

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

МІКРОБІОЛОГІЯ ЖИРІВ ТА ЖИРОЗАМІННИКІВ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

**ДО ВИВЧЕННЯ ДИСЦИПЛІНИ ТА ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ**

для студентів спеціальності 6.091700 "Технологія жирів та жирозамінників" (ТЖ-IV) напрямку 0917 "Харчова технологія та інженерія" денної форми навчання

Всі цитати, цифровий та фактичний матеріал, бібліографічні відомості перевірені.
Написання одиниць відповідає стандартам

СХВАЛЕНО
на засіданні кафедри біотехнології мікробного синтезу
Протокол № від р.

Підпис(и) автора(ів) _____

“ _____ ” _____ 200 _____ р.

Підпис завідувача кафедри _____

“ _____ ” _____ 200 _____ р.

Підпис рецензента _____

“ _____ ” _____ 200 _____ р.

МІКРОБІОЛОГІЯ ЖИРІВ ТА ЖИРОЗАМІННИКІВ : Методичні вказівки до вивчення дисципліни та виконання лабораторних робіт для студентів спец. 6.091700 ""Технологія жирів та жирозамінників"" напряму 0917 "Харчова технологія та інженерія" денної форми навчання / Уклад.: А.А. Воронцов, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2006 – 54 с.

Укладачі: **А.А. Воронцов**, канд. техн. наук
С.В. Ігнатенко

Рецензент: **О.А. Ігнатова**, канд. техн. наук

Відповідальний за випуск: **Т.П. Пирог** д-р біол. наук

ПРАВИЛА ПОВЕДІНКИ В ЛАБОРАТОРІЇ.

В лабораторії студент повинен постійно перебувати в спецодязі (халаті).

На робочий стіл дозволяється класти лише ті предмети, які необхідні для виконання лабораторної роботи. Особисті речі студента, під час заняття, повинні зберігатися у спеціально відведеній для цього шафі.

Під час занять, пересуватися по лабораторії без дозволу викладача забороняється.

Роботу з кислотами, лугами, леткими речовинами необхідно проводити під витяжною шафою, одягаючи захисний одяг (гумовий фартух та рукавиці).

В лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

Виносити за межі лабораторії будь-які прилади, матеріали та обладнання суворо забороняється.

На робочому місці необхідно постійно підтримувати чистоту.

На кожне заняття студент повинен з'являтися з підготовленим протоколом та чітко знати хід виконуваної роботи.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

Мікробіологічний аналіз сировини для олійно-жирових виробництв.

ПЛАН:

1. Мікробіологічний аналіз тваринної сировини (яловичого, свиного, кісткового жирів) для олійно-жирових виробництв.
2. Мікробіологічний аналіз рослинної сировини (насіння соняшників, сої, кукурудзи та шроту) для олійно-жирових виробництв.

Мета роботи на основі отриманих результатів зробити висновок про відповідність досліджуваних сировини санітарним вимогам. Опанувати методики мікробіологічного аналізу сировини для) для олійно-жирових виробництв.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, комплекти предметних і покривних скелець, спиртівки, сірники, мікробіологічні петлі та голки, стерильні піпетки, шпателі Дригальського, стерильні скальпелі, пестики, ступки; поживні середовища (на підгрупу з двох студентів) – 2 чашки Петрі з середовищем МПА, 1 чашка Петрі з середовищем Ендо; стерильний пісок, стерильна вода; зразки сировини для ковбасного виробництва (фарш, перець червоний та чорний, кардамон, сіль та ін.) ; технічні терези і набір важків.

Основні відомості

Мікробіологічний аналіз сировини для олійно-жирових виробництв.

Сировиною є тваринні, рафінована та дезодорована олія, саломаси, яєчні продукти, молоко коров'яче питне, молоко сухе, вершки коров'ячі та домішки, що забезпечують органолептичні характеристики готового продукту. До них відносять барвники, цукор, гірчичний порошок, кисломолочні закваски, ізоляти, концентрати та гідролізати рослинних білків та інші компоненти згідно рецептури.

Відбір проб на мікробіологічний аналіз проводять один раз на 30 днів від кожного виду продукту, а спецій – середню пробу від кожної партії.

Жири та олії, які мають вміст вологи 0,1 – 0,3%, мікробіологічному аналізу не піддаються.

Відбір зразків (маса 50-100 г) проводять в асептичних умовах. Кожен зразок окремо запаковують в стерильний пергаментний папір (вміщують в стерильний посуд), підписують і направляють в бактеріологічну лабораторію.

В ході мікробіологічних досліджень визначають загальне мікробне число в 1 г проби, характер мікрофлори (БГКП, дріжджі, мікромицети).

Визначення загального мікробного числа. Відбирають наважку сировини (1 г) і з неї готують проби для аналізу ваговим методом. В стерильну чашку Петрі піпеткою вносять 0,1 мл отриманої суспензії (її розведення), відбираючи пробу з верхнього шару. Чашку заливають поживним середовищем (МПА). Інкубацію чашок проводять в термостаті протягом 18-24 годин при 30°C. Рахують колонії і визначають кількості мікроорганізмів в 1 г продукту.

Основні відомості

Класифікація поживних середовищ

В лабораторній практиці для вивчення фізіологічних та біохімічних властивостей мікроорганізмів використовують різноманітні поживні середовища. Кожне з них повинно містити достатню кількість необхідних для росту мікроорганізмів сполук, мати оптимальне для даного виду мікроорганізмів рН та бути стерильним.

Будь-яке поживне середовище повинно містити: органогенні елементи - вуглець, водень, кисень, азот; зольні елементи – фосфор, сірка, калій, кальцій, магній, залізо та мікроелементи – молібден, цинк, мідь та ін.

Для розвитку деяких мікроорганізмів (ауксотрофів) необхідною умовою є наявність вітамінів або їх складових частин (Ко-ферментів) в складі поживного середовища.

За складом поживні середовища поділяють на **природні (натуральні), штучні (синтетичні) та напівсинтетичні.**

Натуральні середовища складаються з продуктів тваринного та рослинного походження (молоко, жовч, відвари та витяжки з м'яса, печінки; капустиане середовище, пивне сусло та ін). Напівсинтетичні середовища виготовляються на основі природних і містять штучні домішки, що поліпшують їх характеристики. Штучні або синтетичні середовища містять в своєму складі визначені органічні сполуки та неорганічні солі в точно зазначених концентраціях. За набором компонентів синтетичні середовища можуть бути складними та простими.

За консистенцією поживні середовища поділяються на **щільні, рідкі та сипучі**.

Для одержання щільних середовищ до субстратів додають ущільнювачі. До таких сполук відносять агар-агар (додають в кількості 1,5 - 4%) чи желатину (додають в кількості 5-25%). Подрібнені ущільнювачі вносять в рідке поживне середовище та піддають термічній обробці.

Щільні середовища використовують для аналізу мікрофлори різних об'єктів (зокрема повітря та води), виділення чистих культур мікроорганізмів, зберігання та транспортування чистих культур та ін. Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси чи продуктів обміну, дослідження фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів. Сипучі – для зберігання деяких видів мікроорганізмів та їх спор, приготування маточного та посівного матеріалу.

За призначенням поживні середовища поділяються на **універсальні, елективні (вибіркові) та диференціально-діагностичні**.

До універсальних середовищ відносять: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонну желатину (МПЖ), м'ясну воду, м'ясопечінково-пептонний бульйон (МППБ). На таких середовищах росте більшість мікроорганізмів.

Для вирощування певних видів мікроорганізмів, які на універсальних середовищах ростуть погано або зовсім не ростуть, застосовують елек-

тивні середовища. До них відносять МПБ з кров'яною сироваткою, середовище Ендо, середовище Кітта-Тароцці та ін.

Диференціально-діагностичні середовища дозволяють розрізнити окремі види мікроорганізмів за фізіологічними ознаками. До таких середовищ відносять: середовища Андрере, Дригальського, "строкатий" ряд Гіса та ін. Зазначені середовища використовують переважно при вивченні біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Диференціально-діагностичні середовища, залежно від складу, можна розділити на 4 групи:

1. Середовища, які містять білкові речовини (желатину, молоко, сироватку крові у згорнутому вигляді, курячі білки) і використовуються для визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.

2. Середовища з цукрами, для визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів.

3. Середовища з хімічними речовинами, які змінюють свої властивості під дією окисно-відновних ферментів.

4. Середовища, які містять індиферентні хімічні складові, що є джерелом живлення одних видів мікроорганізмів і не асимілюються іншими видами.

Приготування універсальних поживних середовищ

При приготуванні деяких поживних середовищ за основу беруть **м'ясну воду** з кислою реакцією. Приготування м'ясної води: з яловичини або кінського м'яса видаляють кістки та жир, подрібнюють м'ясо на м'ясорубці, заливають подвійною кількістю холодної водопровідної води та настоюють 24 години. Потім суміш кип'ятять протягом 30 хв. при постійному перемішуванні. Отриманий бульйон охолоджують та фільтрують. Фільтрат розливають в скляні колби і 20 хв. стерилізують в автоклаві при 120 °С (0,1 МПа).

Приготування МПБ. В м'ясній воді розчиняють 1% пептону і 0,5% хімічно чистого хлориду натрію та визначають рН середовища. Для більшості бактерій значення рН середовища повинно складати 7,0-7,4; для дріжджів і мікроміцетів - 4,5-5,5. При необхідності рН середовища доводять до необхідного значення 1н розчином NaOH або 10% розчином вуглекислої соди з урахуванням того, що при стерилізації значення рН знижується на 0,1-0,2. Після цього, середовище 30 хв. кип'ятять, після охолодження фільтрують, розливають в чисті пробірки або колби, закривають їх ватними пробками та 20 хв. стерилізують в автоклаві при 120 °С.

Приготування МПА. До МПБ (рН 7,4) додають від 2 до 4% подрібненого агару та нагрівають суспензію на слабкому полум'ї до повного розчинення агару. Встановлюють рН розчину на рівні 7,2-7,4, кип'ятять 10-15 хв., фільтрують, розливають в колби або пробірки та стерилізують в автоклаві при 120 °С протягом 20 хв.

Якщо в МПА утворюються пластівці, то середовище розплавляють, охолоджують до 55-60 °С та додають яєчний білок (1 білок на 1 л середовища), розмішаний в 30 мл води. Середовище інтенсивно перемішують і 1 годину витримують в апараті Коха при 100 °С. Гаряче середовище швидко фільтрують, розливають в пробірки чи колби і стерилізують в автоклаві при 120 °С протягом 10 хв.

МПА є основним середовищем для проведення мікробіологічних аналізів.

Приготування МПЖ. До МПБ додають 10-15% подрібненої желатини, залишають на декілька годин для набухання, нагрівають суспензію на слабкому полум'ї до повного розчинення желатини. Встановлюють рН середовища на рівні 7,2. Освітлюють середовище яєчним білком, після чого кип'ятять в апараті Коха протягом 20-30 хв. Після кип'ятіння перевіряють рН, фільтрують, розливають в колби і кип'ятять 3 рази по 20 хв.

три доби поспіль. Між прогріваннями поживне середовище витримують при кімнатній температурі (або в термостаті при 30°C) для проростання спорових форм мікроорганізмів.

Методи стерилізації поживних середовищ, посуду та інструментів.

Необхідно зазначити, що процеси культивування та зберігання мікроорганізмів проводять на стерильних середовищах з дотриманням правил асептики.

Повне знищення вегетативних клітин мікроорганізмів та їх спор в будь-якому матеріалі називають **стерилізацією**.

Існує декілька методів стерилізації: прожарювання в полум'ї (фламбування); стерилізація сухим жаром, насиченою парою під тиском (автоклавування), текучою парою; фільтрування та ін. Вибір способу стерилізації залежить від виду та властивостей стерилізуємого об'єкту.

Прожарювання в полум'ї. Цей метод використовують для стерилізації металевих інструментів (мікробіологічні петлі, голки, ланцети, пінцети) безпосередньо перед використанням. При прожарюванні мікроорганізми згорають в полум'ї пальника або спиртівки.

Стерилізація сухим жаром. Цей метод використовують для стерилізації скляного посуду в сушильних шафах. Тривалість стерилізації: при 150°C – 2 год., при 160°C – 1 год., при 180°C – 30 хв. Посуд перед стерилізацією ретельно миють та висушують. Пробірки та колби закривають ватними пробками та паперовими ковпачками. Чашки Петрі та піпетки загортають в папір.

Стерилізація насиченою парою. Стерилізацію скляного посуду, інструментів, поживних середовищ здійснюють головним чином в автоклавах насиченою парою під тиском 0,05 – 0,2 МПа. Автоклав представляє

собою металевий котел, який герметично закривається кришкою. Посуд або поживні середовища, які піддають стерилізації, завантажують у автоклав. Паралельно заповнюють водопарову камеру приладу дистильованою водою до необхідного рівня, який контролюється за водомірним склом. Автоклав закривають кришкою та відкривають кран для виходу пари і повітря (тримають відкритим доти, доки з нього не піде суха пара), включають автоклав в електричну мережу та починають прогрів. Пара підвищує в автоклаві тиск, а тим самим й температуру. Час стерилізації відраховують з моменту встановлення необхідного тиску. При вичерпанні часу стерилізації автоклав вимикають з електричної мережі та чекають моменту, коли тиск по манометру впаде до нуля. Після цього відкривають спускний кран, обережно випускають з автоклаву залишок пари та відкривають кришку.

Температура та тривалість автоклавування визначаються складом поживних середовищ та їх рН.

Стерилізація текучою парою (дробна стерилізація). Дробну стерилізацію поживних середовищ проводять в апараті Коха або в автоклаві з закритою, але незагвинченою кришкою. Апарат Коха – це металевий циліндр (стілки якого вкриті теплоізоляцією) в середину якого встановлено сітчасту підставку на ніжках. В апарат заливають воду з таким розрахунком, щоб рівень води був нижчим за рівень підставки.

Середовища встановлюють на підставку і починають нагрів води в апараті. Температура пари в процесі стерилізації складає біля 90-100°C. Нагрів середовища здійснюють три рази по 30-40 хв. три доби поспіль. В перервах між нагріваннями середовище витримують при кімнатній температурі (або в термостаті при 30°C) для проростання спорових форм мікроорганізмів.

Даний метод застосовують для стерилізації поживних середовищ, властивості та склад яких змінюються під дією температур вищих за 100°C.

Стерилізацію фільтруванням (холодну стерилізацію) застосовують, якщо властивості середовищ змінюються навіть при незначному нагріванні. Фільтруванню піддають середовища з білками, антибіотиками, вітамінами, леткими речовинами та ін. Для стерилізації фільтруванням використовують спеціальні фільтри з діаметрами пор меншими за 1 мкм (азбестові фільтри Зейтца), свічки Шамберлана та Беркефельда, мембранні ультрафільтри.

Дезинфекція – знешкодження мікроорганізмів за допомогою сильнодіючих хімічних речовин, які називаються антисептиками. До них відносять неорганічні (кислоти, луги, солі), органічні (органічні кислоти, спирти, альдегіди) та інші речовини.

В лабораторіях антисептиками обробляють робочі столи (70-80% етиловий спирт, 2% розчин перекису водню). На виробництві в якості антисептиків використовують розчини сполук хлору, формалін, луги.

Методи кількісного обліку мікроорганізмів

Прямий підрахунок клітин мікроорганізмів проводять в камерах Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера та ін. В них проводять підрахунок клітин дріжджів, спор, клітин деяких бактерій. Камера Горяєва представляє собою товсте предметне скло, розділене чотирма прорізами на три поперечно розташовані площадки. Центральна площадка поздовжнім прорізом ділиться на дві рівні частини. На кожній половині вигравірувана сітка. Бокові площадки розташовані на 0,1 мм вище центральної та використовуються для притирання покривного скла.

Сітка камери Горяєва розділена на 225 великих квадратів (15 рядів по 15 квадратів в кожному). Площа великого квадрата розділена на 16 малих квадратів.

В процесі підрахунку на поверхню сіток наносять невеликі крапельки проби (чи її розведення). Для того щоб об'єм проби точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притирають до її бокових площадок до появи так званих Ньютонових кілець. Рідина під покривним склом повинна розподілитися по всій сітці рівномірно, без пухирців повітря. Підрахунок клітин проводять через 3-5 хв. після заповнення камери, щоб клітини осіли та знаходилися в одній площині. Рухомі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку необхідно вбити нагріванням або внесенням 0,5% формаліну.

Камеру розміщують на предметному столику мікроскопа та роздивляються спочатку з об'єктивом 8×, потім 40×. Клітини підраховують в 5 (10) великих квадратах по діагоналі або по кутах сітки і в центрі. Враховують всі клітини, що знаходяться всередині квадрату або на межі обмежувальних ліній квадрата (якщо клітини більш ніж наполовину знаходяться всередині квадрата). Клітини, що пересікаються обмежувальними лініями квадрата навпіл, рахують тільки на двох з чотирьох сторін квадрата, а клітини, що розташовуються за межами квадрата не враховують.

Кількість клітин в 1 мл:

$$x = \left(\frac{a \cdot 4000 \cdot b}{c} \right) \cdot 1000 ,$$

де а – сума клітин, підрахована в 5 (чи 10) великих квадратах сітки; b – розведення вихідного субстрату; с – кількість малих квадратів, в яких проводили підрахунок.

Визначення кількості клітин методом посіву на щільні середовища. Метод знайшов широке застосування для встановлення кількості мікроорганізмів в природних та промислових субстратах. Метод ґрунтується на тому, що кожна жива клітина при висіві на щільне середовище утворює колонію. Виконання аналізу складається з 3 етапів.

Приготування десятикратних розведень в стерильній водопровідній воді чи фізіологічному розчині (0,5% розчин NaCl).

Посів на щільні середовища. Кожне розведення висівають на 2-4 паралельні чашки Петрі поверхневим чи глибинним способом. При поверхневому посіві в стерильні чашки спочатку вносять по 15-20 мл розплавленого агаризованого середовища. Залиті чашки рекомендується витримати 1-2 доби в термостаті при 30 °С для підсихання середовища та перевірки на стерильність. Для посіву використовують стерильні мірні піпетки, якими переносять в чашки визначений об'єм суспензії (0,05; 0,1; 0,2 мл але не більше 0,5 мл) відповідного розведення. Внесений об'єм стерильним шпателем рівномірно розподіляють по всій поверхні щільного середовища. Висів проводять не менш ніж з трьох послідовних розведень.

При глибинному посіві, по 1 мл відповідного розведення стерильною піпеткою вносять в 2-4 паралельні стерильні чашки Петрі, заливають їх розплавленим (попередньо охолодженим до 40-45 °С) агаризованим середовищем. Кришку чашки закривають і легкими обертальними рухами ретельно перемішують середовище з суспензією мікроорганізмів. Засіяні чашки залишають в горизонтальному положенні для застигання середовища. Чашки перевертають та переносять в термостат де підтримується температура сприятлива для вирощування даного виду мікроорганізмів.

Підрахунок колоній. Різні групи мікроорганізмів володіють різною швидкістю росту. Тому колонії бактерій підраховують через 2-3 доби, грибів та дріжджів – через 5-7 діб, актиноміцетів – через 7-15 діб. Для підрахунку вибирають чашки, в яких колонії є ізольованими, а їх кількість знаходиться в межах 50-300. При великій кількості колоній дно чашки ділять на 4, 8 або 16 однакових за площею секторів, підраховують кількість колоній в кожному секторі, після чого результати підсумовують. Можна підраховувати число колоній в декількох секторах, але не менш ніж на $\frac{1}{3}$ площі середовища, визначити середнє арифметичне число колоній на них та помножити на загальну кількість секторів чашки. Підрахунок колоній також проводять на спеціальних напівавтоматичних лічильниках.

Результати паралельних висівів підсумовують та визначають середнє число колоній, які вирости при висіві розведення. Якщо середнє число колоній є меншим за 10, ці результати для визначення кількості клітин в вихідному матеріалі не враховують. Кількість клітин мікроорганізмів в 1 г (мл) досліджуваної проби розраховують за формулою:

$$x = \frac{a \cdot n}{c \cdot v},$$

де a – середнє число колоній при висіві розведення; n – розведення вихідного матеріалу; c – наважка препарату, г (мл); v – об'єм суспензії, взятої для посіву, мл.

Визначення видової належності мікроорганізмів

При визначенні мікрофлори олійно - жирових виробів іноді виникає необхідність в ідентифікації виділених культур. Ідентифікацію мікроорганізмів (розглянемо на прикладі бактерій) проводять за їх культуральними, фізіологічними та морфологічними ознаками.

Морфологічні ознаки.

1. Форма клітин. В основному бактерії мають кулеподібну, паличковидну або звивисту форми. Інколи палички вигнуті. В старих культурах частіше, ніж в молодих, знаходяться палички з заокругленими або загостреними кінцями.

2. Характер розташування клітин. Кулеподібні бактерії можуть бути розташовані окремо (монококи), з'єднані по дві (диплококи), по чотири (тетракоки), в ланцюжки (стрептококи), в пакети (сарцини), гроноподібні накопичення (стафілококи). Паличковидні бактерії розташовуються поодинокі, з'єднані попарно або утворюють ланцюжки.

3. Розмір клітин.

4. Спороутворення. Спори можуть утворюватись в центрі клітини, не змінюючи її форми – бацили. У деяких бактерій діаметр клітини менший за діаметр спори – клостридії. Коли спора локалізується термінально, паличка приймає форму тенісної ракетки або барабанної палички – плектридії.

5. Рухливість бактерій визначають в препаратах “розчавлена крапля” і “вісяча крапля”.

6. Здатність до утворення капсул. Наявність капсул встановлюють в незабарвлених та забарвлених препаратах. На відміну від безкапсульних бактерій, капсульні мікроорганізми розташовуються на певній відстані один від одного, так як капсули заважають їх більш щільному розташуванню. Для фарбування капсул використовують спиртовий розчин туші.

7. Відношення до фарбування за Грамом: грампозитивні чи грамнегативні мікроорганізми.

Культуральні ознаки.

Для визначення культуральних ознак досліджувану культуру висівають на рідкі і щільні поживні середовища.

При вивченні росту мікроорганізмів на щільних поживних середовищах відмічають:

характер росту – скудний, пухкий, однорідний або неоднорідний;

форма – кругла, амебовидна, кореневидна, складчаста та ін.;

розмір – крапкові (діаметр до 1 мм), дрібні (1-2 мм), середні (2-4 мм), великі (більші за 4 мм);

колір – білі, жовті, рожеві, прозорі та ін.;

поверхня – матова, блискуча, гладенька, шорстка, складчаста, бугриста, плоска, куполоподібна;

краї – рівні, хвилясті, зубчасті, розпливчасті та ін.;

консистенція – щільна, маслоподібна, слизиста, глейка, мокра, суха;

структура – однорідна, дрібнозерниста, крупнозерниста, волокниста.

При вивченні росту мікроорганізмів на рідких середовищах відмічають:

інтенсивність росту – слабка, помірна, значна;

наявність муті – слабка, помірна, значна, рівномірна, нерівномірна, зерниста, у вигляді пластівців;

характер осаду – невеликий, значний, у вигляді пластівців, глейкий;

утворення на поверхні середовища пристінного кільця, плівки, шершхатої поверхні.

В посівах уколом відмічають:

на МПА – характер росту по лінії уколу (ниткою, з боковими відгалудженнями або без них).

на МПЖ – розрідження середовища і його характер (кратероподібний, воронкоподібний, кулеподібний та ін.)

Фізіологічні ознаки.

Фізіологічні ознаки мікроорганізмів обумовлені їх біохімічними особливостями. До фізіологічних ознак відносять:

1. Тип живлення мікроорганізмів.
2. Відношення до кисню – аероби, анаероби, облігатні анаероби.
3. Відношення до температури – мезофіли, психрофіли, термофіли.
4. Відношення до рН .
5. Можливість розвитку в молоці.
6. Цукролітичні властивості – здатність розщеплювати цукри.
7. Протеолітичні властивості – здатність розщеплювати білки.
8. Окисно-відновні властивості.

Кожний вид мікроорганізмів виробляє постійний набір ферментів, одні з яких розщеплюють білки і вуглеводи, а інші викликають окислення чи відновлення різноманітних субстратів.

Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів

Деякі мікроорганізми в процесі життєдіяльності синтезують протеази, ферменти, які здатні розщеплювати білки. Наявність протеолітичних властивостей у мікроорганізмів визначають шляхом їх висіву уколом в стовпчик МПЖ. Пробірки витримують при температурі 22-23 °С протягом 24-48 год. Мікроорганізми, які синтезують протеолітичні ферменти, розріджують желатину. Відмічають швидкість розрідження та його характер.

При висіві на молочний агар Ейкмана (10 частин розплавленого МПА і 3 частини стерильного знятого молока), культури, що синтезують протеолітичні ферменти, викликають пептонізацію казеїну. Спостерігається утворення прозорих зон навколо колоній на мутному фоні середовища. Засіяні чашки витримують в термостаті при 37°C протягом 24-48 годин.

Для визначення протеолітичних властивостей, досліджувані культури аеробних мікроорганізмів висівають на середовища з сироваткою крові. Анаеробні мікроорганізми висівають уколом в стовпчик аналогічного середовища. Чашки і пробірки витримують при 37°C протягом 24-48 годин. Штами, які синтезують протеолітичні ферменти, розріджують зазначене поживне середовище, навколо колоній утворюються поглиблення.

Деяким видам патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів властива протеолітична активність. Вони здатні розщеплювати білок до продуктів глибокого розпаду: індолу, сірководню, сечовини, аміаку. При визначенні протеолітичних властивостей патогенів найбільше значення має виявлення індолу та сірководню.

Для встановлення наявності індолу, в пробірку з МПБ (або пептонною водою) засіяною досліджуваною культурою, вносять смужку фільтрувального паперу насиченого розчином щавлевої кислоти. Засіяні пробірки витримують при 37°C в термостаті протягом 24-48 годин. Забарвлення паперу в рожевий або червоний колір, свідчить про наявність індолу.

Сірководень - кінцевий продукт розщеплення цистину, цистеїну та метіоніну. Для його виявлення в пробірку з МПБ засіяну досліджуваною культурою, вносять смужку фільтрувального паперу змочену 10% розчином оцтовокислого свинцю. При виділенні сірководню, папір буріє або чорніє (утворюється сірчистий свинець).

Визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів

Здатність розщеплювати вуглеводи і багатоатомні спирти, які об'єднують в одну групу "цукри", притаманна багатьом умовно-патогенним і патогенним мікроорганізмам.

Під дією цукролітичних ферментів, які синтезуються бактеріями, цукри розщеплюються до альдегідів і кислот. Кінцевими продуктами їх розщеплення є вуглекислий газ і водень.

Різні види і штами мікроорганізмів по-різному відносяться до цукрів. Одні ферментують лактозу, інші - глюкозу, треті – обидва цукри. Цю властивість мікроорганізмів в мікробіології використовують для ідентифікації бактерій та дріжджів.

Суспензію досліджуваних клітин (0,1-0,2 мл) висівають на короткий чи довгий „строкатий” ряд Гісса (набір пробірок з поживними середовищами). До складу кожного поживного середовища входить пептонна вода (1% пептону), відповідний цукор (0,5-1%) та індикатор Андрере (1мл індикатора на 100 мл середовища) або бромтимолблау (0,1 мл 1,6%-ного розчину бромтимолблау на 100 мл середовища). В ході звичайного аналізу, досліджувану культуру висівають на так званій “короткий” ряд Гісса, який містить середовища з глюкозою, лактозою, манітом, мальтозою і цукрозою. Для поглибленого аналізу в “строкатий” ряд Гісса додатково вводять інші цукри та спирти: дульцит, сорбіт, ксилозу, арабінозу та ін.

Індикатор Андрере: 0,3 г кислого фуксину розчиняють в 100 мл стерильної дистильованої води і додають 16,4 мл 1 н розчину їдкого натру. Розчин стерилізують при 100°C протягом 5 хв. і зберігають в темному місці у флаконі з притертим корком. Індикатор Андрере має солом'яно-жовте забарвлення. При зміщенні рН середовища в кислий бік він набуває яскраво-малинового забарвлення.

Індикатор бромтимолблау: 0,4 г бромтимолблау розчиняють в 40 мл дистильованої води, нагріваючи її до кипіння. Після цього до розчину додають 6,4 мл 0,1 н. розчину їдкого натру, в результаті чого рідина набуває зеленуватого кольору і доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Індика-

тор зберігають в темному місці в склянці з притертим корком. Індикатор бромтимолблау дозволяє визначити зміну рН в межах 6,0-7,6. В лужній зоні (рН=7,6) індикатор має синій колір, в кислій зоні (рН=6,0) – жовтий. При зміні рН у вказаному діапазоні забарвлення приймає різні відтінки зеленого кольору.

Для визначення газоутворення (кінцеві продукти розпаду цукрів) в пробірки додатково занурюють “поплавки” (трубка діаметром 0,5-0,7 см, запаяна з одного кінця). При стерилізації, поплавок повністю заповнюється поживним середовищем, а при виділенні газу в ньому утворюється повітряна бульбашка і поплавок спливає.

Штатив з набором проб витримують в термостаті при 37-43°C протягом 48-72 годин. Візуально за помутнінням середовища, утворенням плівки, осаду відмічають ріст мікроорганізмів або його відсутність на всіх субстратах. В ході експерименту проводять контроль рН, за зміною забарвлення середовища. Проби з кислою реакцією середовища (відбувається утворення кислот) позначають буквою “К”, а проби в яких утворюються бульбашки газу (спливає поплавок) та підтримується кисла реакція – буквами “КГ”, де “Г” вказує на утворення газу.

На основі отриманих результатів роблять висновок, які цукри (спирти) асимілюються даними мікроорганізмами.

Визначення окисно-відновних властивостей мікроорганізмів

Мікроорганізми також синтезують окисно-відновні ферменти. Окислення субстрату може відбуватися за рахунок приєднання до нього кисню (ферменти оксидази) або відщеплення водню.

Речовини, від яких відщеплюється водень, називають донорами, а речовини до яких приєднується водень – акцептором. Акцептором водню часто виступає кисень повітря, а також органічні сполуки.

Для виявлення дегідраз і визначення їх активності в поживне середовище додають органічний барвник, який виконує роль акцептора водню. В результаті приєднання водню барвник відновлюється, перетворюючись в без-

барвну сполуку. Останній при контакті з киснем повітря може знову окислитись і набути кольору. В якості акцепторів водню використовують метиленову синь, лакмусову настоянку, малахітову зелень та ін.

Окисно-відновні властивості мікроорганізмів можна встановити шляхом висіву культур в поживні середовища (МПБ, МПА, молоко), що містять барвник (на 5 мл середовища вносять 1 краплю 5% розчину метиленової сині, або 1-2 краплі 5% розчину індигокарміну, або 1 краплю лакмусової настоянки). При позитивній реакції середовище повністю знебарвлюється.

Відношення мікроорганізмів до кисню повітря

Відношення мікроорганізмів до кисню визначають шляхом їх посіву уколком в стовпчик МПА. Пробірки витримують в термостаті при температурі 30-37°C протягом 48 год.

Якщо спостерігається ріст мікроорганізмів на поверхні середовища (у вигляді цвяха, шляпкою догори) – це аеробні мікроорганізми. Незначний ріст на поверхні середовища та більш інтенсивний по всій довжині уколу є характерним для факультативних анаеробів. Активне розрідження середовища на дні пробірки характеризує розвиток облігатних анаеробів.

Визначення морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних ознак мікроорганізмів (отримані результати заносяться в таблицю) дозволяє провести їх ідентифікацію за спеціальними визначниками.

Ознаки окремих видів мікроорганізмів.

Escherichia coli, Bacterium coli (кишкова паличка) – прямі, із заокругленими кінцями, поліморфні палички, 2,5-3×0,5-0,8 мкм. Зустрічаються рухомі і нерухомі форми. Спор не утворюють. Деякі види мають капсулу, Грам -. На твердих середовищах утворюють сірі, гладенькі, блискучі, ледве випуклі або плоскі колонії, а на середовищі Ендо – характерні, випуклі, яскраво-червоні колонії з металевим блиском. Кишкова паличка є типовим сапрофітом. Зброджує глюкозу,

лактозу, мальтозу, згортає молоко, розкладає білки з утворенням індоли та сірководню.

Культуральні ознаки						Морфологічні ознаки						Фізіологічні ознаки													
Характеристика колоній						Характеристика мікроорганізму						Відношення до кисню		МПЖ		Лакмусове молоко			Ряд Гісса						
Розмір	Форма	Край	Поверхня	Блиск	Колір	форма	Розмір	Рухливість	Спороутворення	Капсулоутворення	Забарвлення за Грамом	Аероб	Анаероб	Факультативний аероб	Без розрідження	Розрідження	Кисла реакція	Лужна реакція	Обезбарвлення	Цукроза	Лактоза	Мальтоза	Глюкоза	Маніт	

Хід роботи

1. Визначити загальне мікробне число у зразках сировини (чашки Петрі з МПА). При виявленні в дослідних зразках бактерій, що відносяться до групи кишкових паличок (чашки Петрі з середовищем Ендо), внести в таблицю позначку (+) навпроти відповідного зразка. Результати спостережень занести у таблицю:

Об'єкт дослідження	Ступінь розведення	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ), КУО/г	Наявність бактерій групи кишкових паличок	Примітки
		бактерії	плісняві гриби			

Контрольні запитання

1. Особливості проведення мікробіологічного аналізу сировини для олійно-жирових виробництв (відбір проби, приготування розведень, висів зразків на поживне середовище).

2. Особливості визначення видової належності мікроорганізмів. Навести приклади морфологічних, культуральних та фізіологічних ознак дріжджів, використовуючи описані в лабораторній роботі види мікроорганізмів.

3. Методи визначення протеолітичних та окисно-відновних властивостей мікроорганізмів.

4. Визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів. “Строкатий” ряд Гісса.

ЛАБОТОРНА РОБОТА 2

Мікробіологічний аналіз продуктів олійно-жирових виробництв

ПЛАН:

1. Методи мікробіологічного аналізу маргарину.
2. Методи мікробіологічного аналізу майонезу.
3. Методи мікробіологічного аналізу олій.
4. Визначення мікробної обнасіненості додатків до майонезу (перечна та часнична паст, грибного екстракту, барвників).

Мета роботи оцінити результати аналізу сировини для олійно-жирових виробництв на загальне мікробне обсіменіння та присутність бактерій групи кишкових паличок. Опанувати методи мікробіологічного аналізу продуктів олійно-жирових виробництв.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, комплекти предметних і покривних скелець, спиртівки, сірники, мікробіологічні петлі та голки, стерильні піпетки, шпателі Дригальського, стерильні скальпелі, пестики, ступки; поживні середовища (на підгрупу з двох студентів) – 2 чашки Петрі з середовищем МПА, 1 чашка Петрі з середовищем Ендо; стерильний пісок, стерильна вода; зразки ковбас (вареної, напівкопченої), свинячих м'ясних хлібів: сумнівної свіжості, несвіжих; технічні терези і набір важків.

Основні відомості

Мікробіологічний аналіз продуктів олійно-жирових виробництв.

Для проведення мікробіологічного аналізу від кожної партії виробів відбирають не менше 2 - 3 зразків. У разі великого пакування асептично відбирають зразки масою ~100 - 150 г (см³) від 2 -3 одиниць від кожної партії. Кожний із зразків окремо пакують у стерильний пергаментний папір (вміщують у стерильний посуд), підписують і направляють в мікробіологічну лабораторію. Аналіз проводять не пізніше 4 годин з моменту відбору проб.

Контроль проводять періодично, але не рідше одного разу у 10 днів з чергуванням асортименту на лінії виробництва продукції. У такий самий термін перевіряють мікробіологічний стан обладнання, інвентарю, пакувальної тари, рук працюючих та спецодягу.

Проби відібрані від зразків однієї партії змішують і формують з них середню пробу.

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

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

Для маргаринів МАФМ не досліджується. Вміст дріжджів не повинен перевищувати 1 000 в 1 г (см³), грибів – 100 в 1 г (см³), БГКП – 0,01.

Визначення мікробного числа та характеру мікрофлори досліджуваних зразків проводять аналогічно викладеним в лабораторній роботі №1 методикам дослідження сировини для олійно-жирових виробництв.

Для виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів в зразках розроблені окремі експрес-методи. Використання методів, що були наведені в попередній роботі, унеможлиблюється за рахунок великої тривалості їх проведення, яка в деяких випадках може перевищувати термін реалізації готового продукту.

Перший метод. Досліджуваний зразок вносять в пробірку з середовищем Хейфеца (до 1л розчину, який містить 1% пептону, 0,5% кухонної солі і 0,5% маніту, додають 1 мл 5% спиртового розчину різолової кислоти і 2,5 мл 0,1% водного розчину метилової сині). Потім профламованим пінцетом вкладають в пробірку трохи стерильного фільтрувального паперу і стерильною скляною паличкою проштовхують його разом з наважкою проби на дно пробірки, щоб проба не сплила. Пробірки 12-13 годин витримують у термостаті при температурі 37°C. У випадку наявності бактерій групи кишкових паличок, середовище змінює колір з червоно-фіолетового на жовтий, а при збівтуванні зеленіє з утворенням осаду. За відсутності умовно-патогенних мікроорганізмів колір середовища не змінюється. Знебарвлення середовища, його інтенсивне помутніння та виділення газу вказує на розвиток анаеробних мікроорганізмів.

Другий метод. Чашки з середовищем Ендо витримують в термостаті при 37°C протягом 2-3 годин та висівають на них досліджувану пробу. При наявності в зразках бактерій групи кишкових паличок, вже через 12-18 год. на середовищі будуть утворюватися характерні для цього виду мікроорганізмів колонії.

Хід роботи

1. Визначити загальне мікробне число у зразках сировини для олійно-жирових виробництв (чашки Петрі з МПА). При виявленні в дослідних зразках бактерій, що відносяться до групи кишкових паличок (чашки Петрі з середовищем Ендо) внести в таблицю позначку (+) навпроти відповідного зразка. Отримані дані занести у таблицю:

Об'єкт дослідження	Ступінь розведення	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ), КУО/г	Наявність бактерій групи кишкових паличок	Примітки
		бактерії	плісняві гриби			

Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми.

2. Визначити мікробне число у зразках продуктів олійно-жирових виробництв.

3. Провести аналіз зразків продуктів олійно-жирових виробництв на присутність бактерій групи кишкових паличок.

Контрольні запитання

1. Особливості процесу відбору зразків продуктів олійно-жирових виробництв та приготування проб при проведенні мікробіологічних аналізів.

2. Характеристика основних експрес-методів виявлення умовно-патогенної мікрофлори в зразках продуктів олійно-жирових виробництв.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3

Методи санітарного контролю у олійно – жировій промисловості.

Мета роботи оцінити результати аналізу олійно - жирових виробів на загальне мікробне обсіменіння, присутність умовно-патогенної мікрофлори та анаеробів. Опанувати методику визначення мікробної забрудненості води, повітря, обладнання.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, комплекти предметних і покривних скелець, спиртівки, сірники, мікробіологічні петлі та голки, стерильні піпетки, шпателі Дригальського, стерильні ватні тампони; поживні середо-

вища (на підгрупу з двох студентів) – 3 чашки Петрі з середовищем МПА; пробірки з стерильною водою; трафарети.

Основні відомості

Мікробіологічний аналіз повітря

Найбільш розповсюдженим та простим методом визначення мікробного забруднення повітря є **седиментаційний метод**. Цей метод базується на гравітаційному осіданні пилу та крапель разом з мікроорганізмами на поверхню поживного середовища.

Чашки Петрі (з МПА та сусло-агаром) переносять в приміщення де проводиться аналіз повітря та розміщують на розгорнутому папері, в якому вони стерилізувалися. Обережно зсувають кришки на край чашок так, щоб вся поверхня агаризованого середовища залишалася повністю відкритою. Час експозиції залежить від забруднення повітря і становить 5-15 хв. Після проведення аналізу чашки закривають кришками і поміщають в термостат. Чашки з МПА (визначення бактерій) витримують 48 год. при 37 °С, з сусло-агаром (визначення дріжджів та мікроміцетів) – 4-5 діб при 24-26 °С. При необхідності підрахунок колоній виконують за допомогою лупи.

Для визначення кількості мікроорганізмів користуються формулою Омелянського, згідно якої на поверхні чашки в 100см² за 5 хв. осідає така кількість мікроорганізмів, яка знаходиться в 10 л повітря. Тоді в 1 м³ повітря кількість мікроорганізмів (загальне мікробне число) буде складати:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{B \cdot t}$$

де: А - кількість колоній, які вирости в чашці Петрі (середня з двох); В - площа чашки Петрі, см²; t – час експозиції, хв; 100 × 5 × 100 – коефіцієнти перерахунку.

Мікробіологічний аналіз води

Проби води відбирають в стерильний посуд місткістю 0,5-1 дм³, закривають ватно-марлевими або притертими скляними пробками та паперовими ковпачками.

При відборі проб з водопровідного крану або колонки спочатку 10 хв. спускають воду. Кран або кінець спускної труби обов'язково обпалюють кільцевим запаленим ватним тампоном (попередньо змоченим у спирті) або паяльною лампою. В склянки, що використовуються для відбору проб хлорованої води, перед стерилізацією в автоклаві вносять 2 мл 1,5% розчину гіпосульфїту натрію.

Перевозити проби слід при температурі не вище ніж 20 °С, досліджувати не пізніше як через 6 годин після відбору.

Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 23 грудня 1996 р. затверджені нові Державні санітарні правила і норми „Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання” (ДСАНПІН). У наведеному документі систематизовані та викладені основні гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання, порядок здійснення державного санітарно-епідеміологічного нагляду за якістю води в звичайних та екстремальних ситуаціях та ін. За мікробіологічними показниками питна вода має відповідати вимогам наведеним у табл.

Мікробіологічні показники безпеки питної води

№	Найменування показників	Одиниці виміру	Нормативи
1	Число бактерій в 1 см ³ води, що досліджується (загальне мікробне число—ЗМЧ)	Колоніїутворюючі одиниці (мікроорганізми)/см ³ КУО/см ³	Не більше 100*
2	Число бактерій групи кишкових паличок (коліформних мікроорганізмів) в 1 дм ³ води, що досліджується (індекс БГКП)	Колоніїутворюючі одиниці (мікроорганізми)/дм ³ КУО/дм ³	Не більше 3**
3	Число термостабільних кишкових паличок (фекальних коліформ – індекс ФК) в 100 см ³ води, що досліджується	Колоніїутворюючі одиниці (мікроорганізми)/100 см ³ КУО/100 см ³	Відсутність***
4	Число патогенних мікроорганізмів в 1 дм ³ води, що	Колоніїутворюючі одиниці (мікроорганізми)/дм ³	Відсутність***

	досліджується	КУО/дм ³	
5	Число коліфагів у 1 дм ³ води, що досліджується	Бляшкоутворюючі одиниці/дм ³ БУО/дм ³	Відсутність***

Примітки: * – для 95% проб води у водопостачальній мережі, що досліджуються протягом року; ** – для 98% проб води, що надходить у водопостачальну мережу і досліджуються протягом року; при перевищенні індексу БГКП на етапі ідентифікації колоній, що вирости, додатково проводять дослідження на наявність фекальних коліформ; *** – при виявленні фекальних коліформ у двох послідовно відібраних пробах води слід розпочати протягом 12 годин дослідження води на наявність збудників інфекційних захворювань бактеріальної чи вірусної етіології (по епідситуації).

Визначення загального мікробного числа зразків води. Проби води обережно збовтують (не змочуючи пробку) та стерильною піпеткою відбирають потрібний для аналізу об'єм зразка. Проби чистої води (водопровідна, артезіанська) висівають без попереднього розведення на чашки з поживним середовищем (МПА) по 0,1-1 мл. Забруднені зразки води висівають по 0,1-1 мл з десятикратних розведень. Десятикратні розведення роблять наступним чином: 1 мл вихідного досліджуваного зразка асептично вносять в пробірку з 9 мл стерильної водопровідної води, добре перемішують і отримують I десятикратне розведення – 1:10. Потім стерильною піпеткою відбирають 1 мл I розведення вихідного зразка води і вносять в другу пробірку з 9 мл стерильної води, отримують II десятикратне розведення – 1:100 і т. д. З кожної проби готують не менше двох розведень.

Засіяні чашки інкубують в термостаті протягом 24 год. при 37°C, після чого проводять підрахунок колоній.

Приклад: на чашці виростило 28 колоній мікроорганізмів;

висів проводили з розведення – 1:100;

в чашку вносили 1 мл відповідного розведення.

Виходячи з наведених умов, в 1 мл вихідного зразка води міститься: $28 \times 100 = 2800$ мікроорганізмів.

Наявність **бактерій групи кишкових паличок** у воді виявляють **методом бродильних проб**. За цим методом зразки досліджуваної води вносять в пробірки (колби) з середовищем Ейкмана.

Середовище Ейкмана готують наступним чином: в 1 л води розчиняють 100 г пептону, 50 г хлористого натрію, 100 г глюкози, розчин кип'ятять, фільтрують, встановлюють рН середовища на рівні 7,4-7,6 та розливають по 10 мл в пробірки з поплавками. Стерилізують текучою парою протягом 30 хв. 3 доби поспіль. Розведене середовище отримують шляхом додавання до 1 частини концентрованого середовища 9 частин дистильованої води.

При дослідженні водопровідної чи артезіанської води засівають: 2 проби по 100 мл і 10 проб по 10 мл води в ємності з 10 мл і 1 мл (відповідно) концентрованого середовища Ейкмана; 1 мл, 0,1 мл, 0,01 мл води і (чи) її розведення в пробірки з 9 мл розведеного середовища.

При дослідженні стічних вод висівають 1 мл вихідного зразка і по 1 мл його розведень (1:10 – 1:10⁶) в середовище Кесслер.

Зразки термостатують при 43°C протягом 24-48 год., після чого переглядають і відмічають газоутворення та помутніння. Якщо ріст мікроорганізмів відсутній, аналіз закінчують і вважають, що колі-титр більше 300. При наявності росту мікроорганізмів встановлюють бродильний титр – це найменше розведення, в якому виявлене газоутворення.

Метод посіву на середовище Ендо (Левіна). З проб, в яких виявлено газоутворення та помутніння, проводять висів на чашки з середовищем Ендо або Левіна таким чином, щоб вирости ізольовані колонії. Засіяні чашки витримують в термостаті 24 год. при 37°C. При утворенні на середовищі темно-червоних колоній з металевим блиском, характерних для бактерій кишкової палички, проводять їх мікроскопіювання (фарбування за Грамом). Наявність в досліджуваних препаратах коротких, грамнегативних, аспорогенних, рухомих або нерухомих паличок вказує на можливість присутності кишкової палички в зразках. Відповідні колонії відмічають та проводять з ними подальші дослідження.

Вторинна бродильна проба. З колоній, в мазках яких виявлені грамнегативні бактерії, роблять посіви в пробірки з розведеним середовищем Ейкмана і витримують в термостаті 24 год. при 37°C. При утворенні в пробах газу дають заключну позитивну відповідь про присутність кишкової палички у досліджуваних зразках води.

Мікробіологічний контроль у олійно – жировій промисловості.

Окрім контролю мікробіологічного стану сировини, готової продукції, повітря та води, постійно контролюють стан здоров'я працівників (система санітарних книжок), а також санітарний стан обладнання, інструментів та приміщень.

Обов'язковим також є мікробіологічний контроль забрудненості обладнання у виробничих приміщеннях. Для його проведення використовують трафарет (виготовлений з органічного скла чи пластмаси) з отвором, площа якого становить 10 см². Цей трафарет прикладають до поверхні обладнання та стерильним ватним тампоном ретельно протирають відокремлену поверхню. Тампон переносять в пробірку з 9 мл стерильної води. З приготованих проб роблять висів на МПА для визначення рівня мікробного обсіменіння обладнання (ЗМЧ) та на середовище Ендо для виявлення умовно-патогенної мікрофлори. Проби термостатують при 37°C протягом 48-72 годин.

Хід роботи

1. Визначити загальне мікробне число у зразках майонезу, маргарину (чашки Петрі з МПА). При виявленні в дослідних зразках бактерій групи кишкових паличок (чашки Петрі з середовищем Ендо) внести в таблицю позначку (+) навпроти відповідного зразка. Отримані дані занести у таблицю:

Об'єкт дослідження	Ступінь розведення	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ), КУО/г	Наявність бактерій групи кишкових паличок	Примітки
		бактерії	плісняві гриби			

--	--	--	--	--	--	--

Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми. На основі отриманих результатів зробити висновок про відповідність зразків ковбасних виробів санітарним вимогам.

2. Провести аналіз продукції олійно – жирових виробництв на присутність бактерій групи кишкових паличок.

4. Визначити загальну кількість спороутворюючих мікроорганізмів в зразках продукції олійно – жирових виробництв.

5. Визначити загальне мікробне число різних зразків води.

6. Провести аналіз води на наявність бактерій групи кишкових паличок (індекс БГКП).

7. Провести мікробіологічний аналіз повітря седиментаційним методом.

8. Провести мікробіологічний контроль забрудненості обладнання.

9. Провести аналіз мікробного обсіменіння волосся, рук та ротової порожнини.

Контрольні запитання

1. Методика відбору зразків продукції олійно – жирових виробництв та приготування проб при проведенні мікробіологічних аналізів.

2. Допустимі норми мікробного забруднення продукції олійно – жирових виробництв.

3. Мікробіологічний аналіз води та повітря .

4. Мікробіологічний контроль забрудненості обладнання.

ЛАБОТОРНА РОБОТА 4

Мікробіологічний аналіз води та повітря.

Мета роботи дати оцінку результатам мікробіологічного аналізу води , повітря та обладнання.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, комплекти предметних і покривних скелець, спиртівки, сірники, мікробіологічні петлі та голки.

Хід роботи

1. Закінчити роботу по визначенню кількісного і якісного складу мікрофлори повітря різних приміщень. Підрахувати кількість колоній, результати спостережень занести у таблицю:

Місце проведення аналізу	Час експозиції	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ)*, КУО/м ³	Примітки
		бактерії	плісняві гриби		

* КМАФАнМ – кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (санітарний показник)

Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми.

2. Закінчити роботу по визначенню кількісного і якісного складу мікрофлори різних зразків води. Підрахувати кількість колоній, що вирости, результати спостережень занести у таблицю:

Об'єкт дослідження	Ступінь розведення	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ), КУО/см ³	Індекс БГКП	Примітки
		бактерії	плісняві гриби			

Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми. Визначити індекс БГКП. На основі отриманих результатів зробити висновок про відповідність досліджуваних зразків води встановленим санітарним нормам.

3. Визначити рівень мікробного обсіменіння поверхонь досліджуваних об'єктів. Отримані дані занести у таблицю:

Об'єкт дослідження	Ступінь розведення	Кількість колоній на чашці Петрі		ЗМЧ (КМАФАнМ), КУО/г	Примітки
		бактерії	плісняві гриби		

Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми. На основі отриманих результатів зробити висновок про мікробну забрудненість обладнання.

4. Визначити рівень мікробного обсіменіння рук, волосся, ротової порожнини (чашки Петрі з МПА). Промікроскопіювати колонії, що вирости та замалювати виявлені мікроорганізми.

Колоквіум

Заключне заняття передбачає проведення колоквіуму, як фінішного етапу контролю знань студентів за темами:

1. Мікрофлора сировини та готової продукції олійно – жирових виробництв.
2. Визначення мікрофлори води, повітря, технологічного обладнання.
3. Живильні середовища та методи їх стерилізації.

Література:

1. *Агульник М.О., Корнеев И.П.* Микробиология мяса, мясопродуктов и пищевых продуктов, - М.: Пищевая промышленность, 1972. - 272с.
2. *Воронцов А.А.* Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу “Техническая микробиология”. – К.: КТИПП, 1984. – 28с.
3. *Гриневич А.Г., Босенко А.М.* Техническая микробиология. – Минск: Высшая. шк., 1986. – 166с.
4. *Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А.* Микробиология в пищевой промышленности. – М: Пищ. Пром-сть, 1975. –502 с.
5. Інструкція по санітарно – мікробіологічному контролю виробництва маргарину та майонезу – К:2002,-50 с.
6. *Микробиология* продуктов животного происхождения. Перевод с нем. под редакцией Королёвой Н.С. – М.: Агропромиздат, 1985 – 590с.
7. *Слюсаренко Т.П.* Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984.-207с.
8. *Хейфец Н.А.* Санитарно-микробиологический контроль в мясной про-

мышленности. – М.: Медицина, 1988. – 196с.

Навчальне видання

Мікробіологія жирів та жирозамінників

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

**до вивчення дисципліни та виконання
лабораторних робіт**

для студентів спеціальності 6.091700

Технологія жирів та жирозамінників" (ТЖ-IV) напряму 0917

“Харчова технологія та інженерія”

денної форми навчання

Укладачі: Воронцов Олександр Олександрович

Ігнатенко Сергій Вікторович

Редактор

Верстка

Підп. до друку . Обл.- вид. арк. Наклад пр. Вид. № /0. Безплатно.

Зам.№ РВЦ НУХТ. 01033, Київ-33, вул.Володимирська, 68