

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра зоогігієни та ветеринарії

МІКРОБІОЛОГІЯ МОЛОКА І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторно-практичних занять та самостійної роботи
для здобувачів вищої освіти ступеня «магістр»
спеціальності 204 – «ТВППТ»

Миколаїв
2018

УДК 619 : 614.31
М59

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету
ТВПШТСБ Миколаївського національного аграрного університету
від 19.04.2018 р., протокол № 8.

Укладачі:

В. А. Кириченко – канд. с-г наук, доцент кафедри зоогієни та
ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;

С. П. Кот – кандидат біол. наук, доцент, завідувач кафедри
зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний
університет

Рецензенти:

Є. В. Баркар – канд. с-г наук, доцент кафедри генетики, годівлі
тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний
університет.

Г. І. Калиниченко – канд. с-г наук, доцент кафедри технології
виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний
аграрний університет.

© Миколаївський національний
аграрний університет, 2018.

ЗМІСТ

Вступ		4
Заняття 1.	Устаткування лабораторії. Відбір проб молока для мікробіологічного дослідження	4
Заняття 2.	Збудники молочнокислого бродіння	7
Заняття 3.	Визначення загальної кількості мікробів	10
Заняття 4.	Визначення колі-титру в молоці	12
Заняття 5.	Визначення загального мікробного обсіменіння молока	14
Заняття 6.	Визначення чисельності і групового складу мікрофлори молока методом посіву	16
Заняття 7.	Способи контролю пастеризації молока	18
Заняття 8.	Виявлення мікобактерій туберкульозу в молоці	21
Заняття 9.	Виявлення збудника бруцельозу в молоці	22
Заняття 10.	Виявлення в молоці стафілококів, стафілококового токсину і сальмонел	23
Заняття 11.	Способи встановлення молока корів хворих на мастит	26
Заняття 12.	Виявлення в молоці антибіотиків	28
Заняття 13.	Виділення чистих культур молочнокислих бактерій. Пропіоновокислі бактерії	30
Література		33

ВСТУП

Молоко є найціннішим продуктом харчування людей. З нього виготовляють широкий асортимент високоцінних молочних продуктів: масло, сир, сметану, вершки, кефір, кисле молоко, різноманітні молочні консерви і багато чого іншого.

Висока біологічна і харчова цінність молока полягає в тому, що воно містить всі необхідні речовини у формі, яка легко засвоюється організмом. Молочні продукти часто застосовуються як дієтичні, а кисломолочні – і як лікувальні засоби.

Молоко – продукт, який швидко псується, оскільки слугує сприятливим середовищем для розвитку різної мікрофлори, у тому числі і патогенної. Порушення режиму утримання і годівлі молочних тварин, недотримання санітарно-гігієнічних вимог при отриманні, первинній обробці, зберіганні і транспортуванні молока можуть істотно вплинути на технологічні і харчові його якості і, деколи, навіть зробити не тільки непридатним, але і шкідливим для людини і тварин.

Фахівець технолог зобов'язаний вміти проводити мікробіологічні дослідження молока і молочних продуктів при отриманні, зберіганні, переробці, транспортуванні і в місцях їх реалізації, повинні мати поглибленні знання і практичні навички з мікробіології.

Заняття 1. Устаткування лабораторії.

Відбір проб молока

Мета заняття: ознайомити здобувачів вищої освіти з обладнанням та структурою лабораторії мікробіології молока та молочних продуктів, технікою безпеки при роботі в лабораторії. Навчити правилам відбору проб молока для дослідження.

Матеріали та обладнання: Мутовки для забору проб, мірні черпаки, циліндри, молоковідбірники, черпаки, ложки, металеві трубки, щупи, шпателі і мензурки, лактоденсиметр.

Устаткування лабораторії та її задачі. Роль лабораторії в молочному виробництві: здійснення систематичного контролю за дотриманням технології виробництва продукції в господарствах і на підприємствах, якісними показниками молока і молочної продукції, виконанням ветеринарно-санітарних вимог на фермах господарств, санітарним станом устаткування і молочного посуду, правильністю

приготування миючих і дезінфікуючих засобів, видачею посвідчень про якість, які підтверджують відповідність продукції вимогам стандартів і технічних умов.

В обов'язки працівників лабораторії входять також приготування хімічних розчинів, перевірка якості реактивів і придатності лабораторних приладів, участь в розробці і здійсненні заходів щодо підвищення якості молочних продуктів, оформлення відповідної документації на продукцію, що відправляється в державні поставки, ведення обліку та ін.

Лабораторія повинна бути обладнана необхідним інвентарем (столи, шафи та ін.), а також лабораторним посудом, матеріалами, приладами, реактивами, витяжною шафою, забезпечена достатньою кількістю

холодної і теплої води, мати добру природну і штучну освітленість, каналізацію і вентиляцію.

Кожний працівник лабораторії повинен ретельно вивчити вимоги інструкції, основні положення якої вивішують на видному місці.

Відбір проб для мікробіологічних досліджень. В стерильний посуд стерильними інструментами проби пастеризованого молока і молочних продуктів відбирають до відбору проб для фізико-хімічних і органолептичних аналізів.

Роблять це відбірником, черпаком, ложкою, металевою трубкою, щупом, шпателем або іншими пристосуваннями, які перед кожним використанням необхідно стерилізувати фламбуванням або в автоклаві. При відборі проб сирого молока для визначення редуктази допускається обробка металевої трубки або пробника пропарюванням або кип'ятінням.

З'єднану пробу молока об'ємом 500 см^3 складають з точкових проб. Для проведення редуктазної проби із з'єднаної виділяють пробу об'ємом $50\text{-}60 \text{ см}^3$.

Пробу, що відправляється в лабораторію іншого підприємства, пломбують або опечатують, приклеюють етикетку з вказівкою номера проби, підприємства або господарства, об'єм партії, дату і час виготовлення продукту з моменту закінчення технологічного процесу, дату і годину відбору проби, посаду і підпис особи, що відібрала пробу і об'єм необхідних аналізів.

Мікробіологічні аналізи продукту проводять не більше ніж через 4 години з моменту відбору проб. Проби слід берегти і транспортувати до початку дослідження в умовах, які забезпечують температуру продуктів не вище 6°C , не допускаючи підморожування, а для морозива не вище

мінус 2°C.

Способи консервації проб молока. Консервують проби молока в тих випадках, коли немає можливості провести аналіз проб відразу ж після відбору. З цією метою застосовують декілька методів.

Консервація холодом полягає в тому, що відібрані проби охолоджують і зберігають при температурі 3-5°C не більше двох діб.

Консервація двухромовокислим калієм. Метод заснований на тому, що двухромовокислий калій є сильним окислювачем, який руйнує протоплазму мікроорганізмів. Для консервації беруть 10%-ний розчин двухромовокислого калія з розрахунку 1 мл на 100 мл молока. Проби, зібрані за декаду, консервують в декілька прийомів, по мірі накопичення в пляшці проби молока. Слід враховувати, що введений в молоко насичений розчин двухромовокислого калію підвищує густину і титруючу кислотність молока. Молоко, консервоване двухромовокислим калієм, забороняється використовувати в їжу людям і на корм худобі. Воно не підлягає також органолептичній оцінці, дослідженню на кислотність, густину, бактерійне обсіменіння, наявність ферментів, кількість вітамінів та ін. Зберігають такі проби 10-12 діб.

Консервацію формаліном проводять, якщо проби молока пропонується досліджувати на кислотність, вміст сухої речовини, білків і золи. Суть методу полягає в сильній бактерицидній дії формальдегіду. Для консервації використовують 37-40%-й формалін в кількості 1-2 краплі на 100 мл молока. Проби, консервовані формаліном, можна зберігати 10-15 діб.

Консервація перекисом водню. Для цієї цілі використовують той, що продається в аптеках 30-33%-вий розчин перекису водню (пергідроль) в кількості 1-3 крапель на 100 мл молока. Під впливом ферментів молока

пероксидази і каталази пергідроль розщеплюється з виділенням кисню, який згубно діє на мікроорганізми молока. Перекис водню – сполука нестійка, тому консервовані проби молока після дослідження можна використовувати на корм тваринам. Консервовані H_2O_2 проби молока зберігаються 6-10 діб.

Заняття 2. Збудники молочнокислого бродіння

Мета заняття: приготувати препарати з кисломолочних продуктів, провести мікроскопію і замалювати збудників процесу (молочнокислий стрептокок, болгарська і ацидофільна палички, мікрофлора кефіру). Вивчити морфологічні, культуральні і біохімічні властивості молочнокислих бактерій. Приготувати звичайне кисле молоко і ацидофілін.

Матеріали та обладнання: чисті культури (у пробірках) молочнокислого і змішаного бродінь: молочнокислого стрептокока, болгарської і ацидофільної паличок, кефірних дріжджів. Предметні скельця. Мікробіологічні петлі. Чашки зливні, містки. Фарбник – метиленовий блакитний. Мікроскопи. Кедрова олія.

Молочнокислі мікроорганізми розділяють на типових і нетипових. До типових (гомоферментативних) молочнокислих мікроорганізмів відносять ті з них, які при зброджуванні цукрів утворюють в основному молочну кислоту (85-95%) і незначну кількість летких кислот. Нетипові (гетероферментативні) мікроби разом з молочною кислотою утворюють велику кількість побічних продуктів (оцтову кислоту, етиловий спирт, вуглецю діоксид). Серед молочнокислих мікроорганізмів розрізняють кулясті і паличкоподібні форми.

Кулясті (кокові) форми. Гомоферментативні молочнокислі стрептококи. Типовий представник цієї групи – *молочнокислий стрептокок* (*Str. lactis*). Його клітини мають овальну форму, які у молодих культур розташовуються у вигляді коротких ланцюжків, а у старих – попарно. Добре росте на агарі з гідролізованого молока і молочної сироватки. На щільних живильних середовищах утворює округлі колонії. На сусло-агарі з крейдою (САК) навколо колоній утворюється зона просвітління – результат взаємодії кислоти і крейди. В процесі життєдіяльності молочнокислого стрептокока накопичується до 1% молочної кислоти, кислотність середовища підвищується до 120°Т. При оптимальній температурі (30-35°С) *Str. lactis* скислює молоко протягом 10-12 г. Продукт набуває приємного запаху і кислого смаку. *Str. lactis* володіє антимікробною дією, він стійкий до високої температури і затримує ріст багатьох грампозитивних мікробів, у тому числі і патогенних (*Mycobacterium tuberculosis*).

Вершковий стрептокок (*Str. cremoris*) утворює довгі ланцюжки. Росте так само, як і *Str. lactis*, але кислотність середовища нижча (110-115°Т). Оптимальна температура 25-30°С. При зброджуванні молока згусток набуває сметаноподібну консистенцію. Вершковий стрептокок входить до складу заквасок для приготування сметани, масла і сирів.

Гетероферментативні молочнокислі стрептококи, окрім молочної, утворюють леткі кислоти, ароматичні речовини, вуглецю діоксид. Деякі з них здатні зброджувати лимонну кислоту. *Ароматизуючі стрептококи* (*Str. paracitrovorus*, *Str. citrovorus*, *Str. diacetylactis*) надають кисломолочним продуктам приємному смаку і аромату. Формою вони є схожими на *Str. lactis*, але клітини у них дрібніші і розташовані ланцюжком. Для приготування кисломолочних продуктів

ароматоутворюючі стрептококи змішують з гомоферментативними: молочнокислим і вершковим. Вони мають майже однакову оптимальну температуру росту (30°C).

Серед гетероферментативних молочнокислих стрептококів є і термофіли (*Str. thermophilus*), які розвиваються при температурі близько 45°C. Це дозволяє використовувати їх разом з термофільними молочнокислими паличками при виготовленні південних простокваш, а також сирів (російського, швейцарського). До гетероферментативних молочнокислих стрептококів відносять також рід *Leiconostoc*. Представники цього роду – *Leiconostoc citrovorum*, *Leiconostoc dextranicum* – мають круглі клітини, які потім приймають витягнуту форму. Зброджуючи цукри, вони утворюють невелику кількість молочної кислоти, додають специфічний запах кисломолочним продуктам, тому їх включають до складу деяких заквасок.

Паличкоподібні молочнокислі бактерії розділяють на гомоферментативні (термофільні і мезофільні) і гетероферментативні.

Гомоферментативні молочнокислі бактерії. Термофільні бактерії розвиваються при 40-45°C; нижче 15°C їх ріст припиняється. При зброджуванні цукру утворюють до 3,5% молочної кислоти, кислотність середовища досягає 300-400°Т. Молоко згущується протягом 6-12 годин. Бактерії мають вид довгих паличок розміром 1,5-10 х 0,5-1мкм, розташовуються вони поодинокі або у вигляді ланцюжків. Грампозитивні. Спор не утворюють.

У цитоплазмі клітини іноді видно зернистість. На щільному середовищі з сироваткою колонії утворюють розгалуження, що нагадують шматочки вати з нерівними краями.

Болгарську паличку (*Lactobact. bulgaricum*) виділяють з південних простокваш, *ацидофільну* (*Lactobact. acidophilum*) – з вмісту кишечника, *сирну* (*Lactobact. helveticum*) – з сирів. Ацидофільну паличку використовують для приготування ацидофіліну, який має лікувальну дію при шлунково-кишкових хворобах. Дія його триваліша, ніж болгарського кислого молока, оскільки збудник знаходить сприятливіші умови в тому середовищі, з якого він виділений.

Мезофільні бактерії розвиваються при температурі 30°C і розташовані ланцюжком, вони утворюють менше продуктів життєдіяльності, кислотність середовища, в якому вони живуть, не перевищує 180°Т.

Виділяють два види стрептобактрій: *Lactobact. casei*, який бере участь в дозріванні сирів, і *Lactobact. plantarum*, який стимулює процеси силосування і квашення овочів. Молоко вони згортають поволі.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії. *Бета-бактерії* зустрічаються на рослинах, зброджують цукри з утворенням великої кількості етилового спирту і вуглецю діоксиду. Молоко не згортають, при цьому виділяється мало молочної, але багато летких кислот, які додають певний аромат молочним продуктам (сирам, кефіру). Характерним представником бета-бактерій є вид *Lactobact. brevis*, штами якого зброджують гексозу, деякі цукри, а також арабінозу і ксилозу.

Приготування препарату. Досліджуваний кисломолочний продукт (сироватку) мікробіологічною петлею наносять на предметне скло і розподіляють тонким шаром на його поверхні. Висушують і фіксують. Фіксувати краще спиртом-ефіром, при цьому розчиняються крапельки жиру, поліпшується фон. Але можна фіксувати і над полум'ям спиртівки. Мазок фарбують метиленовим блакитним протягом 2-3 хв.

Мікроскопічна картина: на ясно-блакитному фоні добре видно фарбовані в синій колір ті форми мікробів, які містяться в досліджуваному продукті.

Кефірні грибки, або кефірні зерна. Кефірні грибки є зернами неправильної форми білого кольору, висушені, – золотисто-жовтого кольору. Їх використовують для приготування кефіру. Висушені кефірні зерна заздалегідь замочують в молоці. До складу закваски для кефіру входять: молочнокислі стрептококи (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) і ароматизуючі коки, молочнокислі палички, молочнокислі дріжджі. Тіло грибка кефіру переплетене нитками паличкоподібного мікроба. Кефірні зерна кефірів служать материнською закваскою для отримання всіх подальших заквасок. Кефірні грибки отримують шляхом розмноження. Це продукт тривалого культивування молочнокислих організмів, внаслідок чого відбувся стійкий симбіоз.

У кефірі, кумисі та ін. подібних продуктах одночасно розвивається спиртове і молочнокисле бродіння. Для приготування кефіру в пастеризоване і охолоджене до 20°C молоко вносять 3-5% грибної закваски, перемішують і залишають при такій же температурі для зброджування. При температурі 20°C і вище переважає молочнокисле бродіння, нижче 15°C – спиртове. Кількість спирту в кефірі коливається від 0,2 до 0,6%. Чим довше термін витримки кефіру, тим більше в ньому спирту і вище кислотність.

Приготування препарату. Шматочок кефірних грибків поміщають між предметними скельцями, придавлюють і розтягують вздовж. Таким чином, маса кефіру залишається на дотичних поверхнях скелець. Отримані мазки потім висушують, фіксують і фарбують метиленовим блакитним протягом 2-3 хвилин. У полі зору мікроскопа видно

переплетення паличкоподібного мікроба, на тлі якого розташовані молочнокислі стрептококи і молочнокислі палички, а також у невеликій кількості клітини дріжджів. Паличкоподібний мікроб, що переплітає тіло грибка кефіру, на звичайних середовищах не росте і в чистому вигляді поки не виділений.

Заняття 3. Визначення загальної кількості мікробів

Мета заняття: засвоєння методик визначення загальної кількості мікробів і колі-титру в молоці.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі, термостат, хімічні пробірки, мікроскоп, живильне середовище Ендо, фарби за Грамом, індикаторний папір.

Дослідження зводяться до встановлення кількості мікроорганізмів в 1 мл молока.

Чашковий метод (стандартний). Із зразка пастеризованого молока одержують розведення в стерильній воді 1:10; 1:100; 1:1000; сирого – 1:10000; 1:100000; 1:1000000. Якщо передбачається інтенсивне обсіменіння молока, розведення можуть бути взяті ще в більшій кратності.

В бактеріологічні чашки засівають по 1 мл від кожного розведення молока і заливають 12-15 мл розплавленого і остудженого до 45°C живильного агару (м'ясо-пептонний агар). Засіяні чашки поміщають на дві доби в термостат при температурі 37°C, після чого підраховують колонії в кожній окремій чашці, використовуючи лупу із збільшенням у 8-10 разів. Практично дуже зручно при великій кількості колоній, що вирости, підраховувати їх по секторах чашки, розкреслених на дні. Дно чашки розкреслюють на 4 і більше однакових секторів і підраховують

кількість колоній в 2-3 секторах при умові, якщо вони охоплюють не менше одну третину чашки. Потім виводять середнє арифметичне для цих секторів і множать на кількість всіх розкреслених секторів. Число колоній кожної чашки множать на ступінь розведення молока. Так роблять з кожною засіяною чашкою. Суму колоній у всіх чашках ділять на кількість чашок і таким чином встановлюють показник мікробного обсіменіння 1 мл молока.

Молоко вважають нормальним, якщо в якнайменшому розведенні знаходять не менше 50 колоній, а в найбільшому – не більше 300.

Спосіб розрахунку по Фросту є менш трудомістким методом і полягає в наступному: 0,1 мл молока (розведеного) з краплею живильного агару швидко і рівномірно розподіляють на стерильному предметному склі, площа мазка повинна бути 1 см². Потім предметне скло поміщають у вологу камеру і тримають в термостаті при температурі 30°C протягом 8-10 годин.

Кількість колоній, знайдених під мікроскопом на площі мазка, помножене на 10, буде становити число колоній в 1 мл розведеного молока. Цей метод іноді називають «методом мікропластинок».

Підрахунок мікробів по Бріду є ще більш доступним методом для практичної експертизи молока. Його використовують в тих випадках, коли підозрюють значне мікробне обсіменіння продукту. 0,01 мл розведеного молока розподіляють рівномірно на ділянці предметного скла площею 1 см². Мазок висушують на повітрі, фіксують спиртом і фарбують метиленовим синім. Після цього під мікроскопом з імерсійною системою підраховують загальну кількість мікроорганізмів у мазку. Кількість мікробів, знайдених на всій площі мазка, помножене на 100, і кратність розведення відповідатиме кількості їх в 1 мл розведеного

молока.

Молоко пастеризоване, пляшкове і в пакетах групи А повинне мати в 1 мл не більше 75 000 бактерій, пастеризоване групи Б – не більше 150 000 і пастеризоване у флягах і цистернах – не більше 300 000 мікроорганізмів.

Сире молоко по ступеню мікробного обсіменіння ще до цих пір не регламентовано.

Заняття 4. Визначення колі-титру в молоці

Мета заняття: засвоєння методик визначення колі-титру в молоці.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі, термостат, хімічні пробірки, мікроскопи, живильні середовища Ендо, фарби за Грамом, індикаторний папір.

Колі титром (бродильним титром) називають найменшу кількість молока, в мілілітрах, в якому виявляються хоч би одну клітину кишкової палички.

Типовою кишковою паличкою є мікроорганізм для якого характерно: малорухливий, грамнегативний, морфологічно відповідний *E. coli*, зброджує глюкозу з утворенням газу і кислоти.

Колі-титр характеризує санітарно-гігієнічний режим отримання і обробки молока і умови утримання корів.

Відповідно до державного стандарту 9225-68 при аналізі пастеризованого молока роблять посів в шість пробірок з середовищем для культивування: в три пробірки по 1 мл, в три – по 0,1 мл молока від кожного розведення.

Для посіву при визначенні колі-титру використовують середовище Кесслера. В пробірки з цим середовищем вносять по 1 мл розведеного

молока і після обережного перемішування (уникати утворення міхурців газу) ставлять їх в термостат при температурі 43°C на 18-48 г. Прояв наявності кишкової палички свідчить утворення газу. Відсутність газоутворення через 48 г є показником того, що молоко не містить кишкової палички.

З пробірок з середовищем Кесслера, в яких було виявлено газоутворення, необхідно зробити посів на середовище Ендо. Дно чашки ділять на чотири сектори і з кожної пробірки проводять посів в окремий сектор. Посіви в чашках (кришками до низу) витримують в термостаті при температурі 37°C протягом 18-24 годин. Відсутність червоних, нерідко з металевим блиском або без нього, рожевих, блідо-рожевих колоній вказує на те, що досліджуване молоко немає кишкової палички.

За наявності колоній, типових для кишкової палички, а також безбарвних виділяють чисті культури і проводять бактеріоскопічне дослідження препаратів. Для цього з підозрілих колоній роблять посів в пробірки з м'ясо-пептонним бульйоном, витримують посіви в термостаті при температурі 37°C протягом 2,5-3 годин, потім готують препарати, фарбують за Грамом і встановлюють чистоту культури, морфологію мікроорганізму і відношення його до фарбування за Грамом. Бактерії групи кишкової палички грамнегативні.

З отриманої чистої культури роблять посів на середовище Козера і середовище з глюкозою. Засіваючи пробірки з середовищем Козера необхідно витримувати в термостаті при 37°C, а з глюкозою – при 43°C протягом 18-24 годин. Посів проводять піпеткою місткістю 1 мл шляхом введення в пробірку з середовищем трьох крапель виділеної культури.

Якщо бактерій кишкової палички немає, то середовище з глюкозою не змінюється. Поява кислоти і газу в середовищі з глюкозою і

відсутність росту на середовищі Козера вказуватимуть на наявність бактерій групи кишкової палички.

Зміна кольору середовища Козера (з оливково-зеленого до волошкового) свідчить про наявність бактерій, що належать до групи кишкової палички, але таких, які не враховуються при визначенні колі-титру.

Стандарт передбачає при встановленні колі-титру пастеризованого молока враховувати результати таким чином: якщо ні в одній з пробірок кишкової палички не знайдено, то титр вважають «більше 3 мл»; якщо в одній з трьох пробірок з 1 мл продукту виявлена кишкова паличка, то титр приймають за «3мл»; якщо кишкова паличка відзначена в посівах в п'яти або у всіх об'ємах продукту, то титр «менше 0,3 мл»; в решті випадків колі-титр буде «0,3 мл».

Для сирого молока, що продається на ринках, встановленого титру кишкової палички немає, тому куплене молоко перед вживанням необхідно кип'ятити.

Визначення колі-титру за допомогою індикаторного паперу. Як індикатор при виготовленні індикаторних паперів використовується трифенілтетразоліум хлористий, який під впливом ферментів мікроорганізмів відновлюється до формазану, що має червоний колір. Кишкова паличка, що знаходиться в молоці, добре розвивається (на відміну від інших мікроорганізмів) в живильному середовищі з 0,2% трифенілтетразоліуму хлористого, на цьому засновано визначення кишкової палички в молоці.

Індикаторні папірці надзвичайно чутливі до світла, тому їх необхідно тримати в поліетиленових пакетах, вкладених в пакети з чорного паперу. Виймають папір з пакетів безпосередньо перед використанням.

Пастеризоване молоко можна досліджувати в нерозведеному вигляді або після розведення фізіологічним розчином 1:10, сире – тільки в розведеному стані (від 1:100 до 1:10000).

Поліетиленовий пакетик з індикаторним папером розрізають з тієї сторони, де є перфорація, витягують папір і змочують в досліджуваній рідині (молоці), занурюючи на 3 с. Надлишок вологи видаляють дотиком кінчика паперу до стінки пробірки. Папір вбирає 1 або 0,5 мл досліджуваної рідини (молока). Після цього папір знову поміщають в поліетиленовий пакетик і перфорований кінець видаляють. Щоб видалити повітря з пакетика і щоб плівка щільно прилягла до змоченого паперу, пакетик добре розгладжують і розрізаний кінець запаюють.

Заняття 5. Визначення загального мікробного обсіменіння молока

Мета заняття: ознайомлення здобувачів вищої освіти з методами визначення загального мікробного обсіменіння молока.

Матеріали та обладнання: редуктазник, хімічні пробірки, водяна баня, метиленовий блакитний, резазурин.

Проба на редуктазу з метиленовим блакитним є непрямим показником бактерійного обсеменіння непастеризованого молока.

В хімічну пробірку наливають 1 мл робочого розчину метиленового блакитного і 20 мл досліджуваного молока. Пробірка повинна бути щільно закрита корком. Після перемішування вмісту пробірку ставлять у водяну баню з температурою 38°C через 20 хвилин, через 2 години і через 5 годин 30 хвилин спостерігають за знебарвленням вмісту пробірки.

Час знебарвлення вмісту пробірки пов'язаний з кількістю мікроорганізмів в молоці, які виробляють фермент редуктазу. За часом знебарвлення встановлюють приблизне бактерійне обсеменіння молока і

його доброякісність.

Редуктазная проба з резазурином є прискореним методом визначення приблизної кількості мікроорганізмів в молоці. В чисті пробірки набирають по 10 мл молока і по 1 мл 0,005%-го водного розчину резазурину. Пробірки закривають стерильними корками, обережно перевертають кілька разів, ставлять у водяну баню при 38-40°C і засікають час. Спостереження ведуть через 20 хв і 1 годину (пробірки в цей період не можна струшувати і перевертати). Необхідно мати контрольну пробірку з молоком і розчином резазурину, приготовану безпосередньо перед обліком результатів дослідження.

Резазурин під впливом редуктази легко віддає кисень, відновлюючись в резозурин рожевого кольору. Резазурин, відновлюючись в резозурин, змінює колір молока в пробірці від блакитного до рожевого, а при подальшому гідруванні – до безбарвного гідрорезозурина.

Резазуринова проба дає можливість порівняно швидше, ніж з метиленовим блакитним, отримати результати оцінки молока за ступенем бактерійної чистоти, але слід ураховувати, що ця проба дає помилкові показники за наявності в молоці великої кількості клітинних елементів (в результаті маститу), попадання молозива, пізньої лактації. Отже, її можна використовувати як додатковий метод, оскільки проба з метиленовим блакитним більш точно відповідає на питання про ступінь бактерійного обсіменіння зливного молока.

Проба з трифенілтетразоліумхлоридом. До 5 мл добре змішаного молока додають 0,5 мл 1%-го водного розчину трифенілтетразоліуму хлористого (ТТХ), пробірку струшують і залишають при кімнатній температурі (18-20°C).

Під впливом мікробного ферменту редуктази (стафілококи, кишкова

паличка, сальмонели, стрептококи та ін.) безбарвні солі ТТХ перетворюються на сполуку формазону, що має червоне забарвлення. Залежно від кількості бактерій в молоці червоне забарвлення в пробірці з'являтиметься через різний час. Так, при вмісті в 1 мл молока близько 50 тис. бактерій рожево-червоне забарвлення з'являється через 2–3 години, при 500 тис. мікробних тіл – через 54 хвилини і при 30 млн. бактерій в 1 мл забарвлення в пробі настає через 8 хвилин.

Заняття 6. Визначення чисельності і групового складу мікрофлори молока методом посіву

Мета заняття: Визначити чисельність і груповий склад мікробів шляхом посіву молока на живильні середовища (МПА, СА, стерильне молоко і лактозу).

Матеріали та обладнання: чашки Петрі, стерильна вода в пробірках по 9 мл в кожній, піпетки 2 мл. Середовища: МПА і СА стовпчиком, молоко і лактоза.

Відбір проб. Після ретельного перемішування молока в стерильну колбу наливають 500 мл. Проба молока повинна знаходитися в холодному місці, приблизно при температурі $+6^{\circ}\text{C}$. Посів молока на живильні середовища краще робити відразу ж і не пізніше ніж через 4 години.

Посіви. Чисельність мікробів в молоці встановлюють шляхом посіву його на щільні і рідкі живильні середовища. На щільних живильних середовищах чисельність мікробів визначають по кількості колоній, що вирости; на рідких живильних середовищах – по найменшому розведенню, в якому появився ріст. Оскільки універсального середовища, на якому могли б рости всі мікроорганізми немає, то посіви молока

проводять на МПА – для визначення гнильної мікрофлори; на СА – цвілевих грибів і дріжджів; у пробірки із стерильним молоком – для визначення молочнокислих мікробів; на САК (сусло-агар з крейдою) висівають ті з молочнокислих продуктів, де припускають наявність головним чином молочнокислого стрептокока.

Перш ніж приступити до приготування розведень молока, необхідно знати приблизний вміст в ньому мікробів: у 1 мл свіжого молока від окремих корів містяться десятки тисяч мікробів, збірного молока – сотні тисяч мікробів, збірного заводського молока – сотні тисяч і мільйони мікробів. Чим чисельність мікробів в молоці вища, тим більше треба робити розведень, з таким розрахунком, щоб в останньому розведенні було від 1 до 10 живих мікробних клітин. Розведення готують в пробірках на стерильній воді або ізотонічному розчині натрію хлориду.

Приготування розведень. Стерильною піпеткою вносять до першої пробірки з 9 мл стерильної води 1 мл досліджуваного молока. Виходить розведення 1:10. Новою стерильною піпеткою перемішують розведення 1:10 і 1 мл його переносять в другу пробірку з 9 мл стерильної води. Виходить розведення 1:100 і так далі. Зазвичай роблять 6-7 розведень молока. З метою економії піпеток одночасно по 1 мл необхідного розведення можна вносити і в чашки Петрі. По 1 мл кожного розведення можна вносити і однією піпеткою, але при цьому треба починати внесення молока з найбільшого розведення. Для того, щоб знати, на які середовища і з яких розведень необхідно вносити по 1 мл, написи на чашках Петрі роблять заздалегідь.

Схема посіву. Приготувати вісім розведень досліджуваного молока (від 1:10 до 1:100 млн). Зробити посів: на чашки Петрі з МПА з розведень II, III, IV; на чашки Петрі з СА з розведень I, II, III; у пробірки із

стерильним молоком з розведень III, IV, V, VI, VII; на лактозу з розведень I, II, III, IV, V, VI.

Після внесення розведеного молока (по 1 мл) розплавляють живильні середовища і при охолоджуванні їх до 45°C виливають в чашки Петрі. Живильні середовища обертальними рухами чашок рівномірно розподіляють з досліджуваним матеріалом і залишають для застигання. Потім всі чашки перевертають вверх дном. Чашки з МПА ставлять в термостат при температурі 37°C, з сусло-агаром (СА) – при 25-28°C на 2-3 доби або при кімнатній температурі на триваліший час. Пробірки з молоком (для обліку молочнокислих мікробів) і лактозою (для обліку газотворних мікробів) поміщають в термостат при температурі 30-40°C. На чашках Петрі і пробірках роблять написи з вказівкою дати, живильного середовища, розведення, прізвища здобувача вищої освіти та інше.

Заняття 7. Способи контролю пастеризації молока

Мета заняття: ознайомити здобувачів вищої освіти із способами контролю пастеризації молока.

Матеріали та обладнання: пробірки, водяна баня, бюретки, термометр, хімічні реактиви.

Реакції на пероксидазу. Ці реакції служать для контролю молока, пастеризованого при температурі не нижче 85°C, а також пастеризованого при температурі не нижче 80°C протягом 30 с і при температурі не нижче 75°C протягом 10 хвилин.

Реакція на пероксидазу з парафенілендіаміном. За допомогою цієї реакції можна встановити домішки сирого молока в пастеризованому в кількості 5-10%.

Техніка визначення. В пробірку наливають 5 мл молока, 2,5 мл буферної суміші і після перемішування вмісту пробірку поміщають у водяну баню при температурі 35°C на 3-5 хв. Потім додають в пробірку 6 крапель 0,5%-го розчину перекису водню і 3 краплі 2%-го водного розчину солянокислого парафенілендіаміну, перемішуючи вміст після введення кожного реактиву, і знову ставлять пробірку у водяну баню.

В пробірці з молоком, пастеризованим при вказаному вище режимі, зміни кольору не буде. Якщо режим пастеризації не був витриманий або пастеризоване молоко змішано з сирим, в пробірці з'являється темно-синє забарвлення. Швидка поява темно-синього забарвлення спостерігається в сирому молоці. Під впливом пероксидази відбувається окислення перекисом водню парафенілендіаміну і розчин набуває синє забарвлення.

Реакція на пероксидазу з йодованим крохмалем. В молоці сирому і пастеризованому при температурі нижче 75°C протягом 10 хв або нижче 80°C протягом 30 с, а також в пастеризованому молоці але з домішками сирого молока фермент пероксидаза знаходиться в активному стані. При додаванні в молоко реактивів фермент у присутності перекисі водню легко розкладає її з утворенням активного кисню, який окислює калію йодид з виділенням вільного йоду, молоко з наявністю пероксидази набуває синє забарвлення.

Йод, що виділився, діючи на крохмаль, викликає синє забарвлення молока. В пробі молока пастеризованого з дотриманням режиму, пероксидаза повністю інактивується, і тому реакція негативна.

Техніка визначення. В пробірку наливають 5 мл молока, додають 5 крапель розчину йодованого крохмалю і 5 крапель 0,5%-мл розчину перекисі водню. Після введення кожного реактиву вміст пробірки ретельно перемішують.

В пробірці з пробою правильно пастеризованого молока колір не змінюється. В пробірці з пробою молока, пастеризованого з порушенням режиму або пастеризованого правильно, але з домішками сирого молока, швидко з'являється темно-синє забарвлення, як і в пробі сирого молока. Пізня поява забарвлення (пізніше 2 хв) не береться до уваги, оскільки вона може з'явитися внаслідок розкладання реактиву. Реакцією з йодованим крохмалем можна встановити домішки сирого молока в пастеризованому в кількості 5-10%.

При застосуванні розчинів крохмалю і калію йодиду роздільно, а не у вигляді одного реактиву реакцію потрібно ставити так: в пробірку наливають 5 мл молока, доливають 0,5 мл 1%-го розчину крохмалю і додають 2 краплі 10%-го розчину калію йодиду і 5 крапель 0,5%-го розчину перекисі водню. Далі діють аналогічно з описаним вище.

Реакцією на пероксидазу не можна користуватися для контролю пастеризованого молока при низькій температурі. В цьому випадку, а також для перевірки режимів пастеризації застосовують метод визначення фосфатази. Для аналізу молока, пастеризованого при температурі не нижче 63°C протягом 30 хв і не нижче 72°C протягом 20 с, може бути застосована лише реакція на фосфатазу – фермент, найчутливіший до температурної дії.

Реакція на фосфатазу. Реакцією на фосфатазу встановлюють додавання сирого молока до пастеризованого в кількості не менше 2%.

Фермент фосфатаза якнайменше стійкий до нагрівання в порівнянні зі всіма іншими ферментами молока. Отже, реакцією на фосфатазу можна встановлювати правильність дотримання режиму тривалої пастеризації. Під впливом фосфатази доданий до молока фенолфталеїнфосфат натрію в аміачній суміші гідролізується з появою кольорового ефекту.

Техніка визначення. В пробірку наливають 1 мл досліджуваного молока, 1 мл 0,1%-ного розчину фенолфталеїнфосфату натрію в аміачній буферної суміші і закривають пробірку корком, після ретельного перемішування вмісту пробірку поміщають у водяну баню при 40-45°C. Реакцію перевіряють через 10 хв і через годину.

В пробірці з правильно пастеризованим молоком (фосфатаза інактивована) ніяких змін кольору не спостерігається. При порушенні режиму пастеризації, коли фосфатаза залишається в активному стані, вміст пробірки набуває забарвлення від світлого до яскраво-рожевого. Такий же результат одержують і в тому випадку, якщо молоко сире, пастеризоване, але розбавлене сирим молоком.

Суть реакції на фосфатазу: фенолфталеїнфосфат натрію в лужному середовищі безбарвний, фермент фосфатаза, відщеплюючи від нього фосфат, звільняє фенолфталеїн, який і додає вмісту пробірки червоне забарвлення, а при невеликому вмісті фосфатази – рожеве.

Лактоальбумінова проба заснована на властивості альбумінової фракції білка молока згущатися під впливом нагрівання при температурі вище 80°C. При такому температурному режимі пастеризації білок, що коагулює, залишається на стінках стерилізатора, отже, при постановці лактоальбумінової проби цю фракцію білка знайти не вдається.

Техніка визначення. В колбу або стаканчик наливають 5 мл досліджуваного молока, 20 мл дистильованої води і додають 3 мл 0,1 н. розчину сірчаної кислоти. Казеїн коагульований фільтрують, після чого беруть в пробірку 5 мл прозорого фільтрату і кип'ятять.

Молоко, пастеризоване при температурі вище 80°C, не дає пластівців альбуміну при кип'ятінні проби – фільтрат залишається прозорим. В пробі молока, сирого або пастеризованого при температурі нижче 80°C,

з'являються пластівці альбуміну в різній кількості залежно від ступеня і тривалості нагрівання молока.

Заняття 8. Виявлення мікобактерій туберкульозу в молоці

Мета заняття: вивчення методів виявлення мікобактерій туберкульозу в молоці.

Матеріали та обладнання: хімічні і аглютинаційні пробірки, центрифуга, термостат, мікроскоп, предметні скельця, спиртівки, водяна баня, фарби, свіжа кров кроля, хімічні реактиви.

Перший спосіб. 25 мл досліджуваного молока змішуємо з 2 мл аміаку, 50 мл петролейного ефіру і 50 мл сірчаного ефіру. Суміш ретельно збовтують, відстоюють, після чого нижній шар відсмоктують в окрему пробірку і центрифугують. Мазок, отриманий з осаду, фарбують одним з прийнятих методів і вивчають під мікроскопом.

Другий спосіб. 5 мл досліджуваного молока змішують з 5 мл спирту, 10 мл антиморфіну і 25 мл фізіологічного розчину і суміш центрифугують. Отриманий з осаду мазок фарбують і також вивчають під мікроскопом.

Метод фарбування за Ціль-Нільсеном – препарат, зафіксований над полум'ям, фарбують розчином карболфуксину протягом 1-2 хв з підігріванням до появи пару. Потім фарбу змивають водою і знебарвлюють мазок 5%-ною сірчаною кислотою 5-10 с. Препарат промивають водою, прополіскують в спирті і знов промивають водою, після чого додатково фарбують метиленовим блакитним Леффлера, промивають водою і висушують. Збудник туберкульозу забарвлюється в червоний колір (фон препарату синій).

Метод флотації (по М. М. Дрябіній): до 50 мл молока додають 50 мл

5%-го їдкого калію. Після перемішування на 30 хв у водяну баню при температурі 56-60°C. Потім додають 0,5-1 мл ксилолу і 60-80 мл дистильованої води, закривають пляшку гумовим корком і струшують протягом 10 хв. Підготовлену таким чином пробу молока переливають в колбу з вузьким горлом і залишають у спокої на 45-60 хв при кімнатній температурі.

Суть методу полягає в адсорбуванні ксилолом збудника туберкульозу; при відстоюванні проби ксилол спливає на поверхню у вигляді кільця у вузькій колбі. Звідси цей шар можна легко перенести на предметне скло, зробивши товстий мазок. Мазок знежирюють ефіром, фіксують і фарбують (за Ціль-Нільсеном).

Заняття 9. Виявлення збудника бруцельозу в молоці

Мета заняття: вивчення методів виявлення бруцел в молоці.

Матеріали та обладнання: хімічні і аглютинаційні пробірки, центрифуга, термостат, мікроскоп, предметні скельця, спиртівки, водяна баня, антиген бруцельозу, фарби, свіжа кров кроля, хімічні реактиви.

Кільцева реакція. В аглютинаційні пробірки наливають 1 мл досліджуваного молока і додають краплю кольорового антигену бруцельозу. Для рівномірного розподілу антигену в молоці вміст пробірки струшують і пробірки ставлять в термостат при 37-39°C на годину, після чого читають реакцію.

Найчіткіші показники реакції спостерігають після додаткового витримання пробірок протягом години при кімнатній температурі.

Позитивна реакція характеризується тим, що у верхньому шарі пробірки з'являється кільце, забарвлене в інтенсивно синій колір при деякому проясненні вмісту пробірки.

Негативна реакція – рівномірне зафарбовування вмісту. Шар вершків залишається білого або коричневого кольору.

Сумнівна реакція – наявність слабого зафарбовування кільця без прояснення вмісту пробірки.

При дослідженні молока овець кільцевою реакцією рекомендується розводити молоко 10-20%-ним розчином хлориду натрію або молоком корови (здорової) в співвідношенні 1:1.

Молоко підвищеної кислотності (32-33°Т), молозиво, молоко корів, хворих маститом, і вміст молочної залози сухостойних корів не дають правильних показників по кільцевій реакції. Проби молока, консервовані фенолом або формаліном, розведення пополам водою, і свіжі вершки після їх розведення 10%-ним розчином хлориду натрію 1:1 можна досліджувати по кільцевій реакції.

Реакція полягає в тому, що доданий в молоко корови хворої на бруцельоз забарвлений антиген з'єднується (склеюється) з антитілом. Виникає комплекс антитіло + антиген, який адсорбується на жирових кульках, які при температурній реакції підіймаються на поверхню вмісту пробірки, утворюючи кільце синього кольору. За відсутності антитіл антиген розподіляється рівномірно в молоці і синє кільце не утворюється.

Реакція аглютинації. До 10 мл теплого молока (35-37°С) додають 5 крапель 10%-го сичужного ферменту (на фізіологічному розчині) і поміщають на 5 хв у водяну баню при температурі 38-40°С для швидкого згортання. Молоко, що згорнулося, обводять скляною паличкою по стінці пробірки, центрифугують і отриману сироватку використовують для дослідження. Для реакції беруть по 1 мл сироватки в шести розведеннях (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і 1:160), додають в кожен пробірку по 0,5 мл стандартного антигену, потім пробірки струшують і поміщають на 30 хв в

термостат при 37°C. Після витримування в термостаті проби центрифугують 5 хв при 3000 об/хв і читають реакцію.

Позитивна реакція – в пробірці з'являється осад у вигляді круглого капелюшка, який при збовтуванні розбивається на пластівці і грудочки.

Негативна реакція – осад при збовтуванні утворює рівномірну каламуть.

Одночасно ставлять два контролю: а) контроль антигену на самоаглютинацію: беруть 0,5 мл антигену і додають замість розведення сироватки фізіологічний розчин; б) контроль сироватки на спонтанну аглютинацію: беруть якнайменше розведення сироватки 1:5 і замість антигену додають фізіологічний розчин.

Заняття 10. Виявлення в молоці стафілококів, стафілококового токсину і сальмонел

Мета заняття: вивчення методів визначення в молоці стафілококів, стафілококового токсину і сальмонел.

Матеріали та обладнання: хімічні і аглютинаційні пробірки, центрифуга, термостат, мікроскоп, предметні скельця, спиртівки, водяна баня, фарби, хімічні реактиви.

Виявлення стафілококів в молоці. Молоко, сир, бринза, масло та інші молочні продукти є сприятливим середовищем для росту стафілококів і утворення токсину.

Визначення стафілококів починають з бактеріоскопії, яка дає приблизне уявлення про ступінь обсіменіння продукту. Досліджуваний матеріал засівають на м'ясо-пептонний агар з додаванням 7,5% хлориду натрію і залишають в термостаті при температурі 37°C на 18-48 г, після чого вивчають колонії, що вирости. Круглі з рівними краями, викликають

підозру на стафілококів. З цих колоній беруть мазок, фарбують по Граму і вивчають морфологію мікроорганізмів.

Слід зазначити, що утворення пігменту у стафілококів, що пігментуються, іноді йде сповільнено і при кімнатній температурі може настати через 2-3 доби. Колонії, що вирости, вивчають під мікроскопом і висівають на кров'яний агар. Посіви на кров'яному агарі вивчають через 24 години після витримки в термостаті при температурі 37°C. Токсигенні штами стафілококів, як правило, викликають в середовищі (на кров'яному агарі) гемоліз, що виявляється виникненням навколо колоній зон прояснення.

Реакція плазмокоагуляції. 8 мл свіжої крові кроля змішує з 2 мл 5%-го розчину лимоннокислого натрію. Плазму, отриману після центрифугування цієї суміші, відсмоктують і розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:4, розливають у пробірки по 0,5 мл, вносять по одній петлі добової культури (агаровій) стафілокока і ставлять в термостат при температурі 37°C.

Спостереження за пробірками, поставленими в термостат, проводять через 1, 2, 3 і 24 години. Токсигенні штами стафілокока коагулюють плазму крові протягом 2-10 годин, частіше за все протягом 4 годин. При постановці реакції плазмокоагуляції ставиться контроль – плазма без культури.

Дослідження молока на наявність стафілококового токсину. В бактеріологічні пробірки наливають 2 мл від кожної досліджуваної проби молока, а для контролю в одну пробірку – 2 мл фізіологічного розчину. У всі пробірки додають по 1 краплі розведених 5%-вим розчином лимоннокислого натрію еритроцитів кролика, ретельно струшують і поміщають на 1 годину в термостат при температурі 37°C, після чого

витримують 1 годину при кімнатній температурі, потім центрифугують при 1000 об/хв протягом 10 хв і читають реакцію. Якщо молоко в процесі дослідження згорнеться, то такі проби обліку не підлягають.

Позитивна реакція (токсин є) – еритроцити лізують, стовпчик молока забарвлений в рівномірно червоний колір.

Негативна реакція (відсутність токсину) – молоко над еритроцитами, що осіли, залишається білим.

Контрольна пробірка – еритроцити осідають на дно, фізіологічний розчин над ними не забарвлюється.

Проби молока, що дали позитивну реакцію, перевіряють повторно із специфічною антитоксичною стафілококовою сироваткою. Для цього беруть дві пробірки, наливають в кожну по 2 мл досліджуваного молока, в першу додають 1 краплю еритроцитів кролика, в другу – 1 краплю еритроцитів кролика і 2 АО (антитоксична одиниця) вказаної сироватки. Проби витримують 1 годину в термостаті при 37°C і 1 годину при кімнатній температурі, потім центрифугують при 1000 об/хв протягом 10 хв і остаточно вираховують результат.

Якщо в пробірці без сироватки буде гемоліз, а в пробірці з сироваткою гемоліз відсутній, реакція вважається специфічною. При гемолізі в обох пробірках реакція вважається неспецифічною.

Визначення в молоці сальмонел. Найбільш вірогідними за визначенням в молоці бактерій роду сальмонела і їх типізації є бактеріологічні методи.

З серологічних методів за визначенням в молоці сальмонел рекомендована кільцева реакція з молоком. Техніка постановки і облік реакції є аналогічними кільцевій реакції з молоком, що проводиться при дослідженні на бруцельоз. Хоча чутливість і специфічність реакції не є

стовідсотковою, проте простота виконання і швидкість обліку дозволяє широко застосовувати її у виробничих умовах.

Заняття 11. Способи виявлення молока корів хворих на мастит

Мета заняття: вивчення основних способів визначення молока тварин хворих на мастит.

Матеріали та обладнання: біла фарфорова пластинка, бромтимоловий синій, каталазник Функе, водяна баня, хімічні пробірки, димастин, хімічні реактиви.

Бромтимолова проба. На білу фарфорову пластинку наносять 2-4 краплі досліджуваного молока і 1-2 краплі 0,2%-го спиртового (спирт 60%) розчину бромтимолового синього.

Жовте, зеленувато-жовте або жовто-зелене забарвлення характерне для молока, отриманого від здорової корови. Молоко корів, хворих маститом, залежно від стадії захворювання і його характеру забарвлюється в кольори від синьо-зеленого до жовтуватого.

Можна використовувати для виявлення молока корів, хворих маститом, і інші індикаторні реакції: з розоловою кислотою, з фенолротом та ін. Всі вказані методи базуються на зміні реакції молока. При виникненні маститу, у тому числі і субклінічного, молоко набуває лужну реакцію.

Визначення каталазного числа. Суть методу полягає в тому, що перекис водню легко розщеплюється під впливом ферменту каталази з утворенням води і молекулярного кисню. По кількості кисню, що виділився, можна зробити висновок щодо кількості каталази в молоці.

Каталазне число свіжого молока від здорових корів, як правило, не перевищує 2,5-3 мл. Молоко корів, хворих маститом, має більш високе

каталазне число. Підвищення каталазного числа спостерігається в молозиві до 8-15 мл.

Техніка визначення. Вийнявши з каталазника Функе внутрішню трубку, наливають 15 мл досліджуваного молока, підігрітого до 25°C, і 5 мл 1% перекисі водню. Після перемішування вмісту негайно вставляють внутрішню трубку і визначають рівень молока в ній, опускаючи або піднімаючи її так, щоб рівень молока знаходився біля нульової позначки. Встановлений по шкалі внутрішньої трубки каталазника рівень записують, а каталазник поміщають у водяну баню при температурі 25°C так, щоб він був занурений до пробки. Через 2 години каталазник виймають і визначають рівень молока. Різниця рівнів відповідає об'єму кисню, що виділився, що і називають каталазним числом.

Визначення хлор-цукрового числа. В свіжому молоці здорових корів хлор-цукрове число не перевищує 2-4. Молоко тварин з наявністю запальних процесів в молочній залозі (маститі) має хлор-цукрове число значно вище 4 (залежно від характеру і стадії захворювання). До виявлення хлор-цукрового числа необхідно встановити в досліджуваному молоці кількість хлору і лактози. Хлор-цукрове число обчислюють по формулі:

$$X = X_{\text{л}} * 100/L$$

де: X – хлор- цукрове число; $X_{\text{л}}$ – вміст хлору (хлоридів) в молоці %; L – вміст лактози в молоці %.

Встановлення кількості хлору (хлоридів) в молоці. В мірну колбу місткістю 200 мл наливає 20 мл досліджуваного молока, 100 мл дистильованої води, 10 мл 20%-го розчину сірчанокиислої міді, 8 мл розчину їдкого натрію (1 г на 100 мл води) і 2 мл 10%-го розчину хромовокиислого калію (індикатор).

Слід переконаватися в тому, що отриманий розчин має нейтральну реакцію, інакше його нейтралізують розчином їдкого натрію. Реакцію перевіряють на лакмус. В колбу наливають до поділки дистильовану воду, закривають корком і вміст добре перемішують. Після цього вміст колби фільтрують. Відміряють 100 мл фільтрату і титрують розчином азотнокислого срібла (4,788 г азотнокислого срібла в 1 л води) до появи цегляно-червоного (томатного) кольору.

Кількість азотнокислого срібла, яке пішло на титрування фільтрату, помножене на 10, відповідатиме кількості міліграмів хлору в 100 мл молока.

Лейкоцитарна проба (проба Уайтсайда). На молочно-контрольну пластинку наносять 5 крапель молока і 1 краплю 4%-го їдкого натрію, перемішують паличкою протягом 20 с і визначають результат проби. При запальному процесі в молочній залозі (маститі) на пластинці з'являється желеподібна маса (значна кількість лейкоцитів), а при нормальній кількості лейкоцитів зміни не спостерігаються – проба негативна.

Суть реакції полягає в том, що під впливом лугу лейкоцити розчиняються із звільненням дезоксирибонуклеїнової кислоти (речовина ядра), яка спричиняє ущільнення в пробі.

Проба відстоюванням (по В. І. Мutowіну). В пробірку наливають по 10-15 мл досліджуваного молока і відстоюють його при температурі 4-8°C. Пробірки переглядають спочатку через 2-3 години і остаточно через 16-24 години. В молоці корів з наявністю маститу на дні пробірки з'являється осад білків молока, клітин і мікробів, в якому при мікроскопуванні виявляється значна кількість лейкоцитів. Таке молоко часто буває водянистим, з синюватим відтінком (субклінічна форма). Поява рожевого кольору в шарі вершків свідчитиме про наявність

еритроцитів.

Реакція з димастином. У виїмки молочно-контрольної пластинки поміщають по 1 мл досліджуваного молока (у виїмках відзначений об'єм в 1 мл), потім вносять по 1 мл димастину. Перемішують реактив і молоко обертальними рухами дерев'яною паличкою протягом 7-15 с визначають консистенцію і колір суміші.

Необхідно ураховувати, що при дослідженні молока корів ялових, що самозапускаються, що знаходяться на 6-8-у місяці тільності і хворих гастроентеритами, можна при реакції з димастином побачити желе і червоне або яскраво-червоне забарвлення (підвищена лужність). При ацидотичному стані корів молоко з димастином даватиме жовте фарбування (підвищена кислотність). Якщо ж при такому стані корів виникає мастит, то молоко з димастином даватиме дуже щільне желе оранжево-червоного або червоного кольору. В сумнівних випадках молоко досліджують на титр лізоциму ЛМ.

Заняття 12. Виявлення в молоці антибіотиків

Мета заняття: вивчення основних способів визначення в молоці антибіотиків.

Матеріали та обладнання: тест-культура термофільного стрептококу, мікроскоп, індикатор метиленовий блакитний, чисті пробірки.

Найдоступнішими і експресними слід вважати методи індикації і прямого мікроскопування.

Суть методу прямого мікроскопування полягає в том, що під впливом антибіотиків істотно гальмується розмноження чутливих бактерійних клітин і спостерігається зміна їх морфологічних властивостей, що

встановлюється при мікроскопуванні.

Методи індикації теж засновані на пригніченні розмноження клітин і зміні їх обмінних процесів, що проявляється зміною кольору індикатора.

У всіх випадках як тестмікроб використовують, як правило, чутливий до антибіотиків термофільний стрептокок. Можна використовувати і інші молочнокислі бактерії.

Проба з метиленовим блакитним. Суть і техніка постановки проби ті ж, що і при редуктазній пробі з метиленовим блакитним. Різниця полягає в том, що в тій реакції по відновленню метиленового блакитного визначають ступінь насиченості молока мікроорганізмами, а в цій по зміні кольору індикатора судять про стан внесеної в молоко бактерійної культури. За наявності антибіотика бактерійна культура не розмножується і індикатор не відновлюється.

Техніка визначення. Беруть дві пробірки, в одну з них до 10 мл досліджуваного молока вносять 1 мл робочого розчину метиленового блакитного і 3-4 краплі свіжої культури термофільного стрептокока, приготованого на знежиреному або гідролізованому молоці; інша проба – контрольна. В неї також відміряють 10 мл молока, вільного від антибіотиків, 1 мл метиленового блакитного і 3-4 краплі культури термофільного стрептокока. Після струшування і 3-4-разового перевертання пробірок їх ставлять у водяну баню при 38-40°C. Реакцію читають через 5 годин. За цей час в пробірці з контрольним молоком метиленовий блакитний повинен відновитися – молоко знебарвиться, а в пробірці, якщо в молоці є антибіотик, термофільний стрептокок не буде розвиватись, а значить, колір індикатора не відновиться – молоко матиме синій колір.

Резазуринова проба. Беруть дві пробірки. В одну наливають 10 мл

досліджуваного молока, 1 мл робочого розчину резазурину і додають 3-4 краплі термофільного стрептокока, чутливого до антибіотиків; в другу пробірку – 10 мл молока, вільного від антибіотиків, 1 мл розчину резазурину і 3-4 краплі термофільного стрептокока. Після перемішування пробірки ставлять у водяну баню при 40°C і через 45 хв. читають реакцію. Синьо-сталекий або фіолетово-рожевий колір молока в пробірці вказуватиме на наявність антибіотиків. Суть даної реакції аналогічна пробі з метиленовим блакитним.

Мікроскопічний метод. В стерильну пробірку вливають 10 мл досліджуваного молока, щільно прикривши корком, поміщають її у водяну баню при 80-85°C на 5 хв. і потім охолоджують до 40°C.

В контрольну пробірку наливають 10 мл молока, вільного від антибіотиків, і далі поступають так, як з пробіркою з досліджуваним молоком. Потім в пробірки додають по 3-4 краплі свіжої культури термофільного стрептокока, чутливого до антибіотиків. Пробірки щільно закривають, струшують, перевертають 3-4 раз і поміщають у водяну баню при 40°C на 90 хв. Після витримки пробірок готують мазки, фарбують їх і мікроскопують з імерсійною системою. В препараті з молока, що має антибіотики, розмноження стрептокока буде різко затримано і кількість його буде значно меншою ніж в препараті з контрольного (без антибіотиків) молока.

Заняття 13. Виділення чистих культур молочнокислих бактерій.

Пропіоновокислі бактерії

Мета заняття: Ознайомитися з методикою виділення чистих культур: молочнокислого стрептокока, болгарської та ацидофільної паличок.

Матеріали та обладнання: Культура збудника пропіоновокислого бродіння, метиленовий блакитний, фільтрувальний папір, мікробіологічні петлі, чашки зливні, містки, мікроскопи, колонії молочнокислого стрептокока і ацидофільної палички на агарі в чашках Петрі.

Методика виділення молочнокислих мікробів. Виділення чистої культури молочнокислого стрептокока проводять із сметани хорошої якості або кислого молока. Одну петлю сметани розводять в 10 мл стерильної води і з цього розведення роблять посів на агар з додаванням гідролізованого молока. Чашки Петрі ставлять на 2-3 доби в термостат при температурі 25°C. Ріст переглядають під малим збільшенням мікроскопа (об'єktiv 8). Типові колонії відзначають і пересівають на стерильне знежирене молоко і культивують при температурі 25-30°C.

Після згортання (через 12-24 годин) знежиреного молока проводять мікроскопію. За наявності коротких ланцюжків визначають активність стрептокока шляхом пересівання на нові середовища. Якщо щільний згусток без бульбашок газу утворюється через 10-12 годин, а при мікроскопії виявлена типова культура молочнокислого стрептокока, то такий штам використовують для приготування заквасок.

Виділення чистої культури молочнокислих паличок. Болгарську паличку виділяють шляхом посіву петлі кислого молока в стерильне молоко, ацидофільну паличку – шляхом посіву вмісту шлунково-кишкового тракту людини або тварини на таке ж середовище. Культури вирощують в термостаті при температурі 40-45°C. Через дві доби з пробірок, в яких згорнулося молоко, роблять мазки і проводять мікроскопію. При характерній формі паличок культуру пересівають 4-5 разів і вирощують при тій же температурі.

Для остаточного виділення культури з пробірок з характерним

згустком одну петлю продукту вносять до 10 мл сироваткового агару (до 7,5 г агар-агару, розплавленого в 100 мл води, додають 400 мл молочної сироватки і стерилізують при 112°C протягом 20 хвилин). Під малим збільшенням мікроскопа розглядають характерні колонії, які потім пересівають на знежирене або незбиране молоко. Якщо продукт зброджується через 12-14 годин, то таку культуру залишають в лабораторії для приготування заквасок і кисломолочних продуктів. Лабораторні культури пересівають через тиждень.

Мікроби пропіоновокислого бродіння. Збудником пропіоновокислого бродіння є *Vact. acidi propionici*, або *Propionibacterium*. Такі мікроби широко розповсюджені в природі, їх багато зустрічається в гноєві. Це нерухомі спороутворюючі палички, краще розвиваються в безкисневому середовищі. Деякі з них подібні на коки, грампозитивні. У молоці пропіоновокислі бактерії розвиваються поволі і згортають його на 7-10 добу. Гранична кислотність, що утворюється в молоці пропіоновокислими бактеріями, значно перевищує ту, яка утворюється в цьому продукті деякими молочнокислими мікробами, вона доходить до 160-170°Т. Розвиваються пропіоновокислі бактерії при температурі 30-35°C.

Пропіоновокисле бродіння може перебігати за рахунок молочного цукру і молочної кислоти. При цьому утворюється пропіонова, оцтова кислоти і вуглецю діоксид. Таке бродіння найбільш характерним виявляється в сирах з тривалим терміном дозрівання (швейцарський, радянський). Пропіоновокислі бактерії покращують якість сиру. Оцтова і пропіонова кислоти надають сиру специфічного смаку і аромату. Вуглецю діоксид утворює вічки.

Пропіоновокислі бактерії ростуть на тих же середовищах, що і молочнокислі, але їх ріст виявляється набагато повільніше, пізніше. За формою колоній пропіоновокислі бактерії нагадують молочнокислий стрептокок. Пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну B12. Вони входять до складу пропіоново-ацидофільної бульйонної культури, яка застосовується в тваринництві і служить хорошим профілактичним і лікувальним засобом при багатьох хворобах молодняку сільськогосподарських тварин.

Література

1. Демченко В. А. Ветеринарна мікробіологія та імунологія / В. А. Демченко, В. А. Бортнічук, В. Г. Скибіцький. — К. : Урожай, 1996. — 367 с.
2. ДСТУ 3662-97. Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі.
3. ДСП 4.4.4 011-98. Державні санітарні правила для молокопереробних підприємств, затверджені Постановою Головного державного санітарного лікаря України від 11.09.98.
4. ГРУ 46.14.01-99. Сировина молочна, одержана від корів з господарств неблагополучних щодо інфекційних хвороб.
5. Державний ветеринарно-санітарний контроль та нагляд на державному кордоні та транспорті в Україні : зб. норм правових актів / М. Пацюк, І. Підганюк, А. Годяк. — Львів : Бак 2003. — 332 с.
6. Загаевский И. С. Справочник по ветеринарно-санитарной экспертизе животноводческой продукции / И. С. Загаевский. — К. : Урожай 1976. — 159 с.
7. Загаевский И. С. Ветеринарно – санитарная экспертиза и технология переработки продуктов животноводства / И. С. Загаевский, Ф. А. Жерновский. — изд. 2-е перераб. - М. : Колос, 1970. — 248 с.
8. Кармашов В. М. Индикация патогенных бактерий в молоке и молочных продуктах / В. М. Кармашов. — М. : Колос, 1973. — 222 с.
9. Коган Г. Ф. Маститы и санитарное качество молока / Г. Ф. Коган, Л. П. Горинова. — Минск : Урожай, 1990. — 133 с.
10. Королев Н. С. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов / Н. С. Королев, В. Ф. Семенихина. — М. : Пищ. пром., 1980. — 255 с.

11. Кравців Р. Й. Основи ветеринарно-санітарної експертизи молока : навч. посібник / Р. Й.Кравців. - Львів : Тріада плюс, 2004. – 172 с.
12. Макаров В. А. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства / под ред. В.А. Макарова. — М. : Агропромиздат, 1991. — 680 с.
13. Макаров В. А. Практикум по ветеринарной экспертизе с основами технологии продуктов животноводства / В. А. Макаров. – М. : Агропромиздат, 1987. – 270 с.
14. Мікробіологія молока і молочних продуктів. Практикум : навч. посібник / [О. М. Бергілевич, В.В. Косянчук, Р.Л. Ковальчук та ін.] ; за ред. В. В. Косянчук. – Суми : Університетська книга, 2010. – 205 с.
15. Справочник ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов животноводства / под ред. П. В. Житенко. — М. : Агропромиздат 1989. — 365 с.
16. Харченко С. Н. Мікробіологія / С. Н. Харченко. — К. : Сільгоспосвіта, 1994. — 359 с.
17. Справочник по ветеринарно – санитарной экспертизе пищевых продуктов животноводства / под ред. В. И. Хоменко. – К.: Урожай 1989. – 349 с.

Навчальне видання

МІКРОБІОЛОГІЯ МОЛОКА І МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Методичні рекомендації

Укладачі: **Кириченко** Віктор Анатолійович,
Кот Стах Петрович

Формат 60x84/16 Ум. друк. арк. 5,8

Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №4490 від 20.02.2013р.