерій виду *Staphylococcus aureus* при рості на середовищі Байрд-Паркер?
4. Який вигляд мають стафілококи офарблені по Граму?
5. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації для бактерій виду *Staphylococcus aureus*?
6. Яким чином виділену чисту культуру досліджують на наявність ферменту плазмокоагулази?
7. Які результати досліджень дають підставу вважати, що продукт контаміновано *Staphylococcus aureus*?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Ціль роботи: ознайомитися з принципами санітарної мікробіології, освоїти основні методи, вивчити основні показники мікробіологічного забруднення навколишнього середовища.

Санітарна мікробіологія – розділ медичної мікробіології, який займається вивченням мікрофлори різних об'єктів навколишнього середовища і їх впливом на організм людини, а також прямою та непрямою оцінкою забруднення навколишнє середовища мікробіологічними об'єктами. Дана наука стоїть на границі медичної мікробіології, епідеміології, гігієни, харчової мікробіології.

Об'єкти дослідження санітарної мікробіології:

- Різні поверхні – під, стеля, стіни; робоча поверхня, поверхня шкіри і т.д.

- Вода питна, технічна, водопровідна і т.д.

- Ґрунт.

- Харчові продукти.

- Слизові оболонки людей (особливо медичного персоналу).

Санітарна мікробіологія базується на ряді принципів.

Принцип узяття проб. Вони повинні бути відібрані в стерильних умовах і швидко доставлені в лабораторію. Умови, у яких вони транспортуються, не повинні бути ні сприятливими для розмноження мікроорганізмів, ні такими, що приводять до їхньої загибелі.

Для таких цілей існують спеціальні консервуючі середовища (транспортні).

Принцип повторності аналізів. Справа в тому, що мікроорганізми (як патогенні, так і санітарно-показові) поширені в навколишньому середовищі нерівномірно. У зв'язку із цим необхідно відбирати кілька проб з одного місця та серію проб з різних місць досліджуваного об'єкта. Крім цього, сполука мікроорганізмів може змінюватися згодом, тому з того самого об'єкта потрібно відбирати проби в різний час.

Принцип стандартності. Уся санітарна мікробіологія побудована на стандартних методиках, прописаних у безлічі нормативних документів (ДСТУ, СанПін, МУК). Усі процедури потрібно проводити, неухильно дотримуючись норм і правил для коректного аналізу, а також для можливості коректного порівняння результатів з відомими показниками.

Принцип комплексності. Не можна судити про забруднення об'єкта тільки за результатами одного тесту. Необхідно проводити кілька різноманітних досліджень як для якісного, так і для кількісного аналізу досліджуваного об'єкта.

Усі методи санітарної мікробіології можна підрозділити на прямі, при яких знаходять безпосередньо патогенні мікроорганізми або їх токсини, і непрямі, при яких знаходять санітарно-показові мікроорганізми, що служать індикаторами мікробіологічного забруднення середовища. У силу того, що патогенні мікроорганізми пристосовані до проживання усередині організму-хазяїна й слабо пристосовані (більшість) до умов зовнішнього середовища, прямі методи дослідження не можуть дати повноцінну відповідь.

Для зручності роботи в санітарній мікробіології виділяють групу санітарно-показових мікроорганізмів (СПМ). У неї включаються умовно-

патогенні мікроорганізми, що входять до складу нормальної мікрофлори й у нормі, та виділяються в зовнішнє середовище різними способами. Самі по собі ці мікроорганізми для людей з нормальною імунною системою небезпеки не представляють. Однак, на відміну від патогенних мікроорганізмів, вони здатні довше зберігатися в зовнішньому середовищі та служити індикаторами мікробіологічного забруднення об'єкта. Тобто чим більше знаходять СПМ у середовищі, тем імовірніше її забруднення патогенними мікроорганізмами.

До СПМ першої групи відносять бактерії групи кишкової палички (БГКП, коліморфні бактерії) – *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* і інші представники сімейства *Enterobacteriaceae*.

Наявність бактерій цієї групи свідчить про фекальне забруднення досліджуваного об'єкта. Крім цього, наявність грампозитивних клітин бактерій роду *Enterococcus* свідчить про недавнє фекальне забруднення, тому що ці бактерії в зовнішньому середовищі гинуть досить швидко.

До СПМ другої групи відносять стафілококи, стрептококи, що зеленять (альфа-гемоліз), гемолізуючі стрептококи (бета-гемоліз) і трохи інших. Усі ці мікроорганізми виділяються в зовнішнє середовище з верхніх дихальних шляхів і носоглотки людини. Наявність бактерій даної групи є показником повітряно-краплинного забруднення досліджуваного об'єкта.

До третьої групи СПМ відносять протей (*Proteus*), термофіли, нітрифікатори. Усі ці мікроорганізми не є складовою мікрофлори людини, але враховувати їх наявність і кількість у зовнішньому середовищі необхідно, тому що вони є показниками забруднення, що розкладають органічними субстратами.

Існує безліч непрямих методів оцінки забруднення навколишнього середовища мікроорганізмами. ЗМЧ [КУО/мл, КУО/г, КУС/м³] – загальне мікробне число – це кількість «усіх» мікроорганізмів в 1 мл рідині або 1 г твердої речовини. Враховують це число простим підрахунком вирослих колоній на м'ясопептонному агарі (МПА). Природно, у подібних умовах ростуть не всі мікроорганізми, а лише аеробні або факультативно-анаеробні мезофільні бактерії, які здатні рости на МПА. Але саме подібні бактерії й становлять інтерес для санітарної мікробіології.

Титр – це найменший об'єм/маса досліджуваного зразка, у якому втримується хоча б одна клітка СПМ.

Індекс – кількість СПМ в 1 л (повітря/рідин) або в 1 г твердого зразка. Це показник, зворотний титру.

Для визначення СПМ існують спеціалізовані диференційно-діагностичні середовища. Подібні середовища містять у собі індикатор, що міняє колір середовища при зміні рН (це відбувається внаслідок метаболізму певних бактерій).

Крім того, диференційними ознаками можуть виступати газоутворення або утвор сірководню. Для виділення кожної конкретної групи мікроорганізмів існує величезна кількість диференційно-діагностичних

середовищ. Як приклад буде розглянутий агар Клигlera – диференційно-діагностичне середовище для ідентифікації ентеробактерій за їх здатністю ферментувати (зброджувати) глюкозу, лактозу, а також за їх здатністю утворювати газ і сірководень. Ріст різних мікроорганізмів і їх ознаки зазначені в табл. 1. Таблиця взята з інструкції до готового комерційного середовища.

Таблиця 1 – Ріст різних бактерій на агарі Клигlera*

Тест-штам	Зкос	Столбик	Газ	H ₂ S
<i>Citrobacter freundii</i>	Ж	Ж	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Ж	Ж	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ж	Ж	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ж	Ж	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Ч	Ж	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	Ч	Ж	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	Ч	Ж	+	-
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	Ч	Ж	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	Ч	Ж	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	Ч	Ж	-	-

*Ж – жовтий колір, Ч – червоний колір

13.1 Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря

Чашки Петрі із МПА відкрити та залишити на годину, бажано на рівні сидячої або стоячої людини. Під впливом гравітації бактерії та їх частки осідають на поверхні живильного середовища.

Чашки закрити та поставити в термостат на 37 °С на добу. Після закінчення доби можна також поставити чашки на другу добу в термостат з температурою 25 °С.

Підрахувати кількість вирослих колоній. Якщо їх менш 250, повітря вважається чистим, при кількості колоній від 250 до 500 – помірно забрудненим, і при кількості колоній більше 500 – забрудненим.

Для порівняльного аналізу можна одночасно досліджувати повітря в різних приміщеннях.

13.2 Санітарно-бактеріологічне дослідження води

Зробити відбір матеріалу в стерильні ємності із прикріпленою стерильною запасною кришкою. Взяти проби водопровідної води після попередньої стерилізації поверхні крана та десятихвилинного пропуску води. Воду з відкритих водойм беруть із глибини 10-15 см від поверхні та 10-15 см від дна.

Визначити ЗМЧ води посівом у дві чашки Петрі із МПА двох об'ємів води (наприклад, 0,1 і 0,01 мл) залежно від її передбачуваного забруднення. Посів слід робити на розплавлене та охолоджене до 45–50 °С середовище. Після посіву середовище необхідно ретельно перемішати. Середовище

помістити в термостат (37 °С) на добу, після чого підрахувати кількість колоній, що з'явилися, і визначити ЗМЧ води. Питна води є чистою при ЗМЧ менше 100.

13.3 Санітарно-бактеріологічне дослідження змивів

Зробити відбір проб за допомогою стерильних одноразових зондів або саморобних зволжених стерильних тампонів.

Для вивчення підійде будь-яка поверхня – руки, телефони, ручки дверей, унітази, робочі поверхні і т.д.

Відразу після забору матеріалу його слід засівати на живильні середовища. У цьому випадку можна користуватися як чашками Петрі, так і зкошеним агаром. Вибір середовищ для дослідження також нічим не обмежений – МПА, сольовий агар для виявлення бактерій роду *Staphylococcus*; агар Ендо, агар Кліглера, цитратний агар Симмонса та багато інші для виявлення та ідентифікації ентеробактерій; середовище Сабуро з теллуридом калію для виявлення грибів.

Засіяні чашки Петрі та пробірки інкубувати у термостаті протягом доби при температурі 37 °С. Після цього вирости колонії ідентифікувати залежно від конкретного середовища.

Контрольні питання:

1. Що таке санітарно-показові мікроорганізми і якими властивостями вони володіють?
2. Для чого в сучасному суспільстві потрібна санітарна мікробіологія?
3. Які принципи лежать в основі забору проб при дослідженнях у рамках санітарної мікробіології?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

Ціль роботи: освоїти різні методи виявлення чутливості бактерій до антибіотиків.

Історія антибіотиків почалася в ХХ ст. Першими виявив антибактеріальні властивості екстрактів цвілевих грибів італієць Вінченцо Тиберіо, але його відкриття не взяли до уваги.

Першовідкривачем першого антибіотика пеніциліну вважається Олександр Флемінг. Своє відкриття він зробив фактично випадково в 1928 р., але не зміг виділити досить чистий пеніцилін.

Тільки в 1940-1941 рр. Ернсту Чейзу та Говарду Флорі вдалося виділити чистий пеніцилін у достатній кількості та успішно вилікувати пацієнта. Після цього виробництво пеніциліну було поставлено на потік, а

вчені по усьому світу стали шукати речовини, що володіють подібними властивостями. В 1945 р. Флемінгу, Чейзу та Флорі була присуджена Нобелівська премія в області фізіології і медицини за відкриття пеніциліну і його цілющого впливу при різних інфекційних хворобах.

Масове застосування пеніциліну в Другу світову війну та пізніше врятувало мільйони життів. Але незабаром виявилось, що бактерії здатні здобувати стійкість до антибіотиків. Особливості генетичної системи бактерій, здатність до горизонтального переносу генів і неконтрольоване приймання антибіотиків людьми привели до швидкого поширення стійких до антибіотиків збудників різних захворювань. І дотепер триває «гонка озброєнь» між ученими, що шукають нові антибіотики або модифікують старі, і бактеріями, які успішно пристосовуються до цих антибіотиків.

Методи визначення чутливості бактерій до антибіотиків використовуються для досягнення двох цілей:

- визначення чутливості клінічних ізолятів для призначення адекватної антибіотикотерапії.

- визначення чутливості музейних штамів і клінічних ізолятів для тестування перспективних протимікробних препаратів.

Антибіотиками в класичному значенні називають речовини природного походження, які здатні в малих концентраціях пригнічувати ріст мікроорганізмів або викликати їх загибель. Також існують синтетичні антибактеріальні засоби, що відрізняються від антибіотиків за походженням. Як видно з визначення, антибіотики можуть мати бактеріостатичну (пригнічувати ріст мікроорганізмів) і бактерицидну (викликати загибель мікроорганізмів) дію.

Антибіотики класифікують за механізмом дії в такий спосіб:

- ті, що гальмують синтез клітинних стінок бактерій – бета-лактами (пеніциліни, цефалоспорини), глікопептиди (ванкоміцин).

- ті, що порушують функції цитоплазматичної мембрани – поліміксини.

- ті, що порушують синтез білка – аміноглікозиди, тетрацикліни, макроліди, феніколи.

- ті, що гальмують синтез нуклеїнових кислот – фторхінолони, сульфаламіди.

Основною метою визначення чутливості є виявлення мінімальної інгібуючої (гнітючої) концентрації антибіотика – МІК (МГК). Методи визначення чутливості до антибіотиків підрозділяють на кілька груп:

1. Дифузійні, які засновані на міграції антибактеріального препарату із твердотелої фази на живильні середовища із бактеріями.

- Метод дисків. На тверде середовище в чашці Петрі вносять певний об'єм бактеріальної культури (звичайно відповідний 0,5 стандарту мутності по МакФарланду, що рівно $1-2 \times 10^8$ КУО/мл). Потім поміщають на поверхню цього середовища диски з відомими концентраціями розчину антибіотика. Далі відбувається дифузія антибіотика в агар. Якщо бактерія чутлива до такої концентрації даного антибіотика, то її ріст зупиняється,

тобто навколо диска утворюється зона придушення росту мікроорганізмів (рис. 8). Чим вона більше, тим більшою ефективністю володіє антибіотик. Відсутність зони придушення росту говорить про повну резистентність даного штаму мікроорганізму до конкретної концентрації досліджуваного антибіотика.



Рис. 8 Диско-дифузійний метод визначення чутливості до антибіотика

- Е-Тести засновані на тому ж принципі, що й метод дисків, різниця лише в тому, що на один відрізок паперу нанесені антибіотики зі зростаючою концентрацією. Ріст бактерій навколо зони з низькою концентрацією антибіотика нічим не обмежений, але в міру наближення до високих концентрацій через дифузію антибіотика в агар зона росту еліпсоїдно зменшується (рис. 9). У місці закінчення зони росту, тобто її перетинання зі смужкою Е-Тесту, перебуває мінімальна інгібуюча концентрація даного антибіотика до даного ізоляту бактерій.

Е-Тести використовуються тільки для з'ясування чутливості невідомих ізолятів до відомих антибіотиків. На відміну від диско-дифузійного методу, їх можна купити тільки в готовому виді із уже нанесеним антибіотиком.

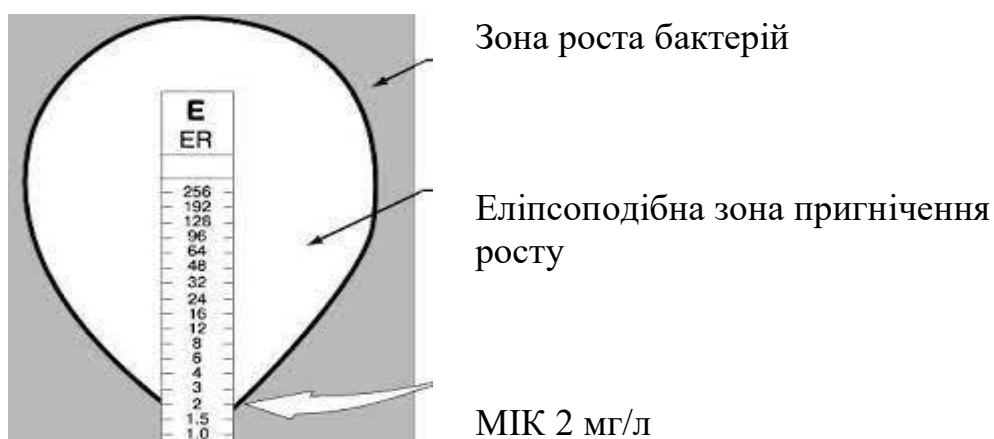


Рис. 9. Метод Е-Тестів

2. Методи розведення засновані на послідовному розведенні розчину досліджуваного речовини та дослідженні його дії на рідкі або тверді

культури мікроорганізмів. У випадку з рідкими культурами готують серію розведень антибіотика в живильному середовищі, після чого в це живильне середовище вносять суспензію культури клітин (звичайно відповідну до стандарту мутності 0,5 МакФарланда). Середовище інкубують добу при 37 °С і дивляться на його помутніння. При наявності помутніння роблять висновок, що дана концентрація антибіотика неефективна проти даного штаму мікроорганізму. Перша ж незамутнена пробірка вказує на мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотика (рис. 10).

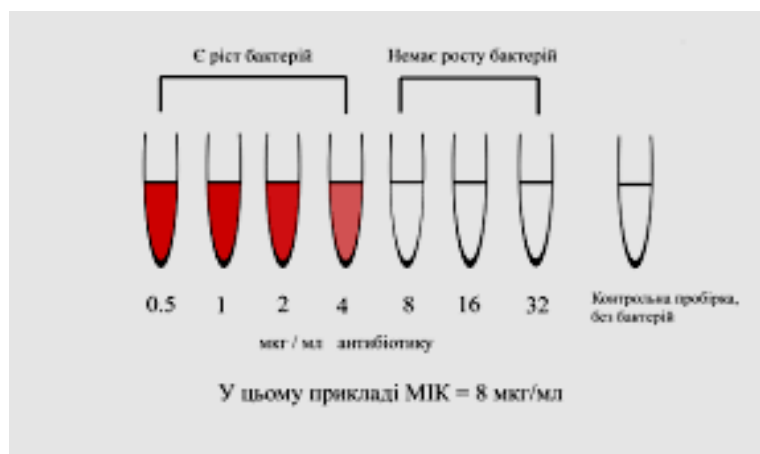


Рис. 10 Серійні розведення в рідкому живильному середовищі

Етапи виконання лабораторної роботи:

1. Готування стандарту мутності 0,5 по МакФарланду. Приготувати 0,5 мл BaCl_2 у концентрації 0,048 моль/л (1,175 % розчин $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Перемішуючи, повільно додати 99,5 мл розчину 0,18 моль/л (1 %) H_2SO_4 до одержання однорідного розчину.

Перевірити правильність готування розчину на спектрофотометрі: кювету 1 см, довжина хвилі 625 нм. У таких умовах поглинання повинне становити 0,08-0,1.

Розлити отриманий розчин по 5 мл у пробірки, які щільно закриваються кришками, щоб уникнути випару. Пробірки повинні бути такого ж діаметра, як і ті, у яких буде перебувати суспензія досліджуваної культури.

2. Установлення чутливості диско-дифузійним методом.

В асептичних умовах рівномірно розсіяти суспензію досліджуваної культури по поверхні чашок Петрі. Слід використовувати інокулюм, що відповідає за оптичною щільністю 0,5 по стандарту Макфарланда. У контрольній чашці Петрі без додавання антибіотиків через добу повинен вирости «газон» – культура повинна покрити всю поверхню живильного середовища.

Стерильним пінцетом помістити диски з різними концентраціями антибіотиків на поверхню чашок Петрі. Диски не повинні розташовуватися ближче 20 мм від краю чашки. Їх слід акуратно пригорнути пінцетом до

поверхні агару та не переміщати після нанесення. Перевернути чашки Петрі та інкубувати їх у термостаті при 35 °С добу.

Наступного дня переглянути чашки Петрі на наявність зон відсутності росту бактерій навколо дисків, зрівняти з контрольними зразками. Виміряти діаметр цих зон, занести дані у робочий зошит.

Побудувати графік залежності діаметра зони відсутності росту бактерій від концентрації антибіотика, розрахувати МІК. Внести дані в табл. 2.

3. Установлення чутливості методами розведення.

Приготувати серію розведень робочого розчину антибіотика в живильному середовищі. Для цього самплером додати 0,5 мл вихідного розчину антибіотика до 0,5 мл рідкого живильного середовища, ретельно перемішати, поміняти наконечник і повторити процедуру з наступною пробіркою. З останньої пробірки 0,5 мл слід вилучити.

Приготувати суспензію культури кліток, еквівалентну 0,5 по стандарту мутності Макфарланда.

В асептичних умовах інокулювати кожен пробірочку з живильним середовищем і антибіотиком 0,5 мл виготовленої суспензії. Інкубувати пробірочки в термостаті при 37 °С 18-24 год. Поставити негативний контроль для кожного антибіотика та зберігати його в холодильнику при +4 °С.

Кожну пробірочку візуально на світлі зрівняти з контрольною пробірочкою, що зберігалася в холодильнику. Відзначити МІК даного антибіотика стосовно даного штаму бактерії по відсутності видимого помутніння середовища, внести дані в таблицю (табл. 2).

Таблиця 2 – МІК антибіотиків для бактерій

Бактерія	Антибіотик	МІК (метод дисків)	МІК (метод розведення)
<i>Esherichia coli</i>	Ампіцилін Ріфампіцин Бензилпеніцилін		
<i>Bacillus subtilis</i>	Ампіцилін Ріфампіцин Бензилпеніцилін		

Контрольні питання:

1. У чому причини появи бактерій, які стійкі до антибіотиків?
2. Якими діями стосовно бактерій володіють антибіотики?
3. Які існують методи визначення чутливості бактерій до антибіотиків?
4. В чому полягає сутність дискового методу?
5. Що таке Е-Тест?
6. У чому полягає сутність методу серійних розведень?

ДОДАТОК

ГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ РЕАКТИВІВ І ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Для приготування розчинів реактивів і живильних середовищ використовують дистильовану воду, якщо немає спеціальних вказівок, і реактиви кваліфікації "х.ч." або "ч.д.а."

Необхідне значення рН розчинів і живильних середовищ установлюють за допомогою розчину гідроокису натрію, розчин концентрації NaOH 0,1 моль/дм³ або розчину соляної кислоти, розчин концентрації HCl 0,1 моль/дм³.

Значення рН розчинів визначають методом потенціометрії при температурі 20±2 °С.

Орієнтовне визначення рН розчинів і живильних середовищ допускається проводити за допомогою індикаторного паперу.

Ізотонічний 0,85%-ий розчин хлористого натрію (фізіологічний розчин)

0,85 г хлористого натрію розчиняють в 100 см³ дистильованої води й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв.

Зберігають при кімнатній температурі не більш 14 діб.

Розчин твіну-80

1,0 г або 4,0 г твіну-80 розчиняють відповідно в 99 см³ або в 96 см³ фізіологічного розчину, фільтрують через ватно-марлевий фільтр і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв.

Зберігають при кімнатній температурі не більш 14 діб.

Розчин фенолового червоного масовою концентрацією 1 %

1,0 г фенолового червоного розтирають у ступці, додаючи невеликими порціями 28,2 см³ розчину натрію гідроокису масовою концентрацією 0,01 моль/дм³. Розчин переносять у мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять водою до мітки.

Зберігають у флаконі з темного скла при температурі 4-10 °С.

Розчин малахітового зеленого масовою концентрацією 0,5%

0,5 г малахітового зеленого поміщають у стерильний флакон, заливають 100 см³ гарячої дистильованої води та поміщають на добу в термостат з температурою 37 °С, періодично перемішуючи.

Зберігають у флаконі з темного скла при температурі 4-10 °С.

Реактив Грісса

Розчин N 1: 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють в 30 см³ крижаної оцтової кислоти, додають 100 см³ води, фільтрують через паперовий фільтр. Розчин придатний протягом місяця.

Розчин N 2: 0,1 г 1-нафтиламіну розчиняють в 100 см³ киплячої води, прохолоджують, додають 30 см³ крижаної оцтової кислоти, фільтрують через паперовий фільтр. Розчин придатний протягом 7 діб.

Перед використанням змішують рівні об'єми розчинів N 1 і N 2.

Реактив для визначення наявності ферменту цитохромоксидази

Розчин N 1: 1,0 г 1-нафтолу розчиняють в 100 см³ етилового спирту.

Розчин N 2: 1,0 г N, N-діметил-n-Фенілендіаміну дигідрохлориду розчиняють в 100 см³ дистильованої води.

Перед використанням змішують розчини N 1 і N 2 у співвідношенні 2:3.

Зберігають у флаконах нейтрального світлозахисного скла при температурі 4-10 °С протягом 14 діб.

Середовища для культивування аеробних і факультативно-анаеробних бактерій

М'ясо-пептонний агар із глюкозою

Пептон	10,0 г
Натрію хлорид	1000 см ³
М'ясна вода	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г

Усі інгредієнти розчиняють у м'ясній воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлювання, установлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони та стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Живильний агар "МК" із глюкозою

Бактофок-Мк	20,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлювання, установлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони та стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовища для культивування дріжджів і мікроскопічних грибів

Синтетичне середовище Рідер для дріжджів

Сульфат амонію	3 г
Сульфат магнію	0,7 г
Нітрат кальцію	0,04 г
Хлорид натрію	0,5 г
Фосфорнокислий калій однозаміщений	1,0 г
Фосфорнокислий калій двозаміщений	0,1

Початкове значення рН середовища 6,6. Для вивчення розмноження дріжджів додають 2% цукру, для дослідження бродіння 5-10%. Повне синтетичне середовище містить також вітаміни (у мкг/мл): інозит 5, біотин 0,0001, пантотенову кислоту 0,25, тіамін 1,0, піридоксин 0,25, нікотинову кислоту 0,5. Стерилізують середовище в автоклаві при 0,1 Мпа.

Картопляно-глюкозний агар

Очищену та нарізану скибочками картоплю масою 200 г заливають 1 л дистильованої води та кип'ятять протягом 1 години. Відвар фільтрують, до фільтрату додають воду до первісного об'єму, 2% глюкози та 2-3% агар-агару. Середовище розливають у пробірки або колби й стерилізують при 0,1 Мпа протягом 10 хв. При вживанні встановлюють рН 3,5 за допомогою 10%-го стерильного розчину безводної лимонної кислоти.

Синтетичне середовище Чапека для грибів

Сахароза або глюкоза	30 г
Дигідрофосфат калію	1,0 г
Нітрат натрію	2,0 г
Сульфат магнію	0,5 г
Хлорид калію	0,05 г
Сульфат заліза	0,1 г
Агар мікробіологічний	20 г

Наважку агару вилужують і додають до зазначених інгредієнтів, попередньо розчинених в 1 л дистильованої води, прогрівають текучою парою, встановлюють рН 4,0-5,5 10%-м розчином лимонної кислоти або гідроксиду натрію. Фільтрують, розливають у пробірки та стерилізують дрібно текучою парою 3 доби по 30 хв.

Повне середовище з лізином для виявлення недосконалих дріжджів

Глюкоза	50 г
Сульфат магнію	1 г
Дигідрофосфат калію	2 г
Лактат калію	12 см ³ 50% розчину
L(+) моногідрат лізину	1 г
Агар мікробіологічний	20 г
Вітамінний розчин на 100 см ³ стерильної дистильованої води	
Інозитол	2 г
Пантотенат кальцію	0,4 г
Нікотинамід	0,5 г
Хлоргідраттіамин	0,1 г

Усі інгредієнти розчиняють у 1 дм³ водопровідної води, вносять вітамінний розчин, установлюють рН середовища 5,0-5,2. Середовище розливають у пробірки й стерилізують при температурі 121 °С 15 хв при 0,1 Мпа. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище з ацетатом для виявлення недосконалих дріжджів

Ацетат натрію	10 г
Хлорид амонію	10 г
Глюкоза	5 г
Дріжджовий автолізат	3 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, розливають у пробірки та стерилізують при температурі 121 °С протягом 30 хв при 0,05 Мпа. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище для вирощування грибів (середовище Сабуро)

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза або мальтоза	40,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 5,8, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони та стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище Сабуро рідке

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза або мальтоза	40,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 5,8, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони та стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища збагачення для бактерій сем. Enterobacteriaceae

Середовище для вирощування бактерій сем. Enterobacteriaceae

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрію фосфат двузаміщений	7,5 г
Калію фосфат однозаміщений	2,5 г
Феноловий червоний	0,08 г
Малахітовий зелений	0,015 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу й солі розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, додають 8 см³ 1%-го розчину фенолового червоного та 3 см³ 0,5%-го малахітового зеленого, установлюють рН 7,5, нагрівають до повного розчинення компонентів, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Мак-Конки

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Лактоза	10,0 г
Жовч суха	5,0 г
Бромкрезоловий пурпурний	0,01 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення компонентів, установлюють рН 7,5, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони та стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Живильні середовища для ідентифікації бактерій сім. *Enterobacteriaceae*

Агар Ендо

Середовище приготують, як зазначено на етикетці або по наступному пропису.

До 100 см³ живильного агару, дотримуючи правила асептики, додають замість глюкози 1 г лактози, розчиненої в 5 см³ стерильної води, і підігривають на киплячій водяній лазні протягом 5 хвилин.

В окрему пробірку наливають 1,0 см³ насиченого спиртового розчину фуксину основного, до якого додають свіжоприготовлений водяний розчин натрію сірчистокиислового масовою концентрацією 10 % до знебарвлення фуксину (блідо-рожевий колір). Отриману суміш додають у розплавлений лактозний агар, перемішують, уникаючи вспінювання, і розливають у чашки Петрі. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 5 діб.

Середовище для визначення ферментації глюкози

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза	40,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Феноловий червоний	0,08 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу та натрію хлорид розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, додають 8 см³ 1 %-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., фільтрують і розливають у пробірки з поплавцями по 4-5 см³. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Потім якнайшвидше прохолоджують середовище. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для визначення відновлення нітратів у нітрити

Пептон або Бактофок-Мк	5,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калію нітрат	1,5 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді при нагріванні, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., фільтрують через паперовий фільтр і розливають у пробірки по 4-5 см³. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Х'ю-Лейфсена

Пептон або Бактофок-Мк	2,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калій фосфорнокислий двузаміщений	0,3 г
Бромтимоловий синій	0,03 г
Агар мікробіологічний	3,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Інгредієнти розчиняють у воді, додають заздалегідь замочений агар, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, кип'ячать 2-3 хв., встановлюють рН 7,4, додають 3 см³ 1 %-го водяного розчину бромтимолового синього. Середовище фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у пробірки по 10-15 см³ і стерилізують при температурі 112 °С протягом 15 хв. Колір середовища до автоклавування – синій, після – трав'янисто-зелений. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища для вирощування *Pseudomonas aeruginosa*

М'ясо-пептонний бульйон із глюкозою

Пептон	10,0 г
М'ясна вода	1000 см ³
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г

Усі інгредієнти розчиняють у м'ясній воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, встановлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

6.4.11.2. Живильний бульйон "МК" із глюкозою

Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення компонентів, встановлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище для вирощування *P. Aeruginosa*

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза	2,5 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калій фосфорнокислий двузаміщений	2,5 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу й натрію хлорид розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, установлюють рН 7,3, кип'ятять 1 хв., фільтрують через паперовий фільтр і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для виявлення пігменту піоціаніну (Середовище А)

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Магнію хлорид безводний	5,0 г
Калію сульфат безводний	1,0 г
Гліцерин	10,0 см ³
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти, крім гліцерину, розчиняють у воді й залишають на 15 хв. Потім вносять гліцерин, ретельно перемішують, розчиняють при нагріванні, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлення, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища для вирощування та ідентифікації *Staphylococcus aureus*

Сольовий бульйон

В 1000 см³ м'ясо-пептонного бульйону або живильного бульйону "МК" вносять 65,0 г натрію хлористого, перемішують до повного розчинення солі, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Жовтково-сольовий агар

Емульсія яєчно-жовткова: куряче яйце протирають ватою, змоченої етиловим спиртом, поміщають у стерильну чашку Петри, стерильним інструментом пробивають із протилежних сторін яйця два отвори. Через один отвір повністю видаляють білок, потім, побільшавши отвір, виливають жовток у стерильну колбу з 50 см³ фізіологічного розчину, зміст струшують до одержання однорідної маси. Зберігають при температурі 4-10 °С.

У 100 см³ 6 %-го сольового агару, розплавленого до 45-50 °С, вносять 9,5 г натрію хлористого й 10 см³ яєчно-жовткової емульсії. Суміш перемішують до повної гомогенізації компонентів і розливають у чашки Петрі. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 5 діб.

Агар Байрд-Паркер

Основа середовища. В 1000 см³ одного з живильних середовищ, (м'ясо-пептонний бульйон з глюкозою або поживний бульйон «МК» з глюкозою), вносять 17,9 г літію хлористого, 15 г агару мікробіологічного, 5,0 г екстракту дріжджового, перемішують і нагрівають до повного розчинення компонентів. Прохолоджують до 50-60 °С, установлюють рН 6,9, розливають у флакони по 100 см³ і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Перед уживанням до 100 см³ розплавленої й охолодженої до 45-50 °С основи середовища додають 0,5 см³ 2%-го розчину калію телуриту й 5 см³ яєчно-жовткової емульсії. Середовище перемішують до повної гомогенізації компонентів і розливають у чашки Петрі. Перед посівом чашки підсушують у термостаті. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 48 год.

Маннітно-сольовий агар

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	75,0 г
Маніт	10,0 г
Феноловий червоний	0,025 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі компоненти розчиняють у воді, вносять 2,5 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,6±0,2, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розплавлення, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують під тиском при температурі 121 °С протягом 15 хвилин. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Гісса з маннітом або мальтозою

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Маніт або мальтоза	10,0 г
Феноловий червоний	0,025 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі компоненти розчиняють у воді, вносять 2,5 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,6±0,2, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розплавлення, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують під тиском при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для контролю стерильності (тіогліколеве середовище)

Середовище готують відповідно до вказівок на етикетці або по наступному пропису:

Панкреатичний гідролізат казеїну	15,0 г
Дріжджовий екстракт	5,0 г
Натрію хлорид	2,5 г
Глюкоза	5,0 г
Цистин (цистеїн)	0,75 г
Тіогліолева кислота або тіогліколят натрію	0,5 г
Розчин резазурину натрію (1:1000)	1,0 см ³
Агар мікробіологічний	0,75 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 7,2±0,2, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 10-25 °С у захищеному від світла місці протягом 14 діб.

Буферний розчин

1,0 г пептону ферментативного (або Бактофок-Мк), 4,3 г хлористого натрію, 7,23 г фосфорнокислого двузаміщеного натрію й 3,56 г фосфорнокислого однозаміщеного калію розчиняють при нагріванні в 1000 см³ дистильованої води, фільтрують через паперовий фільтр, установлюють рН 7,0 і розливають у скляні флакони по 400 см³, стерилізують 15 хв. при температурі 121 °С. Зберігають при температурі 4-6 °С не більш 14 діб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Еремина И.А. Лабораторный практикум по микробиологии / И.А. Еремина, О.В. Кригер. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. – 112 с.
2. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для вузов / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – М.: Академия, 2006. – 461 с.
3. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: учеб. пособие для биол. и технол. специальностей вузов / Л.И. Воробьева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 293, [1] с.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стенли, С. Уилльямса. – М.: Мир. – 1997.
5. Дикий И.Л. Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям / И.Л. Дикий, И.И. Сидорчук, И.Ю. Холупяк; под ред. И.Л. Дикого – Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2002. – 444 с.
6. Лавренчук Л.С. Микробиология: практикум / Л.С. Лавренчук, А.А. Ермошин. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. – 107 с.
8. Правосудова Н.А. Основы санитарной микробиологии: учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов / Н.А. Правосудова, В.Л. Мельников. – Пенза: ИИЦ ПГУ, 2013 – 105 с.

Зміст

Вступ.....	3
Техніка безпеки проведення лабораторних робіт.....	4
Обладнання мікробіологічної лабораторії.....	5
1 Приміщення лабораторії і необхідне встаткування.....	5
2 Посуд для проведення мікробіологічних досліджень.....	6
3 Інвентар.....	6
Лабораторна робота №1. Обладнання мікроскопа та правила роботи з ним. Види мікроскопії.....	6
1.1 Обладнання мікроскопа та правила роботи з ним.....	6
1.2 Види мікроскопії.....	10
1.2.1 Мікроскопія в темному полі.....	11
1.2.2 Фазово-контрастна мікроскопія.....	12
1.2.3 Люмінісцентна мікроскопія.....	12
1.2.4 Електронна мікроскопія.....	13
Лабораторна робота №2. Готування фіксованих препаратів бактерій і фарбування їх простими методами.....	14
2.1 Техніка відбору проб чистої культури мікроорганізма.....	14
2.2 Готування препаратів фіксованих клітин.....	15
2.3 Фарбування фіксованих препаратів мікроорганізмів простими методами.....	16
Лабораторна робота №3. Методи фарбування бактерій. Фарбування бактерій по Граму.....	16
Лабораторна робота №4. Живильні середовища.....	18
4.1 Вимоги, які висуваються до живильних середовищ.....	18
4.2 Класифікація живильних середовищ.....	19
4.3 Готування живильних середовищ із сухих середовищ, які випускаються промисловістю.....	22
4.4 Готування живильних середовищ із окремих компонентів.....	22
Лабораторна робота №5. Культивування, отримання чистих і накопичувальних культур мікроорганізмів.....	22
5.1 Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів..	23
5.2 Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів.....	24
5.2.1 Методи збагачення.....	24
5.2.1.1 Метод нагрівання.....	24
5.2.1.2 Метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича)..	24
5.2.1.3 Методи виділення анаеробних мікроорганізмів.....	24
5.3 Методи виділення чистих культур мікроорганізмів.....	25
5.3.1 Метод Пастера (метод граничних розведень).....	25
5.3.2 Методи механічного поділу мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ.....	25
5.3.2.1 Метод Коха (метод глибинного посіву).....	25
5.3.2.2 Метод Дригальського.....	26

5.3.2.3	Метод виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин.....	27
5.3.2.4	Біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів.....	27
	Лабораторна робота №6. Техніка посіву та пересівання мікроорганізмів на живильні середовища.....	27
6.1	Посів на щільні середовища в чашки Петрі.....	28
6.2	Посів у рідке живильне середовище.....	28
6.3	Пересівання на щільні живильні середовища в пробірках.....	28
	Лабораторна робота №7. Схема розведення досліджуваного продукту та проведення мікробіологічного дослідження.....	30
7.1	Група мікробіологічних критеріїв безпеки харчових продуктів.....	30
7.1.1	Група показників санітарного стану.....	31
7.1.2	Група умовно-патогенних мікроорганізмів.....	32
7.1.3	Група патогенних мікроорганізмів.....	33
7.1.4	Група показників мікробіологічної стабільності продукту.....	33
7.1.5	Представники технічно корисної і технічно шкідливої мікрофлори.....	33
7.2	Мікробіологічний контроль якості деяких харчових продуктів.....	34
7.2.1	Кремові кондитерські вироби.....	34
7.2.2	Маргарин і майонез.....	34
7.2.3	Питне молоко.....	35
7.2.4	Ковбасні вироби.....	35
7.2.5	Сусло та пиво.....	36
7.2.6	Овочеві консерви.....	36
7.2.7	Сухі дитячі суміші.....	37
7.3	Готування розведень досліджуваного продукту.....	38
7.4	Чашкові методи кількісного обліку мікроорганізмів.....	39
	Лабораторна робота №8. Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій.....	40
8.1	Метод глибинного посіву.....	41
8.2	Двошаровий агаровий метод.....	41
	Лабораторна робота №9. Визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів.....	42
9.1	Метод глибинного посіву.....	43
9.2	Двошаровий агаровий метод.....	43
	Лабораторна робота №10. Мікробіологічні методи дослідження, які засновані на накопиченні бактерій сімейства <i>Enterobacteriaceae</i> та сальмонел з їх наступною ідентифікацією.....	44
10.1	Виявлення та ідентифікація бактерій сімейства <i>Enterobacteriaceae</i>	
10.2	Виявлення та ідентифікація сальмонел.....	
	Лабораторна робота №11. Виявлення та ідентифікація <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47

Лабораторна робота №12. Виявлення та ідентифікація <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Лабораторна робота №13. Санітарна мікробіологія.....	50
13.1 Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря.....	53
13.1 Санітарно-бактеріологічне дослідження води.....	53
13.1 Санітарно-бактеріологічне дослідження змивів.....	54
Лабораторна робота №14. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків.....	54
Додаток. Готування розчинів реактивів і живильних середовищ.....	59
Список літератури.....	69

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський політехнічний інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з курсу
«Промислова мікробіологія та санітарія»

для студентів спеціальності
226 «Фармація, промислова фармація»

Харків
2021

Навчальне видання

Методичні вказівки

до лабораторних робіт з курсу
«Промислова мікробіологія та санітарія»
для студентів спеціальності
226 «Фармація, промислова фармація»

Укладачі:

ОВСЯННІКОВА Тетяна Олександрівна
ПОСОХОВ Євген Олександрович

Відповідальний за випуск *В.В. Анан'єва*
Роботу до видання рекомендував *О.О. Варанкіна*

Підписано до друку 07.12.2021 р. Формат 60*90/16
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний.
Друк – цифровий. Ум. друк. арк. 4,69
Наклад 500 прим. Зам. № 141203

Видавець ТОВ «ПЛАНЕТА-ПРІНТ»
м. Харків, 61002, вул. Багалія, 16
свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4568 від 17.06.2013 р.

Виготовлювач ФОП Черняк Л.О.
м. Харків, 61002, вул. Багалія, 16
Свідоцтво № 2400000000079553 від 16.05.2007 р.