

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

М.Д. КУХТИН, Х.Ю. КРАВЧЕНЮК

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З
МІКРОБІОЛОГІЇ
МОЛОКА І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ**

Навчальний посібник

Тернопіль

2023

УДК 579.67
М 59

Автори:

Кухтин Микола Дмитрович, докт. ветеринарних наук, професор
Кравченко Христина Юріївна, канд. тех. наук, асистент

Рецензенти:

О.Й. Цісарик, докт. с/г наук, професор
О.В. Боднарчук, докт.тех. наук, с.н.с.

Схвалено та рекомендовано до друку на засіданні вченої ради
Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.
Протокол № 4 від 24 квітня 2023 р.

М 59 Кухтин М.Д. Лабораторний практикум з мікробіології молока і молочних продуктів: навчальний посібник / Кухтин М.Д., Кравченко Х.Ю. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2023. – 157 с.

ISBN

УДК 579.67

Практикум складається із трьох розділів: загальної та спеціальної мікробіології (18 основних лабораторно-практичних занять та 5 додаткових) і науково-дослідної роботи студентів.

У розділі «Загальна мікробіологія» викладені методи вивчення загальної мікробіологічної техніки. У розділі «Спеціальна мікробіологія» наведені методи мікробіологічного дослідження молока та молочних продуктів відповідно до діючих нормативних документів. Кожна запропонована тема лабораторно-практичного заняття містить мету та завдання, необхідні обладнання та матеріали, довідковий матеріал, самостійні чи індивідуальні завдання та питання для самоконтролю. У розділі «Науково-дослідна робота студентів» викладені загальні методичні вказівки з проведення наукової роботи та орієнтовні теми й послідовність їх виконання.

Посібник призначений для студентів, аспірантів, викладачів спеціальності «Харчові технології» зі спеціалізацією у технології молока і молочних продуктів.

ISBN

© Кухтин М.Д., Кравченко Х.Ю..... 2023
© Тернопільський національний технічний
університет імені Івана Пулюя 2023

ВСТУП

Дисципліна «Мікробіологія молока і молочних продуктів» займає важливе місце в системі підготовки фахівців з переробки та контролю молочної продукції, оскільки забезпечує формування базових знань щодо закономірностей та особливостей динаміки мікробіологічних процесів при виробництві молочних продуктів та впливу мікроорганізмів на їх якість і безпечність для споживачів. Отримані знання дозволять майбутнім спеціалістам забезпечити високий рівень гігієни виробництва, попередити вади або псування молочних продуктів, що дасть змогу отримати доброякісну продукцію та попередити втрати підприємства. Знання про основні закономірності розвитку технічно-корисної та технічно-шкідливої мікрофлори, буде корисною спеціалістам під час розробки нових видів кисломолочних та молочних продуктів.

Об'єктом дисципліни є мікроорганізми молока і молочних продуктах, спричинені ними мікробіологічні процеси та вплив який вони зумовлюють якість молочних продуктів.

Предметом дисципліни є вивчення основних закономірностей і особливостей перебігу мікробіологічних процесів у сировині та під час технологічного процесу виробництва молочних продуктів, а також у формуванні основних показників якості готової продукції.

Метою викладання дисципліни «Мікробіологія молока і молочних продуктів» є систематизація та формування у студентів теоретичних знань та практичних навичків про морфологію й функціонально-технологічні властивості основних видів мікроорганізмів молока та молочних продуктів і взаємодії між ними.

В результаті вивчення дисципліни студенти повинні:

знати:

- загальну систематику та основні характеристики мікрофлори молока і молочних продуктів;

- біологічні властивості та принципи культивування основних груп мікроорганізмів, що впливають на якість молока і молочних продуктів;
- теоретичні засади взаємодії мікроорганізмів у природі та у процесі виробництва молочних продуктів;
- вплив різних чинників на мікробіологічні показники молока і молочних продуктів та способи зниження мікробного забруднення молока;
- мікробіологічні вимоги до молока та молочних продуктів, згідно з нормативними документами, що діють на території України;
- мікробіологію молока, заквасок, кисломолочних продуктів, масла, сиру, молочних консервів та морозива;
- основи мікробіологічного контролю при виробництві молока і молочних продуктів.

вміти:

- розрізняти основні групи мікроорганізмів, що впливають на якість молока і молочних продуктів;
- культивувати мікроорганізми та досліджувати їх властивості;
- відбирати проби молока та молочних продуктів для мікробіологічного дослідження, визначати та аналізувати вплив різних чинників на мікробіологічні показники молока і молочних продуктів;
- проводити мікробіологічні дослідження молока, заквасок, кисломолочних продуктів, масла, сиру, молочних консервів та морозива;
- кваліфіковано здійснювати мікробіологічний контроль сировини, технологічного процесу та готової продукції;
- працювати з нормативною документацією (ДСТУ, ТУ, тощо) та порівнювати отримані дані з нормативними вимогами.

Вивчення дисципліни передбачає поєднання лекційного курсу з лабораторно заняттями, під час яких студенти набувають практичні навички.

Перед початком курсу лабораторно-практичних занять з дисципліни «Мікробіологія молока та молочних продуктів» усі студенти повинні бути

ознайомлені з правилами техніки безпеки при роботі з реактивами та дослідним матеріалом і поставити свої підписи в журналі кафедри з техніки безпеки.

Правила та техніка безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії чи на студентських (навчальних) практикумах з мікробіології

Під час роботи на студентських (навчальних) практикумах з мікробіології кожен студент повинен знати і дотримуватися всіх правил з техніки безпеки, бути акуратним, уважним і обережним під час проведення експериментальних робіт.

Загальний допуск до мікробіологічної лабораторії студент одержує після проходження інструктажу і навчання правилам техніки безпеки, які проводяться викладачем. Правила поведінки в мікробіологічній лабораторії доводяться до відома студентів під розпис і повинні неухильно виконуватися.

Основні правила безпеки містять такі вимоги та рекомендації: Знаходитись в мікробіологічній лабораторії і працювати в ній дозволяється лише у спецодезії (білий халат та шапочка чи хустинка).

1. Знаходитись у мікробіологічній лабораторії і працювати в ній дозволяється лише в спецодезії (білий халат та шапочка чи хустинка).

2. До лабораторії слід заходити та переміщатися в ній спокійно, щоб не пошкодити або не перекинути столи, устаткування, посуд, прилади і реактиви.

3. Забороняється тримати у лабораторії сторонні речі та продукти харчування (крім досліджуваних проб). Не дозволяється курити, їсти та пити в лабораторії.

4. За кожним студентом має бути закріплено робоче місце, мікроскоп та інше приладдя. Робоче місце та обладнання утримують у чистоті.

5. На робочому місці розміщують лише те обладнання та реактиви, які необхідні для виконання конкретної роботи (мікроскоп, набір фарб, предметні скельця, чашки для зливання рідини, бактеріологічна петля, штатив з пробірками, посуд з дезрозчином).

6. Перед початком роботи слід обов'язково перевірити справність лабораторних приладів. У разі встановлення несправності чи недоліків у роботі повідомляють викладача, асистента або лаборанта.

7. Вмикати електрообладнання можна лише з дозволу викладача, асистента або лаборанта.

8. Матеріал, який використовується для дослідження (особливо на студентських лабораторних практикумах) повинен бути безпечним.

9. При дослідженні матеріалу, а також, під час роботи з бактеріальними культурами слід дотримуватися загальноприйнятих правил особистої гігієни.

10. Дослідний матеріал, що потрапив у процесі маніпуляцій на робочий стіл необхідно негайно видалити тампоном, змоченим у дезрозчині. У разі потрапляння матеріалу на шкіру, кон'юнктиву очей, в ротову порожнину слід терміново їх знезаразити (ретельно змити водою й обробити дезінфекційними розчинами).

11. Після закінчення роботи дослідний матеріал, використані культури мікроорганізмів, інструменти і поверхню робочого столу миють, дезінфікують, обладнання впорядковують; знімають спецодяг, руки миють з милом, при необхідності обробляють їх дезрозчином.

12. Забороняється виносити з лабораторії пробірки з культурами, дослідний матеріал, препарати тощо.

13. У мікробіологічній лабораторії передбачається ведення журналу по техніці безпеки. Виконання правил з техніки безпеки на студентських практикумах контролює викладач та черговий студент. Після ознайомлення з правилами з техніки безпеки під час роботи на студентських практикумах, кожен студент повинен поставити свій підпис в журналі з техніки безпеки.

Порядок виконання та оформлення протоколу лабораторно-практичних занять

Лабораторно-практичні заняття проходять в лабораторному практикуму. Роботи виконуються групами по 2–3 студенти, передбачаються і індивідуальні завдання.

Кожне лабораторно-практичне заняття має свою мету, завдання, довідковий матеріал передбачає послідовність виконання завдань та самоконтроль. Перед початком роботи студенти повинні ознайомитися з довідковим матеріалом та послідовністю виконання поставлених завдань. Після завершення виконання практичного завдання кожен студент оформляє протокол та висновки з виконаної роботи у своєму робочому зошиті. Протокол кожного лабораторно-практичного заняття повинен містити:

1. тему лабораторно-практичного заняття.
2. мету лабораторно-практичного заняття.
3. завдання лабораторно-практичного заняття
4. короткий довідковий матеріал.
5. послідовність виконання кожного завдання.
6. результати виконання кожного завдання та висновки.

Перед початком кожного лабораторно-практичного заняття студенти повинні мати в робочих зошитах записи п.1 – 5 і таблиці для запису в них результатів завдань. При оформленні протоколів лабораторно-практичних занять студенти можуть використовувати ілюстрації (рисунок чи схеми), які слід оформляти згідно з поданим зразком на рис. 1 та 2. Під ілюстрацією обов'язково розміщують пояснювальні дані.

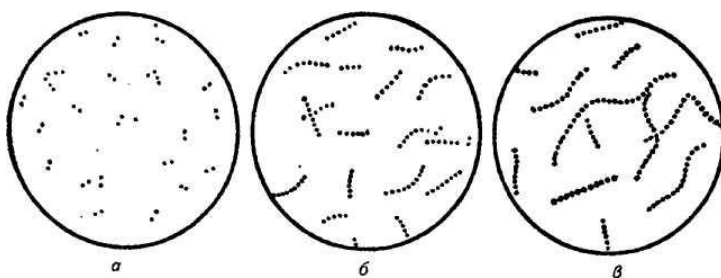


Рис. 1. Молочнокислі стрептококи: а - *Lactococcus lactis*, б - *Lactococcus cremoris*, в - *Streptococcus thermophilus*

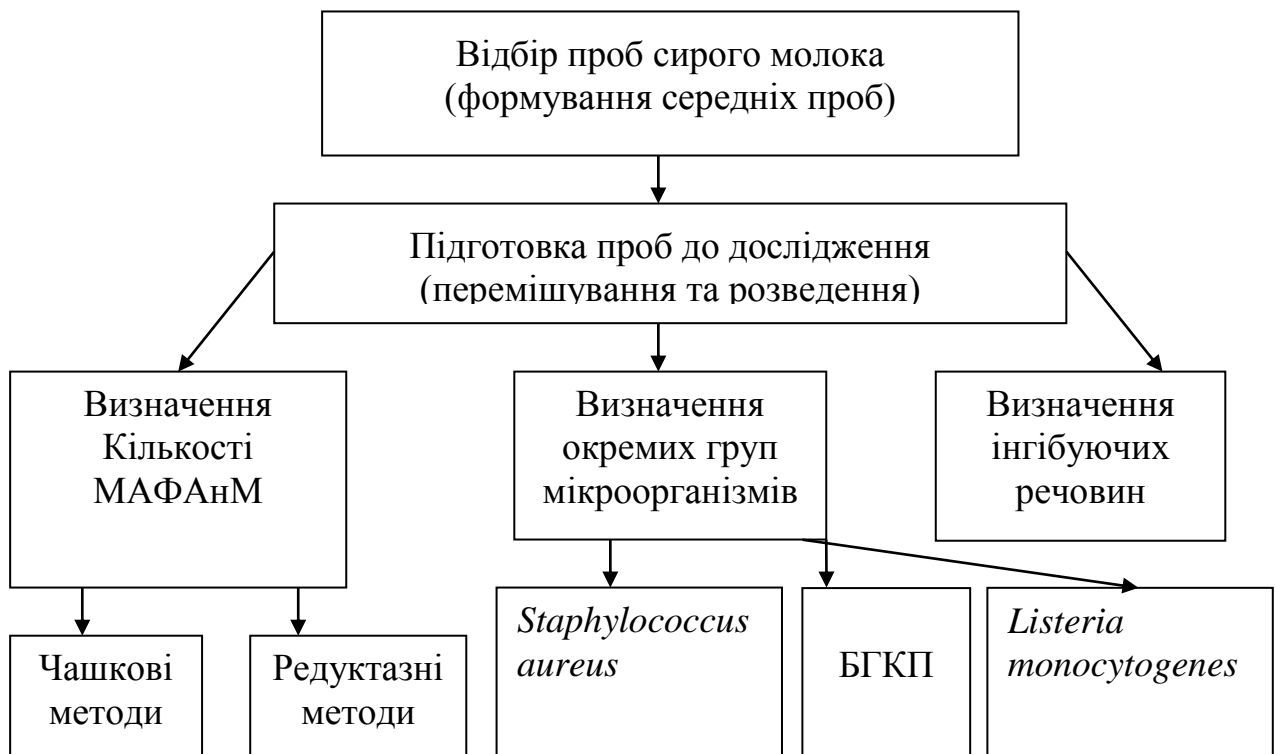


Рис.2. Схема мікробіологічного дослідження сирого молока

Таблиця 1

Систематика молочнокислих мікроорганізмів

Царство	прокаріоти (<i>Procaryotae</i>)			
Відділ	бактерії (<i>Bacteria</i>)			
Клас	власне бактерії (<i>Eubacteriales</i>)			
Сімейство	<i>Streptococcaceae</i>			<i>Lactobacillaceae</i>
Рід	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>
Види	<i>Lactococcus lactis</i> Підвиди <i>L. l. lactis</i> , <i>L.l. cremoris</i> , <i>L. l. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> Підвид <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> Підвиди <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextmnicum</i> <i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	<i>Thermobacterium</i> <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>Lb.lactis</i> <i>Streptobacterium</i> <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>Betabacterium</i> <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fermentum</i>

Наприкінці кожного лабораторно-практичного заняття студенти здають самостійно оформлені протоколи з результатами, висновками та захищають її. Захист й оцінювання роботи проводиться індивідуально. При цьому враховується підготовленість студента до виконання завдань лабораторно-практичного заняття (знання теоретичного матеріалу, наявність в робочих зошитах п. 1–5), якість виконання завдань (самостійність та швидкість виконання, чистота досліду) і захист роботи (достовірність отриманих результатів, аргументованість висновків, якість оформлення протоколу).

Студенти, які не встигли виконати та захистити лабораторно-практичну роботу або були відсутні на занятті з певних причин, повинні відпрацювати його в узгоджений з викладачем час згідно з графіком кафедри.

ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Лабораторно-практичне заняття №1

Організація роботи в мікробіологічній лабораторії на підприємствах молочної промисловості

Мета. Ознайомитися з організацією роботи мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості.

Завдання

1. Визначити основні завдання, структуру мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості.

2. Ознайомитися з лабораторним посудом, інвентарем та обладнанням.

3. Повторити будову мікроскопу та правила користування ним.

Ознайомитися з особливостями роботи з імерсійною системою.

Обладнання та матеріали

Лабораторний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі, ступки, мензурки, колби, циліндри, ступки фарфорові, скляні бюкси, предметні та покривні скельця); лабораторний інвентар (штативи для пробірок, бактеріологічні петлі, редуктазник, пісковий годинник, термометри набори фарб для фарбування мазків для мікроскопії, спиртівки, марлеві серветки, фільтрувальний папір, імерсійне масло, настільне освітлення, вата медична); лабораторне обладнання (термостат, автоклав, сушильна шафа, стерилізатори, центрифуги, холодильники, мікроскопи, водяна баня, лабораторні ваги). Світлові мікроскопи. Схеми будови електронного мікроскопу.

Довідковий матеріал

Основним завданням мікробіологічної лабораторії на підприємствах молочної промисловості є проведення мікробіологічного контролю продукції та санітарно-гігієнічного стану підприємства.

Об'єктами мікробіологічного контролю є:

- сировина (молоко, вершки), закваски та готова продукція. Цей контроль ще називають контролем технологічного процесу. Він дає можливість встановити ефективність процесу пастеризації молока, виявити джерела

надходження мікроорганізмів у молочні продукти на різних етапах технологічного процесу.

- обладнання, трубопроводи, тара, пакувальний матеріал та інші допоміжні матеріали, вода, повітря виробничих приміщень. Мікробіологічний контроль цих об'єктів дозволяє оцінити санітарно-гігієнічний стан виробництва та дотримання санітарних норм і правил особистої гігієни робітниками підприємства.

При організації мікробіологічного контролю керуються «Інструкцією по мікробіологічному контролю виробництва на підприємствах молочної промисловості», санітарними правилами та нормами «СанПиН 2.3.4. 551 - 96» а також державними, галузевими стандартами та технічними умовами щодо різних молочних продуктів.

Так готова продукція (молоко, вершки, кисломолочні напої) повинні контролюватися мікробіологічною лабораторією підприємства не рідше ніж один раз в 5 днів, сметана та кисломолочний сир – не рідше ніж один раз на 3 дні; якість санітарної обробки обладнання має оцінюватися за кожною одиницею обладнання не рідше ніж один раз на 10 днів. Чистоту рук працівників слід контролювати не рідше три разів на місяць.

Для проведення мікробіологічних досліджень у лабораторіях на підприємствах молочної промисловості повинен бути обладнаний бокс, який складається з двох відділень – передбоксу та власне боксу. У боксі мають бути встановлені бактерицидні лампи, кількість яких визначають із розрахунку 2,5 Вт/м². Крім того, лабораторія повинна мати наступне обладнання: термостати, автоклав, сушильну шафу, мікроскопи, стерилізатори, центрифугу, холодильники, водяну баню, лабораторні ваги, тощо.

Лабораторії молочних заводів повинні бути акредитовані відповідними органами в сфері акредитації на право проведення досліджень, які характеризують гігієнічні показники безпечності молочної продукції, що випускається на підприємстві.

За відсутності мікробіологічної лабораторії на підприємстві зазначений вище контроль може здійснюватися згідно госпдоговором з акредитованими лабораторіями для проведення мікробіологічних досліджень.

Лабораторний посуд, інвентар та обладнання

Лабораторний посуд – це пробірки, піпетки, чашки Петрі, ступки, мензурки, колби, циліндри, ступки фарфорові, скляні бюкси, предметні та покривні скельця.

Лабораторний інвентар – це штативи для пробірок, бактеріологічні петлі, редуказник, пісковий годинник, термометри, набори фарб для фарбування мазків для мікроскопії, спиртівки, марлеві серветки, фільтрувальний папір, імерсійне масло, настільне освітлення, вата медична.

Лабораторне обладнання – це термостати (для культивування мікроорганізмів за відповідних температур), автоклав (для стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду та інструментів), сушильна шафа (для сушіння чи стерилізації лабораторного посуду), мікроскопи (оптичні прилади для вивчення мікроскопічних об'єктів), стерилізатори, центрифуга, холодильники, водяна баня, лабораторні ваги, тощо.

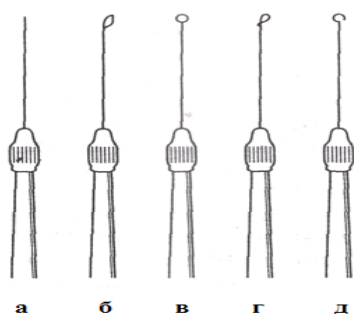


Рис. 1. Бактеріологічні голка, шпатель та петлі: а – голка; б – шпатель; в-д – петлі (в – правильно зроблені; г, д – неправильно зроблені)

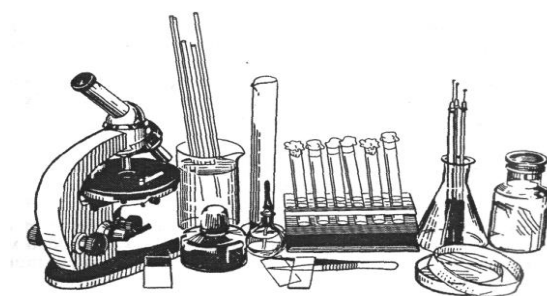


Рис. 2. Лабораторний посуд та інвентар необхідний для проведення мікробіологічних досліджень

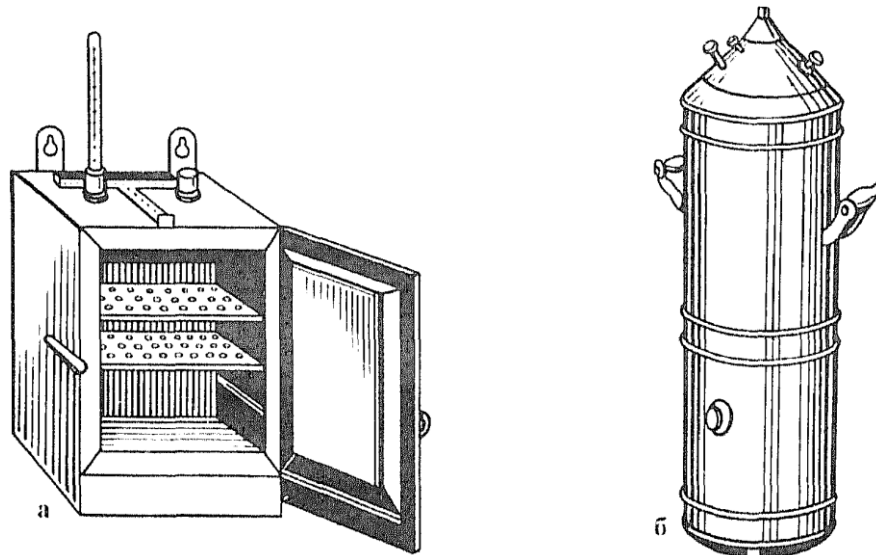


Рис.3 Обладнання для стерилізації: а- піч Пастера, б - автоклав

Будова мікроскопу. *Мікроскопи* – оптичні прилади для вивчення мікроскопічних об’єктів. Найбільш часто в мікробіологічних лабораторіях використовують світлові мікроскопи «Біолам Р-2», МБР-1, МБР-3 та інші.

Звичайний світловий мікроскоп складається з двох частин: механічної та оптичної (рис.4).

Механічна частина складається із штатива, предметного столика, трубки (тубуса) з обертовим диском у нижній частині (“револьвером”), макро- та мікрометричних гвинтів для пересування тубусу угору та вниз. У центрі предметного столика є отвір для проходження світла. Бокові гвинти предметного столика забезпечують його пересування вліво-вправо, а клейми слугують для закріплення предметного скла (препарату). Тубус закріплено попереду верхньої частини колонки штативу та системою гвинтів за допомогою зубчатки (крамальєри) може пересуватись угору-вниз: макрометричним гвинтом робиться пересування, яке можна побачити неозброєним оком; мікрометричним гвинтом – пересування тубусу на дуже малу відстань, яку видно лише при мікроскопії. Повний оберт мікрометричного гвинта пересуває тубус на 0,1 мм.

Оптична частина мікроскопа містить освітлювальний апарат, об’єктиви та окуляр (рис. 4, 5).

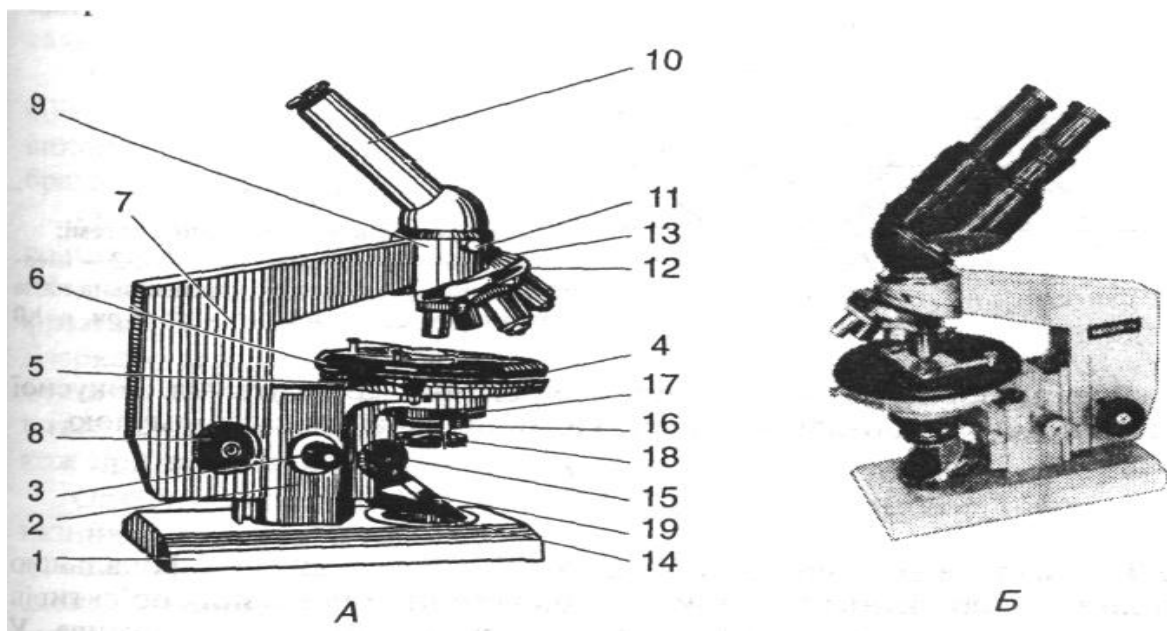


Рис. 4. Будова світлового мікроскопа:

А – складові частини мікроскопа: 1 – основа; 2 – коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3 – рукоятка мікрогвинта; 4 – предметний столик; 5 – гвинт для фіксування диска предметного столика; 6 – регулювальні гвинти; 7 – тубусотримач; 8 – рукоятка мікрогвинта; 9 – головка; 10 – насадка; 11 – гвинт для закріплення насадки; 12 – револьвер; 13 – гвинт фіксування револьвера; 14 – кронштейн конденсора; 15 – рукоятка конденсора; 16 – циліндрична гільза конденсора; 17 – гвинт; 18 – додаткова лінза (відкидна); 19 – дзеркало; Б – зовнішній вигляд мікроскопа.

Освітлювальний апарат знаходиться під предметним столиком, складається із дзеркала, яке дає напрямок світловим променням, конденсора з діафрагмою.

Дзеркало закріплено рухливо, має дві поверхні – плоску та вігнуту. При денному освітленні користуються плоскою поверхнею, при штучному світлі – вігнутою. Конденсор, що збирає світлові промені, складається з двох лінз: верхньої плоско-опуклої та нижньої двояко-опуклої. Світлові промені, які відбиває дзеркало, збираються *конденсором* в фокусі на рівні поля зору препарату, що розглядається. Для зменшення освітленості поля зору конденсор опускають, для збільшення доступу світла – піднімають. Для регулювання освітленості поля зору використовують також “ірис”-діафрагму, прикріплену до нижньої частини конденсора. Складається вона з напівкруглих металевих пластинок, які заходять одна за одну. За допомогою спеціального важеля ці

пластинки розсуваються та зсуваються, збільшуючи або зменшуючи доступ світла.

Об'єктив – один із важливих елементів мікроскопа, оскільки забезпечує збільшення досліджуваного предмету і розташована у нижній частині тубусу в отворі “револьверу”. Зазвичай у мікроскопах використовують такі об'єктиви $\times 8$ ($\times 10$) $\times 40$ та $\times 90$. Об'єктив складається з кількох лінз, закріплених у металевий футляр. Головна лінза є фронтальною, яка направлена на препарат, вона забезпечує необхідне збільшення зображуваного об'єкта. Крім фронтальної лінзи, у металевій оправі розташовані ще кілька корекційних лінз (від 3–4 до 10–12), які забезпечують чіткість зображення.

Об'єктиви є сухі та заглиблені – *імерсійні* (водні та масляні). У разі користування сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктива та препаратом є прошарок повітря. Фронтальні лінзи імерсійних об'єктивів збільшують у 80, 90, 100, 120 разів, тобто, у них коротка фокусна відстань і діаметр їх малий. Щоб створити необхідну освітленість, слід попередити розсіювання променя світла: на препарат, який мікроскопують, поміщають краплю імерсійної рідини, яка має коефіцієнт заломлення світла скла препарату. У каплю цієї рідини під контролем ока (дивитися збоку!) занурюють фронтальну лінзу імерсійного об'єктива, утворюється оптично однорідне середовище, світлові промені не розсіюються, добре освітлюючи поле зору. Як імерсійну рідину використовують кедрову олію (інколи вазелінову).

Окуляр знаходиться в верхній частині тубуса, складається з верхньої очної та нижньої збиральних лінз, які знаходяться у металевій циліндричній оправі. Окуляр лише збільшує зображення, що подається об'єктивом. Збільшення окулярів позначають як $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$.

Мікроскопи бувають монокулярні (один окуляр), вони дають плоске зображення, та біноккулярні (два окуляра), які утворюють оптичне, стереоскопічне зображення об'єкта.

Для визначення загального збільшення мікроскопу, необхідно помножити збільшення об'єктива на збільшення окуляра.



Рис.5. Сучасні світлові мікроскопи

Правила користування мікроскопом:

- працюють з мікроскопом лише сидячи;
- мікроскоп має бути розташований від краю стола на відстані 10 – 15 см, при цьому зошит та інші необхідні предмети розміщують праворуч від мікроскопу;
- повністю відкривають діафрагму мікроскопа, піднімають у верхнє положення конденсору;
- роботу на мікроскопі розпочинають з малого збільшення;
- за допомогою дзеркала виставляють максимальне та рівномірне освітлення поля зору;
- кладуть досліджуваний препарат покривним скельцем уверх, фіксують його клемми;
- спостерігаючи з боку (!), опускають об'єктив за допомогою макрогвинта, так щоб відстань між лінзою об'єктива та препаратом дорівнювала приблизно 5 мм. Неприпустимо одночасно дивитися в окуляр, опускати об'єктив, оскільки існує ймовірність роздавити препарат та пошкодити лінзу об'єктиву (!);
- дивлячись в окуляр і переміщуючи макрогвинт, повільно піднімають об'єктив до появи чіткого зображення;
- спочатку оглядають досліджуваний препарат при малому збільшенні;

- ділянку досліджуваного препарату, що потребує детального вивчення, поміщають у центр полю зору й повертають револьвер на об'єктив х40 чи х90, тобто переводять на велике збільшення;
- за допомогою мікрогвинта, виставляють чітке зображення;
- після закінчення роботи встановлюють мале збільшення і приймають досліджуваний препарат;
- мікроскоп переносять обома руками.

Під час мікроскопії визначають морфологічні особливості мікроорганізмів, їх тинкторіальні властивості (реакцію на різні барвники), розміри, наявність спеціальних структурних елементів клітини (спора, капсула), встановлюють рухливість.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Визначити основні завдання та особливості організації роботи в мікробіологічній лабораторії на підприємствах молочної промисловості. Коротко законспектувати в зошити основні моменти.

Завдання 2. Повторити будову світлового мікроскопу. Звернути увагу на оптичну його частину та призначення його основних механізмів.

Завдання 3. Занести в робочі зошити та самостійно заповнити таблицю 1, що наведена нижче.

Таблиця 1

Призначення основних складових світлового мікроскопу

№ п\п	Частина мікроскопа	Призначення
<i>Механічна частина</i>		
1.	штатив	
2.	предметний столик	
3.	тубус з “револьвером”	
4.	макрометричні гвинти	
5.	мікрометричні гвинти	
<i>Оптична частина</i>		
6.	дзеркало	

7.	конденсор з діафрагмою	
8.	об'єктиви	
9.	окуляр	

Питання для самоконтролю.

1. У чому полягають основні завдання мікробіологічної лабораторії на підприємстві молочної промисловості? Яка її структура ?
2. З чого складається світловий мікроскоп? Які правила користування ним? Як перейти з маленького збільшення на велике?
3. У чому особливості роботи з імерсійною системою?
4. Назвіть лабораторне обладнання, інвентар та посуд.
5. Що є об'єктом досліджень мікробіологічної лабораторії.

Лабораторно-практичне заняття №2

Якісна оцінка мікрофлори молока і молочних продуктів

Мета. Ознайомитися з методами якісної оцінки молока та молочних продуктів.

Завдання

1. Приготувати й виконати мікроскопію мазків молока, заквасок та молочних продуктів.
2. Визначити в мазках основні форми бактерій (коки, палички та звивисті форми). Звернути увагу в мазках на наявність дріжджів і пліснявих грибів.
3. Зарисувати результати спостереження.

Обладнання та матеріали

Світловий мікроскоп, проби молока, заквасок та молочних продуктів, предметні скельця, набори фарб, бактеріологічні петлі, готові пофарбовані препарати з культур кокоподібних форм мікроорганізмів, паличкоподібних бактерій, дріжджів та цвілевих грибів, імерсійне масло. Схеми будови дріжджів та пліснявих грибів.

Довідковий матеріал

Якісна оцінка мікрофлори молока, заквасок чи молочних продуктів передбачає встановлення видового складу мікроорганізмів. Установлення виду мікроорганізмів проводять перш за все шляхом мікроскопії мазків із молока, заквасок чи молочних продуктів.

Перед ніж розпочати виготовлення препаратів для мікроскопії необхідно підготувати предметні скельця. Вони повинні бути сухими й знежиреними. За ретельного знежирення спостерігається рівномірний розподіл краплі води на поверхні скла.

Нові скельця спочатку миють у мильному розчині, зполіскують в теплій воді, знежирюють у розчині спирт-ефіру. Використані скельця спочатку витримують в розчині сірчаної кислоти, а потім кип'ятять в розчині соди й мильної води, після чого ополіскують у воді та висушують в сушильній шафі.

Оброблені таким чином скельця зберігають у скляній банці сухими або в розчині спирт-ефіру. Скельця беруть пінцетом, оскільки пальці залишають жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчині спирт-ефіру, то їх протирають фільтрувальним папером або бавовняною тканиною.

1. Виготовлення препарату для мікроскопії. Препарат готують за допомогою бактеріологічної петлі (з платини) або пастерівських піпеток.

2. Висушування препарату-мазка проводять на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не потрібно, оскільки в разі швидкої втрати вологи відбувається груба коагуляція (згортання) білків, і клітина втрачає свою природну форму.

3. Фіксацію висушеного препарату здійснюють фізичним або хімічним способом.

Фізичний спосіб. Скельце з мазком тричі проводять над полум'я спиртівки (протягом 6 с).

Хімічний спосіб. Мазок обробляють розчинами: метилового (5 хв) або етилового спирту (10 хв) або сумішшю спирту та ефіру.

Зафіксований мазок називається мікробіологічним препаратом для мікроскопії.

4. Фарбування препарату проводять простими або складними методами.

Прості методи фарбування – застосовують один барвник (наприклад, фуксин Пфейффера або метиленовий синій). Наносять на фіксований препарат фуксин Пфейффера (на 2 хв) або метиленовий синій (на 3–5 хв); промивають водою; висушують за допомогою фільтрувального паперу.

Складні методи фарбування дозволяють відрізнити мікроорганізми один від одного або визначити особливості їх структури (наявність спор та капсул). До них належать фарбування за Грамом (виявляють грампозитивні або грамнегативні мікроорганізми), за Романовським – Гімзою (виявляють спірохети) та методи фарбування для виявлення спор та капсул (реактиви для фарбування за Грамом наведено в додатку А).

Суть методу фарбування за Грамом. Здатність чи нездатність мікроорганізмів набувати забарвлення за Грамом залежить від хімічного складу

бактеріальної стінки. Грамнегативні мікроорганізми (набувають червоного кольору) мають просту будову бактеріальної стінки (невелика кількість полісахаридів (пептидоглікан) – близько 10% або один шар), яка легко вимивається спиртом та знебарвлюється. У грампозитивних (забарвлюються у фіолетовий або синій колір) – складна бактеріальна стінка (близько 80% полісахариду, кілька шарів) і при обробці спиртом вона не вимивається й зберігає інтенсивність забарвлення.

Після фарбування мазка проводять його мікроскопію, при цьому в першу чергу звертають увагу на зовнішній вигляд мікроорганізмів, які спостерігаються в полі зору (форму бактерій, наявність дріжджів і пліснявих грибів).

Форми бактерій. За формою бактерії поділяють на кулясті (коки), паличкоподібні та звивисті (рис.1.).

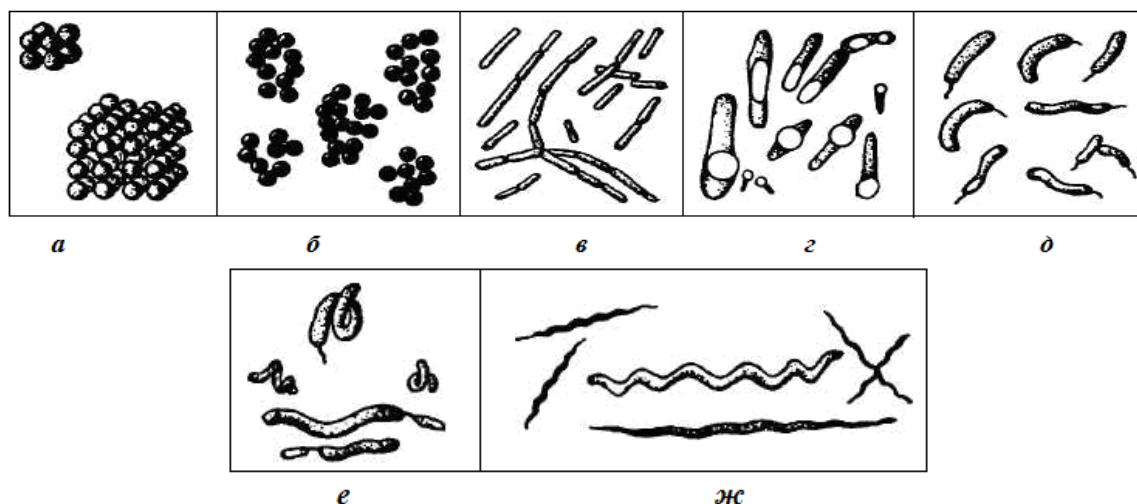


Рис. 1. Основні форми бактерій:

а – сарцини; *б* – стафілококи; *в* – стрептобактерії ; *г* – бацили та клостридії;
д – вібріони; *е* – спірили; *ж* – спірохети

Кулясті форми бактерій (кокоформи). За розташуванням клітин одна відносно один одної та характером поділу при розмноженні кокоформи поділяють на:

мікрококи – поодинокі розміщені, ізольовані одна від одної клітини округлої форми, діляться в рівних площинах;

диплококи – клітини, розміщені попарно, внаслідок поділу в одній площині та збереження зв'язку між двома дочірніми клітинами;

стрептококи - клітини, розміщені у вигляді ланцюжків різної довжини, внаслідок поділу в одній площині та збереження зв'язку між дочірніми клітинами;

стафілококи – хаотично розміщені клітини у вигляді грона винограду. (рис. 1б);

тетракоки – кулясті клітини, розміщені по чотири внаслідок поділу у двох взаємно перпендикулярних площинах;

сарцини – клітини, розміщені у пакетах кубоподібної форми по 8–16 клітин унаслідок їх поділу у трьох взаємно перпендикулярних площинах (рис. 1 а).

Паличкоподібні бактерії (палички) мають осьову симетрію й циліндричну форму із заокругленими або гострими краями. Їх поділяють на палички, які не мають спор, або бактерії, та палички, які мають спори, це бацили й клостридії (рис. 1г).

Бацили – це паличкоподібні мікроорганізми, що утворюють спори, діаметр яких не перевищує ширини мікробної клітини.

Клостридії – це паличкоподібні мікроорганізми, що утворюють спори, діаметр яких перевищує ширину мікробної клітини.

Крім того, залежно від взаємного розташування клітин паличкоподібні бактерії поділяють на поодинокі та безсистемні скупчення, диплобактерії та диплобацили (попарно розміщені бактерії та бацили), стрептобактерії та стрептобацили (розміщення бактерій та бацил у вигляді довгих та коротких ланцюжків).

Звивисті форми мікроорганізмів поділяють на:

вібріони – мають форму коми або неповного завитка;

спірили – мають від одного до п'яти завитків;

спірохети – мають багато дрібних завитків (рис. 1д, е, ж).

Кокоформи здебільшого фарбуються грампозитивно, звивсті форми – грамнегативно. Серед палчковидних форм мають місце грампозитивні, так і грамнегативні мікроорганізми.

Морфологія дріжджів. Дріжджі (дріжджові гриби, аскоміцети) – одноклітинні, нерухливі мікроорганізми різної форми (округлої овальної, еліпсоподібної, рідше циліндричної та лимоноподібної). Будова клітин дріжджів більш складна за будову бактеріальних клітин (мають подвійну оболонку, диференційоване ядро, у цитоплазмі включення (краплі жиру, включення глікогену, вакуолі)). Розмір дріжджових клітин більший, ніж бактеріальних.

Більшість дріжджів є факультативним анаеробами, добре росте в кислому середовищі (ацидофіли). По відношенню до температури вважаються мезофілами (оптимальна температура для їх розвитку становить 25-30 °С). У природі дріжджі розташовуються на поверхні плодів і ягід, у ґрунті, воді та в шлунково-кишковому тракті людей та тварин. Існують патогенні та умовно-патогенні види, які викликають кандидамікози.

Більшість дріжджів є збудниками спиртового бродіння (анаеробне окислення вуглеводів до етилового спирту)



глюкоза етиловий спирт

Класифікують дріжджі за способом розмноження: брунькуванням (несправжні або несахароміцети), або спороутворенням (справжні дріжджі, або сахароміцети) (рис. 2). У молоці й молочних продуктах здебільшого містяться спороутворюючі дріжджі родини *Saccharomycetaceae* (родів *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*) та дріжджі, що розмножуються брунькуванням з родини *Torulopsidaceae* (родів *Torulopsis*, *Candida*, *Mycoderma* та ін.).

Дріжджі, здатні до спороутворення (родина *Saccharomycetaceae*, до якої відносять роди *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*) є активними в процесі спиртового бродіння, тому їх використовують в промисловостях, як пекарські, пивні, а в молочній промисловості, їх додають вводять до складу заквасок для ацидофільно-дріжджового молока, кефіру та кумису. Крім того,

спороутворюючі дріжджі використовуються при виготовленні сирів із сирним слизом (наносять на поверхню сиру разом із спорами пліснявих грибів) (рис. 2а).

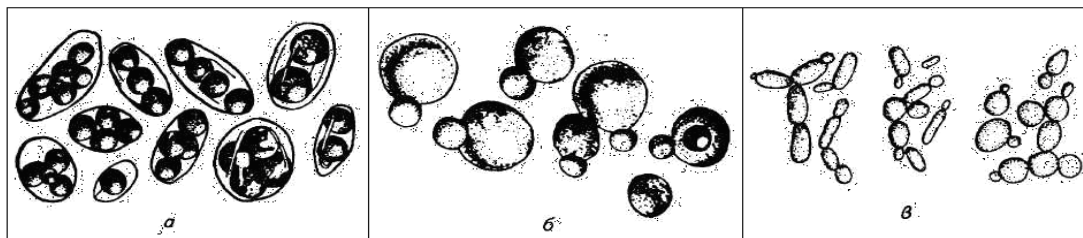


Рис. 7. Дріжджі:

а - дріжджі, що розмножуються спорами (справжні дріжджі);
б та *в* – дріжджі, що розмножуються бруньками (несправжні дріжджі).

*Дріжджі, які розмножуються брунькуванням, називаються несправжніми (родина *Torulopsidaceae*, до якої відносять роди *Torulopsis*, *Candida*, *Mycoderma* та ін.). Вони широко поширені в природі і викликають вади молочних продуктів (у сирах спричиняють спучування, «бомбаж» молочних консервів, крім того, надають молочним продуктам (кисломолочний сир, сметана) невластивого спиртового присмаку й запаху та викликають значне газоутворення) (рис. 2б, в).*

Морфологія пліснявих грибів. Плісняві гриби (нитчасті гриби) – це безхлорофільні мікроорганізми, які живуть на поверхні субстратів.

Основою вегетативного тіла пліснявих грибів є гіфи, сплетіння яких утворюють міцелій. Існує два види міцелію – нижній або субстратний, що вростає в субстрат, і верхній або повітряний, на якому розміщені спорангієносії. Під мікроскопом гіфи мають вигляд трубчастих волокон, які складаються із тонкої клітинної стінки, одного чи кількох ядер та цитоплазми.

Плісняві гриби – аероби, але можуть рости і в глибині продукту за умов обмежаного доступу кисню. Мезофіли можуть розвиватися і за низьких температур: від +5 до – 2 °С. Ацидофіли люблять кисле середовище. Спори грибів гинуть за пастеризації молока, проте стійкі до дезінфікуючих речовин.

Залежно від будови міцелію плісняві гриби поділяються на одноклітинні й багатоклітинні. У більшості грибів гіфи поділені перегородками на окремі клітини (багатоклітинні). Отже, міцелій у них септований (аспергили, пеніцили). В інших грибів перегородки в гіфів відсутні, тому ці гриби мають вигляд однієї великої клітини з багатьма ядрами (одноклітинні).

До одноклітинних пліснявих грибів належать гриби роду *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium* (рис. 3).

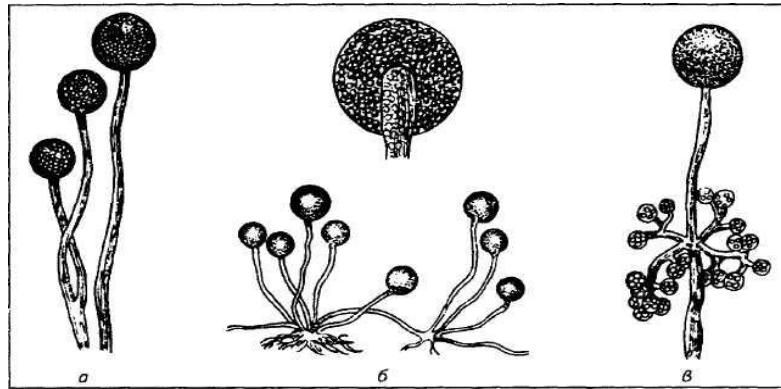


Рис. 3. Одноклітинні плісняві гриби:

a — *Mucor*; *б* — *Rhizopus*; *в* — *Thamnidium*.

Плісняві гриби роду *Mucor* (Мукор). Міцелій представлений однією розгалуженою клітиною, від якої відходить спорангієносій з спорангієм і спорами. Пліснява має вид ніжного сірувато-білого дуже густого пушка, росте на різних продуктах та ґрунті (рис. 3а).

Плісняві гриби роду *Rhizopus* (Різопус) характеризуються тим, що до субстрату кріпляться коренеподібними виростами (ризоїдами), що утворюють вузлики, від яких відходять спорангієносії зі спорангіями (рис. 3б).

Плісняві гриби роду *Thamnidium* (Тамнідіум), на відміну від плісняви роду *Mucor* мають у середній частині спорангієносія так звані спорангіоли, які нагадують гантелі, усередині яких дозрівають спори. Представники цих родів можуть розвиватися в холодильниках – 9... – 11 °С (рис. 3в).

До багатоклітинних пліснявих грибів належать плісняві гриби роду *Penicillium* та *Aspergillus*, *Catenularia*, *Cladosporium*, *Oidium lactis*. Плісняві гриби саме цих родів здебільшого трапляються в молчних продуктах.

Пліснява роду *Aspergillus*, на відміну від інших багатоклітинних видів плісняви, має несептований, дуже довгий конідієносій, який у верхній частині закінчується булавовидним потовщенням. Від нього радіально в різні боки відходять клітинні вирости – стеригми з конідіями, які розміщуються ланцюгами. Під мікроскопом конідієносій зі стеригами та конідіями нагадує садову лійку в той момент, коли з неї виливається вода (лійкова пліснява). Ростає на різних продуктах, у центрі має чорний колір, а по боках білий (рис. 4).

Пліснява роду *Penicillium* має багатоклітинний міцелій та конідієносій у вигляді мутовки або кисті руки, на верхівці якого розміщуються ланцюжки конідій. Через це плісняву називають кистеподібною. Вона росте на різних субстратах у вигляді зеленого по середині й білого по боках пухнастого нальоту. Представників цього роду використовують у виробництві м'яких пліснявих сирів. Конідії цих грибів розпилюють на поверхню сиру (рис. 4).

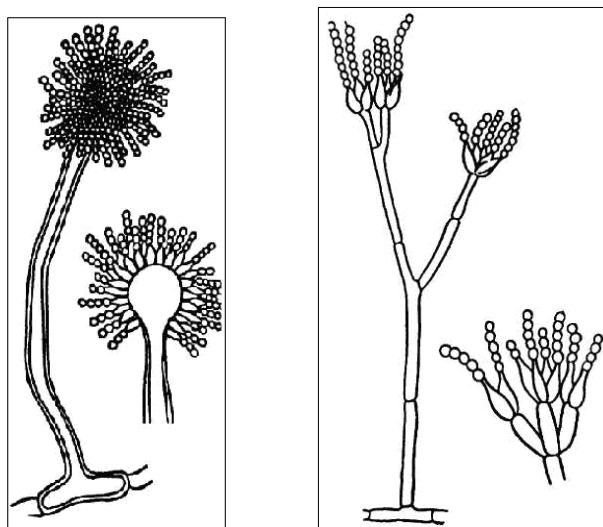


Рис. 4. Плісняві гриби роду *Aspergillus* та *Penicillium*

Пліснява роду *Cladosporium* (гроноподібна пліснява) має слаборозвинутий міцелій, на повітряних гіфах якого формуються великі оливково-зелені овальні або округлі конідії, які групуються в грона. Ця пліснява спричиняє появу темних плям на маслі і його прогрікання (рис. 5).

Пліснява роду *Catenularia* (шоколадно коричнева пліснява) характеризується наявністю коротко розгалуженого конідієносія від якого відходять довгі ланцюжки конідій, що нагадують намисто. Ця пліснява розвивається на солодких молочних консервах у вигляді коричневих кононій, спричиняючи вади консервів (рис. 5).

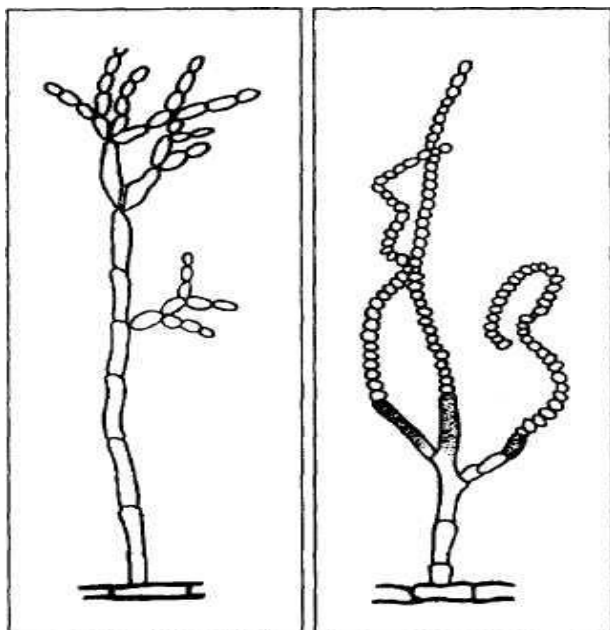


Рис. 5. Пліснява роду *Cladosporium* та *Catenularia*

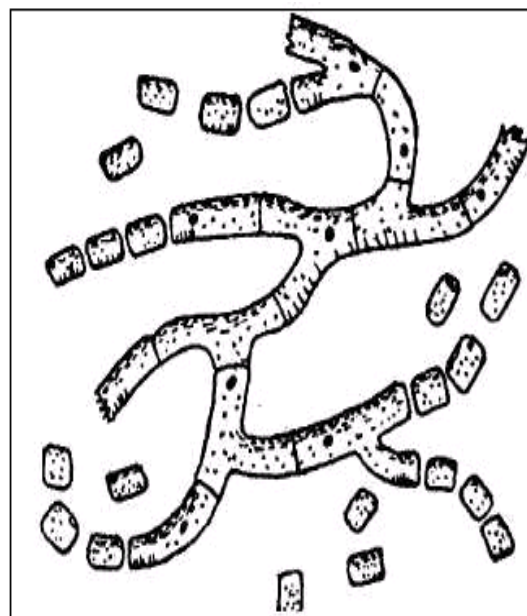


Рис. 6. Молочна пліснява *Oidium lactis*

Молочна пліснява *Oidium lactis* не має спеціальних гіф для розмноження. Недорозвинуті конідії утворюються внаслідок розпаду кінцевих ділянок повітряного міцелію і становлять собою прямокутні або овальні клітини, які формують білий пігмент (рис. 6).

У міцелії пігмент не утворюється, тому незріла пліснява має вигляд сіруватого нальоту. Пліснява на молочних та інших продуктах має вигляд білого ніжного пушку.

Плісняві гриби мало використовуються у вітчизняній молочній промисловості (лише для виготовленні сирів з пліснявою – сир «Рокфор»). За кордоном сир з пліснявою широко представлений в асортименті сирів. Плісняві гриби викликають глибокий розпад білків, жирів та інших складових молока, що спричиняє псування молочних

продуктів (пліснявіння сухого молока при підвищеній вологості, пліснявіння масла й кисломолочних продуктів (сметана, кисломолочний сир) у разі тривалого зберігання. Деякі гриби в процесі росту на молочних продуктах утворюють отруйні речовини: мікотоксини (афлотоксини), тому можуть стати збудниками харчових мікотоксикозів.

Виготовлення препаратів для мікроскопії пліснявих грибів та дріжджів. За допомогою бактеріальної петлі знімають поверхневий (повітряний) міцелій гриба з субстрату та обережно поміщають його у краплю води (або фізрозчину), яка заздалегідь була нанесена на предметне скельце. Краплю води з міцелієм гриба накривають покривним скельцем і злегка придавлюють, щоб видалити пухирці повітря. При цьому визначають одноклітинну чи багатоклітинну будову міцелію, звертають на форму спорангіїв та спорангієносіїв. Крім того, у препараті завжди спостерігають велику кількість вільно розміщених спор, що висипалися із спорангіїв, які лопнули.

Для мікроскопічного дослідження дріжджів на предметне скло наносять краплю дріжджів у фізрозчині та накривають покривним скельцем (роздавлена крапля). Розглядають під мікроскопом в затемненому полі зору, для чого звужують діафрагму конденсора. Звертають на форму та розмір дріжджових клітин і на наявність форм, що розмножуються брунькуванням.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Приготувати предметні скельця для мікроскопії.

Завдання 2. Виготовити препарат для мікроскопії з молока, заквасок чи молочнокислих продуктів.

Завдання 3. Пофарбувати приготовлені препарати для мікроскопії простим методом (метиленовою синькою) та методом за Граму та провести їх мікроскопію. При цьому звернути увагу на наявність в мазках основних форм мікроорганізмів, дріжджів та пліснявих грибів

Завдання 4. Зарисувати результати спостереження в робочих зошитах (форми бактерій, дріжджів та пліснявих грибів).

Завдання 5. Заповнити нижченаведену таблицю 1.

Особливості морфологічної будови і розмноження
дріжджів та пліснявих грибів.

Показники	Дріжджі	Плісняві гриби
Особливості морфологічної будови		
Особливості розмноження		
Значення для молочної промисловості		

Питання для самоконтролю

1. Як готують предметні скельця для виготовлення препарату для мікроскопії?
2. Які методи використовують для фарбування препаратів для мікроскопії?
3. В чому полягає сутість методу фарбування за Грамом?
4. Назвіть основні форми бактерій. Коротко охарактеризуйте кожен з них?
5. Що таке дріжджі і як вони класифікуються? Які особливості будови дріжджів? Яке значення мають дріжджі для молочної промисловості?
6. Яка класифікація пліснявих грибів? Які особливості морфології пліснявих грибів? Як використовують плісняві гриби в молочної промисловості?

Лабораторно-практичне заняття №3

Кількісна оцінка мікрофлори молока і молочних продуктів

Мета. Ознайомитися з методами кількісної оцінки мікрофлори молока й молочних продуктів.

Завдання

1. Ознайомитися та вивчити основні підходи до визначення кількості мікроорганізмів у молоці й молочних продуктах.
2. Відпрацювати методику десятикратних розведень молока й молочних продуктів.

Обладнання та матеріали

Світловий мікроскоп, проби молока, заквасок і молочних продуктів, чисті колби, мірні стакани, пробірки, штативи, дистильована вода, фізіологічний розчин, середовища в чашках Петрі, піпетки, термостат.

Довідковий матеріал

Кількісна оцінка мікрофлори молока й молочних продуктів характеризується ступенем (або кількістю) мікробного забруднення даних об'єктів, тобто характеризується кількістю мікроорганізмів в одиниці об'єму (1 см³) чи маси (1 г).

Існує два підходи до визначення кількості мікроорганізмів в одиниці об'єму – **прямі методи** (метод прямого підрахунку кількості мікроорганізмів під мікроскопом у підрахункових камерах та метод кількісного посіву розведених проб дослідного матеріалу на живильні середовища) і **непрямі методи** (наприклад, редуктазні методи визначення загальної кількості мікроорганізмів в молоці).

Метод прямого підрахунку кількості мікроорганізмів під мікроскопом у підрахункових камерах. Для цього використовують камери Горяєва або в камери, які спеціально сконструйовані для підрахунку мікроорганізмів. Цей метод підрахунку мікроорганізмів у молоці або молочних продуктах використовують в екстрених випадках, коли необхідно швидко

зробити висновок про кількісний вміст мікроорганізмів у досліджуваному об'єкті.

Метод прямого підрахунку кількості мікроорганізмів є швидким і простим, проте він має низку суттєвих недоліків, які знижують його цінність, тому його застосовують рідко. Одним із таких недоліків є похибки в підрахунку мікроорганізмів, коли вони утворюють скопичення або прилипають до інших складових компонентів досліджуваного об'єкту. У цьому разі не можливо підрахувати дуже дрібні мікроорганізми. Найгірше, що цей метод не дає дозволяє відрізнити живі мікроорганізми від неживих.

Проте створення й використання автоматичних (фотоелектронних і електронних) приладів для підрахунку мікроорганізмів робить цей метод більш перспективним і точним.

Більш часто використовують **метод кількісного посіву розведених проб дослідного матеріалу на живильні середовища**, який є більш точним. Для цього готують десятикратні розведення досліджуваного матеріалу (молока або молочних продуктів) з подальшим додаванням його в кількості 1 мл у стерильні чашки Петрі й заливають його розплавленим і охолодженим до 40 – 45 °С МПА чи іншим середовищем (наприклад, молочний агар у разі підрахунку молочнокислих бактерій) (рис. 1). Для рівномірного розподілення дослідного матеріалу в середовищі чашки Петрі злегка коливають. Після застигання агару, чашки поміщають у термостат.

Після інкубації підраховують кількість колоній, що вирости або визначають кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) в одиниці об'єму досліджуваного матеріалу. Якщо, посіви культивували за температури 30 – 37 °С, то показником загальної бактеріальної забрудненості є кількість мезофільних аеробних та факультативно-анеробних мікроорганізмів (КМАФАНМ). У разі дослідження кисломолочних продуктів, для виробництва яких використовували заквасочні культури, зміни в кількості КМАФАНМ свідчать про свіжість даного продукту, стадію його псування або санітарно-гігієнічні умови його отримання чи зберігання. Проте, необхідно враховувати, що цей метод певною мірою є приблизним, оскільки не можливо виявити й

підрахувати всі мікроорганізми в досліджуваному матеріалі на одному середовищі, через те що їх фізіологічні властивості є відмінними. Крім того, режим культивування також може не відповідати вимогам усіх мікроорганізмів, що знаходяться в асоціації. Незважаючи, на такі недоліки молоко й молочні продукт нормуються за кількістю МАФАНМ.

Крім того, цей метод використовують для визначення кількості патогенних мікроорганізмів у молоці й молочних продуктах, таких, як сальмонели, бактерії групи кишкових паличок, лістерії, патогенні стафілококи та ін. Виявлення цих мікроорганізмів у молоці й молочних продуктах є показником його контамінації. Встановлення кількості патогенних мікроорганізмів у молоці й молочних продуктах вище норму є дуже важливим.

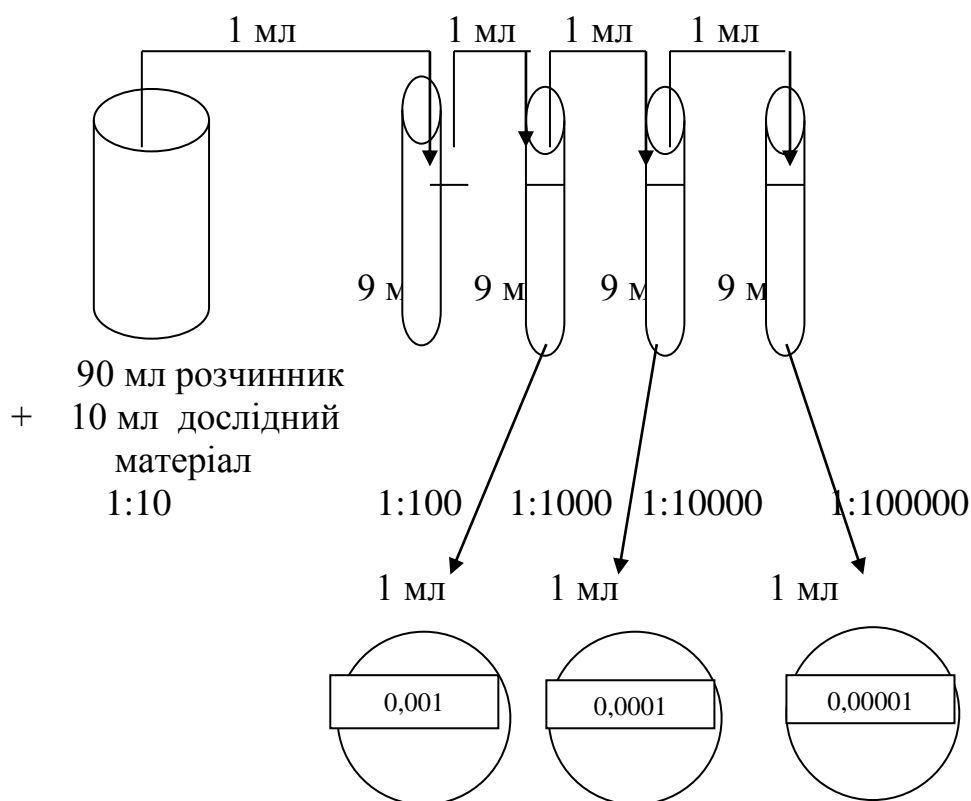


Рис. 1. Метод кількісного посіву розведених проб дослідного матеріалу на живильні середовища

Для встановлення кількості патогенних мікроорганізмів використовують дві методики – встановлення титру й індексу.

Титр – це найменший об’єм (в мілілітрах) або маса (у грамах) молока або молочних продуктів, у яких виявлена хоча б одна одиниця патогенного мікроорганізму.

Методика визначення колі-титру та колі-індексу.

Індекс – це кількість патогенних мікроорганізмів, виявлених у певному об'ємі чи кількості молока й молочних продуктів. Для молока й рідких молочних продуктів в одному літрі, в інших молочних продуктах – в одному грамі.

Індекс – це зворотня величина титру, тому перерахунок титру в індекс і навпаки можна виконувати за формулою:

$$\text{Титр} = \frac{1000}{\text{Індекс}} \quad \text{та} \quad \text{Індекс} = \frac{1000}{\text{Титр}}$$

та відповідно, для молочних продуктів:

$$\text{Титр} = \frac{1}{\text{Індекс}} \quad \text{та} \quad \text{Індекс} = \frac{1}{\text{Титр}}$$

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Підрахувати кількість мікроорганізмів у мазках з молока, заквасок або кисломолочних продуктів у підрахункових камерах.

Завдання 2. Відпрацювати методику десятикратного розведення проб молока, заквасок або кисломолочних продуктів. Зарисувати схему у робочий зошит.

Питання для самоконтролю

1. Які існують підходи до визначення кількості мікроорганізмів в молоці та молочних продуктах?
2. Яка методка кількісного посіву розведених проб дослідного матеріалу на живильні середовища?
3. Що таке колі-титр та колі-індекс? Як їх визначають?

Лабораторно-практичне заняття №4
Вивчення морфологічної будови та властивостей
молочнокислих бактерій

Мета. Вивчити морфологічну будову та основні властивості молочнокислих бактерій (лактококів та лактобактерій).

Завдання

1. Виготовити препарати для мікроскопії молочнокислих бактерій, пофарбувати їх та провести мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів молочнокислих бактерій).

2. Зарисувати побачене.

3. Вивчити основні властивості молочнокислих бактерій (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, здатність зброджувати молоко, утворювати CO₂ та ароматичні речовини, тощо)

Обладнання та матеріали

Світловий мікроскоп, закваски із молочнокислих бактерій (або кисломолочні продукти: кисле молоко, сметана, кефір, ряжанка, тощо), предметні скельця, бактеріологічна петля, фізрозчин, набори фарб для виготовлення препаратів для мікроскопії або готові пофарбовані препарати молочнокислих бактерій, імерсійне масло. Чашки Петрі з середовищами (молочний агар, агар з гідролізованим молоком або інше живильне середовище для виділення молочнокислих бактерій), пробірки з стерильним молоком.

Довідковий матеріал

Молочнокислі бактерії – це специфічна група мікроорганізмів, що обумовлюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів (цукрів) до молочної кислоти. Крім основного продукту бродіння – молочнокислої кислоти утворюються побічні продукти: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, етиловий спирт і ін.

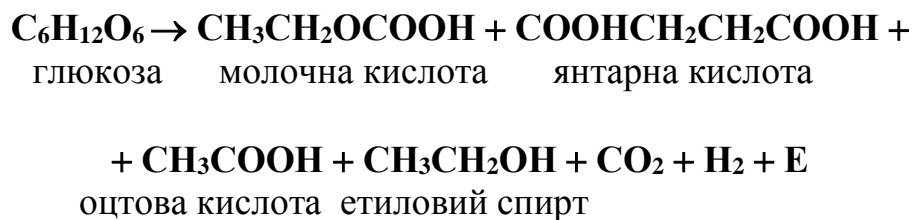
До молочнокислих бактерій відносять молочнокислі стрептококи (лактококи та лейконостоки) та молочнокислі палички (лактобактерії).

Вони в свою чергу поділяються на гомоферментативні та гетероферментативні (або ароматоутворюючі) бактерії.

- *гомоферментативні бактерії* – бактерії, які під час розщеплення відповідних вуглеводів молока утворюють як основний продукт молочну кислоту і незначну кількість інших продуктів:



- *гетероферментативні бактерії* – бактерії, які поряд з молочною кислотою утворюють значну кількість газу та ароматичні речовини.



До гомоферментативних лактококів належать молочнокислий стрептокок *Lactococcus lactis* і вершковий стрептокок *Lactococcus cremoris*.

До гетероферментативних лактококів належать *Lactococcus diacetylactis* та *Lactococcus acetoinicus*.

Проміжне положення між гомо- і гетероферментативними стрептококами займає термофільний стрептокок *Streptococcus thermophilus*.

До гомоферментативних лактобактерій відносять мікроорганізми родів *Thermobacterium* (*Lactovacillus helveticus*, *Lactovacillus acidophilus*, *Lactovacillus bulgaricus*, *Lactovacillus lactis*) та *Streptobacterium* (*Lactovacillus plantarum* і *Lactovacillus rhamnosus* (*casei*), а до гетероферментативних лактобактерій – мікроорганізми роду мікроорганізми *Betabacterium* (*Lactovacillus brevis*, *Lactovacillus buchneri*, *Lactovacillus fermentum*).

За температурним режимом культивування молочнокислі бактерії поділяються на мезофільні, для яких оптимальна температура росту складає від 20 до 30° С, і термофільні – оптимальна температура росту яких 40–45°С (див. табл. 1).

Мезофільні і термофільні молочнокислі мікроорганізми

Мезофільні молочнокислі мікроорганізми		Термофільні молочнокислі мікроорганізми	
Лактококи	Лактобактерії	Лактококи	Лактобактерії
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus (casei)</i>		<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>		<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Leuconostoc cremoris</i>		
	<i>Leuconostoc dextranicum</i>		
	<i>Leuconostoc lactis</i>		

Природним місцем існування молочнокислих мікроорганізмів є рослини, шлунково-кишковий тракт, молоко й молочні продукти.

Молочнокислі стрептококи (лактококи та лейконостоки)

Морфологія. Клітини *Lactococcus lactis* (молочний стрептокок) овальної форми, які у молодих культур розміщені у вигляді коротких ланцюжків (від двох до шести), а у старих – попарно. *Lactococcus cremoris* (вершковий стрептокок) на відміну від молочного стрептококу утворює довгі ланцюжки з округлих клітин (рис. 1). Клітини гетероферментативних стрептококів *Lactococcus diacetylactis* та *Lactococcus acetoinicus* мають округлу форму, проте за розмірами дещо менші від *Lactococcus lactis* і розміщені в ланцюжках. Клітини термофільного стрептококу *Streptococcus thermophilus* найбільші серед клітин інших молочнокислих стрептококів і розміщуються в довгих ланцюжках.

Усі лактококи нерухливі, спор і капсул не утворюють, за Грамом фарбуються позитивно.

Культуральні властивості. Лактококи – факультативні анаероби, тобто ростуть не тільки в анаеробних умовах (безкисневих), а й за наявності молекулярного кисню. Оптимальна температура для їх росту становить 25–30 °С, крім стрептококу *Streptococcus thermophilus* (40–45 °С). Не ростуть на звичайних живильних середовищах МПА. Молочнокислі стрептококи культивують на знежиреному стерильному молоці або на щільних і рідких

штучних живильних середовищах з використанням гідролізованого молока, молочної сироватки та інших живильних речовин, отриманих з молока.

На щільних живильних середовищах мікроорганізми утворюють округлі та гронаподібні колонії. Округлі росинчасті колонії з рівним краєм утворюються на поверхні середовища, а гронаподібні або човникоподібні колонії – вростають в агар.

Lactococcus lactis (рис. 1а) є активним кислотоутворювачем, тому молоко сквашується протягом 6–10 год, з кислотністю 120 °Т. Сквашене молоко має рівний щільний згусток, приємний кислуватий запах і смак. Деякі штами молочного стрептококу утворюють згусток в'язкої, тягучої консистенції, тому непридатні для виробництва кисломолочних продуктів.

Lactococcus cremoris (рис. 1б) сквашує молоко протягом 8–12 год, з кислотністю 110–115 °Т. При сквашуванні молока згусток має сметаноподібну консистенцію й кислуватий запах і смак, тому його використовують у складі заквасок при виробництві тих продуктів, де необхідно досягти в'язкої консистенції та помірного кислотоутворення (сметана, кисломолочний сир, тощо). При розмноженні вершкового стрептокока в молоці утворюється слиз.

Lactococcus diacetylactis сквашує молоко від 10 год до 2 діб (з кислотністю 70–100°Т і при цьому утворює велику кількість летючих кислот (оцтову, пропіонову) та ароматичних речовин (діацетилу та ефірів). При сквашуванні молока згусток має рівну, щільну консистенцію з незначною кількістю пухирців газу. Запах і смак його слабкі, приємно кислуваті. Саме тому він має промислове значення та належить до складу заквасок для кисломолочного сиру, сметани, кислого молока, масла й сирів.

Streptococcus thermophilus (рис. 1в) за оптимальної температури (40–45 °С) згортає молоко за 3,5–6 год з граничною кислотністю 110–120 °Т, утворюючи рівний щільний згусток сметаноподібної чи в'язкої тягучої консистенції з приємним кисломолочним смаком і запахом. Деякі штами цього мікроорганізму виділяють діацетил.

Термофільний стрептокок разом із *Lactobacillus bulgaricus* використовують для виготовлення йогурту і як компонент культури для

приготування ементальського сиру, сметани та кисломолочного сиру прискореним методом. *Streptococcus thermophilus* чутливий до пеніциліну та деяких інших антибіотиків і тому його використовують в якості тест-культуру для біологічного виявлення антибіотиків в молоці.

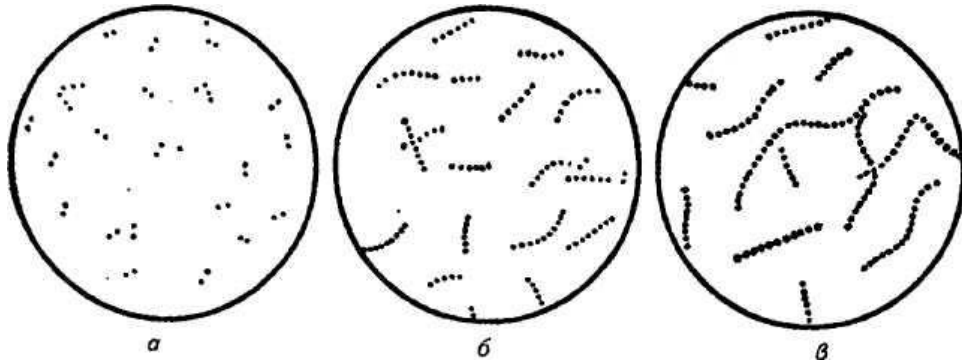


Рис. 1. Молочнокислі стрептококи: а - *Lactococcus lactis*, б - *Lactococcus cremoris*, в - *Streptococcus thermophilus*

Представники роду *Leuconostoc* морфологічно подібні до лактококів: мають сферичну форму, грампозитивні, неспороутворюючі, нерухливі мікроорганізми, які з'єднуються попарно чи в ланцюжки, які переплітаються. Більшість представників цього роду утворюють капсули, тому під час їх розвитку на живильних середовищах утворюється слиз.

Лейконостоки – факультативні анаероби, вони ростуть на середовищах за температури 20–30 °С. Порівнянно з лактококами, лейконостоки є більш вибагливими до живильних середовищ і потребують додавання до них чи до молока в якому вони розвиваються, стимуляторів росту (амінокислот, біотину, дріжджового екстракту).

На щільних живильних середовищах утворюють дрібні (менше 1 мм) гладкі круглі сіруваті колонії. Зброджують глюкозу та інші вуглеводи з виділенням молочної кислоти.

Із роду *Leuconostoc* тільки *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* і *Leuconostoc dextranicum* використовуються в молочній промисловості для ароматоутворення при виробництві кисловершкового масла, сирів, рідше кисломолочних напоїв, сметани, кисломолочного сиру, оскільки ці організми

розщеплюють лимонну кислоту з утворенням діацетилу, що надає продуктам приємного смаку та аромату.

Молочнокислі палички (лактобактерії)

Молочнокислі палички належать до родни *Lactobacillacea*, роду *Lactobacillus*, який має три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бета-бактерії).

До термобактерій належать вісім видів паличок, серед яких найбільше застосовують *Lactovacillus helveticum*, *Lactovacillus acidophilus* (рис. 2б), *Lactovacillus bulgaricus* (рис. 2а), *Lactovacillus lactis*. Підрид стрептобактерій містить сім видів, серед яких у молочній промисловості використовують *Lactovacillus plantarum* і *Lactovacillus rhamnosus (casei)*. До підроду бета-бактерій належать 11 видів паличок, найбільш вивченими серед них є *Lactovacillus brevis*, *Lactovacillus buchneri*, *Lactovacillus fermentum* та ін.

Морфологія. Лактобактерії – це палички, які розміщуються поодинокі, попарно чи короткими ланцюжками, розміром 4–10 × 0,5–0,6 мкм. Вони нерухомі, спор і капсул не утворюють, грам-позитивні. Клітини стрептобактерій дещо дрібніші за клітини термобактерій і часто розміщуються у вигляді ланцюжків. Бета-бактерії мають найбільш дрібні і тонкі клітини.

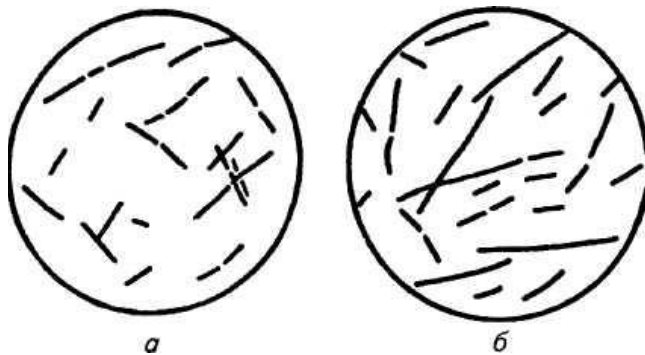


Рис. 2. Молочнокислі палички: а – болгарська паличка; б – ацидофільна паличка

Культуральні властивості. Молочнокислі палички є факультативними анаеробами. За температурним режимом стрептобактерії і бета-бактерії є мезофілами, термобактерії – термофілами. На звичайних живильних середовищах вони не ростуть, тому для їх культивування додають молоко (стерильне чи гідролізоване) (див. додаток А). На щільних живильних

середовищах формують дрібні гладкі блискучі колонії сферичної форми сіробілого кольору. Колонії лактобактерій різних видів майже не відрізняються, проте є R-форми колоній (дрібні з шороховатою поверхнею колонії, що врастають у субстрат) та S-форми (гладкі, великі поверхневі колонії).

Молочнокислі палички зброджують молоко за 6–12 годин з утворенням щільного згустку, який має приємний кисломолочний смак і запах.

Більшість видів молочнокислих паличок використовують у молочній промисловості для виробництва кисломолочних напоїв, кисломолочного масла, сирів. Крім того, лактобактерії вводять до складу різних лікувальних та профілактичних препаратів, біодобавок для покращення діяльності шлунково-кишкового тракту людей і тварин.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії зарисувати в робочих зошитах основних представників лактококів та лактобактерій.

Завдання 2. Спостерігати за ростом на живильних середовищах у чашках Петрі молочнокислих стрептококів та паличок; спостерігати пробірки за пробірками зі сквашеним молоком та визначити його органолептичні показники.

Завдання 3. Результати отриманих спостережень занести в табл. 2 та 3.

Таблиця 2

Загальна характеристика молочнокислих стрептококів

Показники	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Розміщення клітин				
Форма та величина колоній				
Температура росту: - оптимальна - гранична				
Кислотність				
Утворення ароматичних речовин				
Сквашування молока: - час сквашування - характер згустку - консистенція				

- смак				
- запах				
Джерела виділення				
У виробництві яких кисломолочних продуктів використовують				

Таблиця 3

Загальна характеристика молочнокислих паличок

Показники	<i>Lactbacillus bulgaricus</i>	<i>Lactbacillus acidophilus</i>	<i>Lactbacillus casei</i>	<i>Lactovacillus brevis</i>
Розміщення клітин				
Форма та велична колоній				
Температура росту: - оптимальна - гранична				
Кислотність				
Утворення ароматичних речовин				
Сквашування молока: - характер згустку - консистенція - смак - запах				
Джерела виділення				
До складу яких кисломолочних продуктів вводять				

Питання для самоконтролю

1. Які бактерії належать до молочнокислих? Які молочнокислі бактерії називають гомоферментативними та гетероферментативними? Наведіть представників кожної групи.
2. Назвіть представників лактококів. Які їх основні характеристики?
3. Назвіть представників лактобактерій. Які їх основні характеристики?
4. Наведіть приклади використання молочнокислих бактерій у молочній та інших галузях промисловості.
5. Яка роль моліль молочнокислих бактерій у формуванні якості молочних продуктів?

Лабораторно-практичне заняття №5

Вивчення морфологічної будови та властивостей мікроорганізмів, що викликають псування молока і молочних продуктів

Мета. Ознайомитися з морфологічною будовою та основними властивостями мікроорганізмів, що викликають псування молока та молочних продуктів.

Завдання

1. Виготовити препарати для мікроскопії із культур збудників псування молока й молочних продуктів, отриманих на живильних середовищах, пофарбувати їх за Грамом та виконати їх мікроскопію (або провести мікроскопію готових препаратів).

2. Зарисувати результати спостереження.

3. Ознайомитися з основними властивостями мікроорганізмів, що викликають псування молока й молочних продуктів (ріст на живильних середовищах, температурні режими росту, відношення до O_2 , здатність зброджувати молоко, тощо).

Обладнання та матеріали

Світловий мікроскоп, культури збудників псування молока й молочних продуктів, отриманих на МПА, МПБ, агарі з молоком чи на стерильному молоці, предметні скельця, бактеріологічна петля, фізрозчин, набір фарб для фарбування за Грамом або готові пофарбовані препарати для мікроскопії, імерсійне масло.

Довідковий матеріал

До мікроорганізмів, які викликають псування чи вади молока й молочних продуктів, належать: маслянокислі бактерії, гнилісні бактерії, деякі види дріжджів та плісняві гриби (заняття №2), бактеріофаги (заняття № 14).

За характером дії на складові частини молока шкідливі мікроорганізми умовно поділяються на три підгрупи:

- 1) Ті, що діють переважно на молочний цукор і солі молочної кислоти (маслянокислі бактерії);

й молочних продуктах викликають вади кольору (темні плями на поверхні сирів), смаку (гіркий, прогірклий, нечистий).

Гнилісні бактерії досить поширені й трапляються в ґрунті, воді, повітрі, кишечнику людини і тварини на харчових продуктах.

За відношенням до кисню гнилісні бактерії поділяють на три підгрупи:

- 1) аероби;
- 2) факультативні;
- 3) чітко виражені анаероби.

Крім того, розрізняють спороутворюючі та безспорові гнильні мікроорганізми .

Спороутворюючі гнилісні аероби

У молоці й молочних продуктах здебільшого трапляються *Bacillus subtilis* (сінна паличка) (рис. 1а), *Bacillus megatherium* (капустяна паличка) (рис. 1б), *Bacillus mycoides* (грибоподібна паличка) (рис. 1в), *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка) і *Bacillus cereus* (рис. 1г). Спороутворюючі гнилісні аеробні мікроорганізми викликають вади молочних продуктів (прогірклий та гіркий смак) і передчасне згортання молока без підвищення кислотності.

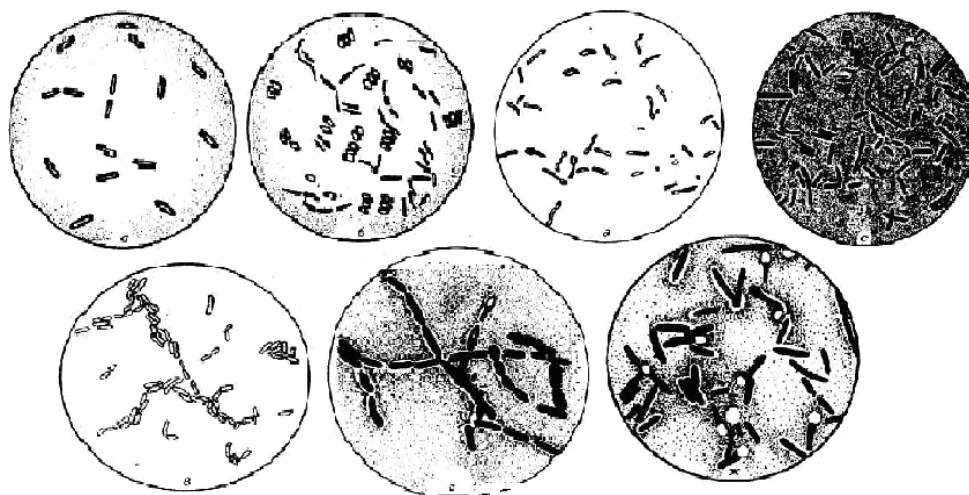


Рис. 1. Спороутворюючі гнильні аероби та анаероби: а – *Bac. subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. mycoides*; г – *Bac. cereus*; д – *Cl. putrificum*; е – *Cl. perfringens*; ж – *Cl. sporogenes*

Морфологія. Це грампозитивні, рухливі палички із заокругленими кінцями, що утворюють терmostійкі спори. Залежно від виду розміщуються поодинокі, попарно чи в ланцюжках.

Культуральні властивості. Аероби, тому добре ростуть на звичайних живильних середовищах (МПА, МПБ).

На поверхні МПБ *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus* формують білового кольору зморшкувату плівку, бульйон залишається прозорим. Інші представники аеробних гnilісних бактерій викликають помутніння бульйону різного ступеня та незначний осад.

На МПА *Bacillus subtilis* формує сухі горбисті колонії сіруватого кольору з нерівними краями, *Bacillus megatherium* – матові колонії з гладкою поверхнею та рівними краями, *Bacillus mesentericus* – сухі сіро-білі колонії з хвилястим краєм та радіальними складками, *Bacillus mycoides* – коренеподібні сіро-білого кольору колоній, що нагадують міцелій гриба, *Bacillus cereus* – великі колонії з бахромчатим краєм.

Неспороутворюючі гnilісні аероби

Ця група гnilісних мікроорганізмів представлена родиною *Enterobacteriaceae* родами *Proteus* (*Proteus vulgaris* і *Proteus mirabilis*) та *Escherichia* (*Escherichia coli*) (рис. 2).

Морфологія. Це урамнегативні, безспорові палички, які розміщуються поодинокі. Капсул не утворюють.

Культуральні властивості. Оптимальна температура для росту мікроорганізмів 25–37 °С. Під час росту мікроорганізмів роду *Proteus* на щільних живильних середовищах відбувається їх характерний повзучий ріст, унаслідок чого поверхня середовищ повністю покривається тонкою прозорою плівкою. У МПБ викликають рясне помутніння бульйону та появу плівки. *Escherichia coli* на МПА утворює росинчасті напівпрозорі колонії, у МПБ – росте у вигляді помутніння середовища.

Неспороутворюючі гnilісні пігментоутворюючі мікроорганізми (рис.2).

Це бактерії видів *Pseudomonas fluorescens* (флюоресцююча паличка), *Pseudomonas aerogenosa* (синегнійна паличка), *Serratia marcescens* (чудова паличка). Викликають вади кольору, консистенції, запаху та смаку молочних продуктів, що зумовлене розщепленням жиру в разі їх довготривалого

зберіганні в охоложеному стані (у холодильнику, холодильних камерах). У молоко здебільшого попадають із залишками води.

Морфологія. Це грамнегативні рухливі палички, спор та капсул не утворюють. Розміщуються поодинокі. Психротрофи.

Культуральні властивості. Викликають помутніння МПБ з утворенням пігменту, характерного для кожного виду: флюоресцююча паличка зафарбовує середовище в зеленувато-жовтий колір, синегнійна паличка – в синьо-зелений, а чудова паличка – у червоний. На МПА формують округлі колонії з рівними краями.

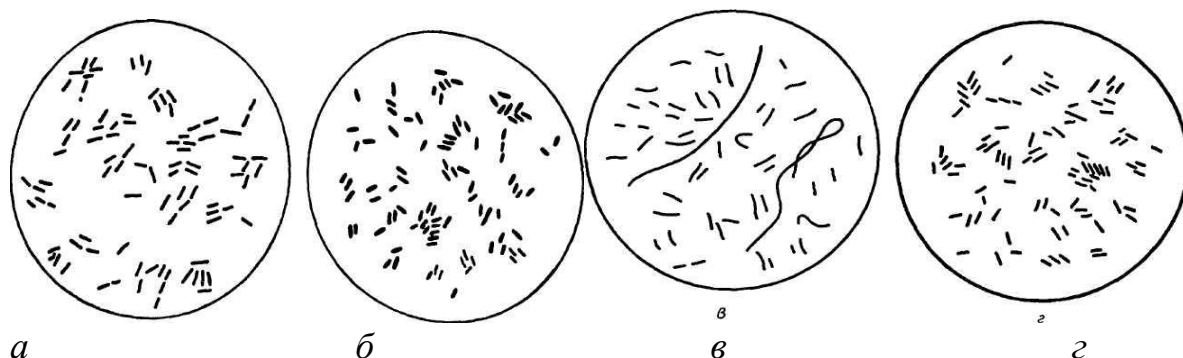


Рис. 2. Неспороутворюючі гнильні аероби: а – *Pseudomonas fluorescens*; б – *Ps. aeruginosa*; в – *Proteus vulgaris*; г – *Escherichia coli*

Спороутворюючі гнильні анаероби

Представлені мікроорганізмами роду *Clostridium* (*Clostridium perfringens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*), які також викликають маслянокисле бродіння (рис. 1д, е, ж).

Крім того, що клостридії спричиняють маслянокисле бродіння в молочних продуктах, вони також є збудниками анаеробного гниття тобто розпаду білка в анаеробних умовах, викликаючи вади смаку, запаху та консистенції даних продуктів. Так, при розвитку клостридій в сирах викликають їх пізні спучування: сир набуває неправильного щелеподібного малюнку, розм'якшену губчасту консистенцію, неприємний салістий запах.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії зарисувати в робочих зошитах мікроорганізми, що викликають псування молока й молочних продуктів.

Завдання 2. Спостерігати на живильних середовищах у чашках Петрі ріст мікроорганізмів, що викликають псування молока й молочних продуктів.

Завдання 3. Використовуючи отримані результати спостереження та дані літературних джерел, заповніть таблицю 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика мікроорганізмів, що спричиняють псування молока й молочних продуктів

Показники	Маслянокислі бактерії	Гнилісні бактерії					
		спороутворюючі аероби		неспороутворюючі аероби		спороутворюючі анаероби	
		<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. ycoides</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Cl. putrificus</i>	<i>Cl. sporogenes</i>
Морфологічна будова мікробних клітин							
Наявність спор капсул джгутиків							
Ріст на середовищах МПА МПБ							
Оптимальна температура культивування							
Які складові молока розщеплюють							

Питання для самоконтролю

1. Назвіть мікроорганізми, що спричиняють псування молока й молочних продуктів.
2. Які існують шляхи потрапляння в молоко мікроорганізмів, що призводять до його псування.
3. Які морфологічні та культуральні властивості характерні для маслянокислих бактерій?
4. Які морфологічні та культуральні властивості мають гнильні бактерії?
5. Яку роль молочнокислі бактерії відіграють у формуванні якості молочних продуктів?

Лабораторно-практичне заняття №6

Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко та молочні продукти

Мета. Ознайомитись з морфологічними та культуральними властивостями основних збудників токсикозів.

Завдання

1. Чітко визначити шляхи потрапляння збудників харчових токсикозів в молоко й молочні продукти.
2. Вивчити морфологічні властивості основних збудників токсикозів методом мікроскопії готових препаратів.
3. Вивчити культуральні властивості основних збудників токсикозів.
4. Вивчити стійкість збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти, до фізичних та хімічних факторів.

Обладнання та матеріали

Готові фіксовані препарати збудників харчових токсикозів для мікроскопії, мікроскопи, імерсійне масло. Демонстраційні схеми та фото культур збудників харчових токсикозів на різних середовищах.

Довідковий матеріал

Токсикози – захворювання людей, що виникають унаслідок споживання продуктів, які містять токсини бактеріального походження. До збудників, що викликають харчові токсикози (інтоксикації), відносять патогенні стафілококи та стрептококи і збудник ботулізму (*Clostridium botulinum*).

Патогенні стафілококи. Стафілококові інтоксикації вважаються найтипівішими бактеріальними токсикозами.

Стафілококи здатні виробляти різні отруйні речовини (летальний токсин, дермонекротоксин, ентеротоксин), ферменти, що беруть участь в обміні речовин (протеазу, ліпазу, фосфатазу), і ферменти мікробного самозахисту та агресії (коагулазу, фібринолізин, лецитиназу). Порівняно з іншими коками патогенні стафілококи більш стійкі до дії бактерицидних речовин, особливо стійкішими є їхні токсини.

Найбільш хвороботворним є золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*), але його небезпека для людини не залежить від здатності виділяти пігмент. Причиною токсикозу можуть бути стафілококи як з наявністю пігменту (золотисто-жовтий, лимонно-жовтий), так і без нього (білого кольору). Пігменти, нерозчинні у воді, забарвлюють тільки культуру і не дифундують у живильне середовище. Джерелами і носіями стафілококів є тварини та люди (кишечник, осередки ураження шкіри вим'я, печінки, слизових оболонок та ін.).

Молоко й молочні продукти є сприятливим середовищем для продукування стафілококом токсину. Фактично молоко завжди містить певну кількість патогенних мікроорганізмів і є джерелом постійної загрози виникнення стафілококових токсикозів. Джерелом потрапляння стафілококів у молоко й молочні продукти є тварини, хворі на мастит (запалення молочної залози), і люди з гнійничковими ураженнями шкіри.

Морфологія. Стафілококи – це округлої форми мікроорганізми, що розміщуються у вигляді грона винограду, діаметром 0,5–1,5 мкм. Грампозитивні. Вони не мають джгутиків, не утворюють спор. Деякі штами, утворюють капсулу або мікрокапсулу. Це аероби та факультативні анаероби, не вибагливі до живильних середовищ, культивуються за температури 32 – 37 °С, рН середовища 7,2–7,6. На МПА через 12–24 год з'являються округлі колонії білого, лимонно-жовтого або помаранчевого кольору. Стафілококи гинуть при дії теплових режимах, що застосовуються у виробництві молочних продуктів, проте токсини є термостійкими, особливо ентеротоксин, що спричиняє токсикоз.

Патогенні стрептококи досить поширені в природі й швидко та інтенсивно розмножуються в найрізноманітніших харчових продуктах як за кімнатної температури, так і за температури 37 °С, досягаючи максимальної концентрації протягом 24 год.

Морфологія. Ці нерухомі бактерії овальної, сферичної, ланцетоподібної форм, їх діаметр становить 0,5–1,25 мкм, капсул і спор не утворюють. У мазках з харчових продуктів (молочних, м'ясних), уражених органів мають вигляд

розташованих попарно коків або складених з них ланцюжків різної довжини, у мазках із культур створюють переважно короткі ланцюжки.

На МПА стрептококи ростуть у вигляді сірувато-білих колоній, у МПБ – ріст виявляється у вигляді пластівців, що осідають на дно пробірки.

Ентерококи відрізняються від інших стрептококів більшою стійкістю: вони здатні рости за температури 10–45 °С, тривалий час переносять низькі температури (–20 °С), стійкі до висихання, мають виражену солестійкість (розмножуються в середовищі з вмістом 17 % кухонної солі і рН 3,0–12,0), витримують нагрівання до 60 °С упродовж 30 хв. Під час нагрівання до 85 °С вони гинуть упродовж 10 хв.

Джерелами зараження харчових продуктів є хворі тварини та люди. Особливу небезпеку представляють корови, уражені маститом. Хвора людина або бактеріоносій, у яких стрептококи можуть знаходитись у носоглотці, або така, яка має розлади шлунково-кишкового тракту, є небезпечним джерелом зараження харчових продуктів.

Клінічні прояви харчового захворювання, спричиненого патогенними стрептококами, малохарактерні, а інкубаційний період триває від 3 до 24 годин. Тривалість захворювання – від кількох годин до 1 доби, рідко – до 3 діб. Ознаки хвороби: нудота, блювання, біль у животі по ходу кишечника, головний біль, температура часто не підвищується, пронос. Одужування настає через 36–40 год. Летальних випадків не зафіксовано.

Збудник ботулізму – це анаеробний споровий мікроорганізм із роду клостридій – *Cl. botulinum*. За токсичністю ботуліністичний токсин перевищує токсин усіх відомих мікробів. Це типовий ґрунтовий анаероб.

Морфологія. *Clostridium botulinum* – це велика паличка, рухлива, має овальну спору, яка своїми розмірами перевищує діаметр бактеріальної клітини (клітина має вид тенісної ракетки), капсулу не утворює, грампозитивна. Збудник ботулізму – чітко виражений анаероб, оптимальна температура росту 28–35 °С при рН середовища 7,2–7,4 од. Добре росте на середовищі Кітта–Тароцці у вигляді помутніння середовища з подальшим випадінням осаду на дно пробірки. Пептонізує молоко. Температурний оптимум для

токсинування знаходиться в межах 22–37 °С, за температури нижче 14 °С продукування токсину зупиняється. Оптимальне середовище нейтральне.

Збудник ботулізму досить стійкий до впливу зовнішніх факторів. Спори цих бактерій витримують кип'ятіння упродовж 6 год; за температури 105 °С витримують до 70 хв, 110 °С – 15 хв., 115 °С – 7 хв, і 120 °С – 2 хв; автоклавування руйнує їх через 20 хв; 10 % соляна кислота – через 1 год, 50 % розчин формаліну – через 24 год. Вегетативні форми збудника малостійкі у зовнішньому середовищі і гинуть у разі нагрівання до 80 °С упродовж 15–30 хв.

Однак найхарактернішою ознакою збудника ботулізму є його здатність виробляти в анаеробних умовах токсини великої сили. На противагу іншим токсинам, ботуліністичний токсин не руйнується травними ферментами. Температурний оптимум для токсинування становить 21–37 °С, однак є дані, що воно можливе за температури 10 °С. Оптимум рН для утворення токсину 7,0. Нагрівання до 80 °С руйнує різні типи токсинів через 30 хв. (до 60 хв), кип'ятіння – через 10–15 хв. У харчових продуктах, зокрема у консервах, нагрівання до 100 °С іноді не повністю руйнує токсин протягом зазначеного часу, тільки послаблює його дію.

Зовнішній вигляд продуктів, у яких утворився ботуліновий токсин може змінюватися. У них порушується структура тканин, вони розм'якшуються, з'являється неприємний запах, утворюється газ. У герметично закритій тарі виникає бомбаж. Однак відзначаються випадки, коли незважаючи на наявність мікробів ботулізму та їхніх токсинів харчові продукти виглядають доброякісними і бомбаж консервів не спостерігається.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми та готові препарати для мікроскопії, зарисувати в робочих зошитах збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 2. Провести спостереження за ростом на живильних середовищах в чашках Петрі збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 3. Використовуючи результати отриманих спостережень та дані літературних джерел, заповніть табл. 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика збудників харчових токсикозів та токсикоінфекцій

	Патогенні стрептококи	Патогенні стафілококи	Збудник ботулізму
Форма бактеріальних клітин			
Фарбування за Грамом			
Рухливість			
Наявність спор			
Наявність капсули			
Відношення до кисню			
Температура культивування			
Стійкість до фізичних та хімічних факторів - високі температури - низькі температури - висушування - рН середовища - наявність солей			
Джерела потрапляння в молоко й молочні продукти			
Основні симптоми (клінічні ознаки)			
Шляхи попередження			

Питання для самоконтролю

1. Що таке токсикози? Які мікроорганізми викликають токсикози через молоко й молочні продукти?
2. Які морфологічні особливості основних збудників токсикозів?
3. Які культуральні властивості основних збудників токсикозів?
4. Які харчові токсикози виникають у результаті вживання недоброякісних молочних продуктів?
5. Охарактеризуйте заходи щодо попередження харчових токсикозів.

Лабораторно-практичне заняття №7

Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко та молочні продукти

Мета. Ознайомитися з морфологічними та культуральними властивостями збудників токсикоінфекцій.

Завдання

1. Чітко визначити шляхи надходження збудників токсикоінфекцій у молоко й молочні продукти.
2. Вивчити морфологічні властивості збудників токсикоінфекцій методом мікроскопії готових препаратів.
3. Вивчити культуральні властивості збудників токсикоінфекцій.
4. Вивчити стійкість збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти до фізичних та хімічних факторів.

Обладнання та матеріали

Готові фіксовані препарати збудників харчових токсикоінфекцій для мікроскопії, мікроскопи, імерсійне масло. Демонстраційні схеми та фото культур збудників токсикоінфекцій на різних середовищах.

Довідковий матеріал

Харчові токсикоінфекції – гострі кишкові захворювання, які виникають у результаті вживання харчових продуктів, що містять велику кількість живих бактерій специфічного збудника та їхніх токсинів.

Збудниками токсикоінфекцій є бактерії родів сальмонела (*Salmonella*), ешерихія (*Escherichia*), лістерія (*Listeria*), протей (*Proteus*), клостридіум (*Clostridium (Cl. perfringens)*).

Бактерії роду сальмонела (*Salmonella*) – це палички із заокругленими кінцями, іноді овальної форми, довжиною 2–4 мкм, завширшки 0,5 мкм. Іноді бактерії утворюють нитки, це аероби або факультативні анаероби. Усі вони, за винятком *S. gallinarum*, *S. pullorum*, рухливі. Сальмонели грамнегативні, не утворюють спор та капсул. Оптимальна реакція середовища для росту слабколужна (рН 7,2–7,4), температура 37 °С, хоча вони добре ростуть за

кімнатної температури. Більшість сальмонел добре росте на звичайних живильних середовищах. На простому агарі гладкі форми бактерій утворюють круглі, окреслені, напівпрозорі, випуклі, вологі колонії з блакитним відтінком. Шорсткуваті форми ростуть у вигляді нерівно округлених, шорсткуватих, каламутних (тьмяних) і сухих колоній. Під час росту у бульйоні вони викликають рівномірне помутніння середовища, за винятком шорсткуватих форм, які у рідких середовищах дають осад з прозорою надосадовою рідиною.

Стійкість сальмонел до дії деяких фізичних та хімічних факторів є досить високою. Вони порівняно легко переносять високі й низькі температури, значною мірою стійкі до впливу навколишнього середовища: можуть тривалий час виживати у пилу, гноївці, сухому калі, ґрунті, воді та тваринних кормах, зберігаючи вірулентність.

Життєздатність сальмонел у молочних продуктах залежить від виду останніх. Так, у сирому молоці за температури +18...20 °С та кислотності 26 °Т виживають 11 діб, а за +5...+8 °С до 20 діб; у вершковому маслі, що зберігається за кімнатної температури, сальмонели життєздатні від 52 до 128 діб; у кисломолочному сирі – 16 діб, а за температури 4 °С – 91 та 64 діб, відповідно, у молочно-шоколадній масі – близько 15–19 міс; у кисляку з кислотністю 85 °Т – 48 год, а з кислотністю 130–135 °Т вони втрачають життєздатність через 24 год.

Бактерії роду ешерихія (*Escherichia*) – бактерії групи кишкових паличок) мають фекальне походження і як постійні мешканці кишечника людини та тварин досить поширені у навколишньому середовищі. Серед бактерій кишкових паличок поряд з непатогенними (сапрофітними) штамами трапляються ентеропатогенні, здатні викликати шлунково-кишкові захворювання людей і тварин. Ентеропатогенність *E. coli* визначається її токсиноутворенням і здатністю розмножуватися у тонких кишках.

Рід *Escherichia* представлений делількома видами, які містять велику кількість різних біохімічних та серологічних варіантів. Ці бактерії мають своєрідну антигенну структуру, за якою проводять диференціацію патогенних кишкових паличок від апатогенних..

За морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями між ентеропатогенними та банальними сапрофітними штамми кишкових паличок особливих розбіжностей не встановлено. Не спостерігаються також різкі розбіжності між вказаними штамми та їх стійкістю до дії несприятливих факторів довкілля (високі й низькі температури, реакція середовища, висушування, кухонна сіль, ультрафіолетове випромінювання та ін.), а також і виживанні в різних середовищах (молоко, вода, ґрунт).

Ешеріхії можна виділити з молока, сметани, молочнокислих продуктів, сиру. Якщо ці продукти були виготовлені у промислових умовах, то основною причиною знаходження вказаних мікроорганізмів є порушення встановлених санітарно-гігієнічних вимог до виробництва.

У молоці при кімнатній температурі *E. coli* зберігається 10–30 діб, за температури +3...+5 °С близько 30–50 діб, у стерилізованому молоці 9–10 міс., а у дитячій поживній суміші – 92 діб.

Морфологія. Ешеріхії – це дрібні короткі палички, рухливі, грам негативні, спор та капсул не утворюють. Є факультативними анаеробами і культивуються на простих живильних середовищах за рН 7,2–7,4 та оптимальної температури 37 °С. На МПА бактерій формують опуклі колонії округлої форми з рівними краями, напівпрозорі, зі сіро-голубим відтінком. У МПБ бактерії викликають помутніння бульйону зі сіро-білуватим осадом.

Стійкість бактерій *E. coli* до дії високих температур невелика: за температури 50 °С гинуть через 1 год, за 60 °С – 15 хв, за 100 °С – миттєво. Дотримання технологічних режимів теплової обробки молочних продуктів з доведенням температури до 68–72 °С забезпечує загибель ешеріхії колі.

Бактерії роду *E. coli* можуть місяцями знаходитися у ґрунті, воді, випорожненнях, на предметах побуту. Добре витримують висушування. Дезінфікуючі речовини, що використовуються у прийнятих концентраціях, надійно знищують ешеріхій у короткі строки.

При вживанні сирого молока можуть виникати гострі шлунково-кишкові захворювання, які викликаються ентеропатогенними видами кишкової палички. Ці бактерії можуть знаходитись в молоці у великих кількостях у літні місяці.

Бактерії групи кишкових паличок викликають зміни смаку і запаху молока, а деякі різновиди – його ослизнення. Вони гинуть здебільшого під час пастеризації, і їх наявність у пастеризованому молоці вище встановленої норми вказує на незадовільну пастеризацію або вторинне забруднення після пастеризації.

Джерелом забруднення молока патогенними штамми кишкових паличок є хворі тварини й люди, які працюють на фермі та переобному підприємстві й порушують санітарно-гігієнічний режим під час технології виробництва продуктів.

Протягом останніх 10 років значна увага учених і практиків була спрямована на інші мікроорганізми, які прийнято вважати етіологічним фактором харчових токсикоінфекцій, так звані «нові тапогени» або маловивчені збудники родів *Campylobacter*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafhia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*. Для розгляду пропонується мікроорганізми родів *Campylobacter*, *Yersinia*.

Лістерії (*Listeria monocytogenes*). Джерелами надходження цих мікроорганізмів у молоко й молочні продукти є повітря, вода, обладнання, корма (особливо силос низької якості), персонал, конденсат з стелі, а також хворі на лістеріоз тварини та інші носії лістерій тощо. Лістерії ростуть як за наявності кисню, так і без нього, але оптимальним є середовище з невисокою концентрацією кисню. Ростуть ці бактерії за температури від – 0,4 °C до + 45 °C, концентрації NaCl – до 10 %, рН 4,3–9,4. Лістерії гинуть за температури 100 °C за 1–2 сек, а за температури 70-75 °C за 10–15 хв.

Лістерії є небезпечними мікроорганізмами для здоров'я людей. Інкубаційний період перебігу лістеріозу в людей становить від 2 діб до декількох місяців. Субклінічний перебіг – ураження геніталій, у вагітних можливі аборти. Клінічної перебіг – головний біль (менінгіт), підвищення температури, блювота. Особливо небезпечними ці мікроорганізми є для новонароджених дітей, у яких можуть розвиватися менінгіти. Летальність серед новонароджених може сягати до 30–40 %. Смертність серед дорослого населення становить 3–10 %.

Кампілобактерії. Джерело надходження цих мікроорганізмів у молоко – фекальна контамінація. Ріст кампілобактерій відбувається за пониженої концентрації кисню, за температури 36,5–37 °С, виживають за 0–4 °С, але не ростуть за цієї температури. Не ростуть у кислому середовищі. Гинуть за температури 65–70 °С за 5–10 хв. Симптоми та перебіг захворювання такі: інкубаційний період становить від 12 годин до 7 діб після вживання продукту, який містить *Campylobacter*. В окремих випадках цей період може бути до 1,5 місяця. Клінічні ознаки характеризуються діареєю, головними болями, підвищеною температурою. Перебіг – від однієї доби до одного тижня. Смертельні випадки зареєстровані в 0,5–2 % хворих.

Ієрсинії (*Yersinia enterocolitica*). Основним джерелом *Y. enterocolitica* є тварини (свині, корови, гризуни, собаки, кішки). Людина також може бути джерелом контамінації продукту (працівники молочної промисловості тощо). Найбільше інфіковані ієрсиніями свині. Основний шлях передачі *Y. enterocolitica* – харчовий. Захворювання здебільшого виникає після споживання забруднених молочних продуктів, свинини, яловичини, баранини, дичини, свіжих заморожених фруктів та овочів. *Y. enterocolitica* не тільки виживають, але й розмножуються за умови низьких температур, що слід урахувати при виникненні спалахів ієрсиніозу.

Ієрсиніоз частіше реєструють у холодну пору року. Клініка поліморфна; переважає гастроентероколітна форма. Можливі також септичні, суглобові форми. Інкубаційний період становить 1–2 доби, іноді від 4 годин до 4 діб. Захворювання починається з ознобу, підвищення температури до 38–39 °С, головний біль, загальна слабкість, біль у м'язах, суглобах, нудота. Через 1–2 год. виникає переймоподібний біль у животі і пронос, іноді з домішками слизу і крові. Тривалість захворювання до 7 діб, у разі важкого перебігу подовжується до 20–28 діб. Для підтвердження діагнозу проводять бактеріологічні й серологічні дослідження.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Використовуючи схеми й готові препарати для мікроскопії, зарисувати в робочих зошитах збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 2. Провести спостереження за ростом на живильних середовищах в чашках Петрі збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко й молочні продукти.

Завдання 3. Використовуючи отримані спостережень та дані літературних джерел, заповніть табл. 1.

Таблиця 1

Загальна характеристика збудників харчових токсикозів та токсикоінфекцій

Показники	Бактерії роду сальмонела	Бактерії роду кишкової палички
Форма бактеріальних клітин		
Фарбування за Грамом		
Рухливість		
Наявність спор		
Наявність капсули		
Відношення до кисню		
Температура культивування		
Стійкість до фізичних та хімічних факторів: - високі температури - низькі температури - висушування - рН середовища - наявність солей		
Джерела потрапляння в молоко й молочні продукти		
Основні симптоми (клінічні ознаки)		
Шляхи попередження		

Питання для самоконтролю

1. Що таке токсикоінфекції? Які мікроорганізми викликають токсикоінфекції через молока й молочні продукти?
2. Які морфологічні особливості основних збудників токсикоінфекцій?
3. Які культуральні особливості збудників токсикоінфекцій?
4. Охарактеризуйте умови вживання збудників токсикоінфекцій в молоці й молочних продуктах.
5. Які збудники токсикоінфекцій відносять до «нових патогенів»? Дайте їх коротку характеристику.

СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Лабораторно-практичне заняття №8

Визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини за редуктазними методами

Мета. Ознайомитися з методикою визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини за редуктазною пробою (з метиленовим синім та із резазурином).

Завдання

1. Ознайомитися зі схемою мікробіологічного дослідження сирого молока.
2. Навчитися проводити відбір проб молока-сировини і їх готувку для дослідження.
3. Визначити бактеріальну забрудненість молока-сировини за редуктазною пробою (з метиленовим синім та із резазурином).

Обладнання та матеріали

Проби молока-сировини, пробірки, піпетки, редуктазник або водяна баня, термометри, мірні циліндри на 100 та 200 мл, робочі розчин реактивів.

Довідковий матеріал

Основним джерелом потрапляння мікробів у молоко є вим'я, шкірний покрив тварин, руки операторів, посуд, повітря та ін. У процесі зберігання молока мікроорганізми змінюють його властивості. Отже, бактеріальна забрудненість молока є важливим показником, який характеризує умови отримання та гігієнічну якість.

Загальні правила відбирання проб сирого молока для мікробіологічного контролювання проводять згідно ДСТУ ISO 707:1997, ДСТУ ISO 2859-1 (назви дивись в списку нормативних посилань).

1. Відбирати проби для мікробіологічних досліджень завжди повинна проводити особа, що має досвід у застосованні методики відбирання проб для мікробіологічних досліджень. Ця особа не повинна бути хворою на будь які інфекційні захворювання.

2. Відібрана проба повинна бути достовірною, без пошкоджень, не забрудненою під час зберігання та\або транспортування.

3. Слід відбирати паралельні проби і зберігати їх на випадок проведення арбітражу.

4. Проби для мікробіологічного контролювання потрібно відбирати у стерильний посуд, використовуючи стерильне приладдя та накривати стерильними накривками.

5. Обладнання з відбирання проб повинне бути виготовлене з нержавіючої сталі або іншого придатного матеріалу відповідної міцності, який не буде викликати змін у пробі, які зможуть вплинути на результати дослідження. Усі поверхні повинні бути гладкі і вільні від тріщин. Усі кути повинні бути заокруглені. Не дозволено застосовувати несправне, забруднене приладдя. Перед використанням обладнання повинне бути сухим.

6. Стерилізацію приладдя проводять такими методами:

- витримуванням в сушильній шафі за температури $170-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж $2\pm 0,5$ год;

- витримуванням в автоклаві за температури $121\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менше, ніж 20 хв;

- витримуванням упродовж 1-2 с усіх робочих поверхонь обладнання в полум'ї спиртівки або газового пальника;

- зануренням у розчин етанолу концентрацією не менше 70 %;

- зануренням у етанол концентрацією 96 % та наступним фламбуванням.

7. Перемішування сирого молока перед відбиранням проб проводять мутовками ручними або механічними (рис. 1, 2).

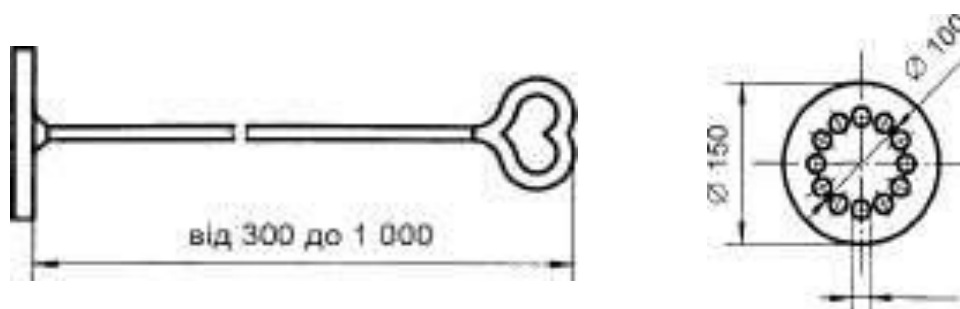


Рис. 1. Ручна мутовка (мішалка) для бідонів і відер (розміри у міліметрах)

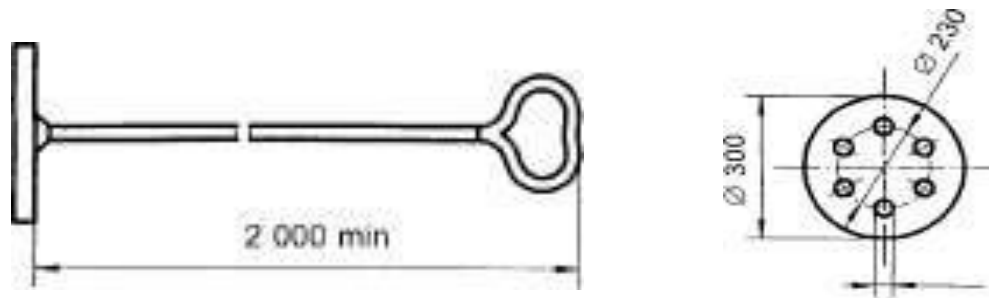


Рис. 2. Мутовка (мішалка) для автомобільних, залізничних цистерн і цистерн на фермах (розміри у міліметрах)

8. Відбір проб проводять відбірником, черпаком, металевою трубкою, які кожного разу перед використанням повинні бути простерилізовані.

9. З точкових проб, відібраних з кожної фляги, відра, цистерни, баку готують об'єднану пробу. Кількість об'єднаної проби повинна бути не меншою, ніж 100 мл.

10. Відібрані проби молока забезпечують етикеткою, на якій помічають: номер проби, номер та обсяг партії, дату та час відбирання проби, посаду та підпис особи, що відбирала пробу;

11. Мікробіологічне контролювання продукту виконують не пізніше, ніж через 4 год з моменту відбирання проби. До початку контролювання пробу зберігають у холодильнику за температури не вище 6 °С. Проби продукту повинні бути доставлені в лабораторію не пізніше ніж через 2 год після їх відбирання.

Визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини за редуктазними пробами. Визначення бактеріальної забрудненості молока проводять методами визначення редуктази. Редуктаза – це ензим, який виробляють мікроорганізми і редуктазні методи базуються на здатності цього ферменту знебарвлювати метиленовий синій чи змінювати колір резазурину – фарбників. Чим швидше відбувається знебарвлення чи зміна кольору фарбника тим більше в дослідній пробі молока редуктази та мікроорганізмів, які її продукують. Отже, якість такого молока низька.

Визначення бактеріальної забрудненості молока за редуктазною пробою можна проводити двома методами: з метиленовим синім або резазурином.

Метод визначення редуктази з метиленовим синім

Сутність методу. Метод заснований на відновленні метиленового синього окислювально-відновлювальними ензимами, що виділяють в молоко мікроорганізми. За тривалістю знебарвлення метиленового синього оцінюють бактеріальну забрудненість сирого молока.

Проведення аналізу. Визначати якість молока за редуктазною пробою можна стандартним або прискореним методом.

Стандартний метод. У пробірки наливають по 1 мл робочого розчину метиленового блакитного (приготування дивись в додатку В) і 20 мл досліджуваного молока, змішують їх шляхом триразового перевертання пробірок. Пробірки поміщають у редуктазник або на водяну баню з термометром за температури води 37 ± 1 °С.

Вода в редуктазнику або у водяній бані після занурення пробірок з молоком повинна доходити до рівня рідини в пробірці або бути трохи вище. Температуру води необхідно підтримувати на рівні 37 ± 1 °С.

Момент занурення пробірок у редуктазник вважають початком аналізу. Спостереження за зміною забарвлення ведуть через 30 хв, через 2 години, 5 годин та більше після початку аналізу.

Закінченням аналізу вважають момент знебарвлення молока. При цьому, якщо залишається невеликий кільцеподібний зафарбований шар угорі (близько 1 см) або невелика зафарбована частина внизу пробірки, на це не зважають. Появу забарвлення молока в цих пробірках при струшуванні не враховують. Залежно від часу знебарвлення молоко відносять до одного із трьох гатунків.

Прискорений метод. У пробірки відміряють 10 мл молока і нагрівають його до $38-40$ °С на водяній бані або в редуктазнику. У нагріте молоко додають 1 мл метиленового синього, приготовленого аналогічно стандартному методу, але розведеного в 10 разів (1 мл робочого розчину, який застосовують при стандартному методі, розводять 9 мл дистильованої води. Розчин готують перед постановкою проби).

Завершенням аналізу вважають момент знебарвлення молока. Залежно від часу знебарвлення вмісту пробірки визначають клас і якість молока.

Обробка результатів. Гатунок та орієнтовну кількість мікроорганізмів в сирому молоці встановлюють відповідно до таб. 1.

Таблиця 1

Критерії визначення класу молока за редуктажною пробою з метиленовим синім

Гатунок молока	Тривалість знебарвлення, год.	Орієнтовна кількість бактерій в 1 см ³ молока, КУО
Екстра	Від 5 годин і більше	До 100 тис.
Вищий	Від 2 год. до 5 год.	До 300 тис.
Перший	Від 30 хв. до 2 год.	До 500 тис.

Метод визначення редуктази з резазурином

Сутність методу. Метод заснований на відновленні резазурину окислювально-відновлювальними ферментами, що виділяють в молоко мікроорганізми. За тривалістю зміни забарвлення резазурину оцінюють бактеріальну обсіянність сирого молока.

Проведення аналізу. Пробу з резазурином варто проводити не раніше, ніж через 2 год. після доїння. У пробірки наливають по 1 см³ робочого розчину резазурину (приготування дивись в додатку) і по 10см³ досліджуваного молока, закривають гумовими пробками і змішують шляхом повільного триразового перевертання пробірок. Пробірки поміщають у редуктазник з температурою води (37± 1) °С.

У разі відсутності редуктазника можна використовувати водяну баню, поміщену в термостат з температурою (37±1) °С. Вода в редуктазнику або водяній бані після занурення пробірок з молоком повинна доходити до рівня рідини в пробірці або бути трохи вище, її підтримують протягом усього часу визначення (37±1) °С.

Пробірки з молоком і резазурином протягом аналізу повинні бути захищені від світла прямих сонячних променів (редуктазник має бути щільно закритий кришкою).

Момент занурення пробірок у редуктазник вважають початком аналізу.

Показання знімають через 1 год. та 1,5 год.

Появу забарвлення молока в цих пробірках при струшуванні не враховують. Через одну год пробірки дістають із редуктазника або іншого обладнання. Пробірки з молоком, які мають забарвлення від сіро-бузкового до бузкового зі слабким сірим відтінком, залишають у редуктазнику ще на 30 хв.

Обробка результатів. Залежно від тривалості знебарвлення або зміни кольору молоко відносять до одного з трьох гатунків, зазначених у табл. 2.

Таблиця 2

Рівень бактеріального забруднення молока за резазуриною пробою

Гатунок молока	Тривалість знебарвлення чи зміни кольору, год	Забарвлення молока	Орієнтована кількість бактерій у 1 см ³ молока, КУО
екстра	більше 3,5	Сіро-бузкове до бузкового зі слабким сірим відтінком	до 100 тис.
вищий	3,5	Сіро-бузкове до бузкового зі слабким сірим відтінком	до 300 тис.
перший	2,5	Бузкове з рожевим відтінком або яскраво-рожеве	до 500 тис.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Провести відбір середніх проб сирого молока й підготувати їх до мікробіологічного дослідження, дотримуючись правил стерильності. Перерисувати в робочий зошит схему мікробіологічного дослідження сирого молока та схему проведення десятикратних розведень.

Завдання 2. Визначити бактеріальну забрудненість відібраних проб сирого молока за редуктазною пробою:

а) з метиленовим синім (табл. 3) або б) з резазурином (табл. 4).

Результати проведеної роботи занести в таблиці та зробити висновок.

Завдання 3. Охарактеризувати молоко щодо бактеріальної забрудненості, якщо при визначенні редуктази методом з метиленовим синім знебарвлення проб молока відбулося: а) через 10 хв; б) через 1,5 год; в) через 3 год; г) не відбулось навіть через 5 і більше годн.

Таблиця 3

Результати дослідження молока пробою на редуктазу з метиленовим синім

№ проби молока	Тривалість знебарвлення молока, год	Орієнтовна кількість бактерій в 1 см ³ досліджуваного молока згідно ДСТУ, КУО	Гатунок молока
1			
2			

3			
---	--	--	--

Таблиця 4

Результати дослідження проб молока пробою на редуктазу з резазурином

№ проби молока	Тривалість зміни кольору, час	Забарвлення проб молока	Орієнтовна кількість бактерій в 1 см ³ досліджуваного молока згідно ДСТУ, КУО	Гатунок молока
1				
2				
3				

Питання для самоконтролю

1. Як відбирають проби сирого молока для мікробіологічного дослідження?
2. Як відібрані проби молока готують до дослідження?
3. Які методи використовують для визначення бактеріальної забрудненості молока?
4. У чому полягає сутність методів визначення редуктази з метиленовим синім та резазурином?
5. Як оцінюють сире молоко методом визначення редуктази з метиленовим блакитним?
6. Як оцінюють сире молоко методом визначення редуктази з резазурином?

Лабораторно-практичне заняття №9
Визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини
чашковим методом

Мета. Ознайомитися з методикою визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини чашковим методом.

Завдання

1. Ознайомитися зі схемою визначення бактеріальної забрудненості сирого молока чашковим методом.
2. Навчитися готувати проби молока для мікробіологічного дослідження.
3. Визначити в дослідних пробах сирого молока кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ) чашковим методом.

Обладнання та матеріали

Проби сирого молока, пробірки, піпетки, мірні циліндри на 100, стерильний розчин натрію хлориду 0,9 %, чашки Петрі, живильні середовища (МПА), термостат, термометр.

Довідковий матеріал

Відбирають проби сирого молока та готують їх до дослідження.

Підготовка проб для дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003).
Відібрані проби сирого молока перед дослідженням ретельно перемішують, уникаючи утворення піни або дають їй осісти. Інтервал між перемішуванням та перенесенням дослідної проб не повинно перевищувати 3 хв.

Безпосередньо перед посівом готують десятикратні розведення сирого молока в стерильних розчинах хлористого натрію, пептонно-сольового розчину, розчину з пептоном або фосфатного буферу. Для цього відбирають стерильною піпеткою 1 см³ (або 10 см³, або 11 см³) сирого молока, у стерильну пробірку 9 см³ (чи колбу з 90 см³ або 99 см³ розчинника). Перемішують і отримують перше розведення 1:10 (або 10¹).

Подальші десятикратні розведення готують наступним чином. Переносять із першої пробірки (колби) 1 см³ (10 см³ або 11 см³) в іншу пробірку (колбу), яка містить 9 см³ (90 см³ або 99 см³) стерильного розчинника, уникаючи контакту піпетки з розчинником. Для кожного розведення необхідно брати нову піпетку.

У разі потреби повторюють ці операції з розведенням 10², одержуючи наступні розведення (див. рис. 1).

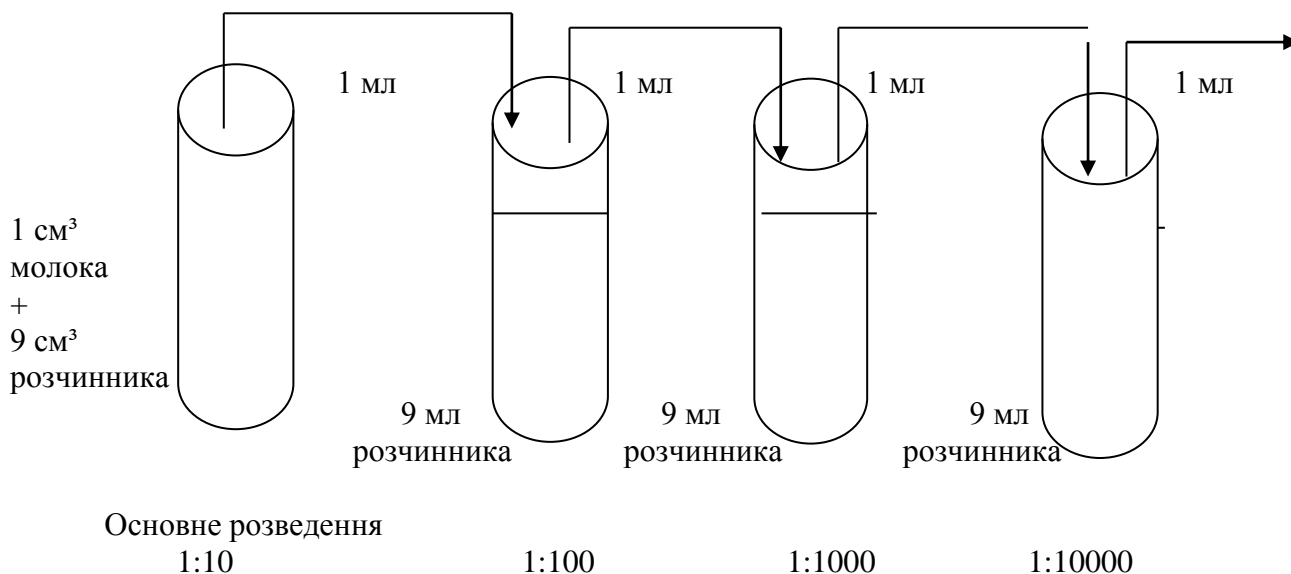


Рис. 1. Приготування десятикратних розведень молока для мікробіологічного дослідження

Посів роблять з таких розведень молока, щоб на чашках виросло не менше 30 і не більше 300 колоній.

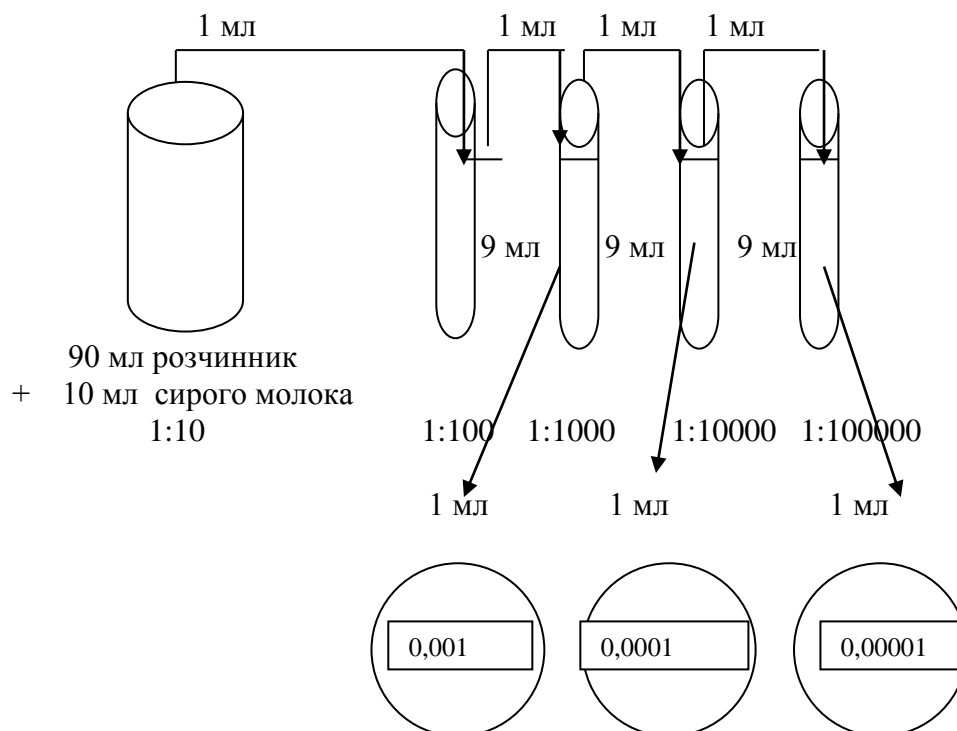


Рис. 2. Визначення бактеріальної забрудненості сирого молока чашковим методом

Із кожної проби роблять посів по 1 мл на 2–3 чашки із розведень від 0,1 до 0,000001.

Кожне розведення вносять у чашку в об'ємі 1 мл і заливають 10–15 мл розплавленого й охолодженого до 40–45 °С живильного середовища (МПА).

Після заливу середовища вміст чашки ретельно перемішують і залишають для затвердіння. Посіви ставлять у термостат при 30 °С на 72 год, а потім підраховують кількість вирослих колоній і вираховують кількість мікроорганізмів в 1 мл молока-сировини за формулою:

$$X = \left(\frac{(\sum C_{n_0}) * 1}{m} + \frac{(\sum C_{n_1}) * 10^1}{m} + \frac{(\sum C_{n_2}) * 10^2}{m} + \frac{(\sum C_{n_i}) * 10^i}{m} \right) * \frac{1}{n}$$

де $\sum C_{n_0} * 1; \sum C_{n_1} * 10^1; \dots; \sum C_{n_i} * 10^i$ – сума колоній, які виросли на чашках Петрі в межах даного розведення;

m – кількість чашок з яких проводять підрахунок колоній в межах даного розведення;

n – кількість врахованих розведень;

Приклад:

Підрахунок кількості колоній на трьох чашках показав такий результат:

– для нерозведеного дослідного матеріалу: 280; 290; 270;

– у розведенні 1:10 (10^1): 29; 30 і 35;

– у розведенні 1:100 (10^2): 5; 6; - не враховуємо.

$$X = \left(\frac{(280 + 290 + 270) * 1}{3} + \frac{(29 + 30 + 35) * 10}{3} \right) * \frac{1}{2} = 295$$

Отже, в 1 см³ дослідної проби молока сирого виявили в середньому 295 клітин мікроорганізмів.

У разі необхідності підрахунку великої кількості колоній на чашках Петрі часто послуговуються лічильними камерами, або спеціальними приладами для підрахунку колоній.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Провести відбір середніх проб сирого молока для мікробіологічного дослідження та підготувати їх до дослідження, дотримуючись правил стерильності. Перерисувати в робочий зошит схему визначення бактеріальної забрудненості сирого молока чашковим методом.

Завдання 2. Провести визначення бактеріальної забрудненості відібраних проб сирого молока чашковим методом. Результати проведеної роботи занести в табл. 1.

Таблиця 1

Результати дослідження молока-сировини чашковим методом

№ проби молока	Орієнтовна кількість бактерій в 1 см ³ молока згідно ДСТУ, КУО	Гатунок молока
1		
2		
3		

Питання для самоконтролю

1. В чому суть визначення бактеріальної забрудненості сирого молока чашковим методом?
2. Яка схема визначення бактеріальної забрудненості сирого молока чашковим методом?
3. Як проводять оцінку сирого молока за чашковим методом?
4. Як визначають кількість мікроорганізмів в 1 см³ чашковим методом?

Лабораторно-практичне заняття №10

Визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині й молочних продуктах

Мета. Ознайомитися з методиками визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині.

Завдання

1. Визначити наявність у дослідних пробах молока-сировини бактерій групи кишкових паличок.
2. Установити колі-титр.
3. Ознайомитися з методикою визначення сальмонел у молоці-сировині.

Обладнання та матеріали

Проби молока-сировини, пробірки, піпетки, мірні циліндри на 100 та 200 мл, середовище Кеслера, Ендо, Плоскірева, Козера, Мюлера, Олькеницького.

Довідковий матеріал

1. Визначення бактерій групи кишкової палички

Метод базується на здатності бактерій групи кишкових паличок зброджувати в середовищі Кеслер лактозу з утворенням кислоти і газу. Дослідний матеріал засівають по 1 см³ відповідного розведення в пробірки з 5 см³ середовища Кеслер і ставлять у термостат за температури 37 °С на 18–24 год. Після цього пробірки перевіряють на наявність чи відсутність газоутворення. Якщо газоутворення відсутнє, то вважають, що продукт не забруднений бактеріями групи кишкових паличок. Якщо в дослідному матеріалі виявлено бактерії групи кишкових паличок, проводять подальшу їх ідентифікацію. Із пробірок, у яких спостерігається бродіння, бактеріологічною петлею проводять пересів із кожної пробірки на окремий сектор чашки із середовищем Ендо з таким розрахунком, щоб отримати окремі колонії. Посіви культивують за температури 37 °С протягом 18–24 год.

У разі наявності колоній бактерій групи кишкових паличок їх вивчають: проводять мікроскопію мазків, виготовлених із цієї колонії, і петлею пересівають на середовище Козера та на середовище з глюкозою. Посіви на

середовищі Козера культивують за температури 37 °С, а на середовищі з глюкозою – за температури 43 °С протягом 18–24 год.

Наявність кислоти та газу на середовищі із глюкозою і відсутність росту на цитратному середовищі Козера вказує на наявність бактерій групи ешерихій.

Зміна оливково-зеленого кольору середовища Козера на волошковий (синій) свідчить про наявність ешерихій, які належать до цитратпозитивних різновидів ешерихій, що не викликають бродіння з утворенням газу на середовищі із глюкозою за культивування за температури 43 °С.

2. Визначення колі-титра молока

Колі-титр молока визначають на середовищі Кеслер, до складу якого входять речовини, що пригнічують ріст молочнокислих та інших грампозитивних мікробів.

Молоко й молочні продукти спочатку розводять 1:10, 1:100, 1:1000. Потім беруть шість пробірок з середовищем: у три з них вносять по 1 см³, в інші три – по 0,1 см³ кожного розведення. Засіяні пробірки ставлять на 24 години в термостат за температури 37 °С. Відсутність газоутворення у всіх шести пробірках свідчить чистоту продукту, а його колі-титр вважають вище 3 см³. У разі газоутворення в одній пробірці, яка засіяна 1 см³ дослідного продукту, колі-титр дорівнює 3 см³. Якщо газ утворився більше, ніж в одній пробірці з 0,1 см³ колі-титр вважають рівним 0,3 см³. Наявність газу в шести або п'яти пробірках вказує на те, що колі-титр менше, ніж 0,3 см³. Таке молоко непридатне до використання.

3. Визначення сальмонел

Підготовлені проби сирого молока висівають у 25 см³ середовища збагачення подвійної концентрації (селенітовий бульйон, магнієве середовище, середовище Мюллера, Кауфмана). Посіви культивують за температури 37 °С протягом 18–24 год.

Із середовищ збагачення пересівають на середовище Ендо, Плоскірева та ін. і культивують за температури 37 °С протягом 18–20 год.

За наявності підозрілих колоній проводять посів 3–5 колоній у пробірки з комбінованим середовищем (трицукровий агар з сечовиною Олькеницького, Клігера). Посів здійснюють спочатку штрихом по скошеній поверхні

середовища, а потім уколом у стовпчик і культивують за температури 37 °С протягом 18–20 год.

Із вирощених колоній готують мазки, проводять їх мікроскопію. Якщо в мазках виявлено грамнегативні палички, а культура не ферментує лактозу, не розщеплює сечовину, але ферментує глюкозу її піддають дослідженню на біохімічні і антигенні властивості.

Мікробіологічні критерії для сирого коров'ячого молока визначені в ДСТУ 3662-2018, а молока питного у ДСТУ 2661:2010.

Вимоги до мікробіологічних показників питного молока і кисломолочних продуктів наведені нижче.

Згідно діючих в Україні вимог щодо мікробіологічних показників у пастеризованому молоці для дитячого харчування загальна кількість мікроорганізмів (КМАФАнМ), КУО в 1 мл повинна бути не більше 5×10^4 , а для молока пастеризованого групи В – 1×10^5 , для молока пастеризовано у флягаг та цистернах 2×10^5 .

Маса продукту (г), у якому не допускаються БГКП (колі-форми): молоко пастеризоване для дитячого харчування та молоко групи А – 1,0; для інших видів пастеризованого молока – 0,1.

Сальмонели та інші патогенні мікроорганізми недопускаються в 50 г пастеризованого молока для дитячого харчування, а для всіх інших видів пастеризованого молока та кисломолочних продуктів – у 25 г.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Приготувати дослідні проби сирого молока до дослідження. Провести посів приготовленого дослідного матеріалу на середовище Кеслер. Визначити колі-титр в дослідних пробах сирого молока.

Завдання 2. Заповнити табл. 1. Зробити висновок, порівнюючи отримані дані з даними нормативних документів.

Завдання 3. Вивчити послідовність визначення сальмонел у молоці. Зробити посів на середовище збагачення.

**Результати визначення в дослідних пробах сирого молока бактерій
групи кишкової палички**

№ проби сирого молока	Наявність газу в пробірках	Зміна кольору середовища в пробірках	Колі-титр
1			
2			
3			

Питання для самоконтролю

1. Що таке колі-титр молока? Як його визначають?
2. Як визначають наявність у сирому молоці бактерії роду сальмонела?
3. Які вимоги нормативних документів до кількості бактерій групи кишкових паличок та сальмонел у молоці питному?

Лабораторн-практичне заняття № 11

Визначення інгібувальних речовин у молоці

Мета. Вивчити методику (мікробіологічну) визначення інгібіторів у молоці.

Завдання

1. Установити, як антибіотики, дезінфікуючі речовини та інші чинники, що є в молоці впливають на хід реакції на інгібітори.

Обладнання та матеріали

Проби сирого молока, пробірки скляні (висота 150 і діаметр 16 мм), штатив для пробірок, колби мірні на 200 мл; піпетки, редуクタжник або водяна баня, що забезпечують регулювання температури від 30 до 50°C термометри, мірні циліндри на 100 та 200 мл, тест-культура колекційна (штам В – 2095 або штам К, *Streptococcus thermophilus*), вода дистильована, антибіотики (пеніцилін (бензилпеніциліну калієва або натрієва сіль), сода.

Для визначення інгібувальних речовин у сирому молоці з резазурином: основний розчин резазурину, препарат сухий для контролю визначення інгібувальних речовин у молоці (СКІР).

Для визначення інгібувальних речовин у сирому молоці з метиленовим синім: пептон сухий ферментативний для бактеріологічних цілей та приготовлену з нього суміші для визначення інгібувальних речовин в молоці з метиленовим синім.

Приготування всіх необхідних робочих розчнів та тест-культур наведено в додатку А.

Довідковий матеріал

Антибіотики потрапляють у молоко, в основному при лікуванні маститу (запалення молочної залози) у корів. Це становить небезпеку для здоров'я людей, і в першу чергу для дітей. Так, постійне вживання молока, що містить антибіотики, може викликати нечутливість мікробіоти наявної в шлунково-кишковому тракті людського організму до лікувального препарату та призвести

до утворення в організмі людини стійких до антибіотиків патогенних бактерій, а також спричинити зміни в складі кишкової мікрофлори.

Дезінфікуючі речовини потрапляють у молоко із продезінфікованого та погано ополісненого після дезінфекції молочного обладнання.

У технологічному плані антибіотики і дезінфікуючі речовини в молоці є небажаними, оскільки вони впливають на перебіг молочнокислого бродіння і тим самим погіршують якість молока як сировини для виробництва молочних та кисломолочних продуктів.

Визначення інгібувальних речовин у сирому молоці проводять експрес-методами (БРТ-тест, Дельво-тест) та у разі їх відсутності можна класичними методами з індикаторами резазурином і метиленовим синім.

Для проведення аналізу відбирають 50 см³ молока середньої проби, яку можна зберігати у холодильнику за температури 6–8 °С не більше доби.

Метод визначення інгібуючих речовин з індикатором резазурином

Сутність методу. Метод базується на відновленні резазурину в результаті розвитку в молоці чутливих до інгібувальних речовин мікроорганізмів роду *St. thermophilus* (термофільний стрептокок). Чутливість методу дозволяє визначити в молоці наявність антибіотиків і залишків дезінфікуючих речовин.

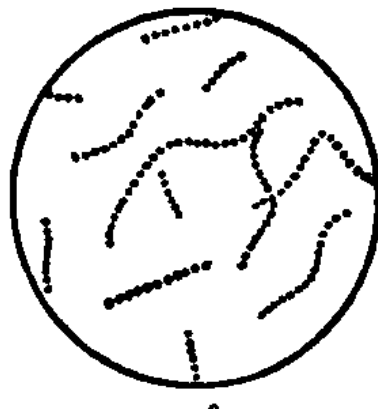


Рис. 1. *St. thermophilus* (термофільний стрептокок)

Проведення аналізу. У чисті пробірки наливають по 10 см³ молока і закривають стерильними гумовими корками. Решту проби зберігають до кінця аналізу у холодильнику за температури 6–8 °С. Одночасно здійснюють контрольний аналіз. Для цього у пробірку наливають 10 см³ відновленого

препарату (СКІР), одержаного розчиненням сухого препарату у флаконі з 10 см³ дистильованої води за температури 50°C.

Пробірки з дослідним молоком і контрольною пробою нагрівають на водяній бані до температури 85–90 °С. Потім охолоджують до 43–45 °С і стерильною піпеткою у пробірки додають 0,3 см³ робочої тест-культури. Вміст пробірки перемішують триразовим перевертанням і витримують протягом 2 год у редуктазнику або на водяній бані за температури 42–43 °С.

У пробірки з молоком контрольної проби додають по 1 см³ 0,05%-ного розчину резазурину за температури 18–20° С. Вміст пробірок перемішують дворазовим перевертанням. Пробірки витримують у редуктазнику або на водяній бані протягом 15 хв за температури 42–43 °С.

Обробка результатів. За відсутності інгібувальних речовин досліджуване молоко буде рожевим або білим. За наявності інгібуючих речовин молоко буде мати синьо-стальне, синьо-фіолетове або фіолетове забарвлення.

Цей метод дає змогу виявити в молоці вміст пеніциліну більше 0,01 МО/см³; стрептоміцину – від 30 до 50 мкг/см³; тетрацикліну, окситетрацикліну – 1 МО/см³; олеандоміцину – 10 МО/см³; масову частку пероксиду водню – 0,01 %; масову частку формаліну – 0,003 %..

Метод визначення інгібуючих речовин з метиленовим синім

Сутність методу. Метод базується на знебарвленні метиленового синього в результаті розвитку в молоці чутливих до інгібувальних речовин мікроорганізмів роду *St. thermophilus* (термофільний стрептокок).

Проведення аналізу. У чисті пробірки наливають 10 см³ досліджуваного молока і закривають (нешільно) гумовими корками. Пробірки з досліджуваним молоком нагрівають на водяній бані до 87±2 °С з витриманням до 10 хв і охолоджують до 43±2 °С. Після цього у пробірки стерильною піпеткою додають по 2 см³ приготовленої суміші для визначення інгібувальних речовин в молоці з метиленовим синім, перемішують триразовим перевертанням і витримують на водяній бані від 1 год 40 хв до 2 год 20 хв за температури 41–42 °С.

Обробка результатів. За відсутності у молоці інгібувальних речовин вміст пробірок буде мати білий колір. Синє кільце, що утворюється в пробірці на поверхні молока висотою 1 см, до уваги не беруть.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Дослідити проби сирого молока на наявність чи відсутність у них інгібувальних речовин.

Після проведення аналізу результати занести в табл. 1.

Таблиця 1

Результати виявлення інгібувальних речовин у сирому молоці

№ проби	Колір вмісту пробірок на початку реакції	Колір вмісту пробірок на кінець реакції	Інгібуючі речовини	
			відсутні	наявні

Питання для самоконтролю

1. Що відносять до інгібувальних речовин у молоці?
2. Як вони впливають на якість молока?
3. В чому сутність методу визначення інгібувальних речовин з індикатором резазурином?
4. Чому антибіотики та інші невластиві для молока хімічні сполуки в молоці називають інгібіторами?

Лабораторно-практичне заняття №12

Мікробіологічне дослідження питних видів молока та вершків

Мета. Ознайомитися зі схемою та методами бактеріологічного дослідження питних видів молока та вершків.

Завдання

1. Навчитися правил відбору проб питних видів молока та вершків для мікробіологічного дослідження згідно нормативними документами.

2. Вивчити схему та освоїти методи мікробіологічного дослідження питних видів молока та вершків.

3. Ознайомитися з мікробіологічними показниками питних видів молока та вершків згідно з нормативними документами.

Обладнання та матеріали

Проби пастеризованого, стерилізованого, пряженого молока, колби, пробірки, піпетки, водяна баня, термометри, мірні циліндри на 100 та 200 мл, робочий розчин резазурину, живильні середовища: Кеслер, МПА, Ендо.

Довідковий матеріал

Загальні правила відбирання проб питних видів молока та вершків для мікробіологічного контролю проводять згідно ДСТУ ISO 707:1997, ДСТУ ISO 2859-1, ДСТУ 7357:2013. Перед відбиранням проб продукт перемішують до однорідного стану. З точкових проб, відібраних з кожної фляги, відра, цистерни, баку, контейнеру або секції, готують об'єднану пробу. У разі складання об'єднаної проби продукту, який знаходиться у спожитковому пакуванні, продукт перемішують перевертаючи пакування не менш ніж п'ять разів, за наявності відстоювання жиру в продукті його нагрівають до температури (32 ± 2) °C на водяній бані та охолоджують до температури (20 ± 2) °C. Об'єм об'єднаної проби повинен бути не меншим ніж 100 мл. Посуд з об'єднаною пробою закривають стерильною пробкою. Маркування, транспортування та зберігання відібраних проб молочних продуктів ті самі, що й для сирого молока.

Підготовка проб для дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003).

Відібрані проби ретельно перемішують та готують десятикратні розведення.

У питному молоці та вершках визначають:

- Кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ) (редуктазні проби або чашковий метод);
- кількість бактерій групи кишкових паличок (БГКП) (посів у середовище Кеслер);
- патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели (на середовище Ендо);
- ефективність пастеризації – прямим методом (висівають у середовище Кеслер), чи не прним методом – виявляють пероксидазу чи фосфотазу.

Таблиця 1

Мікробіологічні показники питного молока згідно ДСТУ 2661:2010

«МОЛОКО КОРОВ'ЯЧЕ ПИТНЕ»

Вид упаковки	КМАФАНМ, КУО в 1 г, не більше	Кількість продукту см ³ , в якому не допускаються	
		БГКП (коліформи)	патогенні мікроорганізми в тому числі сальмонели
Молоко пастеризоване в пляшках	1×10^5	0,1	25
Молоко пастеризоване у флягах	2×10^5	0,1	25

Порядок виконання роботи.

Завдання 1. Складіть схему мікробіологічного дослідження питних видів молока та вершків.

Завдання 2. Виконайте відбір середніх проб пастеризованого, стерилізованого молока для мікробіологічного дослідження та підготуйте їх до дослідження, дотримуючись правил стерильності.

Завдання 3. Визначте мікробну забрудненість відібраних проб питного молока та вершків за редуктазною пробою: з метиленовим синім або з резазурином

Результати проведеної роботи занести в таблицю 2.

**Результати дослідження проб питних видів молока та вершків
редуктазними методами**

№ проби (питне молоко чи вершки)	Тривалість зміни кольору	Забарвлення в пробірках на кінець реакції	Орієнтовна кількість бактерій (КМАФА н М) в 1 см ³ , КУО
1. Пастеризоване молоко			
2. Стерилізоване молоко			
3. Вершки			

Завдання 4. Визначити в дослідних пробах молока та вершків загальну кількість мікроорганізмів (КМАФАМ) чашковим методом і кількість інших видів мікроорганізмів (сальмонел, бактерій групи кишкових паличок). Отримані дані занести в табл. 3 й порівняти з даними нормативних документів. Зробити висновки.

Результати мікробіологічного дослідження питних видів молока та вершків

№ проби	Вид молока та вершки	Загальна кількість мікроорганізмів	Кількість сальмонел	БГКП	Норма
1.	Пастеризоване				
2.	Стерилізоване				
3.	Пряжене				
4.	Вершки				

Питання для самоконтролю

1. Що таке питні види молока та вершки?
2. Як проводять відбір проб питних видів молока та вершків для мікробіологічного дослідження ?
3. Які використовують методи мікробіологічного дослідження питних видів молока та вершків?
4. Які вимоги висуваються до питних видів молока та вершків за мікробіологічними показниками згідно з ДСТУ?

Лабораторно-практичне заняття №13

Пастеризація і методи її контролю

Мета. Вивчити методи контролю пастеризації за фосфатазною та пероксидазною пробами.

Завдання

1. Ознайомитися з видами пастеризації та методами її контролю.
2. Провести контроль ефективності пастеризації за фосфатазною та пероксидазною пробами. Зробити висновки.

Обладнання та матеріали

Проби молока пастеризованого за різних температурних режимів. Розчин свіжовиготовленого йодисто-калієвого крохмалю, розчин перекису водню, розчин фенолфталеїнофосфату натрію, водяна баня, термометр.

Довідковий матеріал

Головна мета пастеризації – зменшення кількості спрофітних мікроорганізмів у молоці та знищення патогенних бактерій. Слід зважати на те, що в результаті пастеризації знищуються переважно вегетативні форми бактерій.

Молокопереробні підприємства застосовують наступні режими пастеризації молока:

Висока пастеризація (по температурі) (ДСТУ 7380:2013):

85 °C – миттєво;

80 °C – протягом 30 с;

75 °C – протягом 10 хв.

Низька пастеризація (ДСТУ 7380:2013):

63 °C – протягом 30 хв;

72 °C – протягом 20 с.

Характер і ступінь змін складу молока під час пастеризації залежить від терміну дії температури і способу теплової обробки.

Найбільш глибокі зміни в складі молока відбуваються під час його кип'ятінні. У цьому випадку спостерігається побуріння молока, злиття жирових

кульок у великі частки. Цей спосіб застосовується здебільшого в домашніх умовах.

У разі пастеризації молока за температури 63–65 °С покращується відстоювання жиру в результаті незначної денатурації глобулінів. Крім того за температури 62 °С склеюються (коагулюють) жирові кульки, що сприяє більш швидкому відстоюванню жиру. Кислотність молока зменшується незначною мірою.

У разі пастеризації молока за температури 68–80 °С збільшується денатурація сироваткових білків, молоко набуває присмаку прокип'яченого, знижується його кислотність на 0,5–1°Т унаслідок виділення вуглекислоти.

За температури 80 °С протягом 5 хв руйнуються майже всі ензими:

пероксидаза – за 80 °С

кіназа – за 85 °С

амілаза – за 65 °С

фосфатаза – за 70 °С

Під час пастеризації за температури 80–90°С відбуваються більш вагомні зміни. Збільшується по відношенню до сирого молока кількість γ -казеїну, β -казеїну, відбувається агрегація денатурованих сироваткових білків. У разі нагрівання до 90 °С кислотність молока збільшується, і протягом 30 хв вона підвищується з 17,5 °Т до 26,1 °Т.

Ефективність пастеризації залежить як, від ступеня забруднення механічними домішками, так і від бактеріального обсіменіння молока, особливо від наявності термофільних бактерій.

Контроль пастеризації молока базується на визначенні в молоці ензимів фосфатази та пероксидази.

Фосфатажною пробою визначають ефективність низькотемпературної пастеризації (від 62 до 65 °С протягом 30 хв та 72 °С протягом 20 с).

Сутність реакції. Фосфатаза від'єднує фосфор від фенолфталеїнофосфату. Вільний фенолфталеїн у лужному середовищі дає червоне забарвлення. Це свідчить про те, що молоко сире або пастеризоване недостатньо. Цінність

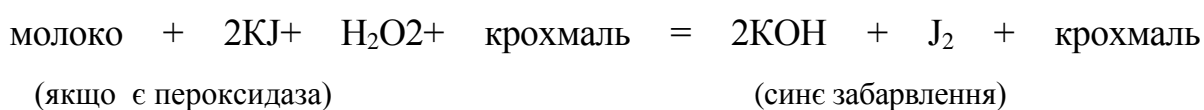
фосфотазної проби полягає в тому, що мінімальна кількість домішок сирого молока (2 %) до пастеризованого дає позитивну реакцію.

Хід реакції. У пробірку наливають 2 см³ молока 1 см³ розчину фенолфталеїнофосфату натрію, закривають гумовим корком і ретельно перемішують. Пробірку ставлять на 40 хв на водяну баню за температури від 40 до 45 °С.

Відсутність забарвлення в пробірках свідчить про те, що фосфатаза зруйнована і молоко пастеризоване. Сире молоко та молоко пастеризоване у разі порушення температурних режимів пастеризації набуває забарвлення від світло- до яскраво-рожевого. Аналогічний результат буде в тому випадку, якщо пастеризоване молоко матиме домішки сирого.

Пероксидазна проба. Цією пробою користуються для перевірки ефективності високотемпературної пастеризації, оскільки пероксидаза руйнується в разі нагрівання молока не нижче ніж 75 °С протягом 10 хв та більше.

Сутність реакції. Якщо молоко містить пероксидазу, вона розщеплює перекис водню, виділяє крохмаль, і звільняє йод з йодистокалієвого крохмалю. Вільний йод із крохмалем дає синє забарвлення. В молоці, нагрітому до 80 °С, забарвлення не відбудеться, оскільки пероксидаза зруйнована. Реакція відбувається за такою схемою:



Ця проба дає можливість визначити не тільки порушення чи недотримання температурного режиму під час пастеризації, а й домішки сирого молока від 5 до 10 %. Недоліком цієї проби є те, що неможна провести її на результат ефективності низькотемпературної пастеризації.

Крім того, пероксидаза може бути виявлена в пастеризованому молоці, що зберігалось більше ніж 6 годин. Накопичення цього ензиму відбувається внаслідок вивільнення його із лейкоцитів молока, здебільшого це відбувається в молоці корів хворих на мастит.

Порядок проведення роботи

В пробірку наливають 3 краплі молока, 3 краплі йодистокалієвого крохмалю і 1 краплю 0,5 % розчину перекису водню. Уміст пробірки слід перемішати.

Поява інтенсивного синього забарвлення свідчить про наявність пероксидази (або сире молоко). Блідо-синє забарвлення свідчить про часткове руйнування ензиму за температури від 65 до 70 °С (недостатня пастеризація). Відсутність будь якого забарвлення одразу після додавання усіх реактивів вказує на пастеризацію молока за температури вище 80 °С.

Послідовність виконання роботи

Завдання 1. Визначити різну ступінь пастеризації проб молока й перевірити ефективність пастеризації за фосфатазною та (або) пероксидазною пробами. Перед початком дослідів у пробах молока обов'язково визначити наявність досліджуваних ензимів. Результати занести в табл. 1.

Таблиця 1

Результати фосфатазної та (або) пероксидазної проби

№ проби	Режим пастеризації, °С	Експозиція пастеризації, хв	Результати			
			фосфатазна проба		пероксидазна проба	
			колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму	колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму
№1	65 °С	30 хв				
№2	65 °С	15 хв				
№3	75°С	10 хв				
№4	75°С	5 хв				
№5	90 °С	5хв				
№6	90 °С	1хв				

Зробити висновок.

Завдання 2. Установити режим пастеризації, що був використаний в пастеризованих пробах молока різних виробників шляхом визначення фосфатази та (або) пероксидази. Заповнити табл. 2 та записати висновок.

Завдання 3. Змоделювати проби пастеризованого молока та визначити в них наявність ензимів за фосфатазною та (або) пероксидазною пробами. Заповнити табл. 3 та записати висновок.

Таблиця 2

Результати фосфатазної та (або) пероксидазної проби

Номер проби	Результати			
	фосфатазна проба		пероксидазна проба	
	колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму	колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму
№1				
№2				
№3				

Таблиця 3

Результати фосфатазної та (або) пероксидазної проби

Проби молока	Результати			
	фосфатазна проба		пероксидазна проба	
	колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму	колір молока після внесення реактивів	наявність чи відсутність ензиму
Пастеризоване молоко				
Стерилізоване молоко				
Сире молоко				
Пастеризоване + домішки сирого				
Стерилізоване + домішки сирого				

Питання для самоконтролю

1. Що таке пастеризація та які є її різновиди? Яка мета пастеризації?
2. Які існують методи визначення ефективності пастеризації?
3. В чому полягає сутність визначення ефективності пастеризації фосфатазною пробою?
4. В чому полягає сутність визначення ефективності пастеризації пероксидазною пробою?

Лабораторно-практичне заняття №14

Мікробіологічний контроль якості заквасок

Мета. Ознайомитися із схемою мікробіологічного контролю якості заквасок та вивчити основні методи цього контролю.

Завдання

1. Ознайомитися з методами вивчення активності заквасок.
2. Ознайомитися з методами визначення чистоти заквасок. Провести мікроскопію заквасок та зарисувати побачене.
3. Вивчити й зарисувати в зошити будову фагу та стадії його розвитку в мікробній клітині. Ознайомитися з методами визначення фагів в заквасці.

Обладнання та матеріали

Різні вид заквасок, предметні скельця, бактеріальні петлі чи пастерівські піпетки, спиртівка, дистильована вода, метиленовий синій, мікроскоп, живильні середовища. Схеми зображення будови фагу та стадії його розвитку в мікробній клітині.

Довідковий матеріал

Закваски – це одно- чи багатокomпонентні комбінації мікроорганізмів, що використовуються для сквашування молочної сировини під час виробництва кисломолочних продуктів.

Розрізняють *одноштамові закваски*, що складаються з одного штаму мікроорганізму, *багатоштамові* – із кількох штамів одного виду і *змішані закваски*, до складу яких входять багато штамів різних видів мікробів. За складом мікрофлори основні закваски, які використовують в молочній промисловості, поділяють на групи: *бактеріальні, грибкові і змішані*.

Для дослідження відбір прод проводять наступним методом: об'єднану пробу заквасок сухих, бактеріальних концентратів і бактеріальних препаратів прямого внесення готують змішуючи вміст, 30–50 та 3–5 одиниць спожиткового пакування (контейнерів/пакетів) відповідно. Для складання об'єднаної проби заквасок рідких точкові проби відбирають стерильною

піпеткою не менше ніж 10 см³ з кожного пакування й переносять в одну ємність. Маса проби заквасок сухих, бактеріальних концентратів, бактеріальних препаратів прямого внесення повинна бути (30±2) г. Кожна проба заквасок рідких повинна становити (50±5) см³.

Послідовність мікробіологічного контролю якості заквасок:

1. Визначення активності закваски (тривалість сквашування та кислотність);
2. Визначення вмісту діацетилу та ацетіну;
3. Встановлення наявності вуглекислого газу;
4. Встановлення наявності бактеріофагу;
5. Визначення мікробіологічних показників закваски: співвідношення між мікроорганізмами, що входять до складу закваски, і наявність сторонньої мікрофлори (кишкових паличок, спорових бактерій, дріжджів, пліснявих грибів).

Активність закваски контролюють за кислотністю і тривалості сквашування. Виробничі закваски для сиру, сметани і звичайного кисляку повинні мати кислотність 80 – 85 °Т, для масла і сирів з низькою температурою другого нагрівання – 90 – 100 °Т. Кислотність заквасок молочнокислих паличок (сирної, ацидофільної і болгарської) не повинна перевищувати 95 – 110 °Т, кефірної – 95 – 100 °Т, закваски для кумису – 130 – 160 °Т.

Тривалість сквашування при внесенні материнської закваски молочнокислих стрептококів (1 – 3 %) складає 6–8 годин, молочнокислих паличок (0,5–1 %) – 4–6 годин.

Збільшення тривалості сквашування молока й утворення слабкого згустку вказують на зниження якості заквасок.

Крім того, під час пробного сквашування звертають увагу на якість згустку, що утворився. Визначають органолептичні показники: загальний видгляд, смак, запах, аромат. Чисті від сторонньої мікрофлори, активні закваски повинні мати специфічні для кожного виду заквасок ці органолептичні показники.

Вміст діацети́лу та ацето́їну визначають за креатиноюю пробою. На білу порцелянову пластинку наносять у рівних об'ємах (по 1–3 краплі) фільтрат закваски, 40% розчин КОН і 0,04% розчин креатину і ретельно перемішують.

Відзначають час появи рожевого фарбування. Якщо рожевий колір з'явився швидше ніж за 7 хв, то закваска вважається гарним продуцентом діацети́лу та ацето́їну. Якщо ж поява кольору спостерігається після 7–10 хв, це свідчить про слабку ароматоутворюючу здатність мікроорганізмів.

Наявність вуглекисло́го газу в заквасці встановлюють, наливаючи в пробірку діаметром 15 мм закваску в об'ємі 20 см³, відзначають її рівень і ставлять на водяну лазню з холодною водою. Температуру води доводять до 90°C і, не виймаючи пробірки, відзначають рівень. Якщо закваска містить вуглекислий газ, то згусток стає губчастим і піднімається над сироваткою від 0,6 до 5 см і більш. За відсутності вуглекисло́го гузу, згусток не піднімається або піднімається незначно (на 0,3 – 0,5 см) і немає явно вираженої губчастості.

Наявність бактеріофа́гу встановлюють шляхом посівом закваски на стерильне знежирене молоко з додаванням розчину метиленового синього. Для цього в 10 мл стерильного обезжиреного молока додають 0,5 мл робочого розчину метиленового синього й одну краплю досліджуваної закваски. Вміст пробірки ретельно перемішують і витримують за температури 37 °С, спостерігають за відновленням метиленового синього. Якщо в процесі культивування після знебарвлення метиленового синього через 4–5 годин знову спостерігається посиніння молока, це вказує на наявність у заквасці бактеріофа́гу.

Більшість фагів складаються з кулястої головки (ДНК) і подовженого відростка. Розміри фагів коливаються від 10 до 100 нм.

Відросток фага утворений порожнім стрижнем діаметром близько 8 нм. Зовні стрижень оточений чохлом, що являє собою порожній циліндр, здатний до скорочення. На нижньому кінці відростка є шестикутна базальна пластинка, у кожному куті якої розташовуються короткі зубці. Від кожного зубця відходить по одній нитці завдовжки 150 нм. За допомогою базальних пластинок і ниток фаг прикріплюється до поверхні бактеріальної клітини. Під чохлом нижньої

частини відростка концентрується лізоцим. Під дією лізоциму в клітинній стінці бактерій утворюється отвір, через який вприскується ДНК кислота бактеріофага в клітину.

Цикл розвитку бактеріофагу показаний на рис. 1. У разі попаданні фагу в культуру бактерій, він адсорбується на бактеріальній клітині базальними пластинами і нитками, а потім за допомогою протеолітичного ензиму лізує клітинну стінку. Далі білкова оболонка фагу скорочується і ДНК вприскується в цитоплазму бактеріальної клітини. У клітині починається синтез ДНК фага і його білків. Одночасно пригнічується бактеріальна генетична система. Надалі утворюються вегетативні фагові частки, а через 30 – 60 хв стінка бактеріальної клітини набухає і проривається, при цьому звільняється до 100 нових фагів, що можуть інфікувати 100 нових бактеріальних клітин. Так продовжується доти, доки не лізуються всі чуттєві до фагу клітини бактерій.

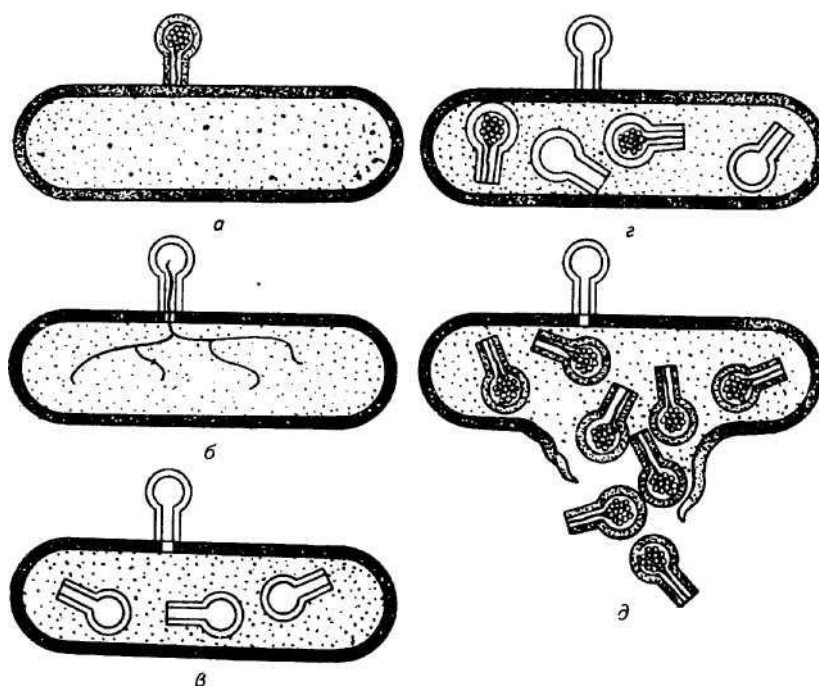


Рис. 1. Цикл розвитку бактеріофага:

- a* — адсорбція бактеріофага на поверхні клітини;
- б* — вприскування ДНК фага в цитоплазму клітини;
- в* — синтез ДНК фага і його білків в середині клітини;
- г* — утворення нових фагів;
- д* — лізис бактеріальної клітини і звільнення фагів

Визначення мікробіологічних показників закваски. У разі зниження активності перевіряють чистоту закваски шляхом перегляду пофарбованого

мікроскопічного препарату не менше чим у 10 полях зору мікроскопа або посівом на відповідні поживні середовища.

Мікроскопією визначають видовий склад мікроорганізмів та наявність сторонньої мікрофлори (бактерій групи кишкових паличок, спорових бактерій, дріжджів, цвілей).

Виготовлення препарату для мікроскопії заквасок. Для приготування мазків з рідких заквасок, на чисте предметне скло бактеріологічною петлею наносять невелику краплю досліджуваного матеріалу та розподіляють на площі приблизно 1 см².

Сухі закваски розводять у краплі дистильованої води (чи стерильного фізрозчину). Препарати висушують при кімнатній температурі, фіксують над полум'ям та фарбують метиленовою синькою.

При цьому, в заквасках для кисломолочного сиру, сметани, простокваши звичайної, масла, сирів з низькою температурою другого нагрівання та кисляку звичайного повинні виявлятися поодинокі, попарно розміщені чи в коротких ланцюжках розміщені коки, рівномірно розташовані в полі зору мікроскопа.

У заквасці для ряжанки, варенця, простокваши Мечніковської та йогурту повинні наявні молочнокислі стрептококи й у меншій кількості палички.

У заквасці для ацидофільної пасти й ацидофільного молока - тільки палички.

У кефірній грибковій заквасці повинні виявлятися молочнокислі стрептококи, клітини паличок і дріжджів та їх скупчення.

Чистоту закваски визначають шляхом її посіву в пробірки із стерильним знежиреним молоком. Посіви термостатують протягом 72 годин. Закваску молочнокислих стрептококів перевіряють на наявність сторонніх термофільних паличок, тому посіви культивують за 40 – 45 °С. Закваски молочнокислих паличок контролюють на присутність сторонніх стрептококів за температурі 30 – 35 °С. Зі згустків готують мікроскопічні препарати, переглядають їх і визначають наявність або відсутність сторонніх мікроорганізмів.

Крім того, чистоту закваски визначають шляхом її посіву на відповідні живильні сеедовища.

Наявність *бактерій групи кишкових паличок* у заквасці визначають шляхом посіву її на середовище Кесслер. Закваску попередньо нейтралізують до рН 7,4 - 7,6, додаючи до 10см³ закваски 1см³ 10% розчину питної соди. Нейтралізовану таким чином закваску, в об'ємі 3 см³ висівають у 20 см³ середовища Кесслер. Посіви термостатують при 43 – 45 °С протягом 24 годин. Відсутність газу в пробірках свідчить про те, що закваска не забруднена бактеріями групи кишкових паличок. Виникнення газоутворення свідчить про можливе забруднення закваски цими видами бактерій. Для підтвердження наявності бактерій видів кишкової палички проводять посіви із пробірок, де відмітили утворення газу на середовище Ендо в чашки Петрі. Чашки витримують в термостаті за температури 37 °С протягом 18 – 24 годин.

При появі на середовищі Ендо характерних малинових колоній з металічним блиском або рожевих слизистих колоній, їх вивчають вибірково. Із них роблять мазки, фарбують по Граму та мікроскопують. Грамнегативні без спорові палички в мазках свідчать про наявність кишкових паличок.

Дріжджі та плісняві гриби визначають шляхом посіву закваски в чашки Петрі на сусло-агар, Сабуро і культивують при 24 °С протягом 3 – 5 діб.

Немолочні бактерії – *спорові аеробні та анаеробні бактерії* визначають посівом закваски в пробірки з стерильним знежиреним молоком з додаванням парафіну для створення анаеробних умов та в пробірки з молоком без парафіну для культивування в аеробних умовах. Пробірки ставлять на водяну баню при температурі 85 °С і витримують 10 хв. Потім охолоджують і поміщають в термостат при температурі 30 °С на 2 – 3 доби.

Склад мікрофлори кефірної закваски визначають методом граничних розведень з подальшим посівом різних розведень у стерильне знежирене молоко і їх культивуванням протягом 3 діб. Після цього мікроскопіюють препарати, приготовлені з вмісту пробірок з сквашеним молоком. На підставі отриманих результатів складають числову характеристику і визначають кількість різних груп мікробів.

Ароматоутворюючі молочнокислі стрептококи виявляють на щільному середовищі з цитратом кальцію при посіві різних розведень закваски. Посіви культивують при 26 °С протягом 3 – 5 діб. Потім підраховують колонії, що утворюють зони просвітління в даному середовищі.

Наявність дріжджів визначають чашковим методом на сусло агарі, Сабуро при посіві різних розведень закваски і наступному культивуванні за температури 24 °С протягом 3 – 5 діб.

Оцтовокислі бактерії визначають шляхом посіву розведень у стерильне знежирене молоко і культивуванні їх в термостаті за температури 30 °С протягом 3 – 5 діб. Облік позитивних результатів проводять за жовтим кільцем, що утворюється на поверхні згорнутого молока.

Співвідношення різних мікроорганізмів, що входять до складу кефірних заквасок, приблизно однакове і складає в 1 см³: мезофільних молочнокислих стрептококів 10⁸ – 10⁹; термофільних молочнокислих стрептококів 10⁵–10⁶; ароматоутворюючих молочнокислих бактерій 10⁷–10⁸; дріжджів 10⁴–10⁵; оцтовокислих бактерій 10³-10⁵.

Чистота закваски. Мікроскопією визначають видовий склад мікроорганізмів та наявність сторонньої мікрофлори (бактерій групи кишкових паличок, спорових бактерій, дріжджів, цвілей).

Наявність бактерій групи кишкових паличок у заквасці визначають посівом її на середовище Кесслера.

Закваску попередньо нейтралізують до рН 7,4—7,6, додаючи до 10 мл закваски 1 мл 10% розчину питної соди. Посіви термостатують за температури 43 °С в протягом 24 год.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Зробити мазки заквасок та провести мікроскопію.

Завдання 2. Заповнити табл. 1.

Завдання 3. Зарисувати в зошитах будову бактеріофагу та схему його розмноження в мікробній клітині. Записати основні етапи розмноження бактеріофагу в мікробній клітині.

Результати мікроскопії заквасок для різних молочнокислих родуктів

№ п\п	Види заквасок для молочних продуктів	Мікроорганізми, що входять до складу закваски	Схематичне зображення мікроскопічної картини
1	Закваска для кисломолочного сиру, сметани, масло простокваша звичайна сири з низькою температурою другого нагрівання		
2	Кефір		
3	Простокваша Мечніковська, Йогурт та ржанка		
4	Ацидофільне молоко, ацидофільна паста		
5	Кумис		
6	Ацидофільно-дріжджове молоко		

Питання для самоконтролю

1. Що таке закваски і як їх класифікують?
2. Яка схема мікробіологічного контролю заквасок?
3. Що таке бактеріофаг та які основні етапи його розвитку в мікробній клітині?

Лабораторно-практичне заняття №15

Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів

Мета. Ознайомитися зі схемою та методами мікробіологічного дослідження кисломолочних продуктів.

Завдання

1. Вивчити основні принципи відбору та підготовки проб кисломолочних продуктів для мікробіологічного дослідження.
2. Ознайомитись з методами визначення кількості молочнокислих бактерій у кисломолочних продуктах.
3. Ознайомитись з вимогами до кисломолочних продуктів за мікробіологічними показниками згідно нормативних документів.

Обладнання та матеріали

Кефір, ряжанка, йогурт, кисломолочний сир та інші кисломолочні продукти, термостат, стерильні шпателі, ножі, колби, пробірки, чашки Петрі з середовищами: гідролізованим молоком, MRS, Ендо, Сабуро, Сусло, пробірки з середовищем Кеслер, стерильний фізрозчинний розчин натрію хлориду, піпетки, штативи.

Довідковий матеріал

Проби для мікробіологічних аналізів відбирають у стерильний посуд за допомогою стерильних пристосувань. Відбір проб і перемішування продукту перед відбором здійснюють відбірником, черпаком, ложкою, металевою трубкою, щупом, шпателем або іншим відповідним пристосуванням, які кожного разу перед використанням повинні бути простерилізовані фламбуванням або в автоклаві.

Рідкі кисломолочні продукти (ряжанка, йогурт, кефір тощо) у споживчій упаковці перемішують, перевертаючи упаковку не менше 5 разів, а густіші (сметана) перемішують упродовж однієї хвилини шпателем, ложкою після відкриття пакування. Поверхню споживчого пакування перед відкриттям необхідно знезаразити спиртом. Усі відібрані пакування відкривають і продукт одного виду зливають у одну ємність, отримуючи об'єднану пробу.

Кисломолочний сир, сиркові вироби, сирні маси нефасовані з транспортної тари, верхній шар від 2 до 3 см продукту відкидають. Пробу беруть щупом на відстані 3–5 см від краю, спрямовуючи щуп під кутом до протилежного боку і занурюючи його на 3/4 довжини. Щуп обертають на один повний оберт і виймають разом із стовпчиком продукту. Із стовпчика продукту відбирають стерильним шпателем чи ножем від 15 до 20 г продукту і готують об'єднану пробу шляхом перемішування точкових проб в стерильній посудині. Залишки продукту використовують для закриття отвору, що утворився після відбору проби.

З об'єднаних проб готують пробу для лабораторного дослідження, яка повинна становити не менше ніж 200 см^3 (рідкі кисломолочні продукти) або не менше ніж 200 г (кисломолочний сир).

Посуду із пробною або пробі в споживчій тарі необхідна етикетка, на якій вказують:

- номер проби;
- найменування і сорт продукту (при наявності);
- номер і обсяг партії;
- день і година відбору проби;
- посада і підпис особи, що відібрала пробу;
- позначення нормативно-технічної документації, згідн якого вироблявся

продукт.

Мікробіологічні аналізи продукту проводять не більш, ніж через чотри год. з моменту відбору проб. Проби повинні зберігатися і транспортуватися до початку дослідження в умовах, що забезпечують температуру продуктів не вище $6 \text{ }^\circ\text{C}$, не допускаючи підморожування.

Підготовка проб до дослідження

Кисломолочні напої та сметана

Відібрані проби перед дослідженням перемішують і нейтралізують. Для цього відбирають стерильною піпеткою 10 см^3 досліджуваного продукту в стерильну пробірку або колбочку і додають 1 см^3 стерильного розчину

двовуглекислого натрію з масовою концентрацією 100 г/дм³ (1 мл 10 % розчину) вміст перемішують.

Кисломолочний сир та сиркові вироби

Десять г кисломолочного сиру або сиркових виробів зважують на стерильному склі, у чашці Петрі або у бюксі, переносять у стерильну або профламбовану ступку, прикриту кришкою від чашки Петрі, і ретельно розтирають.

Приготування розведення продуктів для посіву

Перед посівом готують десятикратні розведення продукту в стерильних розчинах хлористого натрію, лимоннокислого натрію (для сирів) або фосфатного буфера. Для приготування розведень готують усі необхідні стерильні матеріали і посуд у відповідності зі специфікою аналізу досліджуваного продукту: пробірки з 9 см³ або колби з 90 см³ розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера.

З проб сметани, кисломолочних напоїв відбирають стерильною піпеткою 10 см³ і вносять у 90 см³ стерильних розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера. Одержують розведення 1:10.

До приготовлених наважок кисломолочного сиру або сиркових виробів по 10 г додають 90 см³ стерильних розчинів хлористого натрію або фосфатного буфера, підігрітих до 40–45 °С, і збовтують протягом 3–5 хв. до можливо більш повного емульгування. Одержують розведення 1:10.

З першого розведення (1:10) готують наступні 1:100 і т.д.

Для приготування кожного розведення беруть нову стерильну піпетку. Під час посіву на чашки Петрі посівний матеріал вносять від більшого розведення до меншого. У цьому випадку користуються однією піпеткою.

У кисломолочних продуктах визначають:

- кількість молочнокислих бактерій;
- кількість БГКП (посів в середовище Кеслер);
- патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели (на середовище ЕНДО).
- наявність пліснявих грибів та дріжджів на сусли агарі чи агарі Сабуро.

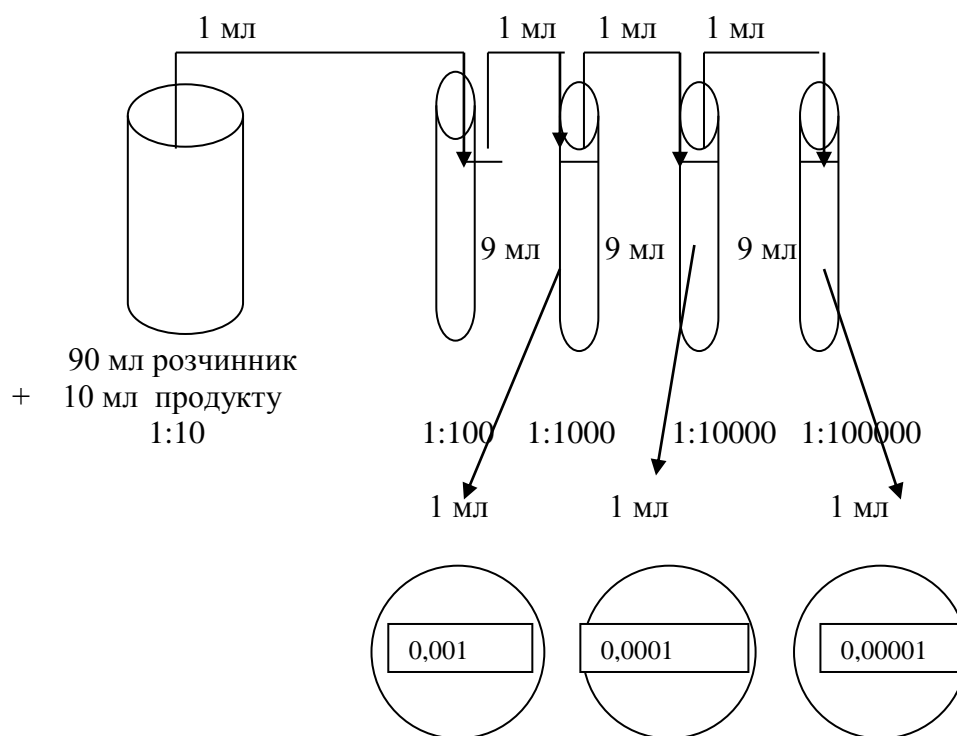


Рис. 1. Проведення десятикратних розведень

Мікроскопія мазків

Для приготування препарату на чисте предметне скло наносять петлею, невелику краплю досліджуваного матеріалу і розподіляють на площі близько 1 см². Досліджуючи сир і сирні вироб, на скло наносять краплю води, вводять у неї петлею продукт, ретельно перемішують і розтирають на площі 1 см². Препарат висушують за кімнатної температури, фіксують на полум'ї пальника і фарбують метиленовим синім.

Орієнтований склад мікрофлори досліджуваних продуктів за мікроскопічною картиною визначають за табл.1.

Таблиця 1

Орієнтований склад мікрофлори кисломолочних продуктів

Найменування продуктів	Орієнтований склад мікрофлори
Сир, сметана, сир домашній, простокваша звичайна	Молочнокислі стрептококи
Ацидофільне молоко, ацидофільна паста	Молочнокислі палички
Ацидофільно - дрожжеве молоко, ацидофільно - дрожжевий напій, кумис	Молочнокислі палички, дріжджі
Простокваша мечніковська, південна, йогурт, сколотини дієтичні, сметана ацидофільна, варинець	Молочнокислі стрептококи і палички
Ацидофілін	Молочнокислі стрептококи і палички, можлива наявність

	дріжджів
Кефір	Молочнокислі стрептококи і палички, одиничні дріжджі

Бактеріальна забрудненість кисломолочних продуктів є важливим показником, який характеризує їх гігієнічну якість та умови одержання. Оцінку за бактеріальною забрудненістю проводять один раз у 10 днів.

Визначення кількості молочнокислих бактерій (див. рис. 1). Метод оснований на можливості молочнокислих мікроорганізмів розмножуватися на елективному середовищі (агар з гідролізованим молоком або MRS-ага) за температури 37 ± 1 °C або 40 ± 1 °C протягом 24-48 год (залежно від групи молочнокислих бактерій: мезофільних чи термофільних). Кількість висіяного продукту встановлюють з урахуванням найбільш вірогідного мікробного обсіменіння.

Посів. Для визначення кількості молочнокислих бактерій вибирають ті розведення, у разі посівів, яких виростає не менше 30 і не більше 300 колоній. Із кожної проби роблять висів на 2–3 чашки Петрі із розведень. Кожне із розведень у кількості 1 мл висівають в одну бактеріологічну чашку з попередньо маркованою кришкою і заливають 10–15 мл розплавленого й охолодженого до температури 40–45 °C живильним середовищем для визначення кількості молочнокислих бактерій.

Допускається посів досліджуваного продукту у чашки із одного і того ж розведення в кількості 1 та 0,1 мл. Відразу ж після заливання середовища вміст чашки ретельно перемішують легкими обертальними похитуваннями для рівномірного розподілення посівного матеріалу. Після застигання середовища бактеріологічні чашки перевертають кришками донизу і в такому вигляді ставлять у термостат за відповідних температур.

Кількість колоній, що виростили на кожній чашці, підраховують, помістивши її доверху дном на темному фоні, користуючись лупою зі збільшенням у 4–10 разів та лічильниками. Кожну підраховану колонію відмічають на дні чашки чорнилом.

У разі великої кількості колоній та їх рівномірного розподілу дно чашки ділять на чотири і більше однакових сектори, підраховують колонії на 2–3 із них (але не менше, ніж на 1/3 поверхні чашки), знаходять середнє арифметичне число колоній і перемножують на загальну кількість секторів чашки. Це буде відповідати загальній кількості колоній, що вирости на одній чашці.

Кількість молочнокислих бактерій в 1 мл або 1 г продукту (X) обчислюють за формулою:

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

де: n – кількість колоній, підрахованих на чашці Петрі;

m – число десятикратних розведень.

За кінцевий результат аналізу приймають середнє арифметичне, одержане в усіх чашках.

Крім того, у дослідних пробах кисломолочних продуктах визначають кількість патогенних мікроорганізмів, в тому числі сальмонел, шляхом посівів розведень на середовище Ендо, дріжджів і пліснявих грибів – на середовище Сабуро чи сусло агар.

За мікробіологічними показниками кисломолочні продукти повинні відповідати вимогам, що наведені в табл 2–7.

Таблиця 2

**Мікробіологічні показники для кефіру згідно
ДСТУ 4417:2005 КЕФІР. Технічні вимоги**

Назва показника	Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см ³ , не менше ніж	10 ⁷
Кількість дріжджів, КУО в 1 см ³ , не менше ніж	10 ³
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 см ³	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду сальмонела, в 25 см ³	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 см ³	Не допускається
Плісняві гриби в 1 см ³ , не більше	50

Примітка: плісняві гриби нормують тільки для кефіру, зі строком придатності більше 3 діб.

**Мікробіологічні показники для кисломолочного сиру згідно ДСТУ 4554:2006
СИР КИСЛОМОЛОЧНИЙ. Технічні умови та виробів з нього згідно ДСТУ
4503:2005 ВИРОБИ СИРКОВІ. Загальні технічні вимоги**

Найменування показника	Норма
Кількість молочнокислих бактерій, КУО в 1 г, не менша	10 ⁷
Бактерії групи кишкової палички (коліформи) - в 0,001 г продукту з терміном зберігання не більше ніж 72 год - 0,01 г продукту з терміном зберігання більше ніж 72 год	Не допускається
Кількість пліснявих грибів, КУО в 1 г продукту, не більше	50
Кількість дріжджів, КУО в 1 г продукту не більше	100
Патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели в 25 г продукту	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> в 0,01 г продукту	Не допускається

Таблиця 4

**Мікробіологічні показники для сметани згідно
ДСТУ 4418:2005 СМЕТАНА. Технічні вимоги**

Найменування показника	Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 г, не менше	10 ⁷
Бактерії групи кишкових паличок в 0,001 г	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 г	Не допускається
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше	50
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	50

Примітка: дріжджі та плісняві гриби нормують тільки для сметани з терміном придатності до споживання більше 3 діб

Таблиця 5

**Мікробіологічні показники для простокваші (всіх видів) згідно
ДСТУ 4539:2006 ПРОСТОКВАША. Технічні вимоги**

Найменування показника	Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 г, не менше	10 ⁷
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи) в 0,1 г	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 г	Не допускається
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше	50
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	50

**Мікробіологічні показники для йогурту, ряжанки та варенця згідно
ДСТУ 4343:2004 «ЙОГУРТИ. Загальні технічні умови»
ДСТУ 4565:2006 РЯЖАНКА ТА ВАРЕНЕЦЬ. Технічні вимоги**

Найменування показника	Норма
Загальна кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см ³ , не менше: - для ряжанки (<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>termophilus</i>); - для варенця та йогурту (<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>termophilus</i> та з <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> або без неї)	10 ⁷ 10 ⁷
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 см ³	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 см ³	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1 см ³	Не допускається
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше	50
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	50

Таблиця 7

**Мікробіологічні показники для кисломолочних продуктів,
виготовлених з використанням ацидофільних бактерій, згідно
ДСТУ 4540:2006 НАПОЇ АЦИДОФІЛЬНІ. Технічні вимоги**

Найменування показника	Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 г, не менше	10 ⁷
Кількість дріжджів в ацидофільно-дріжджовому молоці та ацидофіліні, КУО в 1г, не більше ніж	10 ³
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 г	Не допускається
Плісняві гриби в 1 г, не більше ніж	50
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1 г	Не допускається
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	50

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Схематично покажіть послідовність мікробіологічного дослідження кисломолочних продуктів.

Завдання 2. Відіберіть проби кисломолочних продуктів для мікробіологічного дослідження. Зробити мазки з проб, пофарбувати їх за Грамом, зарисувати мікрокартину. Заповніть таблицю 8.

**Особливості відбору та підготовки проб кисломолочних продуктів
до мікробіологічного дослідження**

№ п\п	Вид кисломолочного продукту	Особливості відбору проб	Особливості підготовки проб
1.	Кисломолочний сир		
2.	Кефір		
3.	Сметана		
4.	Йогурт		

Завдання 3. Підготуйте відібрані проби кисломолочних продуктів для досліджень (зробити десятикратні розведення). Зробити посіви на відповідні середовища. Отримані результати порівняйте з показниками нормативних документів. Зробіть висновок.

Завдання 4. Запишіть у зошит таблиці з мікробіологічними показниками згідно нормативними документами для кисломолочних продуктів.

Питання для самоконтролю

1. Як проводять відбір та підготовку проб кисломолочних продуктів для мікробіологічного дослідження?
2. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів у дослідних пробах кисломолочних продуктів?
3. Як приготувати препарати для мікроскопії з кисломолочних продуктів? Яку мікроскопічну картину спостерігають за мікроскопії мазків?
4. Які мікробіологічні показники для кисломолочних продуктів містять нормативні документи?

Лабораторно-практичне заняття №16

Мікробіологічне дослідження масла

Мета: Ознайомитися зі схемою мікробіологічного дослідження масла.

Завдання

1. Вивчити особливості відбору та підготовки проб масла для мікробіологічного дослідження.
2. Ознайомитися з методами визначення загальної кількості бактерій у маслі, визначення кількості протеолітичних бактерій (посів на молочний агар), дріжджів і цвілей (посів на середовище Сабура) та бродильного титру.
3. Ознайомитися з вимогами по мікробіологічним показникам для різних видів масла згідно нормативних документів.

Обладнання та матеріали

Проби солодковершкового та кисловершкового масла, водяна баня, термометр, термостат, стерильні шпателі, ножі, колби, пробірки, чашки Петрі з середовищами (Ендо, МПА, Сабура), пробірки з середовищем Кеслер, стерильний фізрозчин натрію хлориду, піпетки, штативи.

Довідковий матеріал

Відбір проб масла для мікробіологічного дослідження. Від продукції, що потрапила у вибірку в споживчій тарі, відбирають для аналізу стерильним шпателем 15–20 г (у тому числі поверхневий шар), відібрану пробу поміщають у стерильний посуд, який закривають стерильною пробкою. Від продукту в брикетах масою 50 г і менше об'єднану пробу готують з цілих брикетів продукту без зняття зовнішнього шару, попередньо звільнивши їх від упаковки.

Від продукції, що потрапила у вибірку в транспортній тарі, пробу відбирають стерильним щупом на відстані 3–5 см від краю, спрямовуючи щуп у протилежний бік і опускаючи на 3/4 його довжини. Якщо продукт знаходиться в бочці, щуп занурюють похило від краю бочки до центру, якщо в ящику – щуп занурюють за діагоналлю від торцевої стінки до центру моноліту продукту.

Зі стовпчика масла на щупі відбирають стерильним шпателем 15–20 г масла і поміщають у стерильний посуд. Стовпчик масла, що залишився після відбору проби на щупі, повертають на колишнє місце, а поверхню масла акуратно зашпаровують,

Маркування та зберігання відібраних проб (дивись вище лабораторно-практичне заняття № 8 та 15).

Підготовка проб до досліджень. Перед дослідженням пробу (10 г) розплавляють на водяній бані за температури 40–45 °С і перемішують до одержання однорідної емульсії, з якої готують десятиразові розведення (методику розведень дивись вище).

Проведення дослідження. В солодковершковому маслі визначають загальну кількість бактерій, шляхом посіву розведень на МПА (набільш часто висівають 2, 3, 4 та 5 розведення).

У кисловершковому маслі, крім загальної кількості бактерій, визначають кількість молочнокислих бактерій, шляхом посіву на агар з гідролізованим молоком та кредою.

В обох видах масла визначають кількість протеолітичних бактерій шляхом посіву на молочний агар і кількість дріжджів та плісняви – на сусло агар або на середовище Сабуро.

Бродильний титр встановлюють шляхом посіву розведень у дві паралельні пробірки в середовище Кесслер.

Чашки з засіяними середовищами ставлять в термостат за температури 30 °С на 2–3 доби. Після цього проводять підрахунок колоній.

Для приготування мазків масло підігрівають у центрифужних пробірках на водяній бані за температури 70 °С. Потім центрифугують 10 хв при 1500 обертах. Верхній шар масла й білків зливають, а з осаду роблять мазки.

Мазки фіксують сумішшю спирт-ефіру чи хлороформом, фарбують за Грамом і мікроскопують з використанням імерсійного об'єктива.

У свіжому маслі виявляють молочнокислі стрептококи. У мазках зі старого масла, крім молочнокислих стрептококів, зустрічаються дріжджі та мікроскопічні гриби.

Мікробіологічні для кисло вершкового та солодковершкового масла згідно ДСТУ див.у табл. 1.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Розробити схему мікробіологічного дослідження масла.

Завдання 2. Відібрати проби масла для мікробіологічного дослідження. Зробити мазки з проб солодковершкового та кисловершкового масла, пофарбувати їх за Грамом, зарисувати мікрокартину.

Завдання 3. Підготувати відібрані проби масла до досліджень (зробити десятикратні розведення). Провести посіви на живильні середовища. Отримані результати порівняти з показниками нормативних документів. Зробити висновок.

Завдання 4. Записати у зошит таблицю з мікробіологічними показниками згідно нормативними документами для різних видів масла.

Таблиця 1

Мікробіологічні показники для вершкового масла, згідно з ДСТУ 4399:2005 Масло вершкове. Технічні вимоги

Показники	Норма для груп масла				топленого (молочний жир)
	вершкового селянського		екстра та вершкового бутербродного		
	солодко-вершкове та солоне солодко-вершкове	кисло-вершкове та солоне кисло-вершкове	солодко-вершкове та солоне солодко-вершкове	кисло-вершкове та солоне кисло-вершкове	
Кількість мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів не більше, КУО/г	1,0-10 ⁵	-	5,0 -10 ⁵	-	1,0-10 ⁵
Бактерії груп кишкових паличок, не дозволено, в г продукту	0,01		0,01		1,00
<i>St. aureus</i> , не дозволено, в г продукту	1,0	0,1	0,1		-
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше	100 в сумі		100 в сумі		200
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше					-
Патогенні мікроорганізми, зокрема бактерії роду <i>Salmonella</i> , не дозволено в г продукту	25		25		25

<i>Listeria monocytogenes</i> , не дозволено в г продукту	25	25	-
---	----	----	---

Питання для самоконтролю

1. Як проводять відбір та підготовку проб масла для мікробіологічного дослідження?
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів у дослідних пробах масла?
3. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів у дослідних пробах масла?
4. Як визначають кількість дріжджів та пліснявих грибів у дослідних пробах масла?
5. Як приготувати препарат для мікроскопії з масла? Яку мікроскопічну картину спостерігають при мікроскопії мазка з масла?
6. Які мікробіологічні показники для масла згідно ДТСУ?

Лабораторно-практичне заняття №17

Мікробіологічне дослідження сиру

Мета. Ознайомитись зі схемою мікробіологічного дослідження сиру.

Завдання

1. Вивчити особливості відбору та підготовки проб сиру для мікробіологічного дослідження.

2. Ознайомитись з методами визначення загальної кількості бактерій в сири (посів на МПА), визначення кількості протеолітичних бактерій (посів на молочний агар), дріжджів і пліснявих грибів (посів на середовище Сабуро) та бродильного титру.

3. Провести мікроскопію мазків сиру на наявність молочнокислих бактерій. Препарати пофарбувати за Грамом.

Обладнання та матеріали

Проби досліджуваного сиру, стерильні ступки, предметні та покривні скельця, розчини фарб для фарбування за Грамом, пробірки зі стерильним розчином натрію хлориду або фосфатного буфера, чашки Петрі з середовищами МПА, Сабуро (сусло-агар), молочним агаром, агар з гідролізованим молоком, пробірки з середовищем Кесслер, піпетки, мікроскоп, термостат.

Довідковий матеріал

Відбір проб сиру (твердого, напівтвердого, м'якого, розсольного, плавленого) для мікробіологічного дослідження. Від продукції, що потрапила у вибірку, поверхню сиру дезенфікують навколо місця відбирання проби етанолом. Відбір проб сиру проводять стерильним щупом, вводячи його у товщу продукту на глибину 25 см, повертають на один повний оберт і виймають разом із стовпчиком сиру. Стовпчик зберігають і використовують його пізніше для закриття отвору.

Точкові проби сиру відбирають щупом із двох протилежних сторін кожної голівки сиру, залученої у вибірку, вводячи його на глибину не менш, ніж 3/4 найбільшого розміру голівки. Під час відбирання точкових проб:

- із великих твердих сирів, що мають форму циліндра або бруска, щуп вводять з торцевої сторони ближче до центру;
- із дрібних твердих сирів круглої форми, щуп вводять з верхньої частини голівки до центру.

Від вийнятих стовпчиків сиру відрізають близько 1,5 см верхньої частини стовпчика, нижню частину $4,5 \pm 5$ см переносять у посуд для отримання об'єднаної проби.

Від батона ковбасного сиру точкові проби відбирають ножом поперек на відстані близько 5 см від краю батона, знімаючи затверділий шар сиру товщиною 0,2–0,3 см.

Від усіх видів плавлених сирів у споживчій упаковці, залучених у вибірку, точкові проби відбирають ножом рівномірно з різних частин кожної одиниці споживчої упаковки і переносять у посуд для отримання об'єднаної проби.

Від плавленого сиру в брикетах масою 30 г і менше, пробу готують із цілих брикетів, попередньо звільнивши їх від упаковки.

Маркування та зберігання відібраних проб (див. вище лабораторно-практичне заняття № 15).

Приготування мазка для фарбування за Грамом. Беруть стерильне предметне скельце і приставляють до відібраного кусочка сиру, тобто проводять методом відбитку. Висушують, фіксують, фармують та мікроскопують як описано в попередніх роботах.

Підготовка проб до досліджень. Перед дослідженням пробу будь якого виду сиру (10 г) переносять у стерильну ступку та ретельно розтирають товчачиком. Після цього додають 90 см^3 розчинника і отримують первинну суспензію, з якої готують десятикратні розведення (методику розведень див. вище).

Проведення дослідження. При мікробіологічному дослідженні сирів визначають загальну кількість бактерій шляхом посів розведень на МПА, кількість бактерій групи кишкових паличок шляхом посіву у середовище Кесслер (бродильний титр), кількість патогенних мікроорганізмів, в тому числі

сальмонел, шляхом посівів розведень на середовище Ендо, дріжджів і пліснявих грибів – на середовище Сабуру чи сусло агар.

Мікробіологічні показники для сирів згідно нормативними документами наведено в табл.1.

Таблиця 1

**Мікробіологічні показники сиру , згідно
ДСТУ 4558:2006 СІР ПОШЕХОНСЬКИЙ. Технічні вимоги.
ДСТУ 4669:2006 СІРИ НАПВТВЕРДІ. Загальні технічні умови.
ДСТУ 4395:2005 СІРИ МЯКІ. Загальні технічні умови**

Назва показника	Норма
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,01 г продукту	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, у т. ч. бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г продукту	Не допускається
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г продукту	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> , КУО в 1 г продукту, не більше	5 - 10 ²

Таблиця 2

**Мікробіологічні показники плавлених сирів, згідно
ДСТУ 4635:2006 СІРИ ПЛАВЛЕНІ. Загальні технічні умови**

Назва показника	Норма
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФAM), КУО, в 1 г сиру, не більше	5-10 ⁴
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи) в 0,01 г сиру	Не допускається
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г сиру	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г продукту	Не допускається
Дріжджі, КУО, в 1 г сиру, не більше	50
Плісеневі гриби, КУО, в 1 г сиру, не більше	50

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Розробити схему мікробіологічного дослідження сиру.

Завдання 2. Відібрати проби сиру для мікробіологічного дослідження. Зробити мазки з проб сиру, пофарбувати їх за Грамом, зарисувати мікрокартину.

Завдання 3. Підготувати відібрані проби сиру до досліджень (зробити десятикратні розведення). Провести посиви на живильні середовища для

визначення загальної кількості бактерій (на МПА), визначення кількості протеолітичних бактерій (посів на молочний агар), дріжджів і пліснявих грибів (посів на середовище Сабуро).

Завдання 4. Отримані результати порівняти з показниками нормативних документів. Зробити висновок.

Завдання 5. Запишіть у зошит таблиці з мікробіологічними показниками згідно нормативними документами для різних видів сирів.

Питання для самоконтролю

1. Як проводять відбір та підготовку проб сиру для мікробіологічного дослідження?
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів у дослідних пробах сиру?
3. Як визначають кількість молочнокислих мікроорганізмів у дослідних пробах сиру?
4. Як визначають кількість дріжджів та пліснявих грибів у дослідних пробах сиру?
5. Як приготувати препарат для мікроскопії з сиру? Яку мікроскопічну картину спостерігають при мікроскопії мазка з сиру?
6. Які мікробіологічні показники для сиру згідно нормативними документами?

Лабораторно-практичне заняття №18

Мікробіологічне дослідження згущеного, сухого молока і морозива

Мета. Ознайомитися зі схемами мікробіологічного дослідження згущеного, сухого молока й морозива.

Завдання

1. Вивчити особливості відбору та підготовки проб згущеного, сухого молока й морозива для мікробіологічного дослідження.

2. Ознайомитися з методами визначення загальної кількості бактерій у згущеному, сухому молоці й морозиві (посів на МПА), дріжджів і цвілей (посів на середовище Сабура) та бродильного титру.

3. Підготувати та провести посів приготовлених розведень проб згущеного й сухого молока на МПА, середовище Сабура, середовище Кесслер; морозива – на МПА, середовище Кесслер.

Обладнання та матеріали

Проби згущеного, сухого молока й морозива, стерильні ступки, предметні та покривні скельця, розчини фарб для фарбування зао Грамом, пробірки з стерильним розчином лимоннокислого натрію або фосфатного буфера, із середовищем Кесслер, чашки Петрі з середовищем Ендо та Сабура, піпетки, мікроскоп, термостат.

Довідковий матеріал

Відбір проб згущеного, сухого молока й морозива

Відбирання проб згущеного молока. Перед відбиранням проб продукт перемішують упродовж 2–3 хв у цистернах, бочках, флягах, тощо – мішалками, а в споживчій тарі – шпателем. Якщо у продукті в споживчій тарі є осад, то його підігрівають за температури водяної бані не вище 55 ± 5 °С (а температура продукту не повинна бути вищою 30 °С), перемішують до однорідної маси і охолоджують до 20 °С. Відбирають проби пробником, щупом або ложкою, занурюючи їх до дна тари, переносять в одну ємність, перемішують і отримують об'єднану пробу.

Відбирання проб сухого молока проводять щупом, пробником, ложкою з різних частин кожної одиниці тари. Щуп занурюють у продукт на відстані 2–5 см від стінки упаковки за діагоналлю до дна тари протилежної стінки. Точкові проби переносять у ємність, ретельно перемішують.

Відбирання точкових проб морозива здійснюють теплим 30 ± 5 °С щупом, ножем чи ложкою. Знімають верхній шар продукту глибиною 2,5 см з того місця, з якого відбирається проба. За необхідності отримання «поверхневої проби», рівномірно зішкрібають поверхневий шар продукту на глибину 0,2 см.

З точкових проб готують об'єднану, яка становить 200 г.

Морозиво у споживчій тарі, яке ввійшло до вибірку, звільняють від упаковки після чого кладуть у ємність до повного відтаювання.

Маркування та зберігання відібраних проб (див. лабораторно-практичне заняття №15).

Підготовка проб до досліджень. Для дослідження відбирають 10 г згущеного молока або сухого молока й додають 90 см³ розчинника, ретельно перемішують до утворення однорідної емульсії, з якої готують десятикратні розведення.

Для дослідження зажують 10 г морозива, які розплавляють на водяній бані за температури не вище 37 ± 1 °С, стежачи, щоб температура дослідної проби не перевищувала температуру водяної бані. Потім додають 90 см³ розчинника (лимоннокислого натрію або фосфатного буферу) перемішують до одержання однорідної емульсії, з якої готують десятикратні розведення (методику розведень див. вище).

Для дослідження відбирають 10 г сухого молока й додають 90 см³ розчинника, підігрівають до температури 45 ± 1 °С і ретельно перемішують до утворення однорідної емульсії, з якої готують десятикратні розведення.

Проведення дослідження. При мікробіологічному дослідженні згущеного, сухого молока й морозива визначають загальну кількість бактерій шляхом посів розведень на МПА, кількість бактерій групи кишкових паличок шляхом посівів у середовище Кесслер (бродильний титр), кількість патогенних мікроорганізмів, в тому числі сальмонел, шляхом посівів розведень на

середовище Ендо, дріжджів і пліснявих грибів –на середовище Сабуро чи сусло агар.

Мікробіологічні показники згущеного, сухого молока й морозива згідно нормативних документів наведено в табл. 1–3.

Таблиця 1

**Мікробіологічні показники сухих молока та вершків, згідно
ДСТУ 4273:2003 «Молоко та вершки сухі. Загальні технічні вимоги»**

Назва показника	Норма					
	сухе знежирене молоко		сухе незбиране молоко		сухі вершки	
	у спожитковій тарі	у транспортній тарі	вищій г'атунок	перший г'атунок	вищій г'атунок	перший г'атунок
Кількість мезофільних і факультативно анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г продукту, не більше	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
Бактерії групи кишкових паличок в 0,1 г продукту	Не допускається					
Патогенні мікроорганізми, в т. ч. бактерм роду сальмонела, в 25 г продукту	Не допускається					

Таблиця 2

**Мікробіологічні показники згущеного молока, згідно
ДСТУ 4274:2003 Консерви молочні МОЛОКО НЕЗБИРАНЕ ЗГУЩЕНЕ З
ЦУКРОМ. Технічні умови**

Назва показника	Норма
Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г продукту, не більше	$2,5 \times 10^4$
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в: споживчій тарі в 1,0 г продукту	Не допускаються
транспортній тарі в 0,3 г продукту	Не допускаються
Патогенні мікроорганізми, в т.ч. бактерії роду Сальмонела, в 25 г продукту	Не допускаються
<i>S. aureus</i> , в 1 г продукту	Не допускається

**Мікробіологічні показники морозива, згідно
ДСТУ 4733:2007 Морозиво на молочній основі. Загальні технічні умови**

Назва показника	Норма для морозива
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1г, не більше	1×10^5
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,01г продукту	Не допускають
Патогенні мікроорганізми, в т.ч. бактерії роду Сальмонела, в 25г продукту	Не допускається
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г	Не допускається
Примітка: Для кисломолочного морозива, показник Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів не регламентують	

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Розробити схеми мікробіологічного дослідження згущеного, сухого молока й морозива.

Завдання 2. Відібрати проби згущеного, сухого молока й морозива для мікробіологічного дослідження. Підготувати відібрані проби для досліджень (зробити десятикратні розведення). Провести посіви на живильні середовища для визначення загальної кількості бактерій (на МПА), БГКП (середовище Кеслер), сальмонел (середовище Ендо) дріжджів і пліснявих грибів (посів на середовище Сабуро).

Завдання 3. Отримані результати порівняти з показниками нормативних документів. Зробити висновок.

Завдання 4. Записати у зошит таблиці з мікробіологічними показниками згідно з нормативними документами для згущеного, сухого молока та морозива.

Питання для самоконтролю

1. Як проводять відбір та підготовку проб згущеного, сухого молока й морозива для мікробіологічного дослідження?
2. Як визначають загальну кількість мікроорганізмів в дослідних пробах згущеного, сухого молока й морозива?
3. Як визначають кількість дріжджів та пліснявих грибів у дослідних пробах згущеного, сухого молока й морозива?
4. Які мікробіологічні показники для згущеного, сухого молока й морозива згідно ДСТУ?

ДОДАТКОВІ ТЕМИ ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Лабораторно-практичне заняття № 19

Класифікація, вимоги та приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока і молочних продуктів

Мета. Ознайомитися та набути навиків з приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів. Освоїти техніку посіву на живильні середовища.

Завдання

1. Ознайомитися з класифікацією та вимогами до живильних середовищ, які використовуються для дослідження молока й молочних продуктів на визначення кількості показників мікрофлори.
2. Навчитися готувати живильні середовища для виявлення різних груп мікроорганізмів з молока та молочних продуктів.
3. Вивчити загальні методики посівів на щільне та рідке живильні середовища.

Обладнання та матеріали

МПБ в колбах та пробірках, МПА, середовище Ендо, Кітта-Тароці, Сабуро (та інші середовища) в чашках Петрі, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, лабораторні ваги з наважками, фільтрувальний папір, електричні плити, спиртівки.

Довідковий матеріал

Отримання чистої культури мікроорганізмів, вивчення їх біологічних властивостей з метою встановлення виду мікроорганізмів та отримання біомаси в лабораторії можливе лише за певних умов. Для цього використовують штучні поживні середовища.

Середовища, які використовуються для культивування мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам:

- мати певний набір азотистих та вуглеводних речовин;

- мати вітаміни та необхідні концентрації солей;
- мати необхідне рН середовища;
- мати достатню кількість вологи;
- бути стерильними (до початку посіву не містити мікроорганізмів).

Класифікація середовищ

За походженням сировини:

натуральні (молоко, яйця, кров, сироватка, овочі, фрукти);

синтетичні (суміш хімічно чистих органічних і мінеральних речовин).

За консистенцією:

Рідкі (бульйони), щільні (агари) та напівщільні (агаризовані).

За складом:

прості: м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА);

складні (до простих додають вуглеводи, кров, сироватку, молоко та ін.).

За призначенням:

універсальні – для культивування різних груп мікроорганізмів;

середовища накопичення – рідкі середовища для накопичення та виявлення певних груп мікроорганізмів;

елективні – забезпечують сприятливі умови для росту одних мікроорганізмів і несприятливі – для інших;

диференціально-діагностичні – для визначення видової належності мікроорганізмів;

консервувальні – використовують для первинного росту та транспортування досліджуваного матеріалу.

Як універсальні живильні середовища використовують рідкі (МПБ) та щільні (МПА) середовища.

Середовища накопичення мають рідку консистенцію і використовуються для виявлення мікроорганізмів, вміст яких в продукті не значний. Середовища накопичення використовують для виявлення бактерій групи кишкових паличок – БГКП (середовище Кесслер) та сальмонел (середовище Кауфмана, селенітове середовище). За наявності росту бактерій на середовищах накопичення в подальшому, як правило, здійснюють посів на щільні

диференційно-діагностичні середовища, які використовують для ідентифікації мікроорганізмів, що вирости на середовищах накопичення. Так в якості диференційно-діагностичного середовища для виявлення БГКП використовують середовище Ендо.

Елективні живильні середовища мають щільну консистенцію. Прикладом такого середовища може бути молочно-солевий агар, який використовується для виявлення в молочних продуктах золотистого стафілококу.

Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів із окремих компонентів.

Середовища для культивування молочнокислих бактерій

Знежирине молоко. Молоко відокремлюють від вершків, розливають в пробірки чи колби, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують в автоклаві під тиском 0,05 МПа. Середовище використовують для вивчення фізіологічних властивостей та підрахунку кількості молочнокислих бактерій. Це середовище також використовують для отримання лабораторної закваски з рідких і сухих заквасок та бактеріальних концентратів.

Агар з гідролізованим молоком. Спочатку готують гідролізоване молоко, шляхом гідролізу стерильного знежиреного молока за допомогою ензима панкреатину за температури 45 °С протягом 3-х діб за наявності хлороформа. Отриманий гідролізат розводять водою у співвідношенні 1:2. Потім додають 1,5 – 2 % агару мікробіологічного і 2–3 % крейди у вигляді порошку. Середовище стерилізують. Агар з гідролізованим молоком використовують для кількісного підрахунку молочнокислих бактерій у молочних продуктах.

Середовище для культивування гнилісних бактерій

Молочний агар готують шляхом внесення 20 % горячого стерильного знежиреного молока в стерильних розплавлений 2 % водний розсин агар-агру. Використовується це середовище для кількісного обліку протеолітичних та пептонізуючих бактерій (мікрококів).

Середовища для культивування дріжджів та мікроскопічних грибів

Для культивування дріжджів та пліснявих грибів застосовують середовище Сабуро та сусло-агар, які можна вготувати в лабораторних умовах чи придбати готові у сухому порошкоподібному вигляді.

Середовища для виявлення коагулазно-позитивних стафілококів

Основа – солевий агар: до МПА (рН = 7,2–7,4) додають 2 % агару мікробіологічного і 6,5 % хлористого натрію, розплавляють на водяній бані, за необхідності фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають мірним циліндром по 100 см³ в колби ємністю 250 см³ і стерилізують за температури 121 °С протягом 20 хвилин. Отримують солевий агар. Замість МПБ можна використовувати сухий поживний агар, додавши до нього 6,5 % хлористого натрію.

Жовтково-солевий агар. До розплавленого та охолодженого до 45 °С солевого агару (основа) додають 20 см³ емульсії яєчного жовтка. Після повного розмішування жовтково-солевий агар розливають у стерильні чашки Петрі по 20 см³ та зберігають в холодильнику 5 – 7 діб.

Для приготування емульсії яєчного жовтка на дно стерильної чашки Петрі поміщають курине яйце, яке ретельно протирають ватою, змоченою етиловим спиртом. Стерильним пінцетом пробивають з двох протилежних сторін два отвори. Через один із цих отворів із яйця видаляють білок, а потім, через дещо збільшений отвір, вилвають жовток в стерильну колбу, ємністю 200 см³. Жовток змішують з чотирма об'ємами стерильного фізрозчину, потім вміст ретельно перемішують до отримання гомогенної маси.

Молочно-солевий агар. До 100 см³ розплавленого і охолодженого до 45 °С солевого агару вносять 10 см³ знежиреного стерильного молока, ретельно перемішують та розливають тонким шаром в стерильні чашки Петрі.

Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів із промислово випущених сухих середовищ полягає в розчиненні певної кількості порошку в воді, доведенні отриманої суміші до кипіння, кип'ятінні протягом 5 хвилин. Далі (за необхідності) фільтрування через ватно-марлевий фільтр та

розлив в пробірки чи колби, які закриваються ватно-марлевими корками. Далі живильні середовища стерилізують в автоклаві. Зі сухих середовищ готують МПБ, МПА, середовище Сабуро, середовище Кесслер та ін..

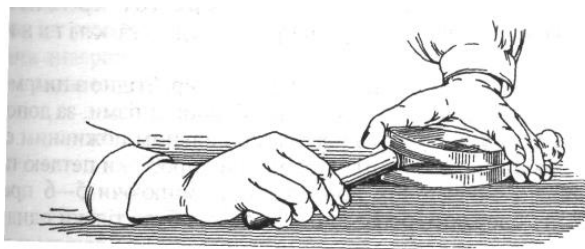


Рис. 1. Розлив поживного середовища в чашки Петрі

Прості середовища зберігають у шафах за кімнатної температури, складні - у холодильнику. Перед посівом середовища підігрівають у термостаті до 20–37 °С.

Техніка посіву на живильні середовища

Увага! Посів проводити в асептичних умовах (швидко, не розмовляти, не робити зайвих рухів, посіви тримати біля полум'я спиртівки на відстані до 10 см). Дотримуватися правил техніки безпеки! Посів досліджуваного матеріалу проводять бактеріальною петлею, шпателем, піпеткою.

Техніка посіву на щільне середовище в пробірці бакпетлею (рис. 2 а):

- беруть пробірку з культурою в ліву руку та нахиляють її вправо;
- фламбують бакпетлю у полум'ї спиртівки (необхідно тримати її як авторучку);
- знімають пробку з пробірки мізинцем правої руки;
- фламбують край пробірки в полум'ї спиртівки;
- вводять петлю в пробірку та охолоджують її, доторкуючись до внутрішньої стінки пробірки;
- беруть досліджуваний матеріал бакпетлею;
- фламбують край пробірки, закривають її корком і ставлять у штатив;
- пробірку з посівом ставлять в термостат.

Техніка посіву на щільне середовище в чашці Петрі бакпетлею (рис. 2 б):

- відкривають (трохи) чашку Петрі лівою рукою;

- проводять посів матеріалу штрихами по поверхні щільного живильного середовища;
- закривають чашку Петрі, на її дні пишуть дату та назву культури, на кришці – назву середовища;
- фламбують бакпетлю;
- ставлять бакпетлю в штатив;
- чашку з посівом ставлять в термостат доверху дном, установлюють відповідний температурний режим.



Рис. 2. Техніка посіву на рідке середовище бакпетлею:
а- в пробірці; б – в чашці Петрі

Техніка посіву на рідке середовище в пробірці бакпетлею:

1. У ліву руку беруть пробірку з рідким середовищем, нахиляють її вправо;
2. Знімають мізинцем правої руки корок, фламбують краї пробірки;
3. Вводять петлю з матеріалом у пробірку (не торкаючись поверхні пробірки);
4. Змивають його живильним середовищем;
5. Фламбують край пробірки і корок, закривають пробірку;
6. Фламбують бакпетлю і ставлять її в штатив;
7. Пишуть номер на пробірці, назву середовища;
8. Ставлять пробірку у термостат.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомитися з класифікацією та рецептурою живильних середовищ (МПА, МПБ, Ендо, Сабуро). Законспектувати в робочі зошити.

Завдання 2. Ознайомитись з методами приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока та молочних продуктів та відпрацювати навички їх приготування .

Завдання 3. Вивчити схему проведення посіву. Провести посіви на рідкі та щільні живильні середовища з дотриманням техніки посіву.

Завдання 5. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

**Середовища, які застосовуються для виділення різних груп
мікроорганізмів**

№ п/п	Середовища	Мікроорганізми

Питання для самоконтролю

1. Як класифікуються живильні середовища? Яким вимогам повинні відповідати живильні середовища?
2. Яка техніка посіву на щільне та рідке живильні середовища?
3. Які середовища застосовують для культивування молочнокислих бактерій та пліснявих грибів?
4. Які середовища використовують для культивування дріжджів та пліснявих грибів?

Лабораторно-практичне заняття №20

Метод виготовлення препаратів для мікроскопії та методи їх фарбування.

Методи фарбування спор і капсул

Мета. Навчитися готувати препарати мікроорганізмів для мікроскопії та ознайомитися з методами їх фарбування.

Завдання

1. Навчитися готувати предметні скельця для виготовлення мазків для мікроскопії
2. Виготовити препарат для мікроскопії з агарової та бульйонної культур мікроорганізмів.
3. Пофарбувати мазки простим та складним методом.
4. Ознайомитись з методами фарбування спор та капсул.

Обладнання та матеріали

Предметні скельця, бактеріологічні петлі та пастерівські піпетки, розчин кристалічного фіолетового для фарбування мікроорганізмів, розчин метиленового синього для фарбування мікроорганізмів, набір фарб для фарбування за Грамом, набори фарб для фарбування спор та капсул, мікроскоп, імерсійне масло, фізіологічний розчин натрію хлориду, агарові та бульйонні культури мікроорганізмів.

Довідковий матеріал

Перш ніж розпочати виготовлення препаратів для мікроскопії, необхідно підготувати предметні скельця. Вони мають бути сухими та знежиреними. Доказом знежирення є рівномірний розподіл краплі води на поверхні скла.

Нові скельця спочатку миють у мильному розчині, зполіскують в теплій воді, знежирюють у розчині спирт-ефіру. Використані скельця спочатку витримують в розчині сірчаної кислоти, а потім кип'ятять в розчині соди та мильної води, після чого ополіскують у воді та висушують в сушильній шафі.

Оброблені в такий спосіб скельця зберігають в скляній банці сухими або в розчині спирт-ефіру. Скельця беруть пінцетом, оскільки пальці залишають

жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчині спирт-ефіру, то їх протирають фільтрувальним папером чи бавовняною тканиною.

Порядок проведення робіт складається з таких етапів.

1. Виготовлення препарату для мікроскопії. Препарат готують за допомогою бактеріологічної петлі (з платини) чи пастерівських піпеток із агарової та бульйонної культури мікроорганізмів.

Виготовлення мазка з агарової культури:

- на знежиреному предметному склі позначають місце мазка, номер пробірки, назву культури (олівцем-маркером);
- стерилізують (фламбують) бакпетлю, остужують на повітрі, наносять краплю фізіологічного розчину натрію хлориду;
- стерилізують (фламбують) бакпетлю, відкривають чашку Петрі, охолоджують бакпетлю доторкуючись до внутрішньої стінки чашки;
- беруть третину ізольованої колонії, чашку закривають;
- вносять зібраний матеріал у краплю розчину натрію хлориду та розтирають її у вигляді монети (круговими рухами) на позначеному місці предметного скельця;
- мазок висушують на повітрі.

Виготовлення мазка з бульйонної культури:

- фламбують та остужують бакпетлю;
- занурюють у пробірку з бактеріальною бульйонною культурою;
- наносять бакпетлею краплю на знежирене предметне скло;
- розтирають на предметному склі круговими рухами;
- мазок висушують на повітрі.

2. Висушування препарата-мазка. Здійснюють на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не потрібно, оскільки за швидкої втрати вологи відбувається груба коагуляція (згортання) білків і клітина втрачає свою природню форму.

3. Фіксацію висушеного препарату. Здійснюють фізичним або хімічним способом.

Фізичний спосіб. Для цього треба тричі провести скельце з мазком над поверхнею полум'я спиртівки (протягом 6 с).

Хімічний спосіб. Для цього мазок обробляють розчинами: метилового (5 хв) або етилового спирту (10 хв) чи сумішшю спирту та ефіру.

Зафіксований мазок називається мікробіологічним препаратом для мікроскопії.

4. Фарбування препарату. Здійснюють простими чи складними методами.

Прості методи фарбування - застосовують один барвник (наприклад, фуксин Пфейффера або метиленовий синій). Наносять на фіксований препарат фуксин Пфейффера (на 2 хв) або метиленовий синій (на 3–5 хв); промивають водою; висушують фільтрувальним папером.

Складні методи фарбування дозволяють відрізнити мікроорганізми один від одного або виявити особливості їх структури (наявність спор та капсул). До них відносять фарбування за Грамом (виявляють грампозитивні або грамнегативні мікроорганізми), за Романовським – Гімзою (виявляють спірохети) та методи фарбування для виявлення спор та капсул.

Метод фарбування за Грамом

Суть методу: Здатність чи нездатність мікроорганізмів фарбуватись за Грамом залежить від хімічного складу бактеріальної стінки. У грамнегативних мікроорганізмів проста будова бактеріальної стінки (невелика кількість полісахаридів (пептидоглікан) – близько 10 % або один шар), яка легко вимивається спиртом та знебарвлюється. У грампозитивних – складна бактеріальна стінка (близьк 80 % полісахариду, кілька шарів) під час обробки спиртом вона не вимивається та зберігає інтенсивність забарвлення.

Техніка методу:

- на мазок наносять барвник кристалічний фіолетовий на 2 хв;
- наносять розчин Люголя на 1 хв;
- наносять 96 % етиловий спирт (на 20–30 с);
- промивають водою;
- наносять фуксин Пфейффера (на 2 хв), добре промивають водою;

- висушують фільтрувальним папером.

Кокоформи в більшості випадків фарбуються граммпозитивно (фіолетовий чи синій колір). Звивсті форми – грамнегативно (червоний колір).

Серед палчковидних форм трапляються як граммпозитивні так і грамнегативні мікроорганізми.

Методи фарбування для виявлення капсул

Для виявлення у мікроорганізмів капсул застосовують метод Ольта та метод Міхіна.

Метод Ольта. Фіксований мазок фарбують 2–3 % розчином сафраніна, фарбу готують перед використанням, розчиняючи її в гарячій дистильованій воді. При цьому, капсули мають світло-жовте забарвлення, а мікробна клітина – цегляно-червоного забарвлення.

Метод Міхіна. Фіксований мазок фарбують розчином метиленового синього (блакитного) протягом 2–3 хв., підігрівачи його до появи парів. Потім фарбу швидко змивають водою, мазок просушують фільтрувальним папером. При цьому, капсули мають світло-рожевий колір, мікробна клітина – темно-синій колір.

Методи фарбування для виявлення спор

Для фарбування спор здебільшого використовують метод Златогорова. Готують мазок звичайним способом, висушують на повітрі. Для фіксації мазка, а також для розм'якшення оболонки спори предметне скельце проводять над полум'ям спиртівки біля 10 разів. На мазок кладуть фільтрувальний папір, на який наносять карболовий фуксин Циля, підігрівачи мазок протягом 8–10 хв до появи пару (в результаті спори та вегетативні форми фарбуються в червоний колір). Потім фільтрувальний папір знімають і протягом 6–10 с знебарвлюють розчином сірчаної кислоти (спори залишаються червоними). Після цього мазок промивають водою, просушують фільтрувальним папером і мікроскопують під імерсійною системою мікроскопу. Після застосування цього методу фарбування вегетативні форми набувають синього кольору, спори – червоного.

Виготовлення препаратів для мікроскопії грибів та дріжджів

За допомогою бактеріальної петлі знімають поверхневий (повітряний) міцелій гриба з субстрату та обережно вносять його у краплю води (або фізрозчину), яка заздалегідь була нанесена на предметне скельце. Краплю води з міцелієм гриба накривають покривним скельцем та злегка придавлюють, щоб видалити пухирці повітря. При цьому визначають, одноклітинну чи багатоклітинну будову міцелію, звертають на форму спорангіїв та спорангієносіїв. Крім того, в препараті завжди спостерігають велику кількість вільно розміщених спор, що висипалися із спорангіїв, які лопнули.

Для мікроскопічного дослідження дріжджів на предметне скло наносять краплю дріжджів у фізрозчині та накривають покривним скельцем (роздавлена крапля). Розглядають під мікроскопом в затемненому полі зору, для чого звужують діафрагму конденсора. Звертають на форму та розмір дріжджових клітин та на наявність форм, що розмножуються брунькуванням.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Приготувати предметні скельця для мікроскопії.

Завдання 2. Виготовити препарат для мікроскопії з агарової та бульйонної культур мікроорганізмів, грибів або плісені.

Завдання 3. Пофарбувати приготовлені препарати для мікроскопії простим методом (метиленовим синім) та методом за Грамом.

Завдання 4. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Методи фарбування препаратів для мікроскопії

Прості методи фарбування	Складні методи фарбування	Методи фарбування для виявлення капсул	Методи фарбування для виявлення спор

Питання для самоконтролю

1. Як готують предметні скельця для виготовлення препарату для мікроскопії?

2. Які методи використовують для фарбування препаратів для мікроскопії?

3. Яка методика виготовлення препарату для мікроскопії з агарової та бульйонної культури?
4. У чому суть методу фарбування за Грамом?

Лабораторно-практичне заняття №21

Визначення якості та придатності молока до сировиробництва за сичужною, бродильною та сичужно-бродильною пробами

Мета. Ознайомитися з методами визначення якості та придатності молока до сировиробництва.

Завдання

1. Ознайомитися з вимогами до молока, яке використовуються для виробництва сирів.
2. Відпрацювати методику проведення бродильної проби.
3. Відпрацювати методику проведення сичужно- бродильної проби.

Обладнання та матеріали

Проби сирого молока, сичужні ензими, пробірки, штативи, колби, термостат, термометр.

Довідковий матеріал

Якість сиру, у першу чергу, визначається органолептичними, фізико-хімічними показниками молока, а також складом його мікрофлори. Молоко вважається сиропридатним, якщо має гарні смак, запах, колір і консистенцію, відповідний вміст і властивості складових частин (білків, жиру, солей), необхідні для розвитку мікрофлори, яка бере участь при формуванні специфічних характеристик сирів.

Органолептичні властивості молока теж дуже важливі для сироваріння, тому що вади його смаку, кольору і запаху викликають відповідні вади і сиру. Сири, виготовлені з молока, що містить більш 5–6 % домішків маститного молока, мають вади смаку і запаху (гіркота, прогірклість), консистенції (мастка, крихка), кольору (нерівномірний), рисунку (рваний, губкоподібний), у зв'язку з чим таке молоко вважають непридатним для сироваріння.

Біологічну цінність молока обумовлюють, з одного боку, речовини, що стимулюють розвиток молочнокислих бактерій: вітаміни, азотисті речовини, продукти автолізу бактерій, з іншого – речовини, що затримують розвиток мікроорганізмів у молоці, інгібітори. Сиропридатне молоко не повинно містити

патогенні мікроорганізми, бактерії групи кишкових паличок і маслянокислих бактерій та інгібуючих речовин.

Тому, на молокопереробному заводі, де виробляють сири молоко досліджують за такими пробами: редуктазна проба (на загальну кількість бактерій), сижужна проба (здатність молока згортатися під дією сичужного ензиму), бродильна або сичужно-бродильна, проба на наявність у молоці маслянокислих бактерій.

Сижужна проба. Грунтується на здатності молока згортатися під дією сичужного ензиму.

Для її проведення в пробірки з 10 см³ досліджуваного молока, нагрітого на водяній бані до 35 °С, додають 2 см³ робочого розчину сичужного ензиму і залишають до зсідання. Початком сичужної проби вважають момент внесення робочого розчину, закінченням – момент, коли при перегортанні пробірки догори дном згусток не випадає.

За тривалістю зсідання молоко поділяють на три типи:

- 1) тривалість зсідання менш ніж 10 хв – здатність молока зсідатися висока;
- 2) тривалість зсідання протягом 10–15 хв – здатність молока зсідатися нормальна;
- 3) тривалість зсідання більш ніж 15 хв або молоко зовсім не згортається – слабка здатність зсідатися молока (молоко «мляве»).

Проба на бродіння. Грунтується на здатності мікроорганізмів, наявних у молоці, викликати його зсідання. Залежно від тривалості зсідання й характеру утвореного згустку оцінюють склад мікрофлори молока й його придатність для виробництва сиру.

Для проведення цієї проби наповнюють пробірки досліджуваним молоком на 1 см нижче верхнього краю і термостатують за температури 38–40 °С. Результати перевіряють через 12 та 24 години і відносять молоко до того або іншого класу.

Найкращим для виробництва сиру вважають молоко, що зсілося за 12 годин, При цьому утворений згусток є щільним, відсутні сироватка, пухирці

газу, тріщин і порожнеч (I клас). Непридатно для сировиробництва молоко, згусток з якого має пухирці газу (III клас), розірваний на шматки або спучений (IV клас).

У разі забруднення молока бактеріями групи кишкових паличок чи пептонізуючими бактеріями (мікроококи) утворюється розірваний, спучений з пухирцями газу згусток.

Сичужно-бродильна проба. Ґрунтується на здатності деяких мікроорганізмів та сичужного ензиму викликати зсідання молока. За характером згустку, що утворюється, оцінюють якість молока та його придатність для виробництва сиру.

Для цього в пробірку з 30 см³ досліджуваного молока додають 1 см³ робочого розчину сичужного ензиму, добре перемішують і ставлять на 12 годин на водяну баню чи в термостат при 38°C, після чого виймають і оглядають згусток, що утворився.

Оцінюють проби за такою схемою:

- *молоко цілком придатне для вироблення сиру* – згусток нормальний, із гладкою поверхнею, пружний, без вічок на поздовжньому розрізі, знаходиться в прозорій сироватці, сироватка кислувата, нетягуча, негірка (I клас молока);

- *молоко, підозріле на наявність газоутворюючих мікроорганізмів* – згусток губчатий, м'який, з численними вічками або розірваний (II клас молока);

- *молоко непридатне для вироблення сиру* – згустку немає, у пробірці пластівцеподібна маса, сироватка каламутна або згусток губчатий, спучений, пронизаний пухирцями газу (III клас молока).

Пробу на наявність маслянокислих бактерій проводять двома способами.

Перший спосіб: 10 см³ досліджуваного молока в пробірці з парафіном підігрівають на водяній бані до 90 °C протягом 10 хв., після цього витримують у термостаті при 30 °C дві доби. Поява розіраного згустку свідчить про присутність маслянокислих бактерій.

Другий спосіб: до м'ясо-пептонного агару додають 1%-ний розчин глюкози, і середовище розливають по 10 см³ у 6 пробірок. Одночасно готують

два розведення досліджуваного молока. Після цього пробірки з живильним середовищем нагрітим до 40 °С, засівають: у перші дві пробірки додають по 1 см³ нерозведеного молока, у другі дві – молоко першого розведення, у треті дві – молоко другого розведення. Посіви нагрівають до 90–100 °С і охолоджують до застигання середовища. У кожену пробірку наливають первісне середовище товщиною 1 см нагріте до 40 °С і термостатують при 35–37 °С протягом 2 доби. За розривами у товщі середовища визначають кількість маслянокислих бактерій методом граничних розведень. У пастеризованому молоці маслянокислі бактерії повинні бути відсутні у 1 см³.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Законспектувати в робочі зошити основні положення щодо послідовності проведення сичужної, бродильної та сичужно-бродильної проби.

Завдання 2. Дослідити різні проби молока за сичужною, бродильною та сичужно-бродильною пробами. За результатами встановити його сиропридатність.

Завдання 3. Результати внести до табл. 1 та зробити висновок.

Таблиця 1

Результати бродильної та сичужно-бродильної проби

№ п\п	Бродильна проба		Сичужно-бродильна проба	
	характеристика згустку	якість молока	характеристика згустку	якість молока
1				
2				
3				

НАУКОВО-ДОСЛІДНА РОБОТА З ДИСЦИПЛІНИ МІКРОБІОЛОГІЯ МОЛОКА І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Загальні методичні вказівки по проведенню науково-дослідної роботи студентів з дисципліни

Науково-дослідна робота студентів є одним із важливих моментів підвищення якості підготовки та виховання спеціалістів, які здатні творчо використовувати в практичній діяльності останні досягнення науково-технічного прогресу. Залучення студентів до науково-дослідної роботи також дозволяє використати творчій та трудовий потенціал у встановлені їх як майбутніх науковців.

Основними завданнями науково-дослідної роботи студентів є:

- 4) оволодіння студентами науковими методами пізнання;
- 5) поглиблене та творче засвоєння навчального матеріалу;
- 6) самостійне розв'язання тих чи інших проблем;
- 7) набуття навичок роботи у науковому колективі.

Науково-дослідна робота є продовженням та поглибленням навчального процесу. Вона поділяється на:

- науково-дослідну роботу, яка є складовою навчального процесу (виконання завдань під час проведення лабораторно-практичних занять, проходження фахової чи навчальної практики, які містять елементи наукових досліджень тощо);
- науково-дослідна робота, яка виконується поза навчальним процесом (робота в наукових гуртках і участь в дослідженнях за державною науковою тематикою).

Науково-дослідна робота передбачає:

- вибір теми дослідження;
- оцінку сучасного стану питання;
- розроблення робочої гіпотези та вибір методик дослідження;

- визначення послідовності виконання досліджень;
- власне виконання досліджень та отримання результатів;
- аналіз результатів та оформлення звіту.

Вибір теми дослідження залежить від низки чинників: особистої зацікавленості студента в поглибленому вивченні певного напрямку, наукових інтересів керівника чи тематики досліджень відповідної кафедри, реальних можливостей виконання досліджень (матеріально-технічне забезпечення).

Перш ніж розпочати науково-дослідну роботу, студент зобов'язаний ознайомитися та вивчити рекомендовані керівником і знайдені самостійно в бібліотеках чи в інших інформаційних джерелах матеріали та підготувати огляд літератури.

Саме в огляді літератури повинен бути висвітлений критичний аналіз оцінки сучасного стану питання досліджень.

Робоча гіпотеза – наукове припущення, розв'язанню чи доведенню якого присвячена робота, формується студентом та його керівником на основі вивчення сучасного стану питання.

На підставі гіпотези здійснюють вибір *методик досліджень* – можливих шляхів вирішення поставленого завдання. При цьому можуть використовуватися як стандартні, загально-прийняті методики, так і нестандартні. Основним в цьому є матеріально-технічне забезпечення кафедри чи лабораторії. Можливе розроблення керівником певних методів досліджень.

Виконання досліджень передбачає розроблення варіантів вирішення поставленої гіпотези, налаштування лабораторного обладнання, підготовку реактивів та супутніх матеріалів, а також проведення власне досліджень. *Отримані результати* під час проведення досліджень повинні забезпечувати можливість порівняння та аналізу.

Разом із керівником студент *аналізує отримані дані*, готує висновки та *оформляє звіт* про проведену наукову роботу. Про результати наукових досліджень студенти доповідають на засіданні наукового гуртка, кафедри або наукової студентської конференції. Найкращі наукові роботи пропонуються на конкурси.

Орієнтовний перелік тем з науково-дослідної роботи

Тема 1. Визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст у ньому кількості МАФАНМ

Мета. Вивчити вплив різних температурних режимів зберігання на вміст у молоці питному кількості МАФАНМ.

Обладнання та матеріали

Проби молока питного, пробірки, штативи для пробірок, піпетки, мірні циліндри на 100 та 200 мл, стерильний фізрозчин натрію хлориду, чашки Петрі, середовище МПА, термостат, термометр.

Основні нормативні документи

ДСТУ IDF 100В-2003 Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30°C.

ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби сирого молока (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ 7357:2013).
2. Зберігати відібрані проби за температури + 4, + 6, +10 °С протягом сім діб.
3. Підготувати їх до дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003, ДСТУ 7357:2013)
4. Провести дослідження (згідно ДСТУ IDF 100В-2003, ДСТУ 7357:2013).
5. Дані занести в табл. 1.
6. Порівняти з даними нормативних документів (згідно ДСТУ 2661:2010)
7. Зробити висновок.

Таблиця 1

Результати визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст у ньому кількості МАФАНМ

№ проби	Температура зберігання, °С	Час зберігання, діб	Кількість МАФАНМ	Норма
1	+ 4	7		
2	+ 6	7		
3	+ 10	7		

Тема 2. Визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст у ньому БГКП

Мета. Вивчити вплив різних температурних режимів зберігання на вміст у молоці питному кількості БГКП.

Обладнання та матеріали

Проби молока питного, пробірки, штативи для пробірок, піпетки, мірні циліндри на 100 та 200 мл, стерильний фізрозчин натрію хлориду, чашки Петрі, середовище Кеслер, термостат, термометр.

Основні нормативні документи

ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби сирого молока (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ 7357:2013).
2. Зберігати відібрані проби за температури + 4, + 6, +10 °С протягом сім діб.
3. Підготувати їх до дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003, ДСТУ 7357:2013)
4. Провести дослідження (згідно ДСТУ IDF 100В-2003, ДСТУ 7357:2013).
5. Дані занести в табл. 2.
6. Порівняти з даними нормативних документів (згідно ДСТУ 2661:2010)
7. Зробити висновок.

Таблиця 2

Результати визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст у ньому кількості БГКП

№ проби	Температура зберігання, °С	Час зберігання, діб	Титр БГКП	Норма

1	+ 4	7		
2	+ 6	7		
3	+ 10	7		

Тема 3. Визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст у ньому психротрофних мікроорганізмів

Мета. Вивчити вплив різних температурних режимів зберігання на вміст у молоці питному психротрофних мікроорганізмів.

Обладнання та матеріали

Проби молока питного, пробірки, штативи для пробірок, піпетки, мірні циліндри на 100 та 200 мл, чашки Петрі з живильним середовищем (МПА, середовище згідно ДСТУ IDF101A:2003) термостат, термометр.

Основний нормативний документ

ДСТУ IDF101A:2003. Молоко визначення кількості психротрофних мікроорганізмів. Метод підрахування колоній за температури 6,5° С.

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби молока питного (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ IDF101A:2003).
2. Зберігати відібрані проби при температурі +4, +6, +10 °С протягом сім діб.
3. Підготувати їх до дослідження (згідно ДСТУ IDF 122C:2003)
4. Провести дослідження (згідно ДСТУ IDF101A:2003).
5. Дані занести в таблицю 3.
6. Зробити висновок.

Таблиця 3

Результати визначення впливу різних температур зберігання молока питного на вміст в ньому психротрофних мікроорганізмів

№ проби	Температура зберігання, °С	Час зберігання, діб	Кількість психротрофних мікроорганізмів	Норма
1	+ 4	7		
2	+ 6	7		
3	+ 10	7		

Тема 4. Порівняльна оцінка якості різних заквасок за мікроскопією

Мета. Оцінити якість різних заквасок за мікроскопією на наявність заквасочних культур та сторонньої мікрофлори.

Обладнання та матеріали

Різні види заквасок, предметні скельця, бактеріальні петлі або пастерівські піпетки, спиртівка, дистильована вода, метиленовий синій, мікроскоп, живильні середовища.

Основний нормативний документ

ДСТУ IDF 149А-2003. Культури молочнокислих заквасок. Визначення видового складу.

Порядок виконання роботи

1. Зробити мазки заквасок та провести їх мікроскопію та порівняти їх видовий склад відповідно до рецептури.
2. Заповнити таблицю 4.
3. Зробити висновки.

Таблиця 4

Результати мікроскопії різних заквасок

№ п\п	Назва закваски	Застосування закваски	Мікроорганізми, що входять до складу закваски	Схематичне зображення мікроскопічної картини
1				
2				
3				

Тема 5. Порівняльна характеристика різних заквасок за якісними показниками

Мета. Оцінити різні закваски за якісними показниками.

Обладнання та матеріали

Різні вид заквасок, предметні скельця, бактеріальні петлі або пастерівські піпетки, спиртівка, дистильована вода, метиленовий синій, мікроскоп, живильні середовища.

Основний нормативний документ

ДСТУ IDF 149А-2003. Культури молочнокислих заквасок. Визначення видового складу.

Порядок виконання роботи

1. Визначити кислотність різних заквасок.
2. Охарактеризувати органолептичні показники згустків сквашеного молока, різними заквасками (смак, запах, зовнішній вигляд).
3. Визначити наявність діацетилу .
4. Результати оформити у вигляді таблиці 5.
5. Зробити висновки.

Таблиця 5

Результати дослідження заквасок по якісним показникам.

№ п\п	Назва закваски	Застосування закваски	Кислотність	Наявність CO ₂	Органолептичні показники			Продуктування діацетилу
					смак	запах	зовнішній вигляд	
1								
2								
3								

Тема 6. Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів різних виробників

Мета. Виконати якісну оцінку складу мікрофлори кисломолочних продуктів різних виробників.

Обладнання та матеріали. Проби кефіру, ряжанки, йогурту, кисломолочного сиру та інших кисломолочних продуктів, предметні скельця, фізрозчин натрію хлориду, мікроскоп, пастерівські піпетки, набори фарб для мікроскопії.

Основні нормативні документи

ДСТУ 4540:2006 НАПОЇ АЦИДОФІЛЬНІ . Технічні вимоги

ДСТУ 4565:2006 РЯЖАНКА ТА ВАРЕНЕЦЬ. Технічні вимоги

ДСТУ 4539:2006 ПРОСТОКВАША. Технічні вимоги

ДСТУ 4418:2005 СМЕТАНА. Технічні вимоги

ДСТУ 4417:2005 КЕФІР. Технічні вимоги

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби кисломолочних продуктів (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ 7357:2013).

2. Зробити мазки та провести мікроскопію.
3. Дані занести в таблицю 6.
4. Зробити висновки (порівняти з нормативними документами).

Таблиця 6

Результати мікробіологічного дослідження кисломолочних продуктів.

№ п/п (назва продукту)	Виробник	Мікроорганізми в полі зору		Висновки
		заквасочні	сторонні	

Тема 7. Дослідження кількісного складу мікрофлори кисломолочних продуктів за різних температурних режимів зберігання

Мета. Оцінити кількісний склад мікрофлори кисломолочних продуктів за різних температурних режимів зберігання.

Обладнання та матеріали

Проби кефіру, ряжанки, йогурту, кисломолочного сиру та інших кисломолочних продуктів, фізрозчин натрію хлориду, мікроскоп, пастерівські піпетки, бактеріологічні петлі, чашки Петрі з середовищами (МПА, Ендо, Сабуро агар та інші) термостат, термометр.

Основні нормативні документи

ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.

ДСТУ 4540:2006 НАПОЇ АЦИДОФІЛЬНІ . Технічні вимоги.

ДСТУ 4565:2006 РЯЖАНКА ТА ВАРЕНЕЦЬ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4539:2006 ПРОСТОКВАША. Технічні вимоги.

ДСТУ 4418:2005 СМЕТАНА. Технічні вимоги.

ДСТУ 4417:2005 КЕФІР. Технічні вимоги.

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби кисломолочних продуктів (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ 7357:2013).

2. Підготувати їх до дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003 ДСТУ 7357:2013).
3. Провести дослідження (згідно ДСТУ 7357:2013).
4. Дані занести в таблицю 7.
5. Порівняти отримані дані з нормативними показниками.

Таблиця 7

Результати дослідження кількісного складу мікрофлори кисломолочних продуктів

№ п/п (назва продукту)	Кількість мікроорганізмів							
	МАФАнМ		БГКП		Дріжджі		Плісняві гриби	
	фактично	норма	фактично	норма	фактично	норма	фактично	норма

Тема 8. Вплив умов зберігання на мікрофлору вершкового масла

Мета. Виизначити мікробіологічні показники вершкового масла за різних режимів його зберігання.

Обладнання та матеріали

Проби масла , предметні скельця, фізрозчин натрію хлориду, мікроскоп, пастерівські піпетки, бактеріологічна петля, набори фарб для мікроскопії.

Основні нормативні документи

ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.

ДСТУ 4399:2005 Масло вершкове. Технічні вимоги.

Порядок виконання роботи

1. Відібрати проби масла (згідно ДСТУ ISO 707-2002, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ 7357:2013).
2. Зберігати проби масла за різних температурних режимів.
3. Зробити мазки з дослідних проб масла, пофарбувати та провести мікроскопію.

4. Підготувати дослідні проби масла до дослідження (згідно ДСТУ IDF 122С:2003, ДСТУ 7357:2013).
5. Провести дослідження (згідно ДСТУ 7357:2013).
6. Дані занести в таблицю 8.
7. Зробити висновки, порівняти результати з нормативними документами.

Таблиця 8

Результати мікробіологічного дослідження масла

№ п/п	Термін зберігання, діб	Температура зберігання, °С	Склад мікрофлори	Висновки

ГОТУВАННЯ РЕАКТИВІВ І СЕРЕДОВИЩ***Приготування робочого розчину метиленового синього для редуктазної проби з метиленовим синім***

Водний розчин метиленового блакитного готують з масовою концентрацією метиленового синього $0,005 \text{ г/см}^3$. Для цього $0,5 \text{ г}$ метиленового синього переносять в мірну колбу ємністю 100 см^3 і доводять до мітки прокип'яченою і охолодженою до $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ водою. Суміш ретельно перемішують до повного розчинення. Термін зберігання приготовленого розчину не більше 12 міс в банках, захищених від світла.

Для приготування розчину метиленового синього з масовою концентрацією метиленового синього $0,00015 \text{ г/см}^3$ беруть 6 см^3 розчину з масовою концентрацією $0,005 \text{ г/см}^3$ і змішують з 194 см^3 дистильованої води. Термін зберігання приготовленого розчину не більше 30 діб у холодильнику.

Приготування робочого розчину резазурину для редуктазної проби з резазурином

Натрієву сіль резазурину (100 мг) переносять у мірну колбу ємністю 200 см^3 і доводять до мітки прокип'яченою і охолодженою до $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ дистильованою водою. Суміш ретельно перемішують. Термін зберігання розчину не більше 30 діб за температури $8\text{--}10 \text{ }^\circ\text{C}$.

Робочий розчин резазурину готують розведенням указанного вище розчину прокип'яченою і охолодженою до $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ дистильованою водою у співвідношенні $1 : 2,5$ (наприклад, до 10 см^3 основного розчину додають 25 см^3 води). Масова частка резазурину в цьому розчині – $0,014 \%$. Термін зберігання робочого розчину резазурину не більше 3 діб за температури $0\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$. Розчин резазурину зберігають у ємностях, захищених від світла.

При використанні резазурину в таблетках (виробництва Німеччини) для виготовлення робочого розчину 1 таблетку розчиняють в 50 см^3 прокип'яченої і

охолодженої до 25 ± 2 °C дистильованої води. Масова частка резазурину в цьому розчині складає 0,01 %.

Приготування робочого розчину резазурину для визначення інгібувальних речовин у молоці з резазурином

Для приготування розчину 0,05 % концентрації, 100 мг резазурину розчиняють у 200 см³ прокип'яченої і охолодженої дистильованої води. Розчин зберігають у склянках з темного скла не більше 20 діб за температури 3–5 °C.

Колекційна тест-культура *Streptococcus thermophilus* для визначення інгібувальних речовин у молоці

Колекційну тест-культуру готують так: у пробірку з 10 см³ стерильного збираного молока вносять одну петлю культури і витримують у термостаті за температури 42–43 °C протягом 16–18 годин. Колекційну тест-культуру зберігають за температури 6–8 °C до 3 міс, пересіваючи через кожні 10–14 діб.

Робоча тест-культура *Streptococcus thermophilus* для визначення інгібувальних речовин у молоці

Робочу тест-культуру готують з колекційної в пробірках або пляшечках (залежно від необхідної кількості). У пробірку з 10 см³ стерильного збираного молока вносять одну петлю колекційної тест – культури *Streptococcus thermophilus* або в пляшечку з 100 см³ стерильного збираного молока вносять 1 см³ тієї ж культури і витримують у термостаті протягом 16–18 год за температури 42–43 °C.

Для проведення аналізу використовують одно-дводобову культуру за умови зберігання її у холодильнику за температури 6–8 °C. Напередодні використання робочу культуру перемішують інтенсивним струшуванням.

Приготування суміші для визначення інгібувальних речовин у молоці з метиленовим синім

Для приготування 3 % водного розчину пептону беруть 3 г пептону, переносять у колбу і доливають до 100 см³ дистильованою водою, стерилізують за температури (121±2) °C протягом 10 хв і зберігають у холодильнику за 6±2 °C протягом 30 діб. За відсутності автоклава допускається кип'ятіння розчину пептону 1–2 хв на слабкому вогні. Цей розчин повинен бути використаний протягом 7–8 год.

Для приготування 0,5 % водного розчину метиленового синього беруть 500 мг фарби і вносять у колбу, доливають 100 см³ дистильованої кип'яченої води і перемішують до повного розчинення. Розчин зберігають у щільно закритому посуді не більше 30 діб за температури 6±2 °C.

Під час приготування суміші для аналізу до 20 см³ 3 % водного розчину пептону додають 3,5 см³ одностодової культури термофільного стрептокока (піпетку заздалегідь потрібно старанно прополоскати цією сумішшю) і 0,1 см³ 0,5 % водного розчину метиленового синього. Суміш старанно перемішують її готують безпосередньо перед аналізом.

Приготування розчинників для десятикратних розведень

Готування розчину хлористого натрію

Склад:

натрій хлористий – 8,5 г;

вода дистильована – 1000 см³.

У (1000±0,5) см³ дистильованої води розчиняють (8,5±0,02) г хлористого натрію, розливають розчин у чисті пробірки по 10 см³, а в колби – по 98 см³ і стерилізують у стерилізаторі за температури 121±2 °C протягом 20 хв. Після стерилізування у пробірках повинно залишитись 9 см³, а в колбах – 90 см³ розчину хлористого натрію (кількість, яка необхідна для приготування розведень посівного матеріалу).

Готування концентрованого розчину фосфатного буферу

Склад:

калій фосфорнокислий однозаміщений – 34 г;

вода здистильована – 1000 см³.

У мірну колбу місткістю 100±0,50 см³ наливають 500 см³ дистильованої води, розчиняють в ній 34±0,02 г калію фосфорнокислого однозаміщеного. За допомогою рН-метра встановлюють рН 7,2 розчином гідроксиду натрію і додають дистильовану воду до 1000 см³.

Готування робочого розчину фосфатного буферу

1,25±0,01 см³ концентрованого фосфатного буфера, вносять у мірну колбу ємністю 1000 см³ дистильованою водою доводять об'єм до позначки, розливають у пробірки по 10 см³ і в колби по 98 см³, після чого стерилізують за температури 121±2 °С протягом 15 хв і використовують для готування розведень.

Готування пептонно-сольового розчину

Склад:

пептон - 1,0 г;

натрію хлорид - 8,5 г;

вода дистильована - 1000 см³.

Розчиняють компоненти у воді, за потреби нагріваючи до температури 70±0,5 °С, встановлюють рН так, щоб після стерилізування він становив 7,0±0,1 за температури 25 °С. Розливають у пробірки по 10 см³ і в колби по 98 см³, після чого стерилізують за 121±2 °С протягом 15хв.

Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів

Приготування м'ясо-пептонного агару (МПА)

Склад:

м'ясо-пептонний бульйон 1000 см³;

Агар мікробіологічний 20 г;

У 1000 см³ м'ясо-пептонного бульйону додають 20 г агару мікробіологічного. Кип'ятять за постійного перемішування до повного розчинення агару. Встановлюють рН середовища 7,0-7,2. Гарячий розчин фільтрують. Розливають середовище в кількостях по 100-150 см³ у колби. Стерилізують в автоклаві за температури 121±2 °С протягом 20 хв.

ТЕРМІНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК

Антибіотики – біологічно активні речовини, які утворюються мікроорганізмами, рослинами та іншими живими організмами.

Бактеріальний концентрат; бактерійний концентрат – заквашувальний препарат із вмістом життєздатних клітин не меншим 10^{10} КУО/г.

Бактеріальний препарат прямого внесення; бактерійний препарат прямого внесення – заквашувальний препарат, призначений для безпосереднього внесення у молоко або молочну суміш.

БКП – бактерії групи кишкових паличок.

Гетероферментативні бактерії – це бактерії, які поряд з молочною кислотою утворюють значну кількість газу та ароматичні речовини.

Гомоферментативні бактерії – це ті бактерії, які при розщепленні відповідних вуглеводів молока дають головним чином молочну кислоту із залишками інших продуктів розпаду.

Дріжджі (дріжджові гриби, аскоміцети) – це одноклітинні, нерухливі мікроорганізми, що мають різну форму (округлу овальну, еліпсоподібну, рідше циліндричну та лимоноподібну).

Закваска; заквашувальний препарат – одно- або багатокомпонентні комбінації мікроорганізмів, що їх використовують під час виробництва кисломолочних продуктів. Уміст бактеріальних клітин не менший 10^7 КУО/мл (г) для рідких різновидів та не менших 10^8 КУО/г – для сухих.

Індекс – це кількість патогенних мікроорганізмів, яка встановлена в певному об'ємі чи кількості молока та молочних продуктах. Для молока та рідких молочних продуктів в 1 літрі, в інших молочних продуктах – в 1 г.

КМАФАнМ – кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

КУО (кількість колонієутворюючих одиниць) – це одиниця виміру кількості мікроорганізмів, яку визначають за кількістю колоній, що утворилися на певному середовищі за відповідних умов.

Мікробіологічна лабораторія – лабораторія, де проводять мікробіологічні дослідження.

Мікробне забруднення молока – це забруднення молока мікроорганізмами, що потрапили туди випадково.

Мікроскоп – це оптичний прилад для вивчення мікроскопічних об'єктів.

Плісняві гриби (нитчасті гриби) – це безхлорофільні мікроорганізми, які живуть на поверхні субстратів, основою вегетативного тіла яких є гіфи, сплетіння яких утворюють міцелій.

Об'єднана проба – це проба, що складається з декількох точкових проб.

Проба для контролювання – визначена кількість продукту, що відібрана для контролювання.

Титр – це найменший об'єм (в мілілітрах) чи маса (в грамах) молока чи молочних продуктів в якому встановлена хоча б одна одиниця патогенного мікроорганізму.

Точкова проба – це проба, яку відбирають одноразово з визначеної частини продукту.

НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

ДСТУ 1277-92 СИР ЛИМАНСЬКИЙ РОЗСОЛЬНИЙ. Технічні умови. (На заміну РСТ УСССР 1277-81).

ДСТУ 2212:2003 Молочна промисловість. ВИРОБНИЦТВО МОЛОКА ТА КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ. Терміни та визначення понять.

ДСТУ 2636 – 94 ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ. Терміни та визначення.

ДСТУ 2661 – 2010 МОЛОКО КОРОВ'ЯЧЕ ПИТНЕ. Загальні технічні вимоги.

ДСТУ 3662 – 2018 МОЛОКО-СИРОВИНА КОРОВ'ЯЧЕ. Загальні технічні вимоги.

ДСТУ 4272:2003 Консерви молочні МОЛОКО НЕЗБИРАНЕ ЗГУЩЕНЕ З ЦУКРОМ. Технічні умови.

ДСТУ 4273:2003 МОЛОКО ТА ВЕРШКИ СУХІ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4275:2003 Консерви молочні. МОЛОКО ЗГУЩЕНЕ З ЦУКРОМ ТА КАКАО. Технічні умови (зі скасуванням ГОСТ 718-84).

ДСТУ 4324:2004 Молочна промисловість ВИРОБНИЦТВО МОЛОЧНИХ КОНСЕРВІВ. Терміни та визначення понять.

ДСТУ 4343:2004 ЙОГУРТИ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4395:2005 СИРИ МЯКІ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4399:2005 МАСЛО ВЕРШКОВЕ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4404:2005 Консерви молочні МОЛОКО ЗГУЩЕНЕ В БАНКАХ. Загальні технічні вимоги.

ДСТУ 4417:2005 КЕФІР. Технічні вимоги.

ДСТУ 4418:2005 СМЕТАНА. Технічні вимоги.

ДСТУ 4420:2005 Молочна промисловість. Виробництво сиру. Терміни та визначення понять.

ДСТУ 4421:2005 СИРИ ТВЕРДІ (український асортимент). Технічні умови.

ДСТУ 4503:2005 ВИРОБИ СИРКОВІ. Загальні технічні вимоги.

ДСТУ 4539:2006 ПРОСТОКВАША. Технічні вимоги.

ДСТУ 4540:2006 НАПОЇ АЦИДОФІЛЬНІ . Технічні вимоги.

ДСТУ 4541:2006 Продукти молочні для дитячого харчування. ВЕРШКИ СТЕРИЛІЗОВАНІ ДЛЯ ДІТЕЙ. Технічні умови

ДСТУ 4552:2006 СИРОВАТКА МОЛОЧНА СУХА. Технічні вимоги.

ДСТУ 4553:2006 СИРОВАТКА МОЛОЧНА ЗГУЩЕНА. Технічні умови

ДСТУ 4554:2006 СИР КИСЛОМОЛОЧНИЙ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4555:2006 МАСЛЯНКА СУХА. Технічні вимоги.

ДСТУ 4556:2006 МОЛОКО СУХЕ ШВИДКОРОЗЧИННЕ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4558:2006 СИР ПОШЕХОНСЬКИЙ . Технічні вимоги.

ДСТУ 4565:2006 РЯЖАНКА ТА ВАРЕНЕЦЬ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4592:2006 МАСЛО ВЕРШКОВЕ З НАПОВНЮВАЧАМИ. Технічні вимоги.

ДСТУ 4635:2006 СИРИ ПЛАВЛЕНІ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4669:2006 СИРИ НАПВТВЕРДІ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4733:2007 МОРОЗИВО НА МОЛОЧНІЙ ОСНОВІ. Загальні технічні умови.

ДСТУ 4734:2007 Морозиво плодово-ягідне, ароматичне, щербет, лід. Загальні технічні умови

ДСТУ 4735:2007 Морозиво з комбінованим складом сировини. Загальні технічні умови

ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.

ДСТУ EN 12824 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*.

ДСТУ IDF 73A – 2003 МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Підрахування кількості коліформ. Метод підрахування колоній і метод визначання найімовірнішого числа (НІЧ) за температури 30°C (IDF 73A:1985, IDT).

ДСТУ IDF 93A – 2003 МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Визначення *Salmonella*.

ДСТУ IDF 100В – 2003 МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30°C.

ДСТУ IDF 101А – 2003. МОЛОКО. Визначення кількості психротрофних мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 6,5°C.

ДСТУ IDF 122С:2003. МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Готування проб і розведень для мікробіологічного дослідження.

ДСТУ IDF 149А:2003 КУЛЬТУРИ МОЛОЧНОКИСЛИХ ЗАКВАСОК. Визначення видового складу.

ДСТУ ISO 707 – 2002 МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Настанови з відбирання проб.

ДСТУ ISO 5538:2004 МОЛОКО І МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Відбирання проб. Контроль за якісними ознаками.

ДСТУ ISO 6887-1:2003 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного дослідження. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень.

ДСТУ ISO 6888-1:2003 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Горизонтальний метод підрахування коагулазо-позитивних стафілококів (*Staphylococcus aureus* та інших видів) . Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард – Паркера.

ДСТУ ISO 6888-2:2003 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Горизонтальний метод підрахування коагулазо-позитивних стафілококів (*Staphylococcus aureus* та інших видів) . Частина 1. Метод з використанням фібриногену плазми крові кролика для агарового середовища.

ДСТУ ISO 8553 – 2005 (IDF 131:2004) МОЛОКО. Визначення кількості мікроорганізмів чашковим методом із застосуванням петлі за температури 30° С.

ДСТУ ISO 11290 -1 – 2003 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення.

ДСТУ ISO 11290 -2 – 2003 МІКРОБІОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 2. Метод підрахування.

ДСТУ ISO 13969:2005 (IDF 183:2003) МОЛОКО ТА МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Настанови щодо стандартизованого описування випробування інгібіторів мікроорганізмів.

ДСТУ ISO 15174:2005 (IDF 176:2002) МОЛОКО ТА МОЛОЧНІ ПРОДУКТИ. Визначення загальної молокозсідальної активності коагулянтів мікробного походження

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Грек О.В., Скорченко Т.А. Технологія сиру кисломолочного та сиркових виробів. Навч. посібн. – К.: НУХТ, 2009 – 235 с.
2. Грегірчак Н. М. Мікробіологія харчових виробництв: Лабораторний практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.
3. Дідух Н. А., Чагаровський О. П., Лисогор Т. А. Заквашувальні композиції для виробництва молочних продуктів функціонального призначення. – Одеса: Видавництво "Поліграф", 2008. – 236 с.
4. Кравців Р. Й. Молочна справа: Підручник [для студ. III – IV рівн. акред.] / Р. Й. Кравців, В. І. Хоменко, Я. Ю. Островський. – К.: Вища школа, 1998. – 279 с.
5. Машкін М. І. Технологія виробництва молока і молочних продуктів / М. І. Машкін, Н. М. Париш – К.: “Вища освіта”, 2006. – 351 с.
6. Мікробіологія молока і молочних продуктів з основами ветеринарно-санітарної експертизи: навч. посібник. [За ред. В. В. Касянчук] – Сума: Університетська книга, 2010. – 320 с.
7. Мікробіологія молока і молочних продуктів. Практикум : навч. посіб. [для студентів ВНЗ III – IV рівня акредитації за напрямками підготовки “Харчові технології та інженерія ” і “Ветеринарна медицина”] / [Бергілевич О.М., Касянчук В.В., Власенко І. В., Кухтин М. Д., Ковальчук Р. Л., Остап’юк М. П.; за ред. д. вет. н., проф. В.В. Касянчук]. – Суми : Університетська книга, 2010. – 205с.
8. Мікробіологія молока та молочних продуктів: підручник / Скибіцький В.Г., Власенко В.В., Власенко І.Г., Ібатулліна Ф.Ж., Козловська Г.В., Соломон А.М, Мельник М.В./- Вінниця: «Едельвейс і К», 2008. - 412с.
9. Мікробіологія харчових виробництв [Текст] : навч. посіб. / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова та ін. - Херсон : Видавець ФОП Грінь Д.С., 2016. - 478 с
10. Старовойтова А.А. Мікробіологія молока і молочних продуктів [Електронний ресурс] / А.А. Старовойтова. - Біла Церква: Технологі-

економічний коледж Білоцерківського національного аграрного університету, 2017. - 153 с.

11. Соломон, А. М., Казмірук, Н. М., & Тузова, С. Д. (2020). Мікробіологія харчових виробництв. *навч. посіб. для студ. напряму підготовки «Харчові технології».*-Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020.-312 с.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
Правила та техніка безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії чи на студентських (навчальних) практикумах з мікробіології	5
Порядок виконання та оформлення протоколу лабораторно-практичних занять	7
Лабораторно-практичне заняття №1. Організація роботи в мікробіологічній лабораторії на підприємствах молочної промисловості.....	10
Лабораторно-практичне заняття №2. Якісна оцінка мікрофлори молока і молочних продуктів	19
Лабораторно-практичне заняття № 3. Кількісна оцінка мікрофлори молока і молочних продуктів	30
Лабораторно-практичне заняття №4. Вивчення морфологічної будови та властивостей молочнокислих бактерії.....	34
Лабораторно-практичне заняття №5. Вивчення морфологічної будови та властивостей мікроорганізмів, що викликають псування молока і молочних продуктів	42
Лабораторно-практичне заняття №6. Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників харчових токсикозів, що передаються через молоко та молочні продукти	48
Лабораторно-практичне заняття №7. Вивчення морфологічної будови та властивостей збудників токсикоінфекцій, що передаються через молоко та молочні продукти	53
Лабораторно-практичне заняття №8. Визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини за редуктазними методами.....	59
Лабораторно-практичне заняття №9. Визначення бактеріальної забрудненості молока-сировини чашковим методом.....	66
Лабораторно-практичне заняття №10. Визначення окремих груп мікроорганізмів у молоці-сировині й молочних продуктах	70
Лабораторно-практичне заняття №11. Визначення інгібувальних	

речовин у молоці.....	74
Лабораторно-практичне заняття №12. Мікробіологічне дослідження питних видів молока та вершків.....	78
Лабораторно-практичне заняття №13. Пастеризація і методи її контролю.....	81
Лабораторно-практичне заняття №14. Мікробіологічний контроль якості заквасок.....	86
Лабораторно-практичне заняття №15. Мікробіологічне дослідження кисломолочних продуктів.....	94
Лабораторно-практичне заняття №16. Мікробіологічне дослідження масла.....	103
Лабораторно-практичне заняття №17. Мікробіологічне дослідження сирів.....	107
Лабораторно-практичне заняття №18. Мікробіологічне дослідження згущеного, сухого молока і морозива	111
Лабораторно-практичне заняття №19. Класифікація, вимоги та приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів при дослідженні молока і молочних продуктів.	115
Лабораторно-практичне заняття №20. Метод виготовлення препаратів для мікроскопії та методи їх фарбування. Методи фарбування спор і капсул.....	122
Лабораторно-практичне заняття №21. Визначення якості та придатності молока до сировиробництва за сичужною, бродильною та сичужно-бродильною пробами.....	128
Науково-дослідна робота з дисципліни Мікробіологія молока і молочних продуктів.....	132
Орієнтовний перелік тем з науково-дослідної роботи.....	134
Готування реактивів і середовищ.....	142
Термінологічний словник.....	147
Нормативні посилання.....	149
Список використаної літератури.....	153
	158

Навчально-методична література

**КУХТИН Микола Дмитрович,
КРАВЧЕНЮК Христина Юріївна**

**Лабораторний практикум з мікробіології
молока і молочних продуктів**

Навчальний посібник

Комп'ютерне макетування та верстка

Формат 60x90/16. Обл. вид. арк. 5,80. Тираж __ прим.

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя
46001, м. Тернопіль, вул. Руська, 56.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4226 від 08.12.11.