

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник
для студентів спеціальності «Харчові технології»

Чернівці
Чернівецький національний університет
2020

УДК 57.083.1:664(075.8)

Т 381

Друкується за ухвалою редакційно-видавничої ради
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

Технічна мікробіологія: навч.-метод. посібник. / Укл.: Васіна Л.М., Чебан Л.М.– Чернівці: Чернівецький національний університет, 2020. – 124 с.

ББК 28.4я7

У виданні подано короткі відомості про особливості організації мікроорганізмів, процеси їх життєдіяльності, біологічну роль та участь у різноманітних технологіях отримання харчових продуктів.

Представлено методики проведення лабораторних робіт, які охоплюють техніку культивування мікроорганізмів, дослідження їх будови та процесів життєдіяльності, приготування нативних та фіксованих препаратів та відображено поля для оформлення результатів проведених експериментів.

Навчальний посібник складений відповідно до програми курсу технічної мікробіології для студентів спеціальності «Харчові технології» вищих навчальних закладів.

© Васіна, 2020

Вступ

Мікробіологія (від грец.-малий, лат.-життя) – наука, предметом вивчення якої є мікроскопічні істоти (мікроорганізми або мікроби), їх біологічні ознаки, систематика, екологія, взаємовідносини з іншими організмами.

У процесі розвитку мікробіології були розроблені оригінальні методи дослідження, багато з яких перейшли з інших дисциплін – біофізики, біохімії, генетики, цитології та ін. За всю історію розвитку перед мікробіологією стояли певні задачі, успішне розв'язання яких сприяло науковому і суспільному прогресу людства. Це у свою чергу стимулювало розвиток спеціалізованих розділів мікробіології:

- **загальної** (вивчає найбільш загальні закономірності, властиві кожній групі перерахованих мікроорганізмів – структуру, метаболізм, генетику, екологію),
- **технічної** (розробка технологій синтезу мікроорганізмами біологічно-активних речовин),
- **сільськогосподарської** (займається вивченням мікроорганізмів, які беруть участь у кругообізі речовин та викликають захворювання рослин),
- **ветеринарної** (вивчає збудників захворювань тварин, розробляє методи їх біологічної діагностики, специфічної профілактики і етіотропного лікування),
- **медичної** (предметом вивчення є патогенні й умовно-патогенні для людини мікроорганізми, а також розробка методів мікробіологічної діагностики, специфічної профілактики й етіотропного лікування викликаних ними інфекційних захворювань),
- **санітарної** (предмет вивчення – санітарно-мікробіологічний стан об'єктів навколишнього середовища, харчових продуктів, напоїв для гігієнічної характеристики оцінки їх як можливого джерела і шляхів передачі інфекції, розробляє методи очищення води, ґрунту, повітря від мікробів, перш за все патогенних),

- **харчової** (розробляє методи отримання харчових продуктів за допомогою мікроорганізмів, а також способи захисту харчових продуктів від мікробного руйнування),
- **фармацевтичної** (вивчає збудників інфекційних захворювань людини і рослин, умови мікробного псування лікарської сировини і контамінації препаратів в процесі виготовлення і зберігання, правила асептики, антисептики, дезінфекції при промислового виготовленні фарматичних препаратів, технічного отримання антимікробних і імунобіологічних препаратів лікувально-профілактичного і діагностичного призначення).

У становленні мікробіології розглядають кілька історичних етапів:

1. Євристичний період розвитку – виникнення уявлень про існування невидимих істот.

2. Описово-морфологічний етап розвитку мікробіології - відкриття мікробів А. ван Левенгуком, який, використовував власноруч сконструйований мікроскоп (зі збільшенням у 200 разів).

3. Експериментальний період – дослідження процесів гниття і бродіння (Я. ван Гельмонт, Шталь, Ж. Л. Бюффон, А. Л. Лавуазьє).

4. Фізіологічний період (пастерівський, «золотий вік мікробіології»). Із 30-х рр. ХІХ в. починається період інтенсивних мікроскопічних спостережень. Л. Пастер вивчав молочнокисле, спиртове, маслянокисле бродіння, „хвороби” вина, захворювання тварин і людини, постулював можливість анаеробного існування, запропонував методи профілактики та боротьби з інфекційними хворобами..

Р. Кох відкрив збудників сибірської виразки, туберкульозу, холери, запровадив введення в мікробіологічну практику методу виділення чистих культур, використання анілінових барвників, імерсійних об'єктивів, мікрофотографування. І.І. Мечников вивчав взаємовідносини макроорганізму-господаря і мікроорганізму-паразита й сформулював фагоцитарну теорію імунітету та теорію антибіозу.

Відомості про активну участь мікроорганізмів у процесах перетворення речовин у природі швидко нагромаджувалися в 70-

80-х рр. XIX ст. У 1877 р. французькі хіміки Т. Шлезинг і А. Мюнц довели мікробіологічну природу процесу нітрифікації. В 1882 р. П. Дегерен відкрив природу процесу денітрифікації та анаеробного розпаду рослинних залишків. М. С. Воронін описав бульбочкові бактерії, а Г. Гельригель і Г. Вільфарт показали їх здатність до азотфіксації. П. А. Костичев створив теорію мікробіологічної природи процесів ґрунтоутворення. Для виділення в лабораторних умовах групи бактерій із певними властивостями С. М. Виноградський запропонував створювати специфічні (елективні) умови, що дають можливість розвиватися лише певній групі організмів – виділив хемолітоавтотрофи. М. Бейеринку належать праці з вивчення фізіології бульбочкових бактерій, процесів азотфіксації, денітрифікації і сульфатредукції.

Розвиток мікробіології на території України пов'язаний з іменами І. Мечникова, Д. Заболотного, М. Гамалії, Л. Тарасевича.

В першій половині XX ст. розвиток мікробіології гальмується відставанням біохімії, генетики, біофізики. В той же час інтенсивно продовжувалося виділення і вивчення збудників інфекційних захворювань.

5. Молекулярно-генетичний період

6. Біотехнологічний період розвитку мікробіології.

Мікроорганізми, що є об'єктом вивчення мікробіології, представлені бактеріями, ммікроскопічними рослинами, тваринами та грибами. Серед них розрізняють представників двох типів клітинної організації - прокаріотичної та еукаріотичної. виявляються серед – найдревніша форма організації життя на Землі, вони з'явилися задовго до виникнення рослин і тварин – близько 3-4 млрд. років тому. На теперішній час – це найчисельніша і найрізноманітніша, яка населяє біосферу Землі. Усі мікроорганізми поділяють на 4 великі царства – бактерії, гриби, найпростіші і віруси. Кожне з них є предметом вивчення окремих розділів мікробіології – бактеріології, мікології, протозоології, вірусології.

Відомо, що існує два типи клітинної організації. Бактерії, як і археї належать до прокаріотів (з'явилися близько 3-4 млрд. років тому, найдревніша, найчисельніша, найрізноманітніша група організмів), що від еукаріот відрізняються рядом ознак:

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| Ознака | Прокаріотична клітина | Еукаріотична клітина |
| Розмір | 0,15-5 мкм | 5 мкм – 20 см |
| Організація генетичного матеріалу | Нуклеоїд (ДНК не відокремлена від цитоплазми мембраною), що складається з 1-ї хромосоми | Ядро (ДНК відокремлена оболонкою), що містить більше 1-ї хромосоми |
| Локалізація ДНК | В нуклеоїді й позахромосомних генетичних елементах | В ядрі, мітохондріях, пластидах |
| Поділ | Бінарний | Мітоз, мейоз |
| Мембранні органели | Відсутні | Наявні одно-, двомембранні органели |
| Рибосоми | 70S | 80S |
| Рух цитоплазми | Відсутній (наявні тубуліно- та актиноподібні білки) | Можливий, наявний цитоскелет |
| Клітинна стінка | Пептидоглікан (переважно) | Целюлоза, хітин, глікокалікс |
| Джгутики | Побудовані з білків, серед яких флагелін | Система мікротрубочок аксонем і базального тільця |

Правила роботи і техніка безпеки в мікробіологічній лабораторії

1. Забороняється ходити у верхньому одязі, класти на столи сумки, портфелі та інші особисті речі.
2. Дозволяється працювати тільки в халатах і косинках (шапочках), які захищають одяг і волосся від забруднення мікроорганізмами, а також запобігають поширенню їх за межами лабораторії.
3. На всіх пробірках і чашках обов'язково вказується назва мікроорганізму, дата його висіву, прізвище студента, номер групи.
4. Під час роботи бактеріологічні петлі й голки знезаражуються прожарюванням у полум'ї пальника. Використані шпатель, предметні та покривні скельця, піпетки кладуть у банки з дезінфікуючим розчином. Класти названі предмети на стіл категорично забороняється.
5. У випадку попадання досліджуваного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат чи взуття необхідно негайно повідомити про це викладача і під його керівництвом провести дезінфекцію.
6. У лабораторії категорично забороняється вживати їжу. Не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час висіву мікроорганізмів).
7. Після закінчення дослідження (заняття) робоче місце дезінфікується, використаний матеріал та інші предмети здаються лаборанту, миються з милом руки.
8. Результати досліджень обов'язково протоколюються. У протоколі записується тема заняття, поставлене завдання, короткий опис ходу роботи, результати заносяться до протоколу у вигляді рисунка з повною назвою об'єкта латиною. Робиться висновок за результатами дослідження.
9. На кожне заняття в групі призначаються чергові. Під час роботи вони стежать за виконанням студентами правил роботи й поведінки в лабораторії.
10. Після закінчення занять чергові здають відпрацьований матеріал на стерилізацію, наводять порядок і провітрюють приміщення.

Лабораторна робота №1
Дослідження морфології мікроорганізмів у живому та
фіксованому стані

Мета заняття: ознайомитися з морфологічною різноманітністю бактерій; засвоїти основні методи дослідження морфології мікроорганізмів у фіксованому стані.

Матеріали й обладнання: знежирені предметні та покривні скельця, фільтрувальний папір, мікроскопи, марлеві серветки, мило, вазелін, водний розчин фуксину, предметні й покривні скельця, мило, бензин, імерсійна олія, промивалка з водою, ванночка зі скляним місточком, мікроскопи, чисті культури мікроорганізмів, настої різних природних матеріалів (гною, сметани, розсолу огірків, капусти, муки, овочів та ін.).

Найпоширенішу й досить різноманітну групу мікроорганізмів складають бактерії. Більшість бактерій – одноклітинні організми з розмірами від 0,5 до 10 мкм. Клітини більшості бактерій мають сферичну, циліндричну чи звивисту форму. Крім того, виявлені галузисті і нитчасті бактерії; бактерії, які утворюють простеки (вирости); бактерії у вигляді півкола (тороїди), правильної шестикутної зірки, трикутної та прямокутної форми тощо.

Форма клітин визначається ригідною клітинною стінкою. Проте у деяких бактерій клітинна стінка є еластичною (спірохети, міксобактерії, флексибактерії) або й зовсім відсутня (мікоплазми, L-форми).

За формою бактерії поділяють на три групи: кулясті, паличкоподібні та скручені.

Кулясті бактерії – коки (*Coccus*), кулясті бактерії з діаметром 0,5–1,2 мкм. Окрім правильної кулястої форми, клітини можуть мати овальну, ланцетоподібну форму (пневмококи) або бобоподібну, форму кофейного зерна (гонококи, менінгококи). Як правило, не мають джгутиків, нерухомі й не утворюють спор (за винятком сечової сарцини (*Sarcina urea*)). Як систематичну ознаку при виділенні родів кулястих бактерій використовують напрям площини поділу клітини та характер взаємного розміщення клітин. Так, розрізняють моно- (одна площина поділу, поодинокі

розміщення), дипло- (одна площина поділу, попарне розміщення), стрепто- (одна площина поділу, розміщення у вигляді лагцюжка), тетракоки (дві площини поділу, розміщення по 4 клітини), сарцини (три площини поділу, пакети клітин по 8-16-32...) та стафілококи (три площини поділу, нагадують виноградне гроно) (рис. 1.).

Паличкоподібні бактерії – найрізноманітніша і найчисленніша група бактерій. Довжина їх клітин коливається від десятих часток мікромметра до 10–15 мкм і більше, діаметр клітини – 0,5–1,0 мкм. Розмір клітин залежить від умов вирощування та віку культури. Паличкоподібні бактерії розрізняють за величиною клітин, їх розміщенням, формою кінців клітини, а також за наявністю або відсутністю джгутиків.

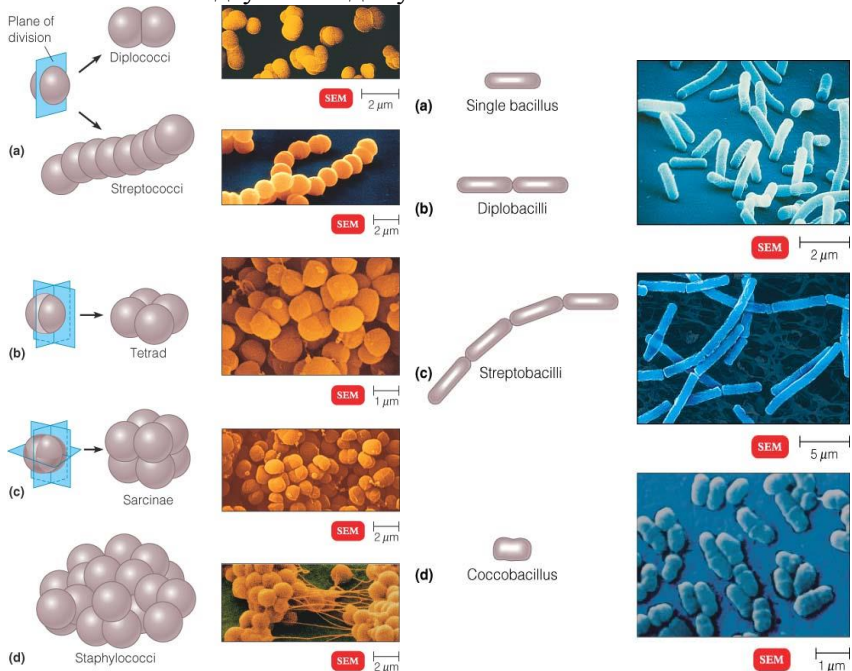


Рис. 1. Різноманітність кулястих та паличководних бактерій <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture2.htm>

Більшість паличкоподібних мікроорганізмів – форми, що не

утворюють спор, отримала назву **бактерій**. Паличкоподібні бактерії, здатні за несприятливих умов формувати спори, прийнято називати **бацилами** або **клостридіями**. Бактерії і бацили розміщуються поодинокі, попарно або з'єднуються в ланцюжки, в останньому випадку їх називають відповідно стрептобактеріями та стрептобацилами (рис. 1). Серед паличкоподібних бактерій зустрічаються як сапрофіти *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, так і патогенні форми *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*.

Скручені (звивисті) бактерії. Залежно від форми та кількості завитків бактеріальні клітини поділяють на три типи: вібріони, спірили та спірохети (рис. 2):

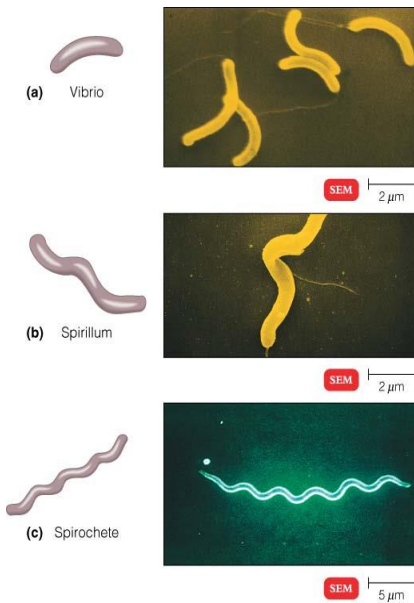


Рис. 2. Звивисті бактерії

вібріони – клітини, що мають форму коротких, зігнутих на 1/3–1/4 оберту паличок у формі коми із довжиною 1–3 мкм. До цієї групи відносять холерний вібріон (*Vibrio cholerae*);

спірили – зігнуті на 2–3 оберти великі клітини, що мають форму латинської букви S (*Spirillum minus*, *Spirillum volutans*);

спірохети – дуже тонкі довгі клітини з великою кількістю дрібних завитків із довжиною, іноді в 5–200 разів більшою за ширину, що досягають 500 мкм. Багато представників спірохет живуть як сапрофіти в намулі водойм, деякі з них – паразити людини і тварин, наприклад: *Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*, *Leptospira interrogans*.

Окрім наведених форм, зустрічаються бактерії, яким властива

морфологічна мінливість – *плеоморфізм*. Вони, залежно від умов існування, можуть набувати форми паличок, коків або галузитися (міксобактерії, корине-бактерії, мікобактерії). Виявлені також рідкісні форми бактерій, подібні до нирки людини, нитчасті, шестикутної чи квадратної форми клітини (рис. 3).

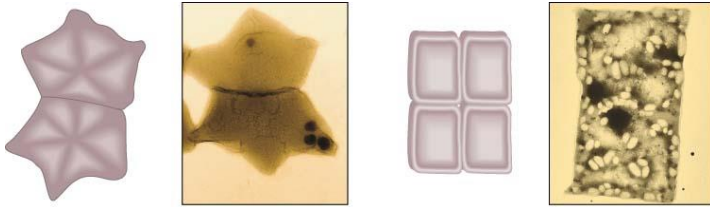


Рис. 3. Рідкісні форми бактерій

Особливе місце в мікросвіті займають актиноміцети. Це бактерії, які галузяться і мають риси подібності з грибами. Вони одноклітинні, як бактерії, і утворюють міцелії, як гриби (*Actinomyces lividans*, *Actinomyces albus*).

Діаметр ниток у цих мікроорганізмів дуже малий, як у бактерій (0,5-0,8 мкм), гіфи міцелію довгі і галузисті, як у грибів. З грибами їх об'єднує також здатність розмножуватися спорами.

Хід роботи:

1. Приготування препарату "роздавлена крапля":

- на чисте знежирене предметне скло бактеріологічною петлею нанести краплину суспензії досліджуваної культури (у випадку роботи з культурами, вирощеними на щільному поживному середовищі, на скло попередньо наносять фізіологічний розчин або змивають мікроорганізми із середовища в пробірку стерильним фізіологічним розчином);

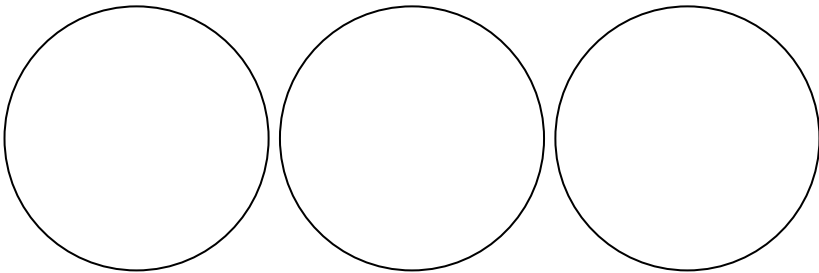
- на край краплі, що знаходиться на предметному склі, помістити ребром покривне скельце під кутом 45° і обережно опустити на поверхню, уникаючи утворення бульбашок повітря. Крапля повинна заповнити весь простір між обома скельцями, не виступаючи за краї покривного скла. Надлишок відібрати за допомогою смужок фільтрувального паперу.

2. Приготування препарату "висяча крапля" (для приготування необхідне предметне скло із заглибленням):

- у центр покривного скельця бактеріологічною петлею або звичайним пером нанести краплю досліджуваного матеріалу;
- змазати краї лунки на предметному склі вазеліновим маслом і перевернути ямкою вниз;
- предметне скло поставити на покривне так, щоб крапля знаходилася в центрі ямки, не торкаючись її країв;
- предметне скло легенько притиснути до покривного й різко перевернути.

В утвореній герметичній камері крапля не висихає, що дозволяє спостерігати за мікроорганізмами тривалий час. При необхідності здійснення тривалого спостереження використовують стерильні скельця, а суспензію мікроорганізмів готують у рідкому поживному середовищі.

Замалювати мікроорганізми виявлені під час мікроскопічного дослідження нативних препаратів і назвати їх:

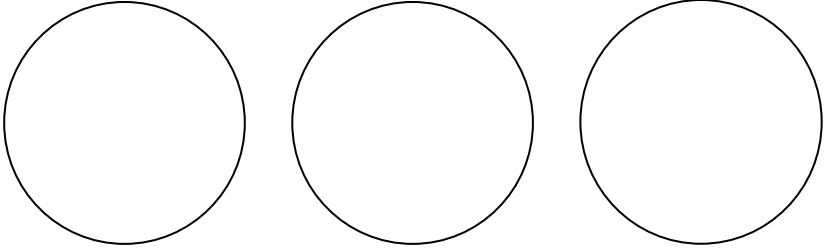


3. Приготування фіксованого, забарвленого мікропрепарату:

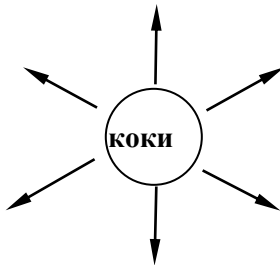
- за допомогою стерильної бактеріологічної петлі нанести на знежирене предметне скло краплю бактеріальної суспензії, зробити мазок і висушити його;
- зафіксувати мазок у полум'ї пальника (час прямої дії полум'я не повинен перевершувати 3–4 с);
- препарат покласти мазком уверх на місток, розташований над ванночкою, нанести піпеткою 2–3 краплі водного розчину фуксину, накриваючи весь мазок (тривалість обробки 2–3 хв);
- промити мазок до знебарвлення промивних вод;

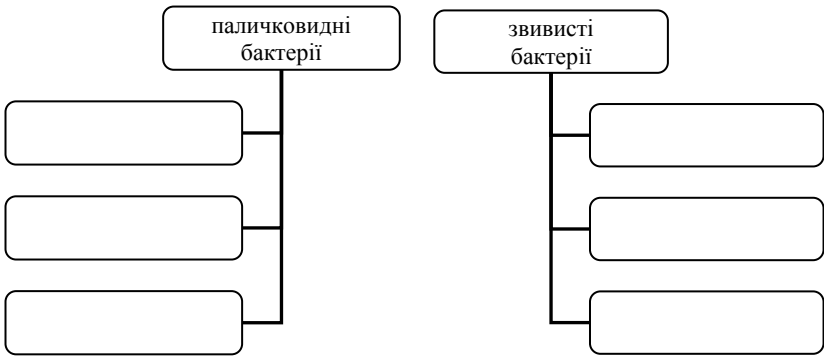
- препарат висушити на повітрі або легко промокнути фільтрувальним папером. Краї і тильну сторону скла добре протерти серветкою.

Промікроскопіювати отримані препарати. Визначити форму мікроорганізмів і замалювати, вказавши їх назву.



Закінчити схеми диференціації кулястих, паличкоподібних, звивистих бактерій:





ВИСНОВОК: _____

Дослідження морфології цвілевих грибів та дріжджів

Мета заняття: ознайомитися з будовою цвілевих грибів, встановити кількість клітин дріжджів у препараті промислових пресованих дріжджів та оцінити їх життєздатність.

Матеріали й обладнання: природні об'єкти цвілевих грибів (грунт, хліб, овочі), 0,1 % суспензія пресованих хлібопекарських дріжджів; мікроскоп; камера Горяєва; препаративні голки, предметні та покривні скельця, метиленовий синій; карболовий фуксин.

Серед еукаріотичних об'єктів мікробіології чільне місце посідають мікроскопічні гриби. Тіло цих еукаріотичних організмів представлене міцелієм чи грибноцею. Це переплетіння тонких галузистих гіфів, що дозволяють грибам кріпитися до будь-якого субстрату. Серед мікроскопічних грибів виокремлюють зигоміцети, аскоміцети та несправжні гриби.

Зигоміцети мають добре розвинений одноклітинний міцелій, що галузиться. Вони розмножуються статевим та безстатевим (спорами) шляхом. Серед найбільш відомих представників – *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*. Ми можемо їх спостерігати як білий чи сірий наліт на рослинних продуктах.

Міцелій цих грибів може як пронизувати субстрат, так і бути орієнтованим на поверхні. Поверх міцелію формуються повітряні гіфи (спорангієносці), на їх кінцях утворюються спорагії. У спорангіях безстатевим шляхом формуються спорангіоспори – ендоспори.

До мікроскопічних грибів із багатоклітинним чи членистим міцелієм відносяться *аскомицети* (сумчасті гриби). Їх назва пов'язана з тим, що спори формуються у спеціальних сумках – асках. Серед представників цього класу вирізняють *еуаскомицетів* (справжні аскоміцети) та *геміаскомицетів*. У перших сумки зі спорами утворюються в результаті статевого процесу на поверхні або всередині плодівих тіл. У геміаскомицетів плодіві тіла відсутні. До геміаскомицетів відносяться більшість дріжджів.

До еуаскомицетів належать два роди ґрунтових грибів – *Penicillium* і *Aspergillus*. Вони характеризуються добре розвиненим

багатоклітинним міцелієм. Ми можемо їх спостерігати як блакитний, зелений, сірий чи рідше інших кольорів наліт на рослинній сировині.

Також багатоклітинними є і *несправжні* гриби. Для них нехарактерний статевий процес. Ці гриби розмножуються безстатевим шляхом за допомогою конідій чи вегетативно – ділянками гіфів. Найбільш розповсюдженими у природі є представники родів *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Зустрічаються на рослинних рештках, плодах, насінні і в ґрунті.

Серед представників роду *Fusarium* є сапрофіти, які живуть в ґрунті та на рослинних рештках, а також паразити багатьох видів рослин.

Колонії різних видів *Fusarium* на живильних середовищах можуть бути білого кольору або зафарбовані в різні відтінки рожевого чи жовтого. Нерідко також спостерігається і пігментація самого живильного середовища.

Приготувавши в краплі води препарат звичайним способом і розглядаючи його під мікроскопом, можна побачити більш чи менш розгалужені конідієносці і дуже характерні для *Fusarium* конідії, так звані макроконідії.

Дріжджі – це сукупна назва одноклітинних еукаріотичних мікроскопічних організмів, які належать до трьох класів грибів – аскоміцети, базидіоцети та дейтероцети (несправжні гриби). Клітини дріжджів мають як правило округлу чи овальну форму, рідше грушевидні чи циліндричні. Їх розміри знаходяться у межах 3-5 мкм до 11-18 мкм. Дріжджі розмножуються вегетативним і статевим шляхом. Спосіб вегетативного розмноження є важливою таксономічною ознакою.

Розрізняють три типи вегетативного розмноження дріжджів: брунькування (роди *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces* та інші), поділ (*Schizosaccharomyces*) та брунькування з наступним поділом (*Saccharomycodes*, *Nadsonia*, *Hanseniospora* та інші). Під час брунькування дозрілі бруньки можуть не відділятися від материнської клітини, внаслідок чого утворюється псевдоміцелій, який з часом розпадається на окремі клітини.

Нестатевими спорами є ендоспори деяких дріжджів родів *Trichosporon*, *Candida*, *Cryptococcus*, хламідоспори деяких родів

Candida, *Metschnikowia* та балістоспори дріжджів родів *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Sporidiolobus*.

Статеве розмноження у дріжджів пов'язане з утворенням спеціальних репродуктивних структур (аски та базидії). У життєвому циклі таких дріжджів спостерігається чергування вегетативного розмноження і спороутворення з різною тривалістю гаплоїдної та диплоїдної стадій.

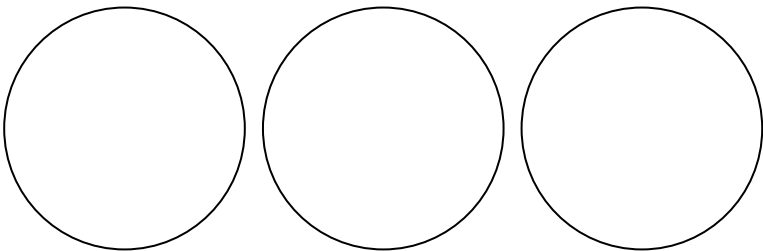
Способи вегетативного розмноження дріжджів вивчають одночасно з морфологічними ознаками клітин.

Хід роботи

1. Ознайомлення з морфологією мікроскопічних грибів

При розгляді будови конідієносців пеніцилу і аспергилу препарувальною голкою вирізають шматочок міцелію, поміщають в краплю води на предметне скло. Зверху кладуть покривне скло. Оскільки міцеліальна плівка гриба досить товста, під покривним склом вода може не повністю намочити міцелій. Тому необхідно додати воду під покривне скло. Препарат спочатку розглядають при малому збільшенні, звертаючи увагу на краї, на них добре видно кисті конідієносців.

Промікроскопіювати отримані препарати. Визначити форму мікроорганізмів і замалювати, вказавши їх назву.



2. Визначення загальної кількості клітин дріжджів

Ретельно перемішують скляною паличкою 0,1 %-ну суспензію пресованих дріжджів. Відбирають одну краплину суспензії, наносять її на сітку камери Горяєва, накривають покривним

скельцем так, щоб рідина рівномірно розподілилась по всій сітці камери.

Камеру Горяєва поміщають на предметний столик мікроскопа і з об'єктивом 8^x знаходять сітку камери, не рухаючи препарат змінюють об'єктив на 40^x. Препарат витримують декілька хвилин для осадження клітин на дно камери Горяєва. Підраховують кількість клітин дріжджів у 10 малих квадратах, пересуваючи камеру так, щоб те саме місце не потрапляло в поле зору декілька разів.

Після закінчення роботи камеру Горяєва ретельно промивають протічною та дистильованою водою, насухо протирають серветкою та поміщають у футляр для зберігання.

Проводять підрахунки:

- знаходять середню кількість дріжджів для 1 малого квадрата;
- знаходять кількість дріжджів у 1 см³ (середнє число дріжджів у 1 малому квадраті множать на 4 000);
- знаходять кількість дріжджів у 1 см³ суспензії (отримане число множать на 1 000);
- підраховують кількість клітин у 1 г пресованих дріжджів за формулою:

$$X = ab/v, \text{ де:}$$

X – кількість клітин у 1 г пресованих дріжджів;

a – кількість дріжджових клітин у 1 см³ суспензії;

b – місткість вимірювальної колби;

v – наважка пресованих дріжджів, г.



3. Визначення відсоткового вмісту мертвих клітин у складі пресованих хлібопекарських дріжджів

Для визначення відсоткового вмісту мертвих клітин дріжджів у пресованих дріжджах беруть краплину ретельно перемішаної 0,1 % суспензії і переносять її на предметне скло. До отриманої суспензії додають краплину метиленового синього і накривають

препарат покривним склом. Через 1÷2 хв мікроскопіюють препарат з об'єктивом 40^x. Підраховують у полі зору кількість зафарбованих (мертвих) та незафарбованих клітин. Розраховують відсоток мертвих клітин до загальної кількості клітин дріжджів.

| Дослідна суспензія дріжджів | Кількість зафарбованих клітин | Кількість незафарбованих клітин | Відсоток мертвих клітин |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | | | |

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №3

Поверхні структури бактеріальних клітин

Мета заняття: ознайомитися з особливостями будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій, типами слизових утворень (капсул, шарів, чохла) та нитчастих поверхневих структур прокариотичних організмів; оволодіти методами виявлення та ідентифікації поверхневих структур бактеріальної клітини.

Матеріали й обладнання: предметні скельця, бактеріальні петлі, спиртівки, ванночка з підставкою для препаратів, промивалка з водою, фільтрувальний папір, розчин Люголя, генціанвіолет, 96% етанол, 1% водний розчин фуксину, мікроскопи, добові культури *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Acetobacter aceti*, *Azotobacter chroococcum*.

Незважаючи на зовнішню простоту, будова мікробної клітини досить складна. Цитоплазма її оточена оболонками, що знаходяться в постійній функціональній взаємодії і визначають: форму клітини (клітинна стінка), біохімічну активність мікробної клітини (цитоплазматична мембрана та мембранні утворення), антигенні властивості (капсула, клітинна стінка).

Кожній з оболонок притаманні свої хімічні й функціональні особливості, покладені в основу їх диференціації.

За будовою і хімічним складом клітинна стінка прокариот різко відрізняється від такої еукариот. До її складу входять унікальні полімерні комплекси. Хімічний склад і будова клітинної стінки постійні для певного виду і є важливою діагностичною ознакою. Залежно від її будови прокариоти, що належать до еубактерій, поділяються на дві великі групи: **грампозитивні** (Грам⁺, Г⁺) та **грамнегативні** (Грам⁻, Г⁻). В основі такого поділу лежить запропонований у 1884 р. датським ученим Х. Грамом (Ch. Gram) спосіб забарвлення, при якому барвники трифенілметанового ряду в комплексі з йодом утримуються чи ні клітинними стінками бактерій при обробці їх спиртом:

- Г⁺ – набувають синього або фіолетового забарвлення за рахунок утворення забарвленого комплексу за послідовної дії

генціанвіолету та йоду, що не вимивається при подальшій обробці етанолом;

- Γ^- – забарвлений комплекс вимивається етанолом, клітини знебарвлюються.

Клітинні стінки грамполозитивних і грамнегативних еубактерій кардинально відрізняються як за хімічним складом, так і за ультраструктурою (рис. 4).

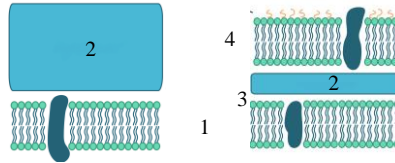


Рис. 4. Будова клітинної стінки грамполозитивних та грамнегативних бактерій: 1 – ЦПМ; 2 – пептидоглікан; 3 – міжмембранний простір; 4 – зовнішня мембрана

Особливості клітинної стінки Γ^+ бактерій:

- Гомогенний електронно-щільний шар товщиною 20–80 нм.
- Щільно прилягає до цитоплазматичної мембрани (ЦПМ).
- 40–90 % маси клітинної стінки складає специфічний гетерополімер – пептидоглікан.
- Полісахаридний остів пептидоглікану побудований із залишків N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних між собою за допомогою 1,4- β -глікозидних зв'язків.
- До N-ацетилмурамової кислоти приєднаний короткий пептидний ланцюг, що складається з невеликого (4-5) числа амінокислот. Для нього характерна:
 - а) наявність амінокислот в D-формі (неприродна конфігурація);
 - б) високий вміст амінокислот з двома аміногрупами (забезпечення просторової організації пептидоглікану).
- Зв'язок між тетра(пента)пептидами різних гліканових остів здійснюється, крім пептидних, і за допомогою інших зв'язків (наприклад, гліцинових містків).
- Мажорним компонентом є унікальний клас хімічних сполук – тейхоеві (ліпотейхоеві) кислоти – полімери, що складаються із залишків рибітолу або гліцеролу, сполучені фосфодіефірними зв'язками, які виконують різноманітні функції:
 - а) є основними антигенами Γ^+ бактерій;

б) визначають поверхневий заряд клітини;
в) вуглеводні компоненти тейхоевих кислот входять до складу рецепторів деяких бактеріофагів, визначаючи можливість адсорбції фагу на клітинній поверхні.

- У незначних кількостях наявні інші полісахариди, білки і ліпіди.

До Γ^+ бактерій належить більшість кулястих бактерій і багато видів паличкоподібних, зокрема бацили, клостридії, стрептококи, стафілококи, сарцини, лактобактерії.

Особливості клітинної стінки Γ^- еубактерій:

- Багатошарова (за даними електронної мікроскопії).

- Нецільно прилягає до ЦПМ, через що між мембраною та пептидоглікановим шаром наявний периплазматичний простір (містить гідролітичні ферменти).

- Пептидоглікан – за хімічною структурою, в основному, схожий до такого Γ^+ бактерій, формуючи шар товщиною 2–3 нм. До його відмінностей відносять:

а) наявність окремих поперечних зв'язків між гетерополімерними ланцюгами,

б) відсутність гліцинових містків,

в) відсутність тейхоевих (ліпотейхоевих) кислот.

- Зовні від пептидоглікану розташовується додатковий шар клітинної стінки – зовнішня мембрана, що складається з фосфоліпідів, білків, ліпопротеїну і ліпополісахариду.

- Специфічний компонент зовнішньої мембрани – ліпополісахарид, локалізований в зовнішньому шарі складної молекулярної будови, що займає близько 30–40% її поверхні.

До Γ^- бактерій належать представники мікрофлори шлунково-кишкового тракту ссавців (ентеробактерії), азотобактерії, ацетобактерії, бульбочкові бактерії, ціанобактерії, багато патогенних видів.

Зовні клітинна стінка прокаріот часто оточена різними **слизовими утвореннями**, які відрізняються за своєю структурою (капсули, шари, чохла). Під **капсулою** розуміють слизове утворення, що має аморфну будову й обволікує клітину, зберігаючи зв'язок із клітинною стінкою. **Слизові шари** мають аморфний, безструктурний вигляд і легко відділяються від

поверхні прокаріотичної клітини. Сильне виділення слизу спостерігається за наявності в середовищі сахарози. **Чохол** являє собою довгу порожнисту трубку, що оточує ланцюжок бактеріальних клітин. На відміну від капсул, чохла мають тонку структуру. Нерідко в них знаходять кілька шарів із різною будовою. Чохли низки бактерій, метаболізм яких пов'язаний з окисненням відновлених сполук металів, часто інкрустовані їх оксидами.

На поверхні клітин багатьох бактерій наявні **джгутики**, кількість яких, розміри та розташування, як правило, є видовими ознаками. Якщо джгутики знаходяться біля полюсів або в полярній ділянці клітини, говорять про їх полярне або субполярне розташування, якщо вздовж бічної поверхні – про латеральне. Залежно від кількості джгутиків та їх локалізації на поверхні клітини розрізняють моно-, лофо-, амфі-, перитрихи.

Зазвичай товщина джгутика 10–20 нм, довжина – 3–15 мкм. Джгутик – відносно жорстка спіраль, звичайно закручена проти годинникової стрілки. Його обертання також здійснюється проти годинникової стрілки з частотою від 40 до 60 об/с, що викликає повертання клітини, але вже у протилежному напрямку. Оскільки клітина набагато масивніша за джгутик, вона обертається зі значно меншою швидкістю – 12–14 об/хв. Обертальний рух джгутика перетворюється в поступальний рух клітини, швидкість якого в рідкому середовищі для різних видів бактерій складає від 16 до 100 мкм/с.

Вивчення будови джгутика під електронним мікроскопом показало, що він складається з трьох частин. Основну його масу складає довга спіральна нитка (філамент, з білка флагеліну), що біля поверхні клітинної стінки переходить у потовщену зігнену структуру – гачок, прикріплений до базального тільця, вмонтованого в клітинну стінку і ЦПМ.

Хід роботи:

1. Приготування препарату, забарвленого за Грамом:

- на фіксований мазок покласти смужку фільтрувального паперу, попередньо просочену генціанвіолетом і нанести 3–5 крапель води (витримати 1–2 хв);
- зняти папірець пінцетом, а на препарат налити розчин Люголя

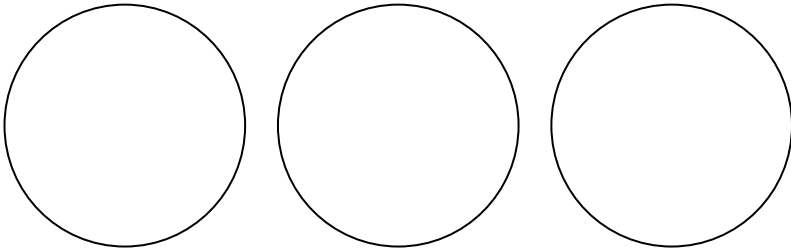
(витримати 1 хв);

- злити розчин Люголя і нанести кілька крапель 96 %-ного спирту (витримати 1–2 хв до зникнення сірувато-фіолетових ниток);
- промити водою і нанести на мазок водний розчин фуксину (витримати 1–2 хв);
- фарбу змити водою, препарат висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати в імерсійній системі.

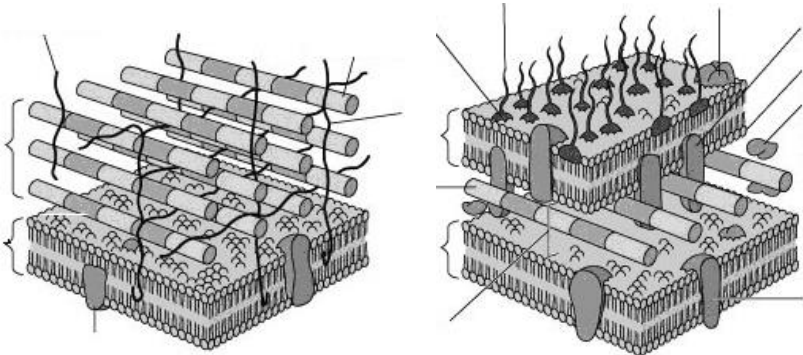
2. Виявлення капсул за методом Буррі:

- на чисте знежирене предметне скло нанести краплю туші та змішати її з краплею суспензії *Azotobacter chroococcum* або *Bacillus megaterium*;
- виготовити мазок за типом «мазка крові» і висушити на повітрі;
- промікроскопіювати з імерсією.

Замалювати Гр⁺ і Гр⁻ бактерії, зобразити бактеріальні капсули та клітини:



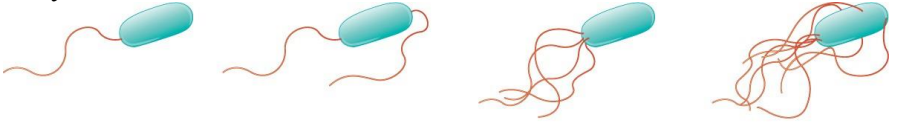
Вказати, яка з наведених схем характеризує клітинну стінку Гр⁺, яка Гр⁻ бактерій. Назвати їх структурні компоненти:



A

B

Як називаються бактерії з відповідним розташуванням джгутиків:



ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №4

Особливості будови внутрішньоклітинних структур мікроорганізмів

Мета заняття: ознайомитися з особливостями будови і функціонування внутрішньоклітинних структур прокариот та оволодіти технікою приготування мікробіологічних препаратів для виявлення клітинних включень.

Матеріали й обладнання: мікроскопи, предметні та покривні скельця, бактеріальні петлі, спиртівки, ванночка з підставкою для препаратів, промивалка з водою, фільтрувальний папір, барвники, фіксатор, бактеріальні культури.

Вся генетична інформація прокариот міститься в одній молекулі ДНК, що має форму ковалентно замкненого кільця й отримала назву бактеріальної хромосоми. Довжина молекули в розгорненому вигляді може складати більше 1 мм (1000 разів перевищувати клітину). Лінійні хромосоми виявлені у *Streptomyces*, *Borrelia*.

Хромосома прокариот – високовпорядкована структура, яка має константу седиментації 1300-2000S для вільної і 3200-7000S для пов'язаної з мембраною форми. ДНК прокариот щільно упакована і малодоступна для дії ферментів (РНК-полімерази). Тому транскрипція можлива не в основній масі ДНК, а лише на поверхні нуклеоїду.

Хромосоми більшості прокариот мають молекулярну масу в межах $1-3 \times 10^9$ Да. У групі мікоплазм генетичний матеріал представлений молекулами, що мають найменшу для клітинних організмів кількість ДНК ($0,4-0,8 \times 10^9$), а найбільший вміст ДНК виявлений у нитчастих ціанобактерій ($8,5 \times 10^9$). Хоча кожна прокариотична клітина містить 1 хромосому, часто в культурі мікроорганізмів і за дії на них певних чинників кількість ДНК на клітину може складати 3, 4, 8 і більше хромосом.

У клітинах більшості прокариот не виявлено гістонів, тому нейтралізація зарядів здійснюється взаємодією ДНК із поліамінами (сперміном і спермідіном), а також з іонами Mg^{2+} . Останнім часом у деяких архебактерій і ціанобактерій виявлені гістони і гістоноподобні білки, пов'язані з ДНК.

Поділ молекули ДНК (реплікація) відбувається за напівконсервативним механізмом і в нормі завжди передує поділу клітини. За допомогою електронного мікроскопа встановлено, що реплікація ДНК починається в точці прикріплення кільцевої хромосоми до ЦПМ, де локалізований ферментативний апарат, відповідальний за реплікацію. Часто контакт ДНК із ЦПМ здійснюється за допомогою мезосом. Реплікація, що почалася в точці прикріплення, йде потім у двох протилежних напрямках, утворюючи характерні для кільцевої хромосоми проміжні структури. Дочірні хромосоми залишаються прикріпленими до мембрани. Реплікація молекул ДНК відбувається паралельно із синтезом мембрани в ділянці контакту ДНК з ЦПМ. Це приводить до розділення дочірніх молекул ДНК і оформлення відособлених хромосом.

У багатьох бактерій виявлені позахромосомні генетичні елементи: **плазмід**, **помірні фаги** і **мігруючі елементи** (транспозони і IS-елементи - insertion sequences). Для плазмід характерне стабільне існування в нехромосомному стані. Транспозони і IS-елементи входять, як правило, до складу хромосом, але здатні переходити з хромосоми у плазмід, тому також можуть бути віднесені до нехромосомних генетичних елементів.

Вважають, що в бактеріальній хромосомі локалізована генетична інформація, необхідна для існування конкретного виду бактерій у певному діапазоні умов зовнішнього середовища. Особливість генетичної інформації, що міститься в позахромосомних елементах – її необов'язковість для життєдіяльності бактерій. Проте вони розширюють можливості існування бактеріального виду, забезпечують обмін генетичним матеріалом і відіграють певну роль в еволюції прокариот.

Кількість плазмідної ДНК у клітині складає не більше кількох відсотків від клітинного геному, а кількість плазмід коливається від 1 до 38. Плазмід – це кільцеві ковалентно замкнені молекули ДНК, що містять від 1500 до 40000 пар нуклеотидів. Нещодавно виявлені лінійні плазмід у *Streptomyces*, *Borrelia*, *Rhodococcus* – вони мають великі розміри, їх важко відрізнити від хромосоми. Більшість плазмід складаються з трьох груп генів: а) відповідальних за автономну реплікацію плазмід; б) забезпечення

перенесення плазмід з однієї клітини в іншу; в) визначають корисні для клітини-господаря властивості.

Відомо більше 20 типів плазмід:

- F – статевий фактор, що контролює синтез статевих ворсинок. Передається при кон'югації в клітину-реципієнта;
- R – велика кількість плазмід, що визначають стійкість до лікарських засобів. Передача їх від одних бактерій до інших призвела до широкого розповсюдження серед патогенних й умовно-патогенних бактерій, що ускладнює хіміотерапію.;
- плазміди патогенності – контролюють вірулентні властивості бактерій і токсиноутворення;
- бактеріоциногенні – кодують бактеріоцини, що згубно впливають на бактерії того ж виду чи близьких – коліцини, пестіцини, вібріоцини, стафілоцини;
- плазміди, що кодують ендонуклеази і метилтрансферази, які здійснюють захист від фагової інфекції та чужерідної ДНК;
- Ті-плазміда (500 т.п.н.) *Agrobacterium tumerfaciens* індукує утворення пухлин;
- плазміди біодеградації несуть інформацію про утилізацію цукрів, білків, найрізноманітніших речовин (псевдомонади утилізують октан, декан, ароматичні вуглеводні, хлоровмісні сполуки), кодують усі ферменти такого шляху деградації або лише частину з них – метабіоз різних мікроорганізмів.

Мігруючі елементи представлені **транспозонами і IS-елементами**. Це лінійні молекули двониткової ДНК, розміри яких коливаються від 200 до 6000 пар нуклеотидів. Відмінна особливість мігруючих елементів – нездатність до автономної реплікації. Мігруючі елементи можуть вбудовуватися в різні ділянки бактеріальної хромосоми або мігрувати з бактеріальної хромосоми на плазмиду; їх реплікація здійснюється під контролем тих же механізмів, що й у відповідній хромосоми або плазмиди. IS-елементи містять лише інформацію необхідну для їх перенесення всередину клітини. Транспозони побудовані складніше: в них вміщені деякі гени, що не причетні до процесу транспозиції (наприклад, гени стійкості до антибіотиків, іонів важких металів та інших інгібіторів).

Зміни бактеріальних клітин можна розділити на два типи:

I. Виявляються в переважній більшості особин у популяції під час зміни зовнішніх умов і спостерігаються доти, поки діє чинник, що викликав ці зміни. Такий тип мінливості отримав назву неспадкової, або **модифікаційної**. Модифікація – зміна, що відбувається на рівні фенотипу і не торкається клітинного генотипу. Реакція клітини на зміну зовнішніх умов приводить до появи нових ознак, властивостей, які не виявлялися в початковій культурі. Модифікація – результат пластичності клітинного метаболізму, що приводить до фенотипічного прояву „мовчазних” генів. Існує кілька типів модифікаційних змін. Найвідоміші адаптивні модифікації, наприклад, адаптація *E. coli* до лактози як нового субстрату, синтез білків теплового шоку. Адаптивні модифікації розширюють можливості організму до виживання та розмноження в широкому діапазоні умов зовнішнього середовища. Біохімічною основою їх слугує синтез індукцибельних ферментів.

II. Ознаки, які спочатку виникають як рідкісні події в популяції особин (з частотою 1 на 10^4 — 10^{11} клітин). Якщо змінені особини мають перевагу перед незміненими (наприклад, підвищена швидкість росту, інтенсивна життєздатність), вони поступово нагромаджуються в популяції та витісняють початкові особини. Ці зміни передаються з покоління в покоління. Такий тип мінливості отримав назву **спадкової**. Спадкові зміни можна поділити на зміни, що виникають у результаті мутацій і рекомбінацій генетичного матеріалу.

У результаті рекомбінації генетичного матеріалу відбувається часткове об'єднання геномів двох кліток. Відомі три основні способи, що приводять до рекомбінації генетичного матеріалу прокаріот:

1) При **кон'югації**, для якої необхідний безпосередній контакт між бактеріальними клітинами, здійснюється направлене перенесення генетичного матеріалу від клітини-донора в клітину-реципієнта. Процес виявлений Дж. Ледербергом і Е. Тейтумом у 1946 р. під час дослідженні *E. coli*. Звичайно клітини *E. coli* синтезують усі необхідні їм амінокислоти, якщо в середовищі міститься достатньо глюкози і неорганічних солей. Експерименти проводили з двома групами мутантних штамів (утворилися за дії УФ): мутантами, не здатними синтезувати біотин і метіонін і мутантами, не здатними синтезувати треонін і лейцин. При цьому

використовували поживне середовище, що не містило жодного з означених факторів росту. У середовище вносили по 10 клітин кожного штаму. Отримано кілька сотень колоній, в яких були всі гени, необхідні для утворення 4-х факторів.

II) **Трансформація** бактерій полягає в перенесенні ДНК, виділеної з одних клітин в інші. Для трансформації не потрібен безпосередній контакт між двома клітинами. Здатність ДНК проникати в клітину-реципієнта залежить як від природи самої ДНК, так і від фізіологічного стану клітини-реципієнта. Трансформуючими ДНК можуть бути тільки високомолекулярні дволанцюгові фрагменти, при цьому проникати в бактеріальну клітку може ДНК, виділена з різних біологічних джерел, але включатися в геном – тільки ДНК із певним ступенем гомологічності. Після того, як екзогенний фрагмент ДНК, що проник у клітину, знайшов гомологічний фрагмент ДНК реципієнта, між ними відбувається генетичний обмін аналогічний останньому етапу кон'югації.

Відкрита у 1928 р. Ф. Грифитсом у дослідах з авірулентним безкапсульним штамом пневмокока, який набув вірулентності.

III) **Трансдукція** – перенесення генів із однієї бактеріальної клітини в іншу за допомогою фагів. Цей вид генетичного обміну відкритий Н. Ціндером і Дж. Ледербергом у 1951 році. абортивну трансдукцію – перенесений фагом фрагмент ДНК бактерії-донора не включається в хромосому бактерії-реципієнта, а розміщується в її цитоплазмі і може там функціонувати.

У цитоплазмі прокаріот виявляють різноманітні включення, що є: активно функціонуючими структурами, продуктами клітинного метаболізму, які не виділяються назовні, структурами адаптивного значення, запасуючими речовинами.

До внутрішньцитоплазматичних включень, що виконують певну функцію у фотосинтезі, належать **хлоросоми** зелених бактерій і **фікобілісоми** ціанобактерій. У цих структурах локалізовані пігменти, що поглинають кванти світла і передають їх у реакційні центри.

У клітинах деяких прокаріот із груп фототрофних і хемолітотрофних (*Nitrosomonas*, *Thiobacillus*) еубактерій містяться структури, що мають форму багатогранника з 4-6 сторонами і діаметром 90-500 нм – **карбокисоми**, або полідральні тіла.

Заповнені гранулярним вмістом і оточені одношаровою мембраною білкової природи товщиною 3 нм. Карбоксисоми складаються з частинок рибулозодифосфаткарбоксилази, ферменту, що каталізує фіксацію CO₂ на рибулозодифосфаті у відновному пентозофосфатному циклі.

Прикладом внутрішньоцитоплазматичних включень, що мають адаптивне значення, слугують **магнітосоми** і газові вакуолі, або **аеросоми**. Основна функція газових вакуолей – забезпечення плавучості водних організмів, які за їх допомогою можуть регулювати глибину.

Запасаючі речовини прокаріот представлені полісахаридами, ліпідами, поліпептидами, поліфосфатами, нагромадженнями сірки.

Із полісахаридів у клітинах відкладаються глікоген (*Bacillus polymyxa*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter*), крохмаль (*Acetobacter pasteurianus*, *Neisseria*) і крохмалоподібна речовина – гранульоза (*Clostridium*). У несприятливих умовах вони використовуються як джерело вуглецю й енергії.

Ліпіди нагромаджуються у вигляді гранул, що різко заломлюють світло й тому добре помітні у світловий мікроскоп. Запасаюча речовина такого типу – полімер β-оксимасяної кислоти. У деяких бактерій, що окислюють вуглеводні, полі-β-оксимасяна кислота складає до 70% сухої речовини клітин. Ліпіди слугують для клітини джерелом вуглецю й енергії. Мікобактерії, актиноміцети, нокардії нагромаджують воски і навіть виділяють їх у середовище.

Поліфосфати містяться у волютинових (термін зумовлений видовою назвою бактерії, де вперше виявлені – *Spirillum volutans*) гранулах (метахроматинних зернах). Використовуються клітинами як джерело фосфору. Поліфосфати містять макроергічні зв'язки, а тому – це депо енергії, хоча вважається, що їх роль у цьому випадку незначна.

Специфічна запасаюча речовина ціанобактерій – ціанофіцинові гранули. Хімічний аналіз показав, що вони складаються з поліпептиду, який містить аргінін і аспартат в еквімолярних кількостях. Для синтезу ціанофіцину необхідні молекули АТФ, іони K⁺ і Mg²⁺.

Для прокариот, метаболізм яких пов'язаний зі сполуками сірки, характерне відкладення в клітинах молекулярної сірки. Сірка нагромаджується, коли в середовищі міститься сірководень, і окислюється до сульфату, коли весь сірководень середовища вичерпується. Для тіонових аеробних бактерій (*Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiovulum*, *Achromatium*) сірка слугує джерелом енергії, а для анаеробних фотосинтезуючих сіркобактерій (*Chromatium*) вона – донор електронів.

Кристалоподібні включення білкової природи – протоксини (використовуються як біоінсектициди) – характерні для *Bacillus thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. medusa*.

Усі запасуючі речовини знаходяться в осмотично неактивному стані, в ряді випадків відмежовані від цитоплазми білковою мембраною.

Хід роботи:

1. Виявлення включення глікогену (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus megaterium*) та гранульози (*Clostridium pasterianum*):

- на предметне скло нанести краплину суспензії бактерій, у яку додати розчин Люголя;
- накрити покривним скельцем.

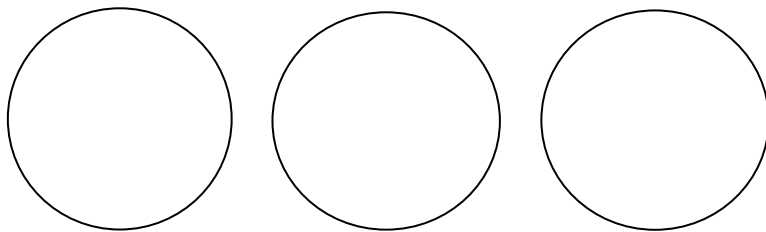
2. Виявлення включення волютину у дріжджів (за методом Лефлера):

- приготувати тонкий мазок *Saccharomyces cerevisiae*, висушити на повітрі і зафіксувати над полум'ям пальника;
- препарат зафарбувати синькою Лефлера чи толуїдиновим синім протягом 10 с;
- барвник змити водою, препарат висушити.

3. Виявлення жирових включень:

- на предметне скло нанести краплину суспензії культури *Saccharomyces cerevisiae*;
- додати краплину 40 %-ного формаліну і витримати 5 хв;
- додати краплю метиленового синього (1:40) і залишити на 10 хв;
- на препарат нанести краплю спиртового розчину судану III, накрити покривним скельцем.

Промікроскопіювати отримані препарати, замалювати їх і назвати мікроорганізми.



ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №5
**Особливості живлення мікроорганізмів.
Приготування живильних середовищ та підходи щодо
стерилізації**

Мета заняття: ознайомитися з потребами мікроорганізмів у поживних речовинах і принципами створення поживних середовищ для їх вирощування.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі, піпетки, пробірки, колби, реактиви для приготування поживних середовищ.

Бактеріальна клітина містить 75-85% води, решта – суха речовина. Спори бактерій містять 40-50% води. За кількісним вмістом у клітині розрізняють органогенні (C, O, H, N), макро- (S, P, K, Na, Ca, Mg, Fe) і мікроелементи (Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, V, B, Cl, Se, Si, W). Крім мінеральних речовин, більшість мікроорганізмів потребують додаткових сполук, що називаються факторами росту – амінокислот, пуринів, піримідинів, вітамінів (отримали назву **ауксотрофів**, на відміну від **прототрофів**, яким такі фактори росту не потрібні).

Організми, що отримують енергію за допомогою фотосинтезу чи шляхом окислення неорганічних сполук здатні використовувати CO₂ як головне джерело вуглецю. Ці **С-автотрофні** організми відновлюють CO₂. Усі інші організми отримують вуглець в основному з органічних сполук, що слугують джерелом як енергії, так і вуглецю, – **гетеротрофи**.

Серед гетеротрофів виділяють 3 групи:

- **Сапрофіти** – харчуються секреторними продуктами інших живих істот або одержують поживні речовини з мертвого органічного матеріалу. Сапрофітні мікроорганізми вирізняються вимогливістю до джерел вуглецю й енергії. Наприклад, бактерії з роду *Pseudomonas*, здатні використовувати будь-яку з 200 різних органічних сполук, а *Bacillus fastidiosus* – лише сечову кислоту і продукти її деградації. Деякі представники роду *Clostridium* ростуть тільки в середовищі, що містить пурини. Використовувати інші органічні субстрати для росту вони не можуть.

- **Симбіотичні організми.**

- **Паразити** – облігантні – існують тільки в живих клітинах, факультативні – викликають загибель організму-господаря та харчуються сапрофітно. Найвищий ступінь гетеротрофності властивий прокаріотам, що належать до облігатних внутрішньоклітинних паразитів. Паразитичний спосіб життя привів до редукції деяких метаболічних шляхів у цих прокаріот, що і зумовило повну їх залежність від метаболізму господаря (мікоплазми). Факультативні паразити здатні рости за відтворення відповідних умов ззовні клітини господаря (їх вдається культивувати на складних штучних середовищах, що містять білки чи продукти їх неповного гідролізу, нуклеїнові кислоти. При цьому використовують м'ясні гідролізати, цільну кров чи сироватку).

Окрім того, враховуючи кількість органічної речовини, необхідної для розвитку мікроорганізмів, розрізняють **оліготрофні** бактерії – здатні рости за низьких концентрацій органічних речовин у середовищі, **копіотрофні** – розвиваються при високих концентраціях поживних речовин.

Залежно від механізму перероблення енергії в доступну для клітини форму АТФ розрізняють 2 головних типи метаболізму – фототрофний і хемотрофний. Організми, що здатні використовувати як джерело енергії для росту електромагнітне випромінення, називаються **фототрофами**. До них належать представники двох великих груп: анаеробні, що не виділяють молекулярний кисень, й аеробні ціанобактерії, водорості, рослини, які виділяють O_2 . На відміну від цього **хемотрофи** отримують енергію в результаті окисно-відновних реакцій за участю субстратів, які слугують для них джерелом живлення. Серед бактерій наявні й **міксотрофи**, що здатні, залежно від умов, використовувати ту чи іншу форму енергії. Якщо донором електронів для організму слугують органічні сполуки, то вони є **органотрофами**, неорганічні – **літотрофами** (H_2 , NH_3 , H_2S , S_2 , Fe^{2+}).

Щодо джерел азоту розрізняють **аміногетеротрофи** – включають більшість бактерій, що використовують азот у відновленій формі – солі амонію, сечовину, амінокислоти та **аміноавтотрофи** – використовують окислені (нітрати) форми чи молекулярний азот.

Для виділення та вивчення властивостей мікроорганізмів застосовується велика кількість середовищ, які відрізняються за кількістю компонентів, походженням, консистенцією, складом, призначенням.

За кількістю компонентів розрізняють прості та складні (дріжджовий екстракт, пептон, м'ясний екстракт, пивне сусло, фруктовий сік, кокосове молоко, кукурудзяні чи соєві екстракти, відходи виробництв) живильні середовища.

Залежно від **походження**, середовища поділяють на природні, штучні, синтетичні. *Природними* середовищами називають натуральні продукти – молоко, яйце, овочі, або природний субстрат – сироватка крові, жовч тощо. *Штучні* середовища готують за певними рецептами з різних настоїв і відварів тваринного й рослинного походження з додаванням неорганічних солей, вуглеводів та азотистих речовин, взятих у певних співвідношеннях.

За **консистенцією** розрізняють середовища рідкі, напіврідкі, тверді, сипучі. *Рідкі* складаються з води й розчинених у ній речовин (ріст як у періодичній, так і безперервній системі). *Тверді* утворюються шляхом додавання до рідких середовищ ущільнюючих речовин – желатини (10-15%), агар-агару (1-2%), силікагелю (1,5-2%), карагенану (2%). *Напіврідкі* – містять такі ж ущільнюючі речовини, але в меншій кількості (0,2-0,3% агар-агару). *Сипучі* – представлені подрібненою рослинною сировиною (застосовуються у харчовій та сільськогосподарській промисловості).

За **призначенням** живильні середовища поділяються на звичайні, спеціальні, елективні та диференціально-діагностичні.

Звичайні застосовують для вирощування більшості мікроорганізмів. До них належать бобово-пептонний і м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар тощо.

Спеціальні середовища застосовують для виділення та культивування певних груп або видів мікроорганізмів, наприклад: середовище Чапека — для культивування грибів, середовище Омелянського — для виділення збудників анаеробного розпаду клітковини.

Елективні середовища придатні для розвитку одного виду мікроорганізмів, які пристосувалися до даних умов існування.

Супутні мікроорганізми або зовсім не ростуть на таких середовищах, або розвиток їх сильно затримується (Ендо, Ешбі). Застосовують на першому етапі виділення чистої культури (для отримання накопичувальної).

Диференціально-діагностичні середовища застосовуються для вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів і для виділення чистих культур. Використання їх дозволяє швидко ідентифікувати близькоспоріднені види, внаслідок трикомпонентного складу – вихідних поживних речовин, субстрату, що виявляє діагностичну ознаку, індикатору.

Стерилізація – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці. В практичній роботі стерилізацію трактують, як методи які застосовують для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів стерилізації. Стерилізують живильні середовища, посуд, інструменти з метою не допустити розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах. Розрізняють стерилізацію: термічну, хімічну, фільтруванням та опроміненням.

Термічна стерилізація

Прожарювання вогнем (фламбування) застосовують безпосередньо перед використанням для стерилізації петель, голук, пінцетів, ножиць, шпательів, скляних паличок, предметних та покривних скелець та іншого дрібного інструменту.

Кип'ятіння у воді використовують для стерилізації шприців, голук, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду, фільтрів у стерилізаторах.

При цьому гинуть, в основному, вегетативні клітини, спори бактерій зберігають життєздатність.

Пастеризація – одноразовий короткочасний прогрів матеріалу при температурах, нижчих 100°C для знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Луї Пастер. Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості, для обробки продуктів, які втрачають смакові і поживні якості при кип'ятінні: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін. Пастеризацію зазвичай проводять при 60°C–75°C протягом 15–30 хв чи при 80°C 15 хв. Інколи нагрівають матеріал до 90°C і одразу ж охолоджують.

Стерилізацію сухим жаром при температурі 170°C, 160°C або 140°C здійснюють у сушильних шафах відповідно протягом 1 год, 2 год та 3 год. Нагрівання за допомогою сухого жару справляє значно слабший вплив на мікроорганізми, ніж волога пара. В той же час можуть серйозно пошкоджувати такі матеріали, як гума, папір, вата, тканина. Тому цей прийом переважно використовують для стерилізації предметів, які є непроникиними для пари, зокрема посуду (чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо).

Температура в сушильній шафі не повинна перевищувати 170°C, оскільки у протилежному випадку з вати та деяких сортів паперу можуть виділятися смолисті речовини, жирні кислоти, які мають здатність пригнічувати ріст мікроорганізмів. Ці речовини у невеликих кількостях також можуть виділятися й при значно нижчих температурах, а при охолодженні шафи осаджуватись на її стінках. Тому час від часу слід очищувати стінки печі. Для попередження інтенсивного змішування холодного забрудненого повітря зі стерильним вмістом шафи, її небажано відкривати до охолодження.

Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) - найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації живильних середовищ і посуду. Цей метод ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску, вищому від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні її тиску. Наприклад, при тиску 1,5 атм. температура пари становить 127°C, 2 атм. – 135°C.

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини, і найстійкіші спори. Стерилізацію парою під тиском здійснюють у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах. Для правильного автоклавування необхідно повністю витіснити повітря з робочої камери, оскільки повітря затримується між предметами, які автоклавуються, внаслідок чого вони можуть не нагріватися до заданої температури. Крім того, заповнювати автоклав слід таким чином, щоб не перешкоджати вільному рухові повітря.

Перед стерилізацією живильні середовища і посуд слід ізолювати від зовнішнього середовища. Для цього колби і пробірки закривають ватними корками: чашки Петрі, піпетки,

шпателі загортають у папір чи кладуть у паперові пакети. Посуд, зазвичай, стерилізують при 1 атм. 20-30 хв.

Температура і тривалість автоклавування живильних середовищ визначається, перш за все, їх складом. Термолабільні субстрати (молоко, желатинові середовища, середовища з цукрами, вітаміни тощо) зазвичай стерилізують при 0,5 атм., протягом 15-30 хв, пивне сусло та сусло-агар при 0,7 атм 20 хв, м'ясо-пептонні середовища при 1 атм. 20 хв.

Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкцій. Оскільки автоклав – апарат, який працює при високому тиску і високій температурі, неправильна експлуатація його може бути причиною нещасних випадків. Для роботи з автоклавом допускаються тільки особи, які мають спеціальну підготовку і дозвіл відповідної інстанції.

Для контролю правильного режиму стерилізації використовують кілька методів: за допомогою прямого вимірювання температури, максимальних термометрів або хімічних індикаторів. Перший спосіб здійснюють за допомогою термопар, розташованих в різних частинах камери. Зручнішим є використання максимальних термометрів та патентованих хімічних індикаторів. Останні змінюють своє забарвлення внаслідок прогрівання протягом певного часу при заданій температурі.

Хімічну стерилізацію використовують для дезінфекції приміщення, столів, знищення патогенних культур мікроорганізмів тощо.

Для стерилізації цим методом застосовують солі важких металів (найчастіше ртуті, міді, цинку), 50-60%-ний розчин етилового спирту, α -оксихіноліну, лізол, формалін (41%-ний розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, пероксид водню, перманганат калію, β -пропіолактон, йод, йодоформ, детергенти та інші хімічні сполуки.

Обладнання, яке має дзеркальні, оптичні поверхні, радіодеталі, а також вироби з термолабільних пластмас (чашки Петрі, центрифужні пробірки тощо) стерилізують, застосовуючи газовий метод. Найчастіше використовують оксид етилену, метилбромід, формальдегід, β -пропіолактон, озон тощо. Газову стерилізацію здійснюють у спеціальних герметичних апаратах. При стерилізації

строго контролюють концентрацію газу, тиск, вологість, температуру і тривалість обробки, у більшості випадків процес відбувається при температурі 45°C–70°C. Режим стерилізації різними газами неоднаковий. Предметами, простерилізованими газами, можна користуватися лише через 24 години (після десорбції газів).

Стерилізація ультрафіолетовими променями

Приміщення (стерильні бокси, операційні, реанімаційні), інколи вироби з термолабільних пластмас стерилізують за допомогою ультрафіолетових променів у діапазоні 260-280 нм. Час опромінення, який встановлюють експериментально, залежить від потужності бактерицидної лампи, від величини об'єкту стерилізації. При обробці УФ-променями дрібних предметів їх одразу після стерилізації кладуть у стерильний обгортковий матеріал або стерильний посуд, де і зберігають до використання.

Стерилізація фільтруванням

Метод часто застосовують для стерилізації субстратів, які не витримують нагрівання, зокрема, сироваток, рідких середовищ і розчинів, до яких входять термолабільні білки, вітаміни, вуглеводи, деякі антибіотики. Спосіб полягає в пропусканні рідин через спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менший за розміри бактерій.

Хід роботи:

1. Приготування середовищ:

Картопляне середовище:

Середовище використовується для виділення амілолітичних бактерій.

- бульби картоплі старанно промити, очистити від лущиння і дрібно нарізати;
- 200 г продукту залити 1 л води, прокип'ятити протягом 15 хв, розлити в посуд і простерилізувати;
- до стерильного середовища додати стерильну крейду для нейтралізації кислих продуктів, які виділяються з картоплі.

Пептонна вода:

Середовище придатне для багатьох мікроорганізмів.

- до дистильованої води додати 1 %-ного пептону і 0,5%-ного кухонної солі;

- довести рН 7,2, прокип'ятити 30 хв і знову перевірити рН;
- профільтрувати через паперові фільтри до повної прозорості і простерилізувати.

Агаризоване живильне середовище (м'ясо-пептонний агар)

Гутується із сухого порошку за заводським прописом.

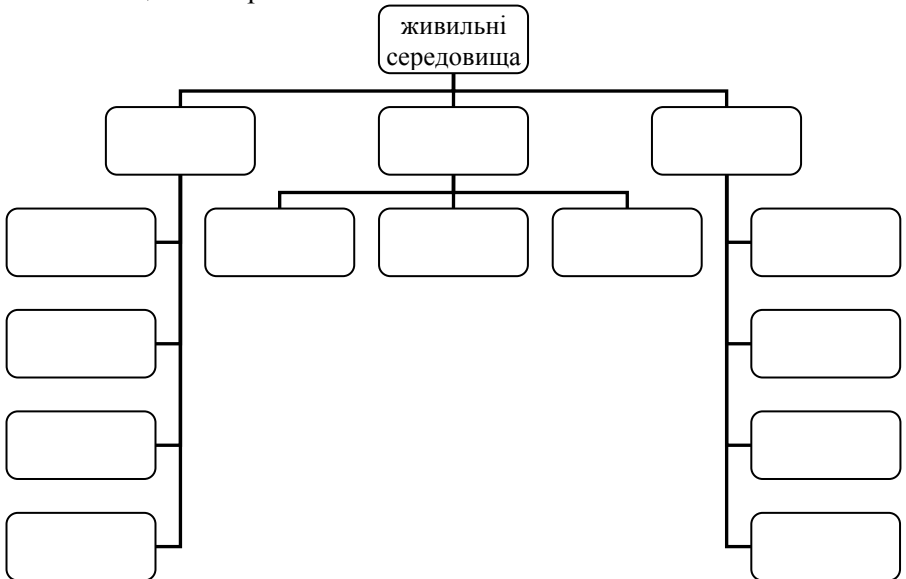
Охарактеризувати поділ мікроорганізмів щодо:

- *джерел вуглецю:*

- *джерел азоту:*

- *джерел енергії:*

Навести класифікації поживних середовищ за походженням, консистенцією та призначенням:



2. Простерилізувати середовища, використовуючи кип'ятіння, автоклавування та холодну стерилізацію. Розлити поживні середовища у стерильні чашки Петрі та пробірки (для отримання скошеного агару).

Через 7 днів зробити аналіз стерильності живильних середовищ, приготовлених з використанням різних методів стерилізації:

Охарактеризуйте методи:

- *термічної стерилізації:* _____

- *холодної стерилізації:* _____

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №6

Виділення чистих і накопичувальних культур мікроорганізмів

Мета заняття: овоїти техніку й способи вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах різних типів; ознайомитися з характером росту мікроорганізмів на різних середовищах; отримати навички здійснювати опис колоній.

Матеріали й обладнання: пробірки, чашки Петрі, бактеріологічна петля, пробірки зі стерильною водогінною водою, шпателі, пастерівські піпетки, м'ясо–пептонний агар (МПА), картопляний агар, пептонна вода, добові культури *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*, *B. mesentericus*.

Культивування мікроорганізмів – основний метод мікробіології. Від принципів, що лежать в його основі, залежить успіх вивчення та практичного застосування мікроорганізму.

При роботі з мікроорганізмами необхідно знати вимоги, що висуваються до поживних середовищ, та основні типи середовищ, володіти технікою культивування в аеробних і анаеробних умовах, методами виявлення і виділення їх із природних субстратів та отримання чистих культур, мати уявлення про накопичувальні культури та принцип елективності.

Культури мікроорганізмів культивують на стерильних твердих (агаризовані культури) або рідких (суспензійні культури) живильних середовищах. Посуд із культурами мікроорганізмів, що підлягають утилізації, обов'язково автоклавують з метою їх знищення, і тільки після цього миють.

У лабораторній практиці для вирощування аеробів найчастіше використовується метод **поверхневого** культивування мікроорганізмів на твердих і рідких середовищах завдяки безпосередньому контакту з киснем повітря. Живильні середовища кількістю 10–20 мл розливають тонким шаром (3–4 см заввишки) у чашки Петрі. Аеробні мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища у вигляді відносно щільних колоній.

Іншим методом є **глибинне** культивування мікроорганізмів у рідких живильних середовищах на качалках-ролерах зі швидкістю обертання 100–200 обертів за хвилину. При збільшенні швидкості

обертання зростає ступінь аерації середовища.

Методи культивування анаеробів ґрунтуються на механічній ізоляції мікроорганізмів від повітря. Найпростіший – вирощування анаеробів у **високому шарі** живильного середовища. Посівний матеріал вносять у нижній шар середовища. Його поверхню заливають шаром стерильного вазелінового масла. Культури, які не виділяють газів, закривають щільними гумовими корками. Анаеробні мікроорганізми можна культивувати у звичайних пробірках і чашках Петрі, ставлячи їх після посіву в анаеростати.

Внесення клітин мікроорганізмів у стерильне середовище називають **посівом**, або **інокуляцією**.

Спосіб посіву в середовищі залежить від його консистенції, якості засівного матеріалу й мети дослідження. Спочатку необхідно написати на пробірці, колбі або чашці Петрі назву мікроорганізму й дату посіву. Інокуляцію здійснюють бактеріологічною петлею (користуються при пересіванні з пробірки в пробірку), голкою чи пінеткою.

Техніка проведення посіву:

- *на скошену поверхню агару* – петлю з посівним матеріалом вносять у конденсаційну воду і сповзаючими рухами розтирають його штрихом від однієї стінки до другої;
- *у стовпчик середовища* – голкою з посівним матеріалом проколюють стовпчик по центру;
- *на тверде живильне середовище* – легко втирають матеріал у поверхню середовища, не пошкоджуючи його;
- *в рідке живильне середовище* – петлю занурюють у середовище і розтирають матеріал по стінці посудини, після чого змивають середовищем, злегка струшуючи пробірку; пересівання з рідкого в рідке середовища проводиться стерильною піпеткою (градуйованою чи пастерівською).

Різні мікроорганізми в результаті розмноження на твердих живильних середовищах утворюють накопичення клітин – **колонії**. Спочатку їх розглядають неозброєним оком або через лупу, а потім вивчають за допомогою мікроскопа (ставлять чашки догори дном на столик мікроскопа і розглядають через об'єктив 8^x). Кожна колонія утворюється в результаті розмноження однієї або кількох клітин.

До основних характеристик колоній відноситься (рис. 5):

- *величина* – визначається її діаметром (більше 4 мм – великі, 2–4 мм – середні, 1–2 мм – дрібні, до 1 мм – карликові, або точкові);
- *характер краю* – може мати вигляд чіткої лінії, бути хвилястим, зубчастим, ворсинчастим;
- *рельєф* колонії (над поверхнею поживного середовища) – може бути конусоподібний, куполоподібний, плоский, кратероподібний;
- *структурою* – однорідна, дрібно- чи крупнозерниста, струминчаста тощо (край та структуру визначають за допомогою лупи чи при малому збільшенні мікроскопа, для чого чашку Петрі ставлять на столик мікроскопа кришкою вниз);
- *форма обрисів* – кругла, неправильна, ризоїдна тощо (для більшості бактерій виявлені два типи колоній: шершаві, гладкі);
- *колір* колоній (визначається їх пігментованістю) – безбарвні або пігментовані (білі, жовті, зелені, червоні тощо);
- *консистенція* (визначають, торкаючись поверхні петлею) – рідкі, пастоподібні, в'язкі, волокнисті, шкірясті тощо (поверхневі колонії), глибинні колонії – здебільшого однорідні, донні – зазвичай мають вигляд тонких прозорих плівок, що стеляться по дну.

У процесі росту колонії її властивості можуть змінюватися.

У навколишньому середовищі, в організмі людини і тварин бактерії знаходяться в асоціаціях з іншими мікроорганізмами, у зв'язку з чим їх вивчення можливе лише при виділенні чистих культур. **Чистою культурою** мікроорганізмів називається така культура, яка складається з особин одного виду і, найчастіше, виділяється з *накопичувальної культури* (з однієї клітини чи окремої колонії).
























| MARGIN | COLOUR | ELEVATION | TEXTURE | SHAPE |
|---|--|---|---|--|
|  Curled |  Orange |  Raised | Slimy, moist |  Round |
|  Entire (smooth) |  Red or pink |  Umbonate | Matte, brittle |  Punctiform |
|  Filamentous |  Black |  Flat | Shiny, viscous |  Rhizoid (root-like) |
|  Undulate (wavy) |  Brown |  Convex | Dry, mucoid |  Filamentous |
|  Lobate |  Opaque or white |  Pulvinate (Cushion-shaped) | Translucent |  Irregular |
|  Erose (serrated) |  Milky | Growth into culture medium | Iridescent (changes colour in reflected light) |  Spindle |

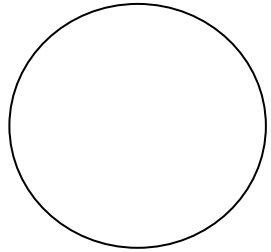
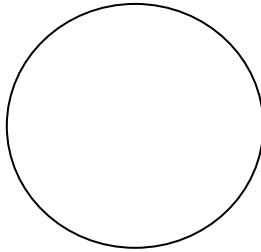
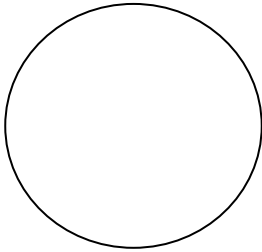
Рис. 5. Критерії оцінки колоній мікроорганізмів (<https://microdok.com/colonial-morphology-of-bacteria/>)

Хід роботи:

1. Розлити пептонну воду в пробірки, засіяти її культурою *B. subtilis*.
2. Розтопити м'ясо–пептонний і картопляний агар. Розлити їх у чашки Петрі.
3. Поверхню МПА засіяти штрихом культурою *S. flava*.

4. На поверхню картопляного агару висіяти методом суцільного газону культуру *B. mesentericus*.

5. Розглянути й замалювати посіви. Приготувати фіксовані забарвлені мазки з окремих колоній, для яких дати характеристику. Препарати промікроскопіювати і зарисувати.



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Дати визначення термінів:

- колонія - _____

- чиста культура - _____

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №7

Вплив факторів зовнішнього середовища на ріст і розвиток мікроорганізмів

Мета заняття: дослідити дію вологості, світла, температури на розвиток мікроорганізмів; визначити характер взаємовідносин між запропонованими культурами мікроорганізмів.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі, мікробіологічні петлі, чисті культури *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Sarcina flava*, спиртівки, джерело ультрафіолетових променів, розчин фуксину, термостати, чорний папір, ножиці, клей, скляні шпатели, пробірки, вода, мікроскопи.

1. Прокаріоти здатні існувати в набагато ширшому діапазоні умов зовнішнього середовища, ніж еукаріоти. Серед них є організми, які ростуть у підводних вулканічних джерелах (температура до 300°C), кислому (pH=1 і нижче) і лужному (pH=11 і вище) середовищах, за тиску 1000 атм, високих концентраціях важких металів, концентрації солі до 30%, високих рівнях радіації. Обов'язкова умова для цього – наявність водного середовища.

Серед прокариот існують значні відмінності у відношенні до молекулярного кисню. За цією ознакою вони можуть бути поділені на кілька груп – облигатні аероби (аерофіли, мікроаерофіли, що використовують кисень як кінцевий акцептор електронів у процесі дихання) та анаероби (строгі, аеротолерантні, що здійснюють процеси бродіння та анаеробного дихання), факультативні форми.

Основну частку сонячного випромінювання складає видиме світло – 75%, біля 20% належить інфрачервоному, біля 5% – світлу довжиною хвилі меншою 400 нм. Видиме світло забезпечує фотосинтез, фототаксис, фотореактивацію, синтез біомолекул. Інфрачервоне – тепловий (прискорений) рух молекул і фотосинтез глибоководних прокариот – зелених – 840 нм і пурпурних бактерій – 920-1100 нм). Ультрафіолетове виявляє бактерицидну дію, пов'язану з утворенням тимінових димерів між сусідніми азотистими основами одного ланцюга ДНК. Рентгенівське проміння виявляє протимікробну дію (стійкість прокариот набагато вища до дії радіації, ніж еукаріотичних клітин) унаслідок утворення розривів одного або обох ланцюгів ДНК.

в) Температурні умови біосфери досить різноманітні. Серед прокариот розрізняють:

- **психрофіти** (-10°C - $+20^{\circ}\text{C}$) - облігатні – пристосувалися до стійких холодних умов (глибини морів і океанів, крижані печери), а факультативні складають більшість холодолюбивих форм, що пристосувалися до нестійких холодних умов (зустрічають навіть у холодильниках). Здатність рости в умовах низьких температур пов'язують з особливостями їх ферментних білків і мембранних ліпідів. Зокрема, синтезом білків холодового шоку, нагромадженням осморегуляторів (проліну, трелагози), формуванням центрів кристалізації льоду;

- **мезофіли** ($+20^{\circ}\text{C}$ - $+40^{\circ}\text{C}$) – більшість бактерій;

- **термофіли**: термотолерантні, факультативні, облігатні, екстремальні. Екстремальні термофіли належать винятково до архей і представлені метаноутворюючими формами і видами, метаболізм яких пов'язаний з молекулярною сіркою. Майже всі вони – строгі анаероби, але є серед них і аероби (представники роду *Sulfolobus*). Конструктивний метаболізм авто- або гетеротрофного типу. Анаеробні автотрофи одержують енергію в результаті відновлення CO_2 або S_0 молекулярним воднем з утворенням метану або сірководню відповідно. Гетеротрофні екстремальні термофільні анаероби використовують різні органічні субстрати (білки, вуглеводи) для отримання енергії у процесах бродіння або анаеробного дихання з молекулярною сіркою як кінцевим акцептором електронів. Аероби одержують енергію у процесах, пов'язаних з окисненням молекулярної сірки, заліза або органічних сполук.

Термофілія включає безліч молекулярних механізмів, найважливіші з яких:

- визначальна роль мембранних ліпідів (переважання насичених жирних кислот);
- визначальна роль білків, перш за все ферментативних. Основні температурні точки термофілів залежать від конформації одного або декількох ключових ферментів: за мінімальної температури росту відбувається перехід від жорсткої неактивної конформації білкових молекул до конформації з обмеженою гнучкістю; оптимальна температура росту визначає найсприятливіший конформаційний стан ферментних білків; за максимальної

температури починаються порушення конформації білків і зниження їх ферментативної активності, а вище за цю температуру ріст припиняється внаслідок теплової денатурації білків. Білки термофілів не характеризуються значними відмінностями у складі амінокислот, проте мають більше гідрофобних зв'язків, стабільну третинну структуру, сформовану за допомогою білків шаперонів у термосомі (тому ліпази використовуються для виготовлення миючих засобів);

- термостабільність ДНК, що проявляється у високому вмісті ГЦ пар (30-60%), формуванні супервитків за дії зворотної гірази, наявність поліамідів та гістоноподібних білків;

- термостабільність структурних компонентів клітини термофілів. Виявилось, що клітинна стінка, мембрани, рибосоми термофілів значно термостабільніші, ніж відповідні структури мезофілів.

Кислотність середовища (концентрація водневих іонів, рН) – важливий чинник, що визначає можливість існування прокариот. Концентрація іонів водню в навколишньому середовищі діє на організм прямо (безпосередня дія H^+) або опосередковано (через вплив на іонний стан і доступність багатьох неорганічних іонів і метаболітів, стабільність макромолекул, рівновагу електричних зарядів на поверхні клітини). При низьких значеннях рН розчинність CO_2 , що є основним або навіть єдиним джерелом вуглецю для автотрофних прокариот, знижується, а розчинність деяких іонів (Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) зростає та досягає рівнів, токсичних для багатьох прокариот. Навпаки, при високих значеннях рН розчинність багатьох катіонів (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), необхідних клітині, різко знижується, вони випадають у осад і стають недоступними для організмів. рН впливає на стан речовин у навколишньому середовищі. Органічні кислоти в кислому середовищі знаходяться в недисоційованій формі, в якій легко проникають у клітину, стаючи токсичними для неї. Концентрація H^+ зовнішнього середовища впливає й на рівновагу електричних зарядів на поверхні клітини: при низьких значеннях рН збільшується сумарний позитивний заряд, при високих – сумарний негативний заряд.

У Світовому океані й на більшій частині суші концентрація водневих іонів оптимальна для росту більшості прокариот – рН = 7. Досить часто зустрічаються помірно кислі природні середовища

(рН = 3-4) – багато озер, кислих боліт, виснажених ґрунтів. Нижчий рівень рН відзначено в териконах вугільних шахт, дренажних водах, рудникових стоках. До найкисліших із природних середовищ належать гарячі кислі джерела й оточуючі їх гарячі кислі ґрунти (рН = 1). Лужні умови, що зустрічаються у природі, звичайно, пов'язані з ґрунтами й озерами, що збагатилися лужними мінералами, екскрементами тварин, білками (рН = 8 – 11).

Залежно від відношення до кислотності середовища прокаріоти поділяють на кілька груп: нейтрофіли (з групами кислото- та лужновитривалих форм), ацидофіли, алкалофіли.

Природно, що здатність до росту за низьких або високих значеннях рН забезпечує організму певні переваги, оскільки в цих умовах різко обмежена конкуренція з боку інших організмів. Водночас усі вимірювання внутрішньоклітинного рН, проведені у представників груп облігатних ацидо- і алкалофілів, не залишають сумнівів у тому, що він не відповідає рН зовнішнього середовища. У всіх відомих ацидофілів значення внутрішньоклітинного рН підтримується близько 6,5, у нейтрофілів – 7,5, у алкалофілів – не вище 9,5.

Прокаріоти, що ростуть при екстремальних значеннях рН, виробили різні механізми для підтримки стабільного внутрішньоклітинного рН (непроникність ЦПМ, клітинної стінки для іонів H^+ , енергозалежне виштовхування іонів водню, Na^+/H^+ -антипорт).

Хід роботи:

1. Визначення впливу УФ-променів на мікроорганізми

На поверхню МПА чашки Петрі густо засіяти чисту культуру *B. subtilis*, розтираючи скляним шпателем. Зверху покласти чорний папір, в якому вирізано "вікно" і поставити на 20–30 хв. під світло бактерицидної лампи. Після опромінення чашки перенести у термостат з температурою 37 °С. Через 3–4 дні охарактеризувати ріст бактерій на різних ділянках середовища.

2. Визначення впливу температури на мікроорганізми

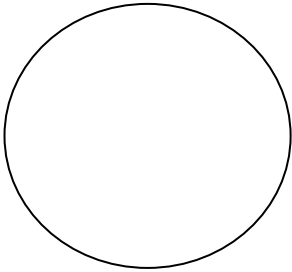
Культури *B. subtilis*, *B. mesentericus* (сінної й картопляної паличок) петлею перенести у пробірки з 1 мл стерильної води, ретельно струсити їх. Нанести 2–3 краплі отриманої суспензії на

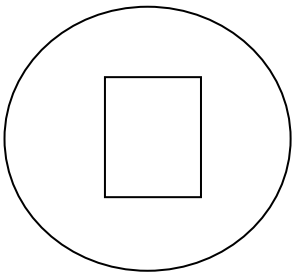
поверхню МПА і розтерти по ньому скляним шпателем. Засіяні чашки впродовж декількох днів витримати при +4, +20 і +50 °С і на основі отриманих результатів зробити висновок про вплив температури на розвиток бактерій.

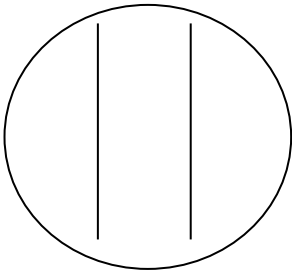
3. Характеристика взаємовідносин між мікроорганізмами.

На поверхню МПА у чашки Петрі мікробіологічною петлею по центру нанести широку смугу культури *Bac. subtilis*. Перпендикулярно до неї паралельними штрихами висіяти культуру *Sarcina flava*. Чашки кілька днів витримати при температурі 25–28 °С і зробити висновок про тип взаємовідносин між досліджуваними культурами мікроорганізмів.

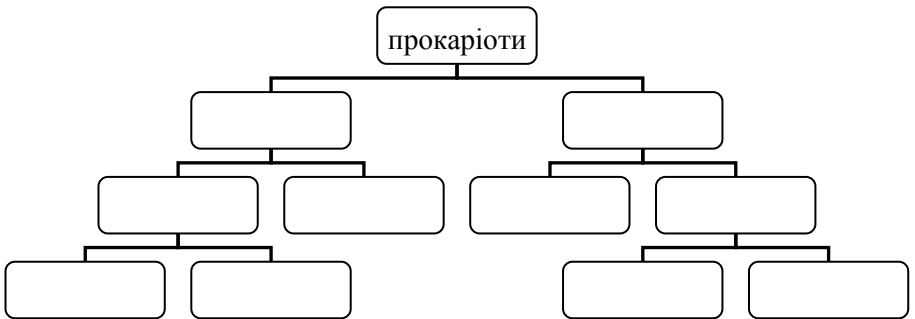
Проаналізувати вплив на культури мікроорганізмів факторів зовнішнього середовища та замалювати отримані результати:



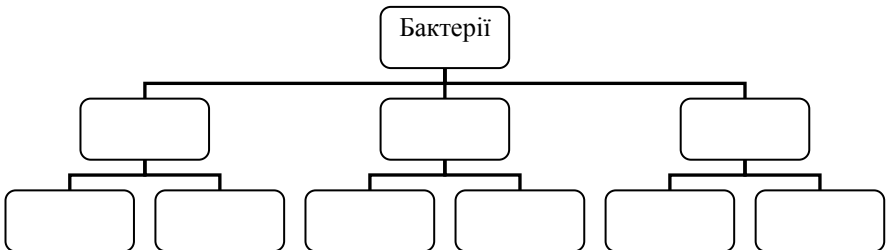




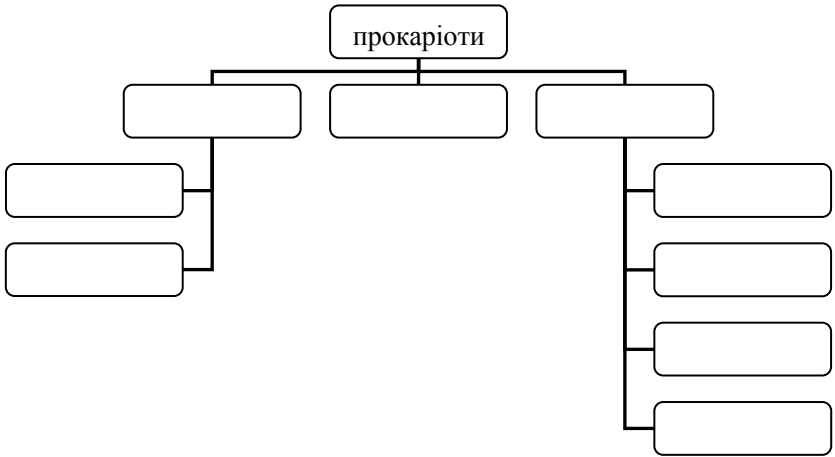
Класифікуйте прокаріоти щодо концентрації кисню у середовищі:



Охарактеризуйте прокаріоти щодо рН середовища:



Як поділяють прокариот щодо температури у середовищі існування:



ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №8 Вивчення мікрофлори ґрунту, води та повітря

Мета заняття: познайомитися з методами дослідження мікрофлори ґрунту, води, повітря; виділити мікроорганізми з природних середовищ та описати їх культуральні й морфологічні властивості.

Матеріали й обладнання: зразки ґрунту, води, стерильні чашки Петрі, піпетки Пастера, стерильні шпателі, водний розчин фуксину основного, мікроскопи, 96% етанол, спиртівки, МПА, колби, пробірки, термостат, водяна баня, вага.

Ґрунти з рослинами і тваринами утворюють складні та багатоманітні біогеоценози, склад, щільність, функціональна активність яких залежать від типу і структури ґрунту, складу мінеральних і органічних речовин, фізико-хімічного стану, температури, рН, вологості, концентрації O_2 і CO_2 .

Максимальна кількість мікроорганізмів у чорноземах і червоноземах на глибині 10-20 см, понад 1-2 м – зустрічаються в незначній кількості, починаючи з 5-6 м ґрунт стерильний. Патогенні мікроорганізми попадають у ґрунт із виділеннями, сечею, гноєм, мокротою, слиною, з трупами людей і тварин, при викиді фекально-побутових і стічних вод різних підприємств.

Мікроорганізми відіграють важливу роль у формуванні ґрунту й визначають його родючість. Загальна кількість мікроорганізмів свідчить про інтенсивність біохімічних процесів, які протікають у ґрунті.

Для точнішого уявлення про родючість ґрунту проводять дослідження на наявність у ньому певних фізіологічних груп мікроорганізмів – амоніфікуючих, нітрифікуючих, денітрифікуючих, азотфіксуєючих та ін.

Бактеріологічне дослідження ґрунту охоплює визначення:

- а) загальної кількості сапрофітних мікроорганізмів;
- б) кількості мікроорганізмів різних фізіологічних груп;
- в) мікроорганізмів-антагоністів і виявлення їх активності;
- г) санітарно-показових мікроорганізмів (кишкової палички);
- д) патогенних мікроорганізмів.

Терміни перебування патогенних мікробів у ґрунті варіюють – неспоротворні (дизентерії, чуми, бруцельозу, туляремії, туберкульозу) кілька днів, місяців; спори правцю, сибірської виразки, газової гангрені – роки. Відмирання зумовлюється нестачею вологи, відсутністю поживних речовин, антагонізмом бактерій, сонячним світлом.

Санітарно-епідеміологічне дослідження ґрунту проводять із метою санітарного нагляду і за епідеміологічними показниками. Ґрунти з переважанням мікрофлори, що свідчить про фекальне забруднення, вважають несприятливими (*Str. faecalis*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *C. perfringens*).

Вода відкритих морських і прісноводних водойм – природне середовище різноманітних бактерій, грибів, вірусів, мікроскопічних водоростей, найпростіших. Концентрація водних організмів визначається, в основному, вмістом органічних речовин. Найчистіші ґрунтові підземні води (затримуються у фільтруючому шарі ґрунту). Значно більше мікробів у відкритих водоймах, що пов'язано з високим вмістом розчинених поживних органічних речовин, які поступають зі стічними і каналізаційними водами, відходами підприємств. Сьогодні в ріки, озера, моря викидається така кількість стічних вод із мікробами й органічними речовинами, що вода не встигає самоочищуватися. Зростання кількості органічної речовини у воді супроводжується збільшенням кількості аеробних і анаеробних бактерій. Особливо багато анаеробів у мулі, на дні водойм. Мікрофлора води виконує роль активного фактору у процесі її самоочищення від органічних відходів.

Склад і кількість мікробів відкритих водойм залежить від: хімічного складу води, заселеності прибережних зон, пори року. Переважну більшість мікрофлори рік, ставків, озер становлять коки – мікрококи, стафілококи – 80%, решта – псевдомонади, бактеріуми, клостридії, ціанобактерії.

Вода має важливе санітарно-епідеміологічне значення як фактор передачі збудників багатьох інфекцій, особливо кишечних (черевного тифу, дизентерії, сальмонельозів, холери), які з виділеннями хворих і носіїв поступають у відкриті водойми, а нерідко і в питну воду.

Хоча вода не особливо сприятлива для патогенних і умовно-патогенних мікробів, більшість із них здатні перебувати в ній певний час. Терміни виживання залежать від їх виду, концентрації, температури води, вмісту органічних речовин. Спори сибірської виразки можуть роками зберігатися у воді, місяці витримують сальмонели, лептоспіри, дні – збудники дизентерії, холери, бруцельозу, туляремії, ентеробактерії.

Ступінь забрудненості води мікробами прийнято виражати сапробністю – сукупністю організмів, які живуть у водах, що містять велику кількість тваринних чи рослинних решток. Кількість сапрофітних мікроорганізмів у воді коливається від кількох одиниць до кількох мільйонів в 1 мл залежно від ступеня її забрудненості та часу взяття проби для аналізу.

Основні об'єкти санітарно-епідеміологічного дослідження води – питна вода водопостачання, вода поверхневих і підземних джерел, стічні води, води прибережних зон морів, плавальних басейнів. Бактеріологічні дослідження води найчастіше проводять шляхом посіву певного об'єму води на тверді поживні середовища з метою виявлення:

- 1) загальної кількості мікробів з 1 мл води;
- 2) санітарно-показових мікроорганізмів, тобто бактерій, які служать показником фекального забруднення води;
- 3) патогенних мікроорганізмів та їх токсинів у воді, а також бактеріофагів (за епідеміологічними та епізоотологічними показниками).

Оскільки виявлення у воді патогенних мікроорганізмів пов'язане з великими труднощами і не завжди дає надійний результат, прийнято використовувати непрямі показники можливого інфікування води колі-титр і колі-індекс:

- **колі-титр** – найменший об'єм води в мілілітрах або масу твердої речовини в грамах, які містять одну кишкову паличку;
- **колі-індекс** – кількість кишкових паличок, які містяться в 1000 мл води або в 1 кг твердої речовини.

Мікрофлора атмосфери вторинна, бідна і варіабельна – коки, бацили, клостридії, актиноміцети, гриби, віруси. Вона залежить від інтенсивності сонячної радіації, вітру, опадів, характеру ґрунту, пори року, умов прибирання, кількості людей, провітрювання.

Мікроби надходять із поверхні ґрунту і рослин, із відходами виробництв, з організмів людини і тварин. Нестача вологи, поживних речовин, сонячна радіація перешкоджають розмноженню мікроорганізмів у повітрі. Багато мікроб у повітрі великих міст, мало – у сільській місцевості, над лісами, горами, морями (стерильне повітря під ліванськими кедрами. У древньому Римі під ними робили операції – виробляє фітонциди).

Зважені у повітрі краплі (слиз з епітеліоцитами і мікроорганізмами) утворюють стійкий мікробний аерозоль, дрібнодисперсні фракції якого здатні проникати не лише у верхні, а й у середні, нижні відділи респіраторного тракту. **Повітряно-крапельним** шляхом відбувається передача респіраторних захворювань – туберкульозу, грипу, кору, віспи, коклюшу, дифтерії, віспи, паротиту. **Пиловим** шляхом, коли викинені з респіраторного тракту крапельки висихають у бактеріальний пил, передаються туберкульоз, дифтерія.

Вивчають мікрофлору повітря методами:

- Природної седиментації – метод Коха.
- Примусової седиментації – з використанням імпакторів, імпінджерів.
- Фільтраційним – повітря продувають крізь воду або мембранні фільтри.

Критерії оцінки санітарно-мікробіологічного стану повітря – загальна кількість мікроорганізмів (на 1 м³); індекс санітарно-показових бактерій – кількість умовно-патогенних мікробів дихальних шляхів – гемолітичних стрептококів, золотистого стафілококу, Гр- бактерій, дріжджеподібних і цвільових грибів.

Хід роботи:

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у ґрунті та воді

Великі грудочки ґрунту подрібнюють, просівають через сито з діаметром отворів не більше 3 мм, старанно перемішують і відбирають наважку не менше 10 г, яку вносять у колбу з 90 мл стерильної води. Вміст колби енергійно збовтують упродовж 3–5 хв до одержання рівномірної суспензії. Після 1,5–2-хвилинного відстоювання з отриманої суспензії (1:10) стерильною піпеткою беруть 1 мл і вносять у пробірку з 9 мл стерильної води,

одержуючи розведення 1:1000. Аналогічно чином переносять 1 мл суспензії з другої пробірки в третю, з третьої – в четверту і т.д., одержуючи потрібні десятикратні розведення (рис. 15). Зазвичай при дослідженні ґрунтів готують розведення 1:1000000.

Отримані розведення використовують для глибинного посіву. Перед посівом вміст пробірок старанно перемішують, стерильною піпеткою набирають 1 мл суспензії і переносять на дно стерильної чашки Петрі. Надалі суспензію заливають 20 мл розтопленого й охолодженого до 45 °С МПА і обережним похитуванням чашки перемішують ґрунтову суспензію з поживним середовищем. Після застигання агару чашку ставлять догори дном у термостат з температурою 30-35 °С на 24–48 год, після чого 1–2 доби витримують при кімнатній температурі. На покритті попередньо записується номер групи, прізвище студента і ступінь розведення ґрунтової суспензії.

Кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 г ґрунту, визначають за кількістю колоній, що виростили в чашці. Для підрахунку слід брати розведення, при яких на чашках виростає від 50 до 150 колоній. Середню кількість колоній на чашках відповідного розведення множать на ступінь розведення. Наприклад, у чашках, засіяних суспензією з розведенням 1:10000, виростило з середньою 60 колоній. Отже $60 \times 10000 = 600000$ бактерій міститься з 1 г ґрунту.

2. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у воді

З метою визначення загальної бактеріальної забрудненості води роблять посіви 1–0,1 мл води на тверді поживні середовища. При підозрі на велику бактеріальну забрудненість проби води розводять у десятикратних співвідношеннях, однак не більше ніж 1:1000. Для посіву на дно стерильної чашки Петрі вносять 1 мл або 0,1 мл досліджуваної води, заливають розтопленим і охолодженим до 45 °С МПА (рН 7,2–7,4), перемішуючи воду з агаром обережними круговими рухами чашки. Після застигання агару одну чашку ставлять на 24 год у термостат при температурі 37 °С, а другу витримують при кімнатній температурі протягом 48 год, після чого підраховують кількість колоній, які на них виростили. При наявності більше 300 колоній їх підраховують на $\frac{1}{4}$ частині чашки, перераховуючи потім на всю площу.

Для визначення кількості бактерій, які містяться в 1 мл

досліджуваної води, середню кількість колоній, які вирости на двох паралельних чашках, множать на розведення. Наприклад, у чашках з посівом 1 мл води, розведеної 1:100, виростило в середньому 160 колоній. Отже, в 1 мл води міститься $160 \times 100 = 16000$ бактерій. Загальна кількість бактерій при посіві 1 мл нерозведеної питної води не повинна переважати 100. Вода, яка містить **100–500** бактерій у 1 мл, вважається **сумнівною**, а **більше за 500 – непридатною** для пиття.

3. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у повітрі

Найпростіше визначити кількісний та якісний склад мікрофлори повітря можна осадженням за методом Коха. Суть його полягає в тому, що чашки Петрі з твердим поживним середовищем залишають на 5 хв відкритими в досліджуваній ділянці простору, після чого їх закривають і ставлять у термостат з температурою 37°C на 24 год. Надалі їх витримують 48 год при кімнатній температурі. Через три доби підраховують колонії бактерій та грибів і визначають бактеріальну забрудненість повітря.

Встановлено, що за 5 хв при спокійному стані повітря на площу 100 см² осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л повітря. Вирахувавши площу поживного середовища в чашці і знаючи кількість колоній, визначають кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 м³ повітря. Наприклад, у чашці Петрі діаметром 10 см виростило 25 колоній. У ній площа поживного середовища дорівнює πr^2 : $3,14 \times 5^2 = 78,5$ см². Якщо на площу 78,5 см² за 5 хв осіло 25 мікробних клітин, то за такий же час на площу 100 см² осіло б:

$$\begin{array}{l} 78,5 \text{ см}^2 - 25 \text{ клітин} \\ 100 \text{ см}^2 - x \text{ клітин} \end{array} \qquad x = 25 \times 100 / 78,5 = 32 \text{ клітин}$$

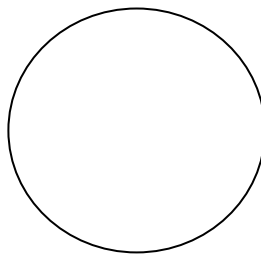
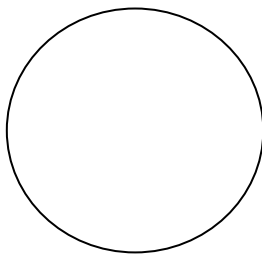
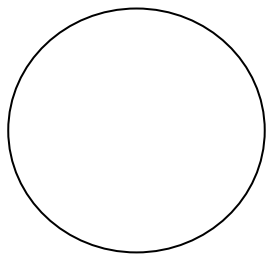
Отже, за 5 хв на площу 100 см² осіло б 32 бактеріальні клітини з 10 л повітря. Щоб визначити кількість бактерій, яка міститься в 1 м³ повітря, складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ л} - 32 \text{ клітини} \\ 1000 \text{ л} - x \text{ клітин} \end{array} \qquad x = 32 \times 1000 / 10 = 3200 \text{ клітин}$$

Проведіть власні розрахунки:

Для більш точного визначення кількості мікроорганізмів атмосфери сконструйовано спеціальні апарати, в яких повітря продувається й фільтрується через стерильні живильні середовища. До них належать прилади Кротова й Шафера.

Розглянути чашки Петрі, засіяні мікрофлорою довкілля. Замалювати зовнішній вигляд довільних колоній, дати їх характеристику. Приготувати фіксовані забарвлені препарати, промікроскопіювати їх, замалювати мікроорганізми та визначити їх морфотип:



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Дати визначення непрямих показників бактеріального забруднення природних середовищ:

- *колі-титр* - _____

- *колі-індекс* - _____

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота № 9

Мікрофлора організму людини

Мета заняття: охарактеризувати кількісний та якісний склад мікрофлори окремих біотопів організму людини.

Матеріали й обладнання: стерильні градуйовані піпетки, піпетки Пастера, предметні скельця, маркери по склу, спиртівки, мікроскопи, фуксин основний (водний розчин), термостат, 96% етанол, стерильні зубочистки, стерильні чашки Петрі з МПА.

Умови існування мікробів у людському організмі неоднакові. Мікрофлора розміщується на шкірі, слизових оболонках порожнин, що контактують із зовнішнім середовищем, окрім матки та сечового міхура. Усі тканини організму в нормі вільні від мікробів.

Мікробіотиopi організму суттєво розрізняються за газовим складом повітряного середовища, спектром ферментів та імунних факторів, продуктів метаболізму, біологічно активних речовин, рівнем рН, набором екзогенних речовин. Усі ці параметри відрізняються в ротовій порожнині, стравоході, шлунку, товстому і тонкому кишечнику, піхві, носі, верхніх і нижніх дихальних шляхах, шкірі. Власних клітин людського організму значно менше, ніж мікробних.

До народження організм людини стерильний – ембріон захищений плацентарним та іншими бар'єрами. Через травму чи хворобу матері відбувається внутрішньоутробне інфікування плоду, тому що ембріональні імунні механізми захисту відсутні, а неспецифічні знаходяться в зародковому стані.

Мікрофлора травного тракту найчисленніша і найзначніша для підтримки здоров'я людини. Особливо значна її роль у дитячому організмі. Існують два критичні моменти у процесі формування кишечного мікробіоценозу. Перший – при народженні дитини, коли протягом перших діб починається колонізація стерильного кишечнику, другий – коли дитину відлучають від грудного годування.

Постійна мікрофлора містить представників, специфічних для цього біотопу, випадкова складається з особин занесених ззовні

(ШКТ – з їжею). Фізіологічна роль представників постійної мікрофлори неоднозначна. У ній розрізняють 2 фракції:

- облігантна мікрофлора – основна складова мікробіоценозу, бере участь у процесах ферментації, імуностимуляції, тобто виконує захисні й інші нормофізіологічні функції. Проявляється бродильною активністю (розпадом вуглеводів з утворенням кислих продуктів),

- факультативна мікрофлора складає меншу частину. Бере участь у гнильних процесах (розпаді білкових речовин з утворенням лужних продуктів). Нормофізіологічні функції – протидія випадковій мікрофлорі, участь у ферментативних процесах, важливих для локального біотипу. При дисбіозі кількість представників зростає – викликають патологічні процеси (нагнівання, некрози).

На **шкірі** виявляється як аеробна, так і анаеробна флора. Бактерії утворюють нагромадження під шаром зроговілих клітин епідермісу, у вустях волосяних фолікул, потових і сальних залоз. Концентрація та видовий склад залежать від вмісту шкірного жиру, вологості, рН, температури. Секреція потових залоз, нейтральна рН і тепло зумовлюють збільшення кількості мікроорганізмів. До складу облігатної мікрофлори входять різноманітні види *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*. На шкірі здорових людей відсутні ентеробактерії, дріжджеподібні гриби, бактероїди. У новонароджених поверхневий жировий шар досить щільний, надалі зменшується. Відповідно з віком зменшується густина нормальної мікрофлори.

У нормальній мікрофлорі **кон'юктиви** домінують дифтероїди, нейсерії, мораксели. На кількісний та якісний склад бактерій впливає слізна рідина, в якій міститься лізоцим, що володіє антибактеріальними властивостями.

Особливість мікрофлори **вуха** – відсутність бактерій в середньому вусі (бактерицидна дія вушної сірки). Проте вони можуть проникати у середнє вухо через євстахієву трубу, з глотки. У зовнішньому вусі виявляють стафілококів, коринебактерій, рідше зустрічаються *Pseudomonas* і *Candida*.

Власна мікрофлора **носа** представлена коринебактеріями, нейсеріями, коагулазо-негативними стафілококами, альфа-

гемолітичними стрептококами. Транзиторні види: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, бета-гемолітичні стрептококи.

Мікробіоценоз **ротової порожнини** різноманітний, у ньому заходиться біля 300 видів, максимальна концентрація досягає 10^8 - 10^{11} на 1 г слини. Анаеробна мікрофлора ротової порожнини починає швидко розвиватися після прорізування зубів. Природну складають бактероїди, фузобактерії, стафілококи, нейсерії, стрептококи, спірохети, молочнокислі бактерії. Незважаючи на анатомічну близькість – синуси, евстахієві труби, нижні дихальні шляхи в нормі стерильні.

Мікрофлора **стравоходу і шлунка** не буває постійною, залежить від характеру їжі. У стравоході – відповідає мікробіологічному пейзажу рота. Мікробіоценоз шлунка – бідний – представлений лактобацилами, стрептококами, хелікобактерами, дріжджеподібними грибами.

Кишечник – біотип із найвищою густиною мікробної колонізації. У дванадцятипалій і порожній кишці переважають стрептококи, лактобацили, вейлонели, у повздошній – кишечна паличка й анаеробні бактерії. У товстому мешкає 500 видів мікроорганізмів.

Розрізняють мікрофлору:

- *мукозну* – разом із компонентами позаклітинного матриксу формують біоплівку. Спеціальні дослідження показали, що в біоплівці, по-іншому, порівняно з чистими культурами бактерій, відбуваються фізіологічні процеси, в тому числі й продукція метаболітів. Спільнота утворює єдину генетичну систему у вигляді плазмід, що несуть поведінковий код для членів біоплівки, визначаючи їх трофічні, енергетичні зв'язки між собою та навколишнім середовищем – соціальна поведінка *quorum sensing* мікроорганізмів. Реакція мікроорганізмів на зміну умов середовища в біоплівці суттєво відрізняється від реакції кожного окремого виду. Така організація забезпечує її фізіологічну й функціональну стабільність і є запорукою конкурентного виживання в екологічній ніші;

- *присінкову*;

- *просвітну*.

Слизиста суцільним газонем заселена асоціаціями анаеробних (97%) і факультативно-анаеробних бактерій. Сумарна біомаса їх

складає 5% ваги (2-5 кг). Містяться ентеробактерії, ентерококи, стафілококи, лактобактерії, бактероїди, біфідобактерії, клостридії. Несподівана наявність актиноміцетів. Природна мікрофлора виконує важливі фізіологічні функції:

- 1) забезпечує колонізаційну резистентність слизової, тобто перешкоджає закріпленню та розмноженню мікробів, невлавистих біотипу. Кисле середовище, яке забезпечується молочною й оцтовою кислотою лактобактерій та біфідобактерій, перешкоджає розмноженню гнильної і патогенної мікрофлори;
- 2) стимулює процеси формування імунної системи в новонароджених і підтримку імунного тону в дорослих за допомогою пептидоглікану клітинної стінки бактерій та інших ад'ювантно-активних макромолекул;
- 3) бере участь у обмінних процесах – за рахунок продукції ферментів для метаболізму білків, ліпідів, НК, жовчевих кислот, підтримання водно-сольового балансу, синтезу вітамінів групи В, К, D, регуляції газового середовища кишечника;
- 4) бере участь у біохімічних процесах травлення;
- 5) зумовлює інактивацію екзогенних і ендогенних токсичних продуктів за допомогою механізмів біотрансформації та біодеградації.

Еубіоз – нормальний стан природної мікрофлори організму. Характеризується стабільним складом мікробіоценозів і повним об'ємом їх фізіологічних функцій. Мікробіологічні нормативи, на які орієнтуються при визначенні еубіозу коливаються в широких межах. Найчастіші наявні міжпопуляційні відмінності, які залежать від клімато-географічних умов і традицій харчування (Крайня Північ, Кавказ чи Африка, вегетаріанство, дієти) та віку.

Дисбіоз – характеризується відхиленням у складі мікробіоценозу, що суттєво виходять за рамки фізіологічної норми. Фактори, що порушують еубіоз:

- застосування антибіотиків, гормонів, імунодепресантів, променевої терапії;
- хірургічні операції, особливо на органах ШКТ;
- тривалий вплив несприятливих екологічних факторів у побуті та на виробництві;

- гострі кишечні інфекції, різноманітні хронічні захворювання шлунка, кишечника, печінки;
- нервово-психічний стрес;
- голодування, нераціональне харчування, авітаміноз.

Дисбіоз у ранньому віці виникає при патології родів, ЦНС у післяродовий період, респіраторній інфекції, харчовій алергізації, пізньому прикладанні до грудей, ранньому переході на штучне годування.

При глибокому дисбіозі опортуністичні мікроби-симбіонти з місць звичайного існування розповсюджуються в інші біотопи, у стерильні органи і тканини, викликаючи нагноєння та інші патологічні процеси.

Лабораторна діагностика дисбіозу базується на визначенні у клінічному зразку кількісного і якісного складу мікробів конкретного біотопу (ідентифікують до роду).

Розрізняють компенсований (1-2 стадії) та некомпенсований (3-4 стадії) дисбактеріоз. Клінічні прояви при першому слабо виражені, іноді можливе самостійне одужання без спеціального лікування. Декомпенсація мікробіоценозу проявляється глибоким дефіцитом біфідобактерій, лактобактерій, типових ешерихій, зростаючою експансією і агресією умовно-патогенної аеробної флори. Останні виходять за межі екологічної ніші з дисемінацією по всьому організму. Застосовують базову терапію препаратами-еубіотиками:

- монокомпонентні – біфідумбактерин, лактобактерин, колібактерин, ентерол.
- полікомпонентні – біфікол, біфілат, лінекс, біоспорин.

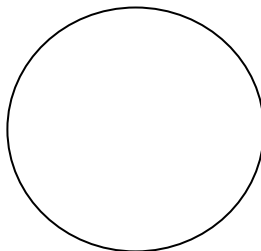
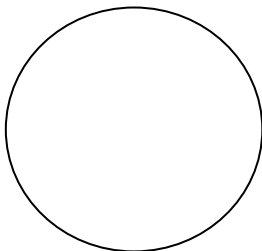
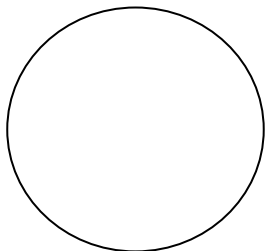
Хід роботи:

Дослідження мікрофлори зубної осуги, волосини та пальців рук методом прямої інокуляції

Для проведення дослідження висіяти на поверхні МПА в чашку Петрі мікрофлору зубної осуги, волосини, зробити відбитки пальців рук. Для цього чашки Петрі з МПА із зовнішнього боку розділити на три сектори (від центру до периферії), які засіяти мікрофлорою різних об'єктів. Чашки інкубувати в термостаті протягом однієї доби при температурі 37 °С.

Проаналізувати чашки Петрі, засіяні мікрофлорою повітря та

людського організму, замалювати їх зовнішній вигляд. Із довільних колоній приготувати фіксовані препарати, промікроскопіювати їх і запротоколювати, охарактеризувавши колонії.



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №10 Виділення збудників різних типів бродінь

Мета заняття: ознайомитися з морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями збудників бродінь; освоїти методи виявлення продуктів бродінь.

Матеріали й обладнання: колби місткістю 250 мл, сахароза, $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 , термостат, картопля, крейда, мікробіологічні пробірки з гумовими корками, розчин Люголя, 5% розчин $FeCl_3$, *Saccharomyces cerevisiae*, молочнокислі продукти, огірковий розсіл, мікробіологічні петлі, спиртівки, мікроскопи, предметні скельця, метиленовий синій, насичений розчин $CuSO_4$, 0,2% розчин тіофену в спирті, водяна баня, електрична плитка.

Мікроорганізми характеризуються великою різноманітністю перетворення органічних сполук, серед яких на особливу увагу заслуговують різноманітні види бродінь.

Особливості бродіння:

- окисно-відновні перетворення органічних сполук відбуваються в анаеробних умовах;
- здійснюється переважно еубактеріями та мікроскопічними грибами;

- зброджуванню піддаються вуглеводи (полісахариди перед бродінням гідролізуються до моноцукрів), амінокислоти, пурини, піримідини, спирти, органічні кислоти;

- кінцеві продукти бродіння – органічні спирти – етанол, ізопропанол, бутанол, органічні кислоти – лактат, пропіонат, форміат, бутират, сукцинат, капронат, ацетат, нейтральні продукти – 2,3-бутандіол, ацетон, гази – CO_2 і H_2 ;

- назва бродіння визначається кінцевим продуктом, що міститься в мажорній кількості – спиртове, молочнокисле, пропіоновокисле, мурашинокисле, маслянокисле, оцтове тощо;

- із субстрату вилучається лише частина енергії;

- АТФ утворюється шляхом субстратного фосфорилування. Найпоширеніші серед них такі реакції: ацетаткіназна, фосфогліцераткіназна та піруваткіназна. Інші реакції обмежені специфічними типами бродінь (піримідини, пурини).;

- будь-який вид бродіння можна розглядати як двостадійний

процес: **перша стадія** – перетворення глюкози до пірвіноградної кислоти одним із трьох відомих шляхів – Ембдена–Меєргофа–Парнаса, Ентнера–Дудорова чи пентозофосфатним, **друга стадія** – використання атомів водню для відновлення пірвату або його перетворення до специфічних кінцевих сполук.

Збудники спиртового бродіння широко зустрічаються в природі. Це дріжджові та цвільові гриби, деякі бактерії. Культурні дріжджі, виведені шляхом тривалої селекції з диких, відрізняються від останніх тим, що здатні витримувати великі концентрації спирту в середовищі й утворюють менше побічних продуктів. До них належать *Saccharomyces cerevisiae*.

Анаеробний процес розщеплення вуглеводів ферментами молочнокислих бактерій з утворенням молочної кислоти та інших продуктів отримав назву молочнокисле бродіння. Розрізняють дві його різновидності: гомо- та гетероферментативне бродіння.

При гомоферментативному молочнокислому бродінні внаслідок перетворення молочного цукру утворюється тільки молочна кислота. Його збудником є *Streptococcus lactis*, *St. cremoris*, *Lactobacillus bulgaricum*, *L. acidophilus*.

При гетероферментативному бродінні, крім молочної кислоти, утворюються також леткі кислоти, спирти та ефіри. Мікроорганізми, що здійснюють гетероферментативне бродіння, частіше зустрічаються у квашених овочах та силосі. До них належать *L. brevis*, *L. brassice*, *Leuconostoc mesenteroides*.

Складний процес перетворення вуглеводів у масляну кислоту й інші продукти має назву маслянокисле бродіння. Здійснюється він групою анаеробних спороносних бактерій. Процесу маслянокислового бродіння піддаються не тільки цукри, але й інші, більш складні вуглеводи. До його збудників належать *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum*.

Хід роботи:

1. Дослідження спиртового бродіння

У колбу місткістю 250 мл наливають 50 мл 20 %-ного розчину сахарози й приблизно 1 г пекарських дріжджів, розведених у 10 мл розчину 20 %-ної сахарози. Колбу закривають пробкою із зігнутою трубкою, нижній кінець якої занурюють у пробірку з барієвою водою, і витримують при температурі 33–40

°C на водяній бані. Через 10–15 хв через трубку виходить CO₂, про що свідчить утворення осаду BaCO₃ і помутніння розчину. Надалі колбу переносять у термостат (температура 33–40 °C).

Через тиждень вміст колби перевіряють на наявність у ньому спирту. Для цього у пробірку з 2–3 мл досліджуваної рідини додають кристалик K₂Cr₂O₇ і кілька крапель H₂SO₄, після чого підігривають.

Вміст пробірки внаслідок окислення хрому набуває зеленого забарвлення, за запахом виявляють оцтовий альдегід, а за допомогою перегонки – етиловий (демонструє лаборант).

2. Виявлення масляної кислоти та збудників при маслянокислому бродінні

Неочищену картоплю нарізають шматочками і заповнюють ними пробірку на 1/3 об'єму, додають грудку крейди й заливають водою майже до верху. Пробірки ставлять на водяну баню при температурі 80 °C на 10–15 хв, після чого закривають гумовими корками і переносять у термостат з температурою 25 °C. Після семиденної інкубації в культуральному середовищі проводять якісні реакції:

- для виявлення масляної кислоти до 5 мл культуральної рідини додають 2 мл 5 %-ного хлориду заліза (III) і підігривають – утворюється маслянокисле залізо коричневого кольору;
- для одержання маслянокислого ефіру (ананасової есенції) до 2–3 мл зброженої рідини додають 0,5 мл 96 %-ного етанолу й 1 мл концентрованої сірчаної кислоти; суміш нагрівають – з'являється характерний запах ефіру.

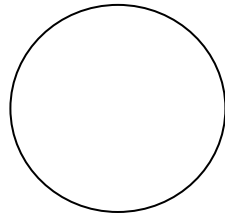
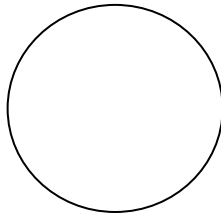
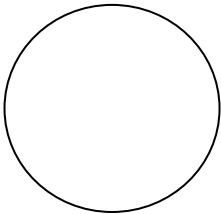
При мікроскопіюванні культуральної рідини в основному виявляють *C. pasteurianum* (при приготуванні препарату необхідно додавати розчин Люголя, який забарвлює гранульозу кластридій у синій колір).

3. Виявлення молочної кислоти у продуктах харчування при молочнокислому бродінні

Утворення молочної кислоти при молочнокислому бродінні у продуктах харчування доводять за допомогою якісної реакції. Для цього до 2 мл профільтрованого через складчастий фільтр продукту додають 5 мл концентрованої H_2SO_4 і 10 крапель насиченого розчину $CuSO_4$. Суміш нагрівають, струшуючи, на водяній бані при $100\text{ }^\circ C$ протягом 5 хв. Після охолодження додають 3–5 крапель 0,2 %-ного спиртового розчину тіофену.

За наявності молочної кислоти виникає вишнево-червове забарвлення.

Приготувати забарвлені фіксовані препарати збудників бродінь. Промікроскопіювати, замалювати їх і вказати збудників:



ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №11

Виділення мікроорганізмів, які руйнують клітковину й пектинові речовини

Мета заняття: ознайомитися з методами одержання і виділення бактерій, які розкладають клітковину та пектинові речовини.

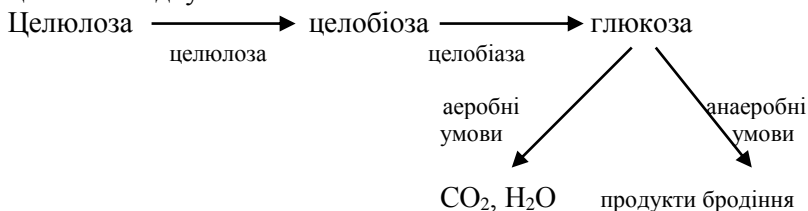
Матеріали й обладнання: мікробіологічні пробірки, фільтрувальний папір, середовище Імшенецького, водний розчин фуксину, ґрунт, термостат, автоклав, мікробіологічні петлі, стебла льону або кропиви, предметні скельця, пінцети, мікроскопи.

Найпоширеніша органічна речовина у природі – целюлоза, до складу якої входить 50% вуглецю біосфери. Полімер дуже стійкий до дії кислот і лугів, у воді лише набухає. Синтезується рослинами й оцтовокислими бактеріями, а розпад здійснюється мікроорганізмами, що належать до різних екологічних ніш із різноманітними природними режимами. Розщеплення целюлози забезпечує повернення CO_2 в атмосферу, формує структуру ґрунту взагалі, й гумусових речовин, зокрема.

В аеробних умовах розпад забезпечують бактерії, актиноміцети, гриби родів *Cytophaga*, *Mycococcus*, *Sporocytophaga*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*.

В анаеробних умовах целюлозу розкладають бактерії роду *Clostridium* чи *Ruminococcus* (у рубці жуйних тварин).

Розщеплення відбувається за схемою:



Пектини містяться в серединних пластинках, що склеюють рослинні клітини у тканини. Крім того, у великих кількостях наявні в шкірці та м'якоті яблук, груш, цитрусових, винограду, у

листяках і коренеплодах. Належать до складних цукрів, мономерами яких є галактуронова кислота. Відомо три типи пектинових речовин: пропектин, пектин, пектинова кислота (розрізняються за розчинністю).

Бактерії розкладають усі пектинові речовини. Кількість пектинолітичних бактерій у ґрунті складає 10^5 на 1 г. Процес розщеплення схожий до маслянокислого бродіння. Мікроорганізми синтезують 3 види ферментів: пропектиназу (розщеплює пропектин до пектину), пектиназу (гідролізує метилефірний зв'язок пектинової кислоти і метилового спирту), полігалактуранази (руйнує 1,4- β -глікозидні зв'язки між мономерами). Продукти розпаду – моноцукри галактоза, арабіноза, які в подальшому піддаються окисленню чи бродінню. У практиці має значення як процес, що призводить до виділення волокон клітковини прядильних культур. Пектинові речовини руйнують вимочуванням:

- водяним – в анаеробних умовах за допомогою *Clostridium*, *Bacillus*;
- росяним – в аеробних умовах за допомогою бактерій і цільових грибів *Fusarium*, *Erwinia*;
- тепловим – за температури 32-38⁰C із використанням чистих культур.

Окрім того, кальцієві солі полігалактуранових кислот використовуються для виготовлення фруктових желе і мармеладу, а пектинолітичні ферменти – у технічних цілях (наприклад, для освітлення соків).

Хід роботи:

1. Одержання накопичувальної культури целюлозолітичних бактерій на середовищі Імшенецького

- у мікробіологічні пробірки розлити середовище Імшенецького;
- у кожную з пробірок кладуть 2–3 смужки фільтрувального паперу довжиною 6–8 см, шириною 0,5 см і стерилізують;
- стерильні пробірки заражають грудочкою ґрунту чи гною;
 - частину пробірок закривають корками, ставлять у термостат при температурі 30–35 °C для виділення мезофільних форм, решта – витримують у термостаті при 60–65 °C для накопичення термофільних бактерій.

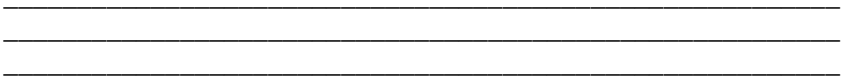
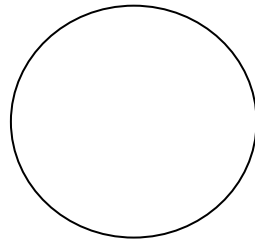
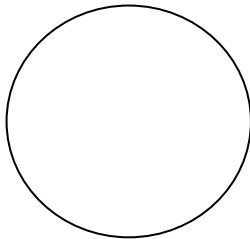
Спостерігаємо повільне руйнування клітковини, що припиняється через 2–3 тижні при 30–35 °С та бурхливе руйнування клітковини через 3–4 дні, пінення рідини, виділення газів; пожовтіння, ослизнення (аж до поступового перетворення в аморфну масу слизу) й осідання на дно смужок фільтрувального паперу; закінчення бродіння – на 8–10 добу при 60–65 °С.

2. Виділення пектинолітичних бактерій

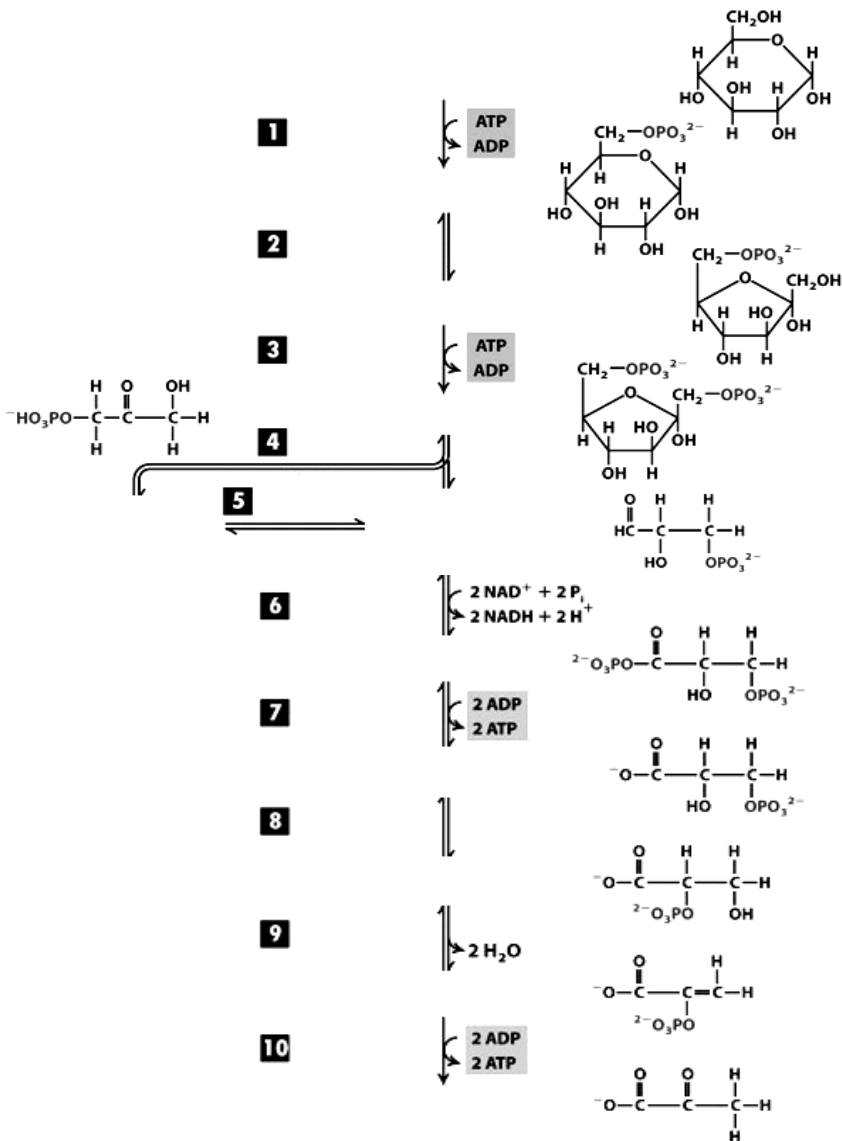
Для виділення пектинруйнуючих бактерій використовують льняне або кропивне середовище:

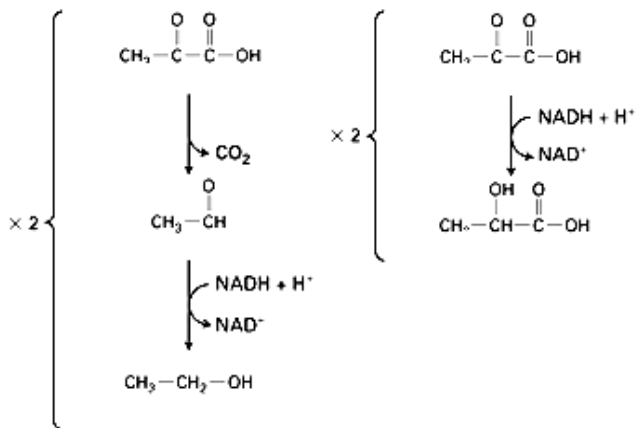
- зі стеблин льону чи кропиви готують снопики довжиною 5–7 см, зв'язуючи ниткою їх кінці;
- внести снопики у мікробіологічні пробірки, залити на $\frac{2}{3}$ об'єму водогінною водою і кип'ятити 15–20 хв;
- Воду зливають, стерилізують з новою порцією води, а всередину снопика вставляють свіжу соломинку льону для зараження.
- пробірки ставлять у термостат при температурі 35–37 °С. Спостерігаємо через 4–5 дні процес пектинового бродіння: рідина піниться й мутніє; гази, виділяючись, виносять снопик на поверхню середовища. Після його закінчення (через 1,5–2 тижні) снопики опускаються на дно.

Зі зруйного матеріалу приготувати фіксовані, забарвлені препарати та промікроскопіювати їх.



Доповнити наведену схему назвами сполук і ферментів, що забезпечують перетворення кожної з них. Вказати, які типи бродінь на ній зображені:





ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №12

Перетворення мікроорганізмами азотовмісних речовин

Мета заняття: навчитися одержувати накопичувальні культури амоніфікаторів-аеробів; ознайомитися з процесами нітрифікації, денітрифікації та азотфіксації, розглянути будову бульбочок бобових, виділити бактерії, що здійснюють перетворення сполук азоту.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі, МПА, колби місткістю 250 мл, родючий ґрунт, живі кореневі системи різних бобових рослин із бульбочками, ботанічні бритви, мікробіологічна петля, бобовий агар, водний розчин фуксину, реактив Неслера, реактив цинк-йод-крохмал, 20%-на H_2SO_4 , концентрована H_2SO_4 , дифеніламін, середовище Гільтая, спиртівка, предметні скельця, 10%-ний розчин BaCl_2 , фарфорові палетки, середовище Ешбі, колби місткістю 100-150 мл, 10%-ний розчин Люголя, промисловий препарат «Білизна» (1:5), 96% етанол, стерилізована дистильована вода, FeCl_3 , мікроскопи.

Азот належить до надзвичайно інертних хімічних елементів, не підтримує процесів дихання та горіння. Проте входить до складу численних неорганічних і органічних речовин – білків, нуклеїнових кислот, енерговмісних молекул, вітамінів, фосфоліпідів. Молекулярний азот – мажорний компонент земної атмосфери, на його частку припадає майже 80%. Однак у такому вигляді елемент не засвоюється більшістю рослин, для свого живлення вони використовують мінеральні сполуки ґрунту. Проте існує велика група мікроорганізмів, як вільноживучих так і симбіотичних форм, що здатні фіксувати азот атмосфери. Отже, у природі постійно відбувається кругообіг азоту, який включає: розпад органічних речовин до аміаку (амоніфікацію), окислення аміаку органічних сполук до нітритів і нітратів (нітрифікацію), відновлення нітратів до молекулярного азоту (денітрифікацію).

Амоніфікація (гниття) – розпад білків, пептидів, амінокислот, нуклеїнових кислот, хітину, гумусових речовин, сечовини мікроорганізмами ґрунту. Це складний багатofазовий процес, кінцеві продукти якого залежать від складу білка, умов розпаду, збудників амоніфікації.

Етапи амоніфікації:

- Гідроліз білків під дією протеолітичних екзоферментів до пептонів і пептидів, у кінцевому рахунку – до амінокислот.

- Перетворення амінокислот. Найчастіше відбувається шляхом дезамінування. При цьому утворюються оксикислоти та аміак.

- Перетворення вуглецевого залишку:

- в аеробних умовах до CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S , H_2 – здійснюють *Bacillus*, *Pseudomonas*;

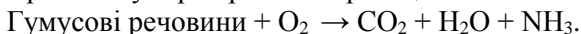
- в анаеробних умовах утворюються CO_2 , NH_3 , спирти, органічні кислоти, діаміни, при розпаді ароматичних амінокислот – крезולי, феноли – здійснюють *Clostridium*, *Proteus vulgaris*, гриби, актиноміцети.

Амоніфікація нуклеїнових кислот можлива за рахунок синтезу ферментів дезоксирибонуклеаз і рибонуклеаз бактеріями, грибами, актиноміцетами. Процес включає кілька етапів:

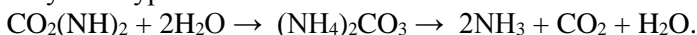
Нуклеїнові кислоти → мононуклеотиди → фосфорна кислота + азотиста основа + пентози.

Останні в анаеробних умовах розпадаються до різноманітних органічних кислот, а в аеробних – до CO_2 , H_2O . Азотисті основи розкладаються з утворенням сечової кислоти, сечовини, амінокислот і в кінцевому підсумку аміаку й органічних кислот.

Дуже повільно відбувається амоніфікація гумусових сполук ґрунту (1-3% за рік), причому як анаеробними, так і аеробними бактеріями. Сумарне рівняння реакції:



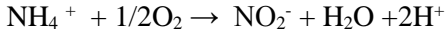
Сечовина (людського організму, організму тварин, окремих грибів) гідролізується лужновитривалими уробактеріями: *Micrococcus ureae*, *Sporosarcina ureae*, *Bacillus pasteurii*. Процес каталізується уреазами:



Процес окислення аміаку, що утворився при розпаді органічних речовин у ґрунті та воді до азотистої, азотної кислоти, називається **нітрифікацією**.

Працями Виноградського С.М. (1890-1892 рр.) показано, що нітрифікація зумовлена двома групами хемолітотрофів, які перебувають у метабіозних взаємовідношеннях:

- нітробактеріями (*Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*), ферменти яких каталізують реакцію:



- *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Bacillus*, ферменти яких каталізують реакцію:



Процес нітрифікації локалізований на ЦПМ і внутрішньоцитоплазматичних мембранах. Йому передують поглинання NH_4^+ і перенесення його через ЦМ транслоказами. При окисленні аміаку до нітриту атом азоту втрачає 6 електронів. Припускають, що на першому етапі аміак окислюється до гідроксиламіну за допомогою монооксигенази, що каталізує приєднання до молекули аміаку 1 атому кисню, другий взаємодії з НАДН₂, що призводить до утворення води.

Гідроксиламін далі ферментативно окислюється до нітриту.

Електрони від гідроксиламіну поступають у дихальний ланцюг на рівні цитохрому с і далі – на термінальну осидазу. Їх транспорт супроводжується перенесення двох протонів через мембрану. При цьому утворюється протонний градієнт і синтезується АТФ. Друга фаза нітрифікації супроводжується втратою 2 електронів. Окислення нітриту до нітрату каталізується молібденвмісною нітритоксидазою, локалізованою на внутрішньому боці ЦПМ.

Електрони поступають на цит a1 і через цит с на термінальну осидазу aa3, де акцептуються молекулярним киснем.

Інтенсивність нітрифікації залежить від типу ґрунту. Нітрати, на відміну від солей амонію, вимиваються водою, тому для збагачення ними ґрунту вносяться азотні добрива.

Денітрифікація – процес відновлення нітратів до молекулярного азоту. Розрізняють:

Пряму денітрифікацію – безпосередньо пов'язану з життєдіяльністю денітрифікуючих бактерій. Вона буває двох типів:

- *асимільаторна* – нітрати відновлюються до аміаку, які використовуються як джерело азоту для побудови тіла мікроорганізмів. Здійснюють *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Thiobacillus*.

- *дисимільаторна* – нітрати використовуються як окислювачі органічних речовин замість молекулярного кисню. Початкові

етапи каталізуються нітратредуктазою. Здатні здійснювати лише певні аеробні бактерії.

Непряму денітрифікацію - молекулярний азот виділяється в результаті реакцій між азотистою кислотою й амінними (амідними) сполуками.

У дихальному ланцюзі денітрифікаторів під час перенесення електронів на нітрат функціонують два генератори АТФ (замість трьох при перенесенні електронів на O_2). Процес відновлення нітрату до нітриту відбувається на внутрішньому боці сторони ЦПМ. За іншими даними, ферментний комплекс має трансмембранну орієнтацію, внаслідок чого поглинені з цитоплазми протони переносяться на протилежний бік, де беруть участь у нітратредуктазній реакції. В будь-якому з варіантів це приводить до створення трансмембранного протонного градієнта потрібного напрямку. Тобто при денітрифікації перенесення 2 електронів пов'язано з трансмембранним перенесенням 4 протонів, а отже, енергетичний вихід складає приблизно 70% порівняно з диханням аеробів.

Усі денітрифікуючі бактерії – факультативні анаероби, що переключаються на денітрифікацію тільки за відсутності O_2 . Здатність до денітрифікації розвинулася після сформування механізмів використання O_2 як кінцевого акцептора електронів. Першим кроком на шляху вторинного пристосування до анаеробних умов був розвиток нітратного дихання. Наступний крок – вдосконалення здатності використовувати нітрати для акцепції електронів дихального ланцюга – привів до виникнення денітрифікації.

Денітрифікуючі бактерії – мешканці прісних і морських водойм, ґрунтів різного типу, у зв'язку з чим денітрифікація широко розповсюджена у природі. Цей процес слугує джерелом атмосферного азоту, оскільки це необхідна ланка в кругообізі азоту в природі. Водночас денітрифікація має негативне значення – приводить до збіднення ґрунтів азотом. Втрати азотних добрив у ґрунтах у результаті денітрифікації можуть складати від 5 до 80%. Один зі способів боротьби з денітрифікацією – опушення ґрунту – створює аеробні умови, які примушують денітрифікуючі бактерії перебудовувати електронтранспортні системи, здійснюючи перенесення електронів на O_2 , а не на нітрати.

Фіксація молекулярного азоту відбувається фізико-хімічним шляхом (кількість зв'язаного азоту незначна, спостерігається за дії електричних розрядів під час грози) та біологічним (симбіотичними та вільноживучими мікроорганізмами). Значення азотфіксації – підтримання азотного балансу у природі; підвищення родючості ґрунту.

Першим дослідником, який виявив зростання родючості ґрунту після вирощування бобових культур, був француз Ж.Бусенго. Він припустив, що бобові здатні асимілювати атмосферний азот, проте не пов'язав це з життєдіяльністю мікроорганізмів. Німецькі дослідники Г.Гельрігель і Г.Вільфарт у 1888 році довели, що мікроорганізми кореневих бульбочок бобових – безпосередні учасники процесу азотфіксації.

Симбіотичні бульбочкові бактерії належать до роду *Rhizobium* (грамнегативні) і розглядаються як група споріднених мікроорганізмів. Молоді бактерії – паличкоподібні, рухливі, діаметром 1,2-3 мкм, із перитрихіальними чи субполярними джгутиками. Зрілі – поліморфні (бактероїди), нерухомі, заповнені жировими включеннями. Належать до груп мезофілів, нейтрофілів. Для бульбочкових бактерій характерна:

- Специфічність – заражають лише певну групу бобових рослин;
- Вірулентність – здатні проникати у тканину кореня, розмножуватися й утворювати бульбочки.
- Активність – здатні в симбіозі з рослинами фіксувати атмосферний азот.

У ґрунті виявляють штами:

- **активних** бульбочкових бактерій – зумовлюють утворення великої кількості корневих бульбочок та інтенсивну азотфіксацію. Бульбочки рожевого забарвлення за рахунок наявності пігменту легемоглобіну (схожого до гемоглобіну крові);
- **неактивних** – спричиняють утворення зеленкуватих бульбочок, азотфіксації не відбувається.

Механізм проникнення бактерій у кореневий волосок бобових:

1. За допомогою ліпополісахариду клітинної стінки бактерії прикріплюються до певного білка клітин кореня.
2. Бактерії проникають у клітину кореневого волоска.

3. Бактерії посилено розмножуються та формують інфекційну нитку.

4. Інфіковані та сусідні клітини інтенсивно діляться з утворенням бульбочок. У однорічних рослин – бульбочки тимчасові утворення, в багаторічних – функціонують кілька років.

Симбіотичні взаємовідносини забезпечують бактеріям постачання вуглеводів, а рослинам – зв'язані сполуки азоту (амінокислоти) та розвиток імунітету.

Найінтенсивніше азотфіксація здійснюється бактероїдами. Після відмирання рослин бактерії сапрофітно існують у ґрунті до наступного проникнення в корені.

Утворення, схожі на бульбочки, характерні для багатьох небобових рослин родин: *Coriariaceae*, *Betulaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae*. У тропічних лісах поширені злаки, кореневі бульбочки яких утворені *Azospirillum*. Бульбочки можуть формуватися на інших рослинних органах, наприклад, на листках представників родини *Rubiaceae*.

Вільноживучі азотбактерії є як анаеробними (наприклад, відкритий С.М. Виноградським у 1893 р. *Clostridium pasteurianum*), так і аеробними (зокрема, відкритий у 1903 р. М. Байєрінком *Azotobacter chroococcum*). Азотфіксація властива представникам родин *Spirillaceae*, *Achromobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, зеленим, пурпурним фототрофам, мікобактеріям, спірохетам, ціанобактеріям, проактиноміцетам.

Процес зв'язування азоту – дуже енергомісткий. Необхідно затратити 941 кДж/моль для розриву трьох зв'язків у молекулі азоту. Відбувається двома шляхами – відновлення й окислення. Більшість науковців схиляється до думки, що азотфіксація здійснюється відновним шляхом, основний компонент якого – нітрогеназа. Фермент складається з молібдофередоксину (білок містить молібден і залізо) й азофередоксину (білок містить лише залізо). Каталізує процес, при якому водень відновної сполуки переноситься на N_2 з утворенням NH_3 . Активація азоту й водню забезпечується білком негемінової природи – фередоксином. Процес відбувається у три стадії: молекулярний азот → діамін → гідразин → аміак.

Хід роботи:

1. Отримання накопичувальних культур амоніфікаторів-аеробів:

- для зараження поживного середовища й одержання накопичувальних культур амоніфікаторів-аеробів у колбі місткістю 250 мл готують ґрунтову суспензію, розводячи 10 г ґрунту в 90 мл стерильної дистильованої води;
- у нагріті на водяній бані до 40–50 °С пробірки з МПА (10–20 мл) вносять одну петлю отриманої суспензії, перемішують катанням між долонями і виливають у стерильну чашку Петрі;
- засіяні чашки ставлять на декілька діб у термостат при 25–28 °С.

2. Отримання нітрифікувальних бактерій:

- розлити в ерленмейєрівські колби шаром 1,0–1,5 см стерильного середовища С. Виноградського;
- закривають колби ватними корками і ставлять у термостат при 25–28 °С на 14–21 день;
- наявність аміаку в середовищі через два тижні перевіряють за допомогою *реактиву Неслера*;
- утворення азотистої кислоти перевіряють за реакцією з реактивом цинк-йод-крохмаль: у фарфоровій палетці до 3 крапель *цинк-йод-крохмалю* додають 1 краплю 20 %-ного розчину H_2SO_4 і 1 краплю досліджуваної рідини –у присутності азотистої кислоти рідина забарвлюється в темно-синій колір;
- утворення азотної кислоти перевіряють за реакцією з дифеніламіном – у фарфорову палетку до 3–4 крапель концентрованої H_2SO_4 додають кристалик *дифеніламіну* і, після його розчинення, 1 краплю середовища для другої фази нітрифікації. При наявності азотної кислоти рідина забарвлюється в темно-синій колір. За інтенсивністю забарвлення роблять висновок про накопичення нітратів і нітритів.

3. Отримання денітрифікувальних бактерій:

- стерильні мікробіологічні пробірки із високим шаром середовища Гільтая заражають грудочкою ґрунту, покривають вазеліновою олією, закривають корками і ставлять на 5–7 днів у термостат при 30–35 °С;
- вміст пробірок перевіряють на зникнення нітратів і нітритів за якісними реакціями з дифеніламіном і реактивом цинк-йод-крохмаль відповідно, утворення аміаку перевіряють за

допомогою реактиву Неслера (позитивна реакція свідчить про відновлення нітратів до аміаку).

4. Одержання вільноживучих азотфіксаторів:

- стерильне середовище Ешбі (використовується для накопичення вільноживучих азотфіксаторів) розливають шаром 1–1,5 см у колби об'ємом 100–150 мл;
- заражають середовище парниковим ґрунтом (1/2 чайної ложки);
- колби закривають ватними корками і ставлять на 5–7 діб у термостат при 28–30 °С;
- спостерігають утворення на поверхні середовища коричнево-бурої плівки азотобактерій (запах масляної кислоти вказує на їх розвиток у середовищі);
- для виявлення масляної кислоти 5 мл рідини з колби переносять у пробірку, додають 2 мл 10 %-ного розчину FeCl_3 і нагрівають до кипіння – утворюється розчин маслянокислого заліза криваво-червоного кольору (для порівняння готують два препарати – з плівки і з нижніх шарів рідини).

5. Приготування препарату бульбочки:

- ретельно відмитий від залишків ґрунту корінець із бульбочкою поставити на предметне скло і накрити іншим, злегка притиснувши;
- препарат мікроскопіювати під об'єктивом 8^x.

6. Приготування фіксованих забарвлених препаратів бульбочкових бактерій

- Зріз бульбочки багато разів проколюють стерильною голкою, викликаючи механічне руйнування клітин, після чого з неї витискають краплю на предметне скло і готують фіксований забарвлений препарат.

- Кілька дрібних бульбочок (2–3) кладуть на предметне скло, додають краплю води і, притискаючи зверху іншим, розмазують. Мазок сушать, фіксують, фарбують фуксином. Добре забарвлення виходить при використанні суміші рівних частин фуксину й метиленового синього, розчинених в 1 %-ній оцтовій кислоті (фарбують 3–5 хв.) – тканини бульбочки забарвлюються в синій колір, а бактерії – у червоний.

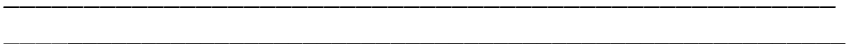
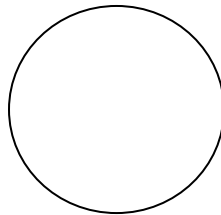
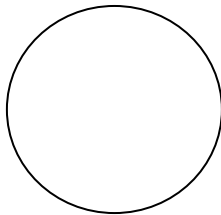
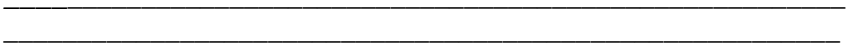
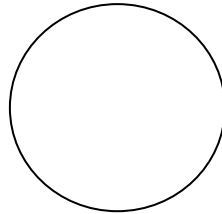
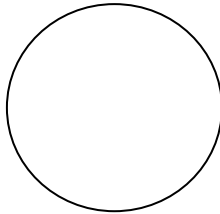
7. Отримання культури бульбочкових бактерій:

- ділянки коренів із бульбочками ретельно відмивають від ґрунту, обробляють розчином детергенту і прополіскують у протічній

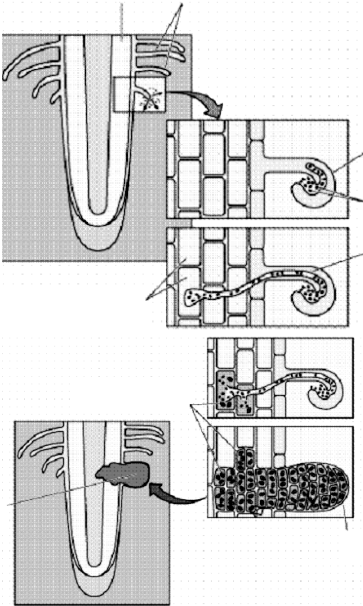
водопровідній воді;

- миті корені на 2 хв занурюють у 96 %-ний спирт;
- корені переносять на 15 хв у розчин промислового препарату «Білизна» (1:5);
- після стерилізації корені тричі по 10 хв відмивають у стерильній дистильованій воді.
- в краплі стерильної води роздушують бульбочку і переносять отриманий сік мікробіологічною петлею на середину чашки Петрі з бобовим агаром;
- шпателем Дригальського роблять посів і ставлять чашки на декілька діб у термостат при температурі 25–28 °С;
- отримані колонії розглядають при малому збільшенні мікроскопа й описують;
- з довільної колонії готують мазки.

Приготувати фіксовані забарвлені препарати мікроорганізмів, що здійснюють перетворення сполук азоту. Промікрископіювати їх, зарисувати та назвати:



Назвати та охарактеризувати етапи інфікування корневих волосків бульбочковими бактеріями. Позначити їх на рисунку:



ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота №13

Визначення чутливості бактерій до антибіотиків

Мета заняття: визначити чутливість бактерій до антибіотиків різних поколінь – пеніцилінів, цефалоспоринів, поліміксинів, тетрациклінів, макролідів.

Матеріали й обладнання: пробірки, чашки Петрі, рідке й агаризоване поживні середовище, шпатель, бактеріологічна петля, бактеріальні культури, різноманітні антибіотики кількох поколінь.

Інфекція (від лат. зараження) – складні біологічні процеси, які виникають в організмі людини, тварини або рослини в результаті проникнення та розмноження в ньому патогенних мікроорганізмів – збудників хвороб.

Історично сформована взаємодія сприйнятливого людського організму і патогенного мікроба отримала назву інфекційного процесу. Дуже важливе значення для виникнення інфекційного процесу має стан макроорганізму. Ступінь його участі в інфекційному процесі може залежати від виду і генотипу (люди чутливі до менінгіту та гонореї, тварини – резистентні); реактивності (готовність протидіяти патогенним мікробам), віку, характеру харчування, розладу ЦНС, гормонів.

Інфекційна хвороба – один із найвищих проявів інфекційного процесу. Суттєве значення для виникнення інфекційного захворювання має інфікуюча доза збудника – мінімальна кількість мікробних клітин, здатних викликати інфекційний процес. Інфікуючі дози залежать від виду збудника, його вірулентності та стану неспецифічного й імунного захисту макроорганізму (захворювання холерою наступає при більшій дозі збудника, ніж черевним тифом і дизентерією).

Джерело інфекції – заражений організм людини чи тварини.

Шляхи передачі інфекції:

- Контактно-побутовий (сифіліс).
- Повітряно-крапельний (туберкульоз, грип, коклюш, дифтерія).
- Через воду (холера, черевний тиф, дизентерія).
- Через харчові продукти (кишечні інфекції).
- Через укуси кровососних комах (малярія).

- Через ґрунт (кишкові хвороби, правець, газова гангрена).

Тканини, які не мають фізіологічного захисту проти конкретного виду мікроорганізму, слугують місцем його проникнення або вхідними воротами інфекції. Слизиста оболонка трахеї, бронхів – для стафілококів, пневмококів, мікоплазми пневмонії, кишкового тракту – для шигел, сальмонел, холерного вібріона, циліндричний епітелій сечостатевого тракту – гонококів, стафілококів, хламідій. Ряд збудників проникають в організм кількома шляхами.

Форми інфекції:

1. за природою збудника – бактеріальна, вірусна, грибова, протозойна;

2. за походженням – екзогенна (в результаті зараження патогенними мікроорганізмами, поступаючи з водою, повітрям, ґрунтом, виділеннями хворих), ендогенна – викликається представниками нормальної умовно-патогенної мікрофлори (виникає при імунodefіциті); аутоінфекція – різновид ендогенної в результаті самозараження шляхом переносу збудника з одного біотопу в інший;

3. за локалізацією – вогнищева – не розповсюджуються по організму; генералізована – розповсюджується лімфогенним чи гематогенним шляхом; сепсис – характеризується розмноженням збудника в крові при різкому пригніченні основних механізмів імунітету;

4. за кількістю збудників – моноінфекція, змішана;

5. за тривалістю – гостра (коротка, певний патогенез і клінічні симптоми), хронічна, мікробоносій (видалення збудника після клінічного одужання);

6. за проявом – безсимптомна, маніфестна;

Інфекційна хвороба характеризується послідовною зміною періодів, що відрізняються тривалістю, клінічними симптомами, мікробіологічними, імунологічними, епідеміологічними особливостями. Періоди інфекційної хвороби:

- інкубаційний – з моменту проникнення інфекційного агента до прояву перших симптомів. Триває кілька годин (дифтерія), тижнів (черевний тиф).

- продромальний – інтенсивне розмноження та колонізація тканини збудником, початок продукції токсинів. У більшості

випадків збудник не виділяється в зовнішнє середовище. Проявляються загальні ознаки захворювання – підвищення температури, загальне нездужання.

- розпал хвороби – прояв специфічних симптомів. Збудник розмножується, секретує токсини, виділяється в середовище. У крові виявляються антитіла.

- реконвалесценція (одужання) – відновлення фізіологічних функцій вражених клітин, тканин, органів. Титр антитіл – максимальний. При респіраторній, кишечній, гнійно-запальній інфекції збудник виділяється назовні у великих кількостях; при локалізації у крові (тиф, рикетсії) – не виділяється. Іноді одужання переходить у мікробоносійство, іноді хвороба закінчується летально (негайна дезинфекція).

Характер поширення інфекційних захворювань серед населення може бути різним. Якщо спостерігаються окремі випадки, – спорадичні; значна кількість захворювань, пов'язаних між собою спільним джерелом чи спільними шляхами, – епідемія (холера, дифтерія); якщо остання охоплює великі території, – пандемія (чума, холера, грип).

Характеристика збудників:

- патогенність – видова ознака мікроорганізму, яка характеризує його здатність спричиняти інфекційне захворювання. Тобто це комплекс хвороботворних властивостей даного мікроба, які виробилися в боротьбі за існування та пристосування до паразитичного способу життя. Характеризуються специфічністю – викликає типові для даного виду патоморфологічні та патофізіологічні зміни певних тканин і органів.

- Вірулентність – кількісна величина або ступінь патогенності, визначається в одиницях DLM (мінімальна смертельна доза, що дорівнює найменшій кількості мікроб, які в певних умовах викликають загибель 95% тварин) і LD50 (викликає загибель 50% заражених тварин). Фенотипічна ознака.

Фактори вірулентності:

- адгезія – мікробні клітини прикріплюються або прилипають до поверхні епітеліальних клітин;

- колонізація – процес розмноження мікроорганізмів у місці адгезії – критична їх концентрація для виникнення патологічного процесу;

- пенетрація – здатність проникати через слизові та сполучно-тканинні бар'єри в нижче розміщені тканини – при цьому виділяються гіалуронідази і нейрамінідази;

- агресія – пригнічення неспецифічного й імунного захисту організму господаря – міграцію лейкоцитів, фагоцитоз.

• Токсичність – здатність утворювати (ендотоксини) та секретувати (екзотоксини).

- *екзотоксини* – переважно білкової природи (виділено 80 білків), які відрізняються за молекулярною масою, хімічною структурою, клітинними мішенями і біологічною активністю – гемолізини, нейротоксини, ентеротоксини (стрептококи, стафілококи, клостридії). Характеризуються вибірковістю – здатністю вражати окремі органи і тканини. Нестійкі до високої температури, світла, кисню.

- *ендотоксини* – виділяються з руйнуванням клітини, стійкі до високих температур, менш токсичні та специфічні. Виявляють пірогенність.

Останнім часом встановлено, що гени, які визначають синтез бактеріальних токсинів, локалізовані у профагах чи плазмідах.

Терапія інфекційних захворювань – це лікування бактеріальних, вірусних, грибкових, протозойних захворювань за допомогою засобів (лікарських препаратів), які вибірково пригнічують розвиток і розмноження відповідних агентів у організмі людини.

Перші хіміотерапевтичні засоби були синтезовані П.Ерліхом – похідні арсену – сальварсан і неосальварсан, що використовувалися для лікування сифілісу. 1932 р. Г.Домагк синтезував перший сульфаніламідний препарат – стрептоцид – родоначальник групи сульфаніламідів, до яких чутливі стрепто-, менінго-, гонококи, хламідії.

Вивчення механізму їх антибактеріальної дії привело до відкриття антиметаболітів – сполук, що мають структурну схожість з найважливішими метаболітами, які беруть участь в анаболічних та катаболічних реакціях (сульфаніламідні – аналоги парааміно-бензойної кислоти, що входить до складу фолієвої,

гідрофолієвої кислот; фтівазид – аналог ізонікотинової кислоти; нітрофурані – азотистих основ нуклеїнових кислот).

Ще в позаминому столітті було відомо, що між різними мікроорганізмами можуть існувати як симбіотичні, так і антагоністичні взаємовідносини. Матеріальною основою антибіозу (теорія І. І. Мечникова про можливість боротьби зі збудниками кишечних захворювань за допомогою молочнокислих бактерій) слугувало спостереження А. Флемінга, який у 1928 році помітив, що колонія *Penicillium notatum* пригнічувала ріст стафілококів. Речовина, що дифундувала в агар дістала назву пеніциліну. В 1940 році Г.Флорі та Е.Чейном отримана стабільна форма пеніциліну. В 1943 році З.Ваксман виділив з актиноміцетів речовину, що ефективно пригнічувала розвиток туберкульозної палички. Відтоді виділено більше 6000 речовин схожої дії, проте використовують лише 50. В 1942 р. введений термін антибіотик, яким позначають високоактивні метаболічні продукти мікроорганізмів, що вибірково пригнічують ріст бактерій і окремих пухлин (у рослин – фітонциди). Напівсинтетичні антибіотики володіють новими цінними властивостями: кислото- і ферментостійкістю, широким спектром дії, ліпшим розподілом у тканинах і рідинах, меншою кількістю побічних ефектів.

Антибіотикотерапія, на відміну від клінічної фармакотерапії, розглядає систему лікування, ефективність якої визначається взаємодією 3 компонентів – мікроба, лікарського засобу, макроорганізму. Вибір антибіотика ґрунтується на особливостях виділеного чи передбачуваного збудника, його чутливості до засобу, локалізації в організмі. Необхідно також враховувати клініко-лабораторні дані стану хворого, важкість протікання інфекційного процесу, стан імунітету, вік, функцію нирок і печінки.

Антибіотики класифікують і характеризують за походженням, хімічним складом, типом впливу, спектром, механізмом дії.

А) Продуценти антибіотиків (мешканці вод і ґрунтів):

- гриби – *Aspergillus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium*;

- актиноміцети, переважно роду *Streptomyces griseus*, *Streptomyces erythreus*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces venezuele*, *Micromonospora*;

- бактерії – *Bacillus polymyxa*.

Антибіотики забезпечують продуцентам селективні переваги (конкуренція за субстрат).

Б) За хімічним складом розрізняють:

- β -лактамі – азотовмісні гетероциклічні сполуки з β -лактаміним кільцем. Визначальна роль β -лактаміного кільця встановлена у 40-х роках ХХ ст.. Розрізняють групи:

- пеніциліну – природні антибіотики – бензилпеніцилін, феніксиметилпеніцилін; напівсинтетичні – метицилін, оксацилін, аміцилін, карбаніцилін. Незважаючи на появу нових антибіотиків, пеніциліни продовжують широко використовуватися у практиці, оскільки вони володіють низьким рівнем токсичності, дозволяють застосовувати широкий діапазон дозування, відносно дешеві. До негативних наслідків застосування можна віднести виникнення алергічних реакцій. Активні у відношенні Гр+ бактерій – стрептококів, стафілококів, пневмококів (проте більшість стафілококів на сьогодні резистентні до дії антибіотиків пеніцилінового ряду).

- цефалоспорину – цефалоридин, цефалолексин, кефзол, мандал, кефлор.

- Тетрациклін і його похідні (окситетрациклін, доксициклін) – складаються з 4-х конденсованих бензольних кілець з різними радикалами. Широкий спектр дії проти Гр+ (стафіло-, стрепто-, пневмококів, клостридій, лістерій) і Гр- (гоно-, менінгококів), анаеробів, вібріона, мікоплазм, хламідій, рикетсій, деяких найпростіших. Побічні ефекти – шлунково-кишкові порушення, забарвлення зубів, бактеріостатичний ефект.

- Аміноглікозиди. Мають широкий спектр антимікробної дії (стафілококи, Гр- – кишечна паличка, шигели, протей, клебсієла, ентеробактер, сератія). Виявляють сильну і швидшу бактерицидну дію, рідко викликають алергію, але рівень токсичності високий – ототоксичність, нефротоксичність, нервово-м'язева блокада.

- стрептоміцини – містять стрептидин, стрептозу, N-метилглюкозамін.

- група, що містить дезоксистрептамін – неоміцин, мономіцин, канаміцин, пентаміцин, гентаміцин, амікацин. Основні показники для застосування гентаміцину – важкі септичні інфекції.

- Макроліди – містять макроциклічне лактонне кільце – еритроміцин, олеандроміцин. Спектр дії, як у пеніцилінів. Бактеріостатичні, низькотоксичні, назначають вагітним при отитах, фагінгітах, тонзилітах.

- Полієнові – мають кілька спряжених подвійних зв'язків – ністатин, леворин, амфотерицин В.

- Левоміцетин (хлорамфенікол) активний проти Гр+ і Гр-. Побічні ефекти – гематологічні зсуви, диспепсія, гепато- і нефротоксичність, дисбіоз.

- Рифаміцин.

- Поліміксини – препарати вузького спектра, застосовують проти Гр- бактерій. Дуже токсичні.

Рідше в лікувальній практиці застосовують антибіотики іншої хімічної структури.

В) За дією:

- Бактеріостатична – макроліди, тетрацикліни, левоміцетин. Застосовують у стадії долікування або при середніх важкостях протікання хвороби.

- Бактерицидна – пеніциліни, цефалоспорини, аміноглікозиди, рифаміцини. Застосовують на початку хвороби. Антимікробну (антибактеріальну) дію раніше визначали в одиницях дії – ОД, що містяться в 1 мл розчину препарату чи в 1 мг хімічної чистої речовини. На теперішній час активність переважної більшості антибіотиків вимірюють у мікрограмах. Звичайно 1 мкг хімічно чистого препарату відповідає 1 ОД, хоча для окремих, випущених раніше антибіотиків, співвідношення інше – в 1 мг натрієвої солі бензилпеніциліну міститься 1,67 ОД, в 1 мкг ністатину – 4 ОД.

Г) За антимікробним спектром: вузького спектра (пеніциліни, полієнові) та широкого спектра дії. Чим ширший спектр, тим легше не помилитися, коли збудник не ідентифікований. Однак такі препарати викликають загибель корисної мікрофлори кишечника (препарати нового покоління тетрацикліни, макроліди, цефалоспорини, аміноглікозиди).

Д) За механізмом дії викликають:

- Пригнічення різних етапів синтезу клітинної стінки – пеніциліни, цефалоспорини. Мішені дії препаратів – ферменти транс- і карбоксипептидази, що каталізують утворення поперечних

зшивок у молекулах пептидоглікану. Зумовлюють загибель молодих клітин. Не діють на мікоплазми.

- Порушення функціонування цитоплазматичної мембрани – ністатин, міконазол, леворин, поліміксин, взаємодіють з ергостерином (ністатин утворює у мембрані пори, через які втрачаються K^+ , ферменти) чи білками (поліміксин).
- Пригнічення синтезу білка на рівні рибосом:
 - Аміноглікозиди підвищують спорідненість аміноацил-тРНК до А-сайта, що призводить до зв'язування помилкових, не відповідних кодону матриці аміноацил-тРНК і викликає помилки при зчитуванні генетичної інформації.
 - Тетрацикліни – зв'язуються з 30S та інгібують мРНК-залежне зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом, пригнічуючи початкову стадію білкового синтезу.
 - Макроліди – зв'язуються з 50S, інгібують транспептидацію, тобто перенесення поліпептидного ланцюга на аміноацил-тРНК, приєднану до А-сайту, і транслокацію – переміщення пептидилРНК з А-сайта в П-сайт.
 - Левоміцетин – пригнічує пептидилтрансферазну реакцію.
- Інгібування ДНК-залежної РНК-полімерази – рифаміцин.
- Порушення реплікації – актиноміцетин (рух ДНК-полімерази), мітоміцин (ковалентні зшивки між ланцюгами ДНК), блеоміцин (комплексотворення з ДНК і фрагментація геному).

5. Ще на початку розвитку хіміотерапії під час вивчення дії трипанового синього на трипаносоми П.Ерліх помітив появу резистентних форм мікроорганізмів до даного барвника. З розширенням арсеналу хіміотерапевтичних засобів збільшувалася кількість стійких бактеріальних форм. На сьогодні день виявлено 90-98% пеніцилостійких стафілококів, 60-70% стрептоміциностійких стафілококів, 90% ампіциліностійких шигел.

Механізми резистентності складні та різноманітні. Найчастіше вони пов'язані з:

- перетворенням активної форми антибіотика в неактивну шляхом ферментативної інактивації та модифікації. Біохімічні механізми резистентності бактерій до β -лактамних антибіотиків пов'язані з індукцибельним синтезом бета-

лактамази, змінами в пеніцилінзв'язуючих білках. Біохімічні механізми резистентності до аміноглікозидних антибіотиків і левоміцетину залежать від здатності бактерій утворювати ацетилтрансферазу, аденілтрансферазу, фосфотрансферазу, які викликають відповідно ацетилювання, аденілювання, фосфорилювання даних препаратів.

- активним виведенням антибіотиків завдяки функціонуванню транспортних білків;
- порушеннями в системі транспорту препарату в бактеріальну клітину (змінюється структура поринових каналів). Мішені, локалізовані у ЦПМ або в цитоплазмі, змінюються (проникають гідрофільні) – тетрацикліни;
- виникненням у мікроорганізмів альтернативного шляху життєво важливого метаболіту, що замінює основний шлях блокований препаратом;
- модифікацією чутливої мішені.

Хід роботи:

Визначення чутливості до антибіотиків методом паперових дисків

Метод базується на дифузії антибіотика з диска в поживне середовище. Концентрацію антибіотика в дисках підбирають таку, щоб діаметр зон затримки росту стандартних тест-організмів був 28–32 мм.

- на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі висівають бактерії досліджуваного штаму (0,1 мл суспензії клітин, що знаходяться в стаціонарній стадії росту) і розподіляють шпателем;
- на засіяну поверхню стерильним пінцетом поміщають (на однаковій відстані один від одного, від країв і центру чашки) стандартні паперові диски, просочені розчинами різних антибіотиків;
- інкубацію здійснюють при температурі, оптимальній для росту досліджуваних бактерій. Якщо бактерії чутливі до даної сполуки, то навколо дисків утворюється зона затримки росту (рис. 23);

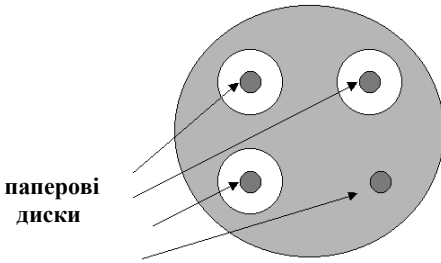
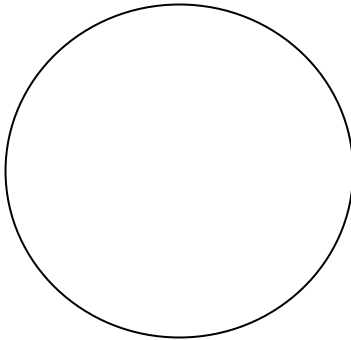


Рис. 23. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків методом паперових дисків (біле кільце – зона затримки росту бактерій)

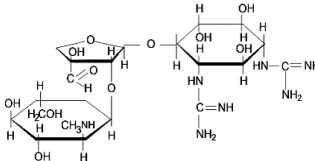
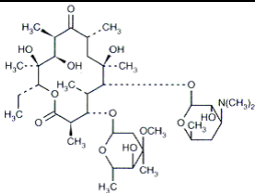
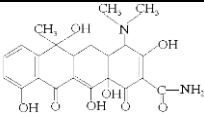
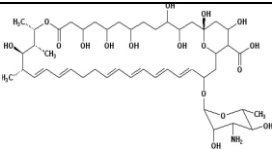
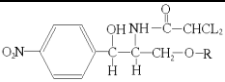
- облік результатів здійснюють на темному папері на перевернутих догори дном чашках (у відбитому світлі); діаметр зони затримки росту (вимірюють із точністю до міліметра) відповідає ступеню чутливості досліджуваного мікроорганізму до даного антибіотика.

Визначити чутливість бактерій до антибіотиків диско-дифузійним методом та зарисувати отримані результати:



Заповнити запропоновану таблицю:

| Антибіотик | Хімічна структура | Мішень дії у клітині | Причини резистентності |
|------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| | | | |

| | | | |
|--|---|--|--|
| |  | | |
| |  | | |
| |  | | |
| |  | | |
| |  | | |

ВИСНОВОК: _____

Мікробіологічний аналіз харчових продуктів

Харчові продукти – найскладніші об'єкти в санітарній мікробіології. Це пояснюється не тільки різноманітністю і великою кількістю мікрофлори в них, але й застосуванням мікроорганізмів у виробництві багатьох продуктів і, на жаль, відсутністю повноцінних методик виявлення мікробів.

Через харчові продукти можуть передаватися збудники багатьох інфекційних хвороб – черевного тифу і паратифів, сальмонельозів, дизентерії, ешеріхіозів, ботулізму, холери, бруцельозу, туберкульозу, сибірської виразки, деяких рикетсіозів (Ку-лихоманка) і вірусних інфекцій (яшур, поліомієліт та ін.). Харчові токсикоінфекції, що викликаються стафілококами і численними умовно-патогенними мікроорганізмами, виникають після вживання в їжу заражених харчових продуктів. Обміненія їх мікробами може відбуватися на етапах заготівлі, зберігання та приготування. Харчові продукти зазвичай неможливо повністю звільнити від присутності мікроорганізмів без ризику зміни їх смакових якостей.

Наявність в їжі великої кількості різних факторів росту і вітамінів сприяє розвитку мікроорганізмів. Цей факт є основною відмінністю вивчення харчових продуктів з-поміж інших санітарно-мікробіологічних досліджень, оскільки ані у воді чи ґрунті, ні тим більше в повітрі настільки бурхливого розмноження мікробів не відбувається. При цьому слід пам'ятати, що природна і нешкідлива для людини мікрофлора їжі служить біологічним захистом від небажаної умовно-патогенної і патогенної. Як у будь-якому біоценозі, в ній можуть домінувати ті чи інші види, що впливають на якість харчових продуктів.

Уявлення про мікрофлору харчових продуктів може дати якісне або кількісне вивчення її популяції. При цьому слід пам'ятати, що роль конкретного мікроорганізму необхідно оцінювати не тільки після всебічного аналізу біоценозу, але й враховувати якість і характер досліджуваних продуктів. Наприклад, ентерококи можна розглядати як ознаку фекального забруднення, але їхні культури також застосовують під час виготовлення деяких продуктів, наприклад дієтичного кисляку або

сиру “чеддер”. Відповідно, у продуктах харчування розрізняють специфічну і неспецифічну мікрофлору.

Специфічна мікрофлора харчових продуктів представлена промисловими штамами мікроорганізмів, які є обов’язковою мікрофлорою в технології виробництва харчових продуктів. Специфічні мікроорганізми, тобто мікроорганізми заквасок використовують для приготування кисломолочних продуктів, хліба, пива, вина, квашених овочів тощо. Під час приготування кефіру, кисляку, кумису, сиру, сметани, масла використовують *Lactococcus lactis*. Для приготування сметани до вершків додають *Streptococcus cremoris*. Для отримання кефіру використовують так звані кефірні грибки, що складаються з асоціації мікроорганізмів: молочнокислі стрептококи, лактобацили, молочні та дріжджоподібні гриби, оцтовокислі бактерії. Для приготування йогурту використовують промислові штами *Lactobacillus bulgaricus* та *Lactobacillus acidophilus*.

Контроль за чистотою культур штамів-продуцентів та їх збереженням здійснюють мікробіологи науково-дослідних інститутів відповідних підприємств харчової промисловості.

Неспецифічна мікрофлора харчових продуктів – це мікроорганізми, які випадково потрапляють в харчові продукти з навколишнього середовища (технологічне обладнання, повітря, упаковка, тощо). Основу її складають сапрофіти, патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, а також види, що викликають псування харчових продуктів. У багатьох харчових продуктах присутня сапрофітна мікрофлора, що викликає утворення різноманітних біоценотичних взаємозв’язків.

Міра забруднення сторонньою мікрофлорою залежить від багатьох факторів: правильності заготівлі, транспортування, зберігання сировини, технології подальшої її обробки та від дотримання санітарного режиму на всіх указаних етапах виробництва харчових продуктів.

Мікробіологічний аналіз якості харчових продуктів переслідує три мети:

1. Контроль безпеки сировини, яку використовують у виробництві харчових продуктів та оцінка санітарно-гігієнічних умов її отримання;

2. Контроль режимів зберігання харчових продуктів та оцінка санітарно-гігієнічних умов їх транспортування та реалізації;

3. Контроль над забезпеченням епідемічної безпеки харчових продуктів.

При оцінці безпеки харчових виробів, насамперед, визначають їх мікробіологічний стан.

Гігієнічні нормативи за мікробіологічними показниками включають контроль наявності 4-х груп мікроорганізмів:

- санітарно-показових, до яких відносять мезофільні аеробні й факультативно-анаеробні мікроорганізми – КМАФАнМ і бактерій групи кишкової палички – БГКП (колі-форми);
- умовно-патогенні мікроорганізми, у тому числі коагулазо позитивні стафілококи (*Staphylococcus aureus*);
- патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели;
- мікроорганізми псування – в основному, дріжджі й цвілеві гриби.

Виявлення патогенів, безумовно, більш точне, але і більш трудомістке завдання, тому його використовують лише при первинній переробці м'яса, а також під час проведення деяких аналізів молока, м'ясних продуктів і контролю консервного виробництва.

Оцінку безпеки харчової продукції здійснюють за нормованою масою продукту, в якій не допускається присутність бактерій групи кишкових паличок, умовно-патогенних, а також патогенних мікроорганізмів. Для інших випадків норматив відображає кількість колонієутворюючих одиниць у 1 г або в 1 см³ продукту (КУО/г, КУО/см³).

Мезофільні аеробні й факультативно-анаеробні мікроби (МАФАнМ) – це мікроорганізми, які розмножуються за температури 25÷40 °С в умовах доступу кисню (аеробний) або його відсутності (анаеробний), одержуючи енергію за рахунок бродіння й у присутності його (енергію дихання) – факультативні анаероби. Показником санітарно-гігієнічного стану продукту є загальне кількісне обсіменіння КМАФАнМ.

Бактерії групи кишкових паличок (БГКП) обрані в якості санітарно-показових мікроорганізмів для багатьох харчових продуктів і об'єднані в такі роди родини *Enterobacteriaceae*:

Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Serratia. Наявність БГКП в харчових продуктах свідчить про їх фекальне забруднення, так як вони є нормальної мікрофлорою кишечника людини і тварин. Це дрібні, грамнегативні, безспоріві палички, факультативні анаероби, які зброджують вуглеводи з утворенням газу. Оптимальна температура росту становить 37°C. В нормативних документах (державних, галузевих стандартах, технічних умовах, вимогах СанПіНу) зазвичай вказують кількість продукту в якому БГКП не допускаються. Виявлення в молочних продуктах БГКП свідчить про низький санітарно-гігієнічний стан їх виробництва і при високому рівні забруднення продукту БГКП збільшується вірогідність знаходження в ньому патогенних мікроорганізмів – збудників дизентерії, черевного тифу, холери та ін.

Бактерії групи кишкових паличок дуже мінливі, потрапляючи в зовнішнє середовище, вони втрачають багато характерних ознак. Тому до санітарно-показових мікроорганізмів відносять всі роди БГКП.

Харчові отруєння можуть спричинити продукти з великою кількістю бактерій роду *Proteus* або групи *E. coli*. Вони є сапрофітами, але деякі їх види здатні виробляти токсини. Тому їх називають умовно-патогенними. Токсичні бактерії роду *Proteus* і кишкова паличка призводять до отруєння, подібного до сальмонельозу, але менш тривалого за часом.

До бактерій, що спричиняють **харчові інтоксикації, відносять деякі стафілококи, зокрема золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*)**. Стафілококовий токсикоз за частотою виникнення займає перше місце серед харчових отруєнь. Розвиваючись у харчових продуктах, у тому числі в кондитерських виробках, золотистий стафілокок виділяє ентеротоксин, який діє на кишечник людини. Ентеротоксин термостабільний, для його повного руйнування потрібне двогодинне кип'ятіння.

Для профілактики отруєння необхідно не допускати до роботи з харчовими продуктами осіб з гнійничковими захворюваннями шкіри, гострими катаральними запаленнями верхніх дихальних шляхів; дотримувати режими теплової обробки продуктів, що гарантує загибель токсину стафілококу; зберігати продукти в холодильниках за температури 2÷4 °С.

Харчові токсикоінфекції, як правило, виникають під впливом бактерії паратифозної групи *Salmonella*. Відомо більше 2 200 різних типів сальмонел. Кожен штам сальмонели потенційно здатний спричинити будь-який клінічний тип інфекції (черевний тиф, гастроентерит) або локальний її прояв. Найбільшу загрозу становлять сальмонели черевного тифу, паратифу А і В та ін. Ці бактерії не утворюють екзотоксин, але при їх загибелі в організм хворої людини з клітин виділяється ендотоксин, що має сильну хвороботворну дію. Сальмонели – нестійкі бактерії. Вони гинуть при нагріванні до температури 60 °С впродовж 30 хв, але виживають при заморожуванні. Профілактика захворювання полягає в ретельному контролі продуктів і питної води на присутність бактерій. Для знищення бактерій рекомендують нагрівати їжу хоча б 10 хв за температури не нижче 75 °С. Бактерії роду *Salmonella* виявляють у молочному шоколаді, шоколадній глазурі, какаопорошку, порошкоподібних сумішах.

Спороутворюючі аеробні бактерії (САБ) часто знаходять у кондитерській сировині. При підвищеному вмісті САБ у сировині й готовій продукції містяться у значній кількості умовно-патогенні бактерії *Bacillus cereus*, що небезпечно для споживачів. Бактерії роду *Bacillus* – активні продуценти гідролітичних ферментів, які призводять до псування продуктів. Газоутворюючі спорові бактерії призводять до спучування цукерок. Є відомості, що пролінові цукерки можуть бути контамінованими спороутворюючими аеробними бактеріями на 33÷75 %.

Патогенні мікроорганізми в кондитерських виробках не допускаються. Виявлення їх здійснюють у спеціальних лабораторіях, що мають ліцензії на їх визначення. Тому у виробничих лабораторіях наявність патогенних мікроорганізмів не контролюють.

До мікроорганізмів псування відносять, в основному, гриби і дріжджі. Найпоширеніші цвілеві гриби родів *Aspergillus* і *Penicillium*, які розмножуються конідіями. Гриби роду *Aspergillus* призводять до пліснявіння харчової продукції. Цвілий продукт має неприємний запах і смак, і залежно від ступеня пліснявіння може призвести до харчового отруєння. Гриби роду *Penicillium* провокують утворення на харчових продуктах зеленої гроноподібної цвілі. Під впливом конідій грибів на продуктах

з'являється сизий пил. Ця цвіль дуже легко поширюється і за наявності вологи виявляється на всіх харчових продуктах. Конідії *Penicillium* постійно знаходяться у повітрі, на плодах, ячмені й солоді, особливо на роздушених зернах. Окремі види грибів цього роду служать для виготовлення лікувальних препаратів – антибіотиків групи пеніциліну.

Гриби роду *Rhizopus* також поширені й утворюють чорну цвіль, яка розростається з великою швидкістю. Цвіль може навіть підніматися вгору по стінках судин. Продукти, уражені цією цвіллю, затягуються павутиноподібним міцелієм. Захворювання, причиною яких є плісняві гриби, що накопичують токсичні (отруйні) речовини в харчових продуктах, називають мікотоксикозами.

Відбір проб для аналізу харчових продуктів

Для мікробіологічного аналізу відбирають одиниці продукції, що не містять ознак зовнішніх ушкоджень, а також дефектів пакування. Одиниці продукції – певна кількість екземплярів поштучної продукції або певний об'єм чи маса не поштучної продукції. Проби для аналізу відбирає мікробіолог підприємства або інша відповідальна особа. *Пробою* називають невелику кількість досліджуваного продукту, що являє собою суму проб з різного місцерозташування товару в пакуванні. Для мікробіологічного аналізу користуються вибіркою, що складається не менше трьох паралельних проб. Відібрані проби ізолюють, обгортаючи щільним папером чи фольгою. Кожну відібрану пробу маркують відповідно до коду контрольованої партії та нумерують. За результатами відбору проб складають протокол, у якому вказують: номер протоколу, дату, час та місце відбору проб, мету мікробіологічного аналізу, найменування продукту, виробника, дату виготовлення і номер партії, результати органолептичного аналізу та виявлені дефекти тари і харчового продукту.

Проби зберігають до початку аналізу за кімнатної температури не більше 24 год, продукти, що швидко псуються, – за температури 0÷5 °С не більше 6÷8 год, швидкозаморожені продукти – за температури -12÷-18 °С не більше 24 год. Зважують

необхідну наважку продукту, взяту стерильним пінцетом, на стерильному посуді. Тверді харчові продукти попередньо подрібнюють у стерильній порцеляновій ступці.

Для підготовки робочого розведення наважку (10 г) продукту переносять у стерильну колбу зі стерильним пептоново-сольовим розчином (90 см³), ретельно перемішують круговими рухами та залишають відстоятися 4÷5 хв, у результаті проведених маніпуляцій отримують вихідний розчин з розведенням 10⁻¹. Після відстоювання надосадову рідину використовують для подальших розведень, які дозволяють при висіві на поживне середовище отримати в чашці Петрі від 30 до 300 колонієутворюючих одиниць (КУО). Кількість специфічних мікроорганізмів має бути менша: наприклад стафілококів від 15 до 150 КУО, пліснявілих грибів від 5 до 50 КУО.

Лабораторна робота №14

Визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці методом Брігса. Визначення колі-титру молока питного

Мета роботи: встановити загальну кількість у молоці мікроорганізмів, визначити його колі-титр, провести пробу на редуктазу.

Матеріали й обладнання: молоко; чашки Петрі; пробірки; циліндри; піпетки Мора; середовище Ендо; редуктазник із нагрітою до 40 °С водою; пробірки зі стерильним середовищем Буліра й поплавками; насичений розчин метиленового синього; проби стерильного та свіжого молока.

Молоко – один з найпоширеніших продуктів харчування. У ньому містяться білки, невелика кількість пептону, вільні амінокислоти, молочний жир, цукор, вітаміни (А, О, Е, С, РР і групи В) та інші сполуки. Тому, за сприятливих температурних умов, мікроорганізми у ньому бурхливо розмножуються, погіршуючи його якість.

За температури 20 °С густина незбираного молока складає 1,028÷1,034 г/см³; при розбавленні водою густина знижується, вміст

жиру – не менше 3,2 %. Свіже молоко має кислотність 16-17 °Тернера, при розвитку мікроорганізмів кислотність зростає до 20÷21 °Тернера і воно втрачає свої технологічні властивості, несвіже – 22 °Тернера і більше. Вміст сухої речовини у цільному молоці – не менше 12,8 %, у знежиреному – не менше 9,2 %.

За показниками безпеки молоко екстра, вищого, першого та другого гатунків повинне відповідати таким вимогам:

Показники безпеки молока коров'ячого незбираного згідно ДСТУ 3662-97 із змінами від 2008 року

| Назва показника безпеки, одиниці вимірювання | Гранично допустимий рівень | Назва показника безпеки, одиниці вимірювання | Гранично допустимий рівень |
|--|----------------------------|--|----------------------------|
| Токсичні елементи, мг/кг, не більше: | | Пестициди, мг/кг, не більше: | |
| Плюмбум | 0,1 | гексахлоран | 0,05 |
| Кадмій | 0,03 | ГХЦГ (гама-ізомер) | 0,05 |
| Арсен | 0,05 | Нітрати, мг/кг, не більше: | 10 |
| Меркурій | 0,005 | | |
| Купрум | 1,0 | | |
| Цинк | 5,0 | | |
| Мікотоксини, мг/кг, не більше: | | Радіонукліди, Бк/кг, не більше: | |
| афлатоксин В ₁ | 0,001 | Стронцій-90 | 20 |
| афлатоксин М ₁ | 0,0005 | Цезій-137 | 100 |

Засівання молока мікроорганізмами відбувається під час доїння та зберігання (попадають з вим'я, шкіри тварин, посуду, обладнання, рук і одягу працівника). При дотриманні санітарних правил у молоці переважають *мікрококи, молочнокислі бактерії, стрептококи, сарцини*. Забруднене молоко містить значну кількість бактерій *групи кишкової палички, маслянокислих і гнильних*. Кількість їх в 1 мл може сягати кількох мільйонів. Під час зберігання молока змінюється кількість бактерій і співвідношення між видами. Їх характер залежить від температури, тривалості зберігання і складу мікрофлори.

Мікробіологічний аналіз молока включає визначення загальної кількості бактерій (мікробне число), титр кишкової

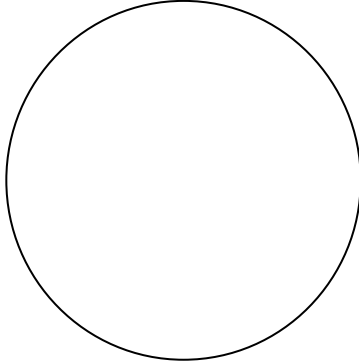
палички і пробу на редуктазу. Визначення в молоці патогенних мікробів проводять у спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

Хід роботи:

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці методом Брігса

Готують фіксований, забарвлений препарат молока.

При визначенні мікробного числа чашковим методом з відібраної проби проводять розведення (10^{-1} - 10^{-9}) додаванням стерильної дистильованої води, які висівають по 1 см^3 у чашки Петрі. Після триденної інкубації за температури $30 \text{ }^\circ\text{C}$ підраховують кількість колоній бактерій, а на четвертий день – кількість дріжджових і цвілевих грибів, після чого визначають їх кількість у розрахунку на $1 \text{ см}^3 \text{ мл}$



2. Визначення колі-титру молока

Для визначення колі-титру молока використовують здатність бактерій групи кишкової палички до газоутворення на рідкому середовищі Буліра. Для цього у пробірки із середовищем вносять по 1 см^3 розведеного молока. Засіяні пробірки ставлять у термостат на дві доби за температури $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Надалі з кожної пробірки проводять висів культуральної рідини на тверде поживне середовище. Для посіву на дно стерильної чашки Петрі вносять $1 \div 0,1 \text{ см}^3$ досліджуваного продукту, заливають розтопленим і охолодженим до $45 \text{ }^\circ\text{C}$ середовищем Ендо, перемішуючи вміст чашки круговими рухами. Після застигання середовища чашки

ставлять на 24 год у термостат за температури 37 °С, після чого підраховують кількість колоній, які на них вирости.

Для визначення бактерій, які містяться в 1 см³ досліджуваного продукту, середню кількість колоній, які вирости на двох паралельних чашках, множать на число, яке рівне коефіцієнту розведення. За одержаними результатами відносять молоко до одного з 4-х класів: колі-титр дорівнює 10⁻¹ – перший клас (добра якість), колі-титр 10⁻² – другий клас, колі-титр 10^{-3÷-4} – третій клас, колі-титр 10⁻⁶ – четвертий клас (дуже забруднене молоко).

3. Метод визначення редуктази з метиленовим синім

Загальну кількість мікроорганізмів у сирому молоці визначають швидкими непрямыми методами, так званими редуктазними пробами, які тривають від 20 хв до 3,5 годин та методами прямого посіву на живильні середовища в чашки Петрі з наступною інкубацією посівів протягом 72 год при 30°С.

Редуктаза – це фермент, який виробляють мікроорганізми, а редуктазні методи базуються на здатності цього фермента знебарвлювати фарбники (метиленовий блакитний) чи змінювати їх колір (резазурин). Залежно від часу знебарвлення або зміни забарвлення визначають орієнтовну кількість бактерій в 1 см³ молока (КУО).

У пробірки наливають по 1 см³ робочого розчину метиленового синього і по 20см³ досліджуваного молока, закривають гумовими пробками і змішують шляхом повільного триразового перегортання пробірок.

Пробірки поміщають у редуктазник або у водяну баню з температурою води (37±1)°С. Вода в редуктазнику або водяній бані після занурення пробірок з молоком повинна доходити до рівня рідини в пробірці або бути трохи вище. Температуру води підтримують протягом усього часу визначення. Для запобігання впливу на реакцію світла редуктазник повинен бути щільно закритий кришкою. Момент занурення пробірок у редуктазник

вважають початком аналізу. Спостереження за зміною забарвлення ведуть чере 40 хв, 2,5 год, через 3,5 год і більше ніж 3,5 год із початку проведення аналізу. Закінченням аналізу вважають момент знебарвлення молока після внесення метиленового синього.

Визначення гатунку молока за редукажною пробою з метиленовим синім

| Гатунок молока | Тривалість знебарвлення, год | Орієнтована кількість бактерій у 1 см ³ молока, тис. КУО |
|----------------|------------------------------|---|
| Екстра | Більше 3,5 | ≤100 |
| Вищий | 3,5 | ≤ 300 |
| Перший | 2,5 | ≤ 500 |
| Другий | 40 хв | ≤ 3 000 |

ВИСНОВОК:

Лабораторна робота № 15
Визначення мікробіологічних показників кисломолочних продуктів

Мета роботи: провести порівняльний аналіз мікрофлори кисломолочних продуктів.

Матеріали й обладнання: асортимент кисломолочних продуктів з роздрібною торгівлі в промисловій упаковці: сметана, кефір, ряжанка тощо; пробірки із середовищем; предметні і покривні скельця; розчин фуксину та метиленової сині; мікроскопи; інструменти.

До основних молочних продуктів відносять кисломолочні продукти, вершкове масло, маргарин, сир. Кисломолочні продукти відіграють важливу роль у харчуванні людини, оскільки, крім харчової цінності, вони мають дієтичне, деяке лікувальне значення. Кисломолочні продукти засвоюються краще, ніж цільне молоко, і значно швидше. У порівнянні з молоком кисломолочні продукти володіють підвищеною стійкістю під час зберігання. Крім того, вони мають середовище, несприятливе для розвитку багатьох патогенних бактерій. Це зумовлено їх підвищеною кислотністю і вмістом антибіотичних речовин, що виробляються деякими молочнокислими бактеріями.

Мікрофлора кисломолочних продуктів може бути представлена:

- залишковою мікрофлорою після пастеризації молока – термостійкі молочнокислі палички, спороутворюючі бактерії, ентерококи, бактеріофаги тощо;
- заквашувальною мікрофлорою, яку вносять із закваскою, залежно від виду кисломолочного продукту;
- вторинною (контамінуючою) мікрофлорою.

Якість і специфічні властивості кисломолочних продуктів багато в чому залежать від спрямованості й інтенсивності мікробіологічних процесів, які відбуваються під час виготовлення продуктів. Вирішальне значення має нормальний перебіг молочнокислого бродіння. В умовах промислової переробки молока при виготовленні різних кисломолочних продуктів його заздалегідь пастеризують, а потім заквашують спеціально

підібраними заквасками з чистих або змішаних культур молочнокислих бактерій. Застосування заквасок мікроорганізмів з відомою біохімічною активністю дозволяє отримати продукт з певними хімічними і органолептичними властивостями, уникнути розвитку випадкових мікроорганізмів, які порушують нормальний перебіг молочнокислого бродіння (що буває при мимовільному скисанні молока), і забезпечує високу якість готової продукції. Режим технологічного процесу повинен бути тісно пов'язаний з властивостями заквашувальної мікрофлори. Велике значення має активність використовуваної закваски і якість молока, яке переробляють. Іноді відбувається сповільнене скисання молока внаслідок пониженого вмісту в ньому сухих речовин, вітамінів, наявності антибіотиків, використовуваних при лікуванні тварин. Втрата активності закваски може бути зумовлена присутністю в молоці бактеріофага. Має значення і склад остаточної мікрофлори пастеризованого молока. Між її компонентами й заквашувальними мікроорганізмами можуть виникати різні взаємодії, що стимулює або гальмує розвиток корисної мікрофлори. При ослабленні молочнокислого процесу створюються умови для розвитку незаквашувальної мікрофлори, що призводить до появи різних дефектів готового продукту.

Кисломолочні продукти поділяють на продукти молочнокислого бродіння (сир кисломолочний, сметана, простокваша, ряжанка, ацидофілін, йогурт) і змішаного бродіння – молочно-кислого, спиртового, пропіоновокислого тощо (кефір, ацидофільно-дріжджове молоко, кумис та ін.). Для перших характерним є розщеплення бактеріями молочного цукру з утворенням молочної кислоти, під дією якої казеїн молока коагулює (випадає у вигляді пластівців), у результаті чого засвоюваність продукту, в порівнянні з молоком, істотно підвищується. Для других – поряд з молочною кислотою з молочного цукру утворюються й інші продукти (наприклад, спирт, вуглекислий газ, леткі кислоти), що також підвищує засвоюваність продукту. За вмістом білків і жиру кисломолочні продукти майже не відрізняються від незбираного молока.

За складом мікрофлори і особливостями приготування розрізняють традиційні кисломолочні напої, як от кефір, ряжанка, сметана, простокваша, йогурт, і функціональні кисломолочні

напої, збагачені різними пробіотичними культурами, – *Bifidobacterium*, *Lb. acidophilum*, *Lb. plantarum* тощо. Найвідоміший приклад – біокефір, біфілін, біфілайф та ін.

Хід роботи:

Приготування фіксованих препаратів кисломолочних продуктів

На знежирене предметне скло наносять краплину дистильованої води, стерильною мікробіологічною петлею захоплюють краплю досліджуваного продукту і розподіляють її у воді до однорідної маси. Висушують мазок на повітрі та проводять наступну фіксацію в полум'ї пальника.

Після охолодження скла мазок накривають смужкою фільтрувального паперу та змочують розчином фуксину чи метиленої сині. Через 1÷2 хв змивають барвник великою кількістю дистильованої води, препарат обережно просушують фільтрувальним папером та мікроскопіюють з об'єктивом 90^x. У приготовлених препаратах відзначають наявність заквашувальної та сторонньої мікрофлори. Наявність сторонніх мікроорганізмів свідчить про зниження якості продукції. Якість продукції оцінюють словами „добра”, „знижена”.

Результати роботи заносять у таблицю та роблять висновок про якість аналізованої кисломолочної продукції:

| Зразок продукту | Мікроорганізми в полі зору | | Висновок про якість |
|-----------------|----------------------------|----------|---------------------|
| | заквашувальні | сторонні | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

ВИСНОВОК: _____

Лабораторна робота № 16

Бактеріоскопія м'яса

Мета роботи: підготувати фіксовані препарати м'яса та промікроскопіювати їх для встановлення характеру мікрофлори проб м'яса.

Матеріали й обладнання: свіже та заморожене м'ясо; технічні ваги; стерильні інструменти (ножиці, пінцет, скальпель), посуд, предметне скло; ватні тампони; етанол; карболовий генціанвіолет; розчин Люголя; водний розчин фуксину; спиртовий розчин кристалвіолету; стерильна дистильована вода.

М'ясо – один з найбільш цінних продуктів харчування людини. У ньому містяться основні компоненти, необхідні для розвитку організму: білки, жири, вуглеводи, мінеральні речовини, вітаміни.

Щодо розвитку багатьох мікроорганізмів, то м'ясо – хороший живильний субстрат, в якому вони знаходять всі необхідні для себе речовини – вуглець і азот, вітаміни, мінеральні солі. Вміст доступної води і рН м'яса також сприяють розвитку мікроорганізмів, у зв'язку з чим воно швидко псується внаслідок розкладання вуглеводів, жирів і білків. Тому для одержання м'яса із мінімальним бактеріальним обсіменінням необхідно правильно підготовлювати тварин до забою, дотримуватися санітарних правил під час забою, розбирання туш, зберігання і перероблення м'яса. Якщо відбулася значна контамінація мікроорганізмами м'яса, то необхідно запобігти їх розмноженню і знизити їхню ферментативну активність.

Серед мікроорганізмів, які зустрічаються у м'ясі, особливу роль відіграють бактерії. Велика частина їх має здатність швидко розкласти білок – найціннішу складову м'яса, тобто здійснювати процес гниття. М'ясо можна зберігати нетривалий час. Яловичину, баранину, телятину зберігають улітку 2 доби, узимку – 4 доби, свинину – відповідно 6 і 10 діб.

Мікробіологічна стійкість і харчова безпека м'яса ґрунтуються на комбінації кількох зберігаючих факторів, так званими бар'єрами, які не можуть перебороти

мікроорганізми. Поняття бар'єрного ефекту вперше ввів Л. Ляйстнер у 1978 р. Бар'єрний ефект має першочергове значення для зберігання харчових продуктів із проміжною і високою вологістю, оскільки бар'єри контролюють процеси, що спричинюють мікробне псування і ведуть до харчових отруень. Бар'єрний ефект – це комплексна взаємодія температури, активності води, кислотності, окисно-відновного потенціалу, консервантів та ін., що має важливе значення для мікробіологічної стійкості та безпеки більшості продуктів.

М'ясо обсіменяється мікроорганізмами двома шляхами: ендогенним і екзогенним. М'язи здорових тварин, як правило, стерильні. М'язи хворих тварин, що перенесли перед забоєм голодування, сильну перевтому можуть містити мікроорганізми. Частина мікроорганізмів, яка міститься в шлунково кишковому тракті тварини, заноситься з кров'ю і лімфою в мускулатуру – ендогенний шлях. Крім прижиттєвого інфікування, м'язи можуть обсіменятися мікробами після забою тварини (екзогенний шлях): при первинній обробці туш (особливо якщо ушкоджується кишечник), з інструментів, з рук і одягу працівників, а також при транспортуванні, зберіганні, розрубі в магазинах тощо. Тому навіть свіжовироблене м'ясо не стерильне і в ньому, переважно на поверхні, міститься та чи інша кількість мікроорганізмів.

У м'ясі зустрічаються мікроорганізми майже всіх груп, зокрема *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Thermobacterium*, *Flavobacterium*. Деякі фахівці з мікробіології м'яса вважають бактерії цих груп мікроорганізмів природною мікрофлорою свіжого м'яса. Зустрічаються вони у м'ясі в різних кількостях і співвідношеннях, причому важливу роль відіграють такі фактори, як гігієна забою тварин, санітарний стан приміщення для забою, пора року, температура й відносна вологість повітря.

Якість і стійкість м'яса при зберіганні пов'язані із вмістом мікроорганізмів на його поверхні. Визначаючи кількість мікроорганізмів і їх видовий склад, судять про тривалу стійкість м'яса при зберіганні. Для цього пропонують брати мазки-відбитки з визначених ділянок поверхні туші тварини, де накопичується найбільша кількість мікроорганізмів – область хрестця, груднина і передні кінцівки. Мазки беруть у трьох місцях за шаблоном.

Під час заморожування м'яса відмирає значна кількість мікроорганізмів. Окрім низької температури на мікроорганізми згубно діє висока концентрація розчинених в продукті речовин і знижена вологість, вимерзання води, що є результатом заморожування, зміна білків, які містяться в клітинах і механічна дія льоду, який утворюється поза клітиною, а при швидкому заморожуванні – й усередині клітини.

Мікроорганізми, які вижили під час зберігання мороженого м'яса, при його розмороженні починають розмножуватися. Швидкість розмноження залежить від температури та тривалості розморожування. Для уникнення активного розвитку мікроорганізмів рекомендовано проводити розмороження м'яса за низьких плюсових ($1 \div 8^{\circ}\text{C}$) температур.

Тканини тіла здорових тварин, як правило, стерильні. На поверхню м'яса мікроорганізми потрапляють із навколишнього середовища під час розробки та зберігання туші. При порушенні режиму зберігання м'яса мікроорганізми інтенсивно розмножуються і проникають усередину тканини. М'ясо, отримане від хворих тварин, може містити умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

Аналіз мазків-відбитків, виготовлених із різних ділянок м'яса, дозволяє орієнтовно судити про якісний склад мікрофлори та ступінь обсіменіння м'яса мікроорганізмами.

Проби м'яса для мікробіологічного дослідження відбирають згідно з вимогами. З кожної туші відбирають пробу масою 200 г (біля розрізу 4-го та 5-го шийних хребців, із м'язів у ділянці лопатки, з м'язів стегна в товстій частині). Із кожної проби готують не менше трьох мазків-відбитків: із поверхневого шару, з глибини $1 \div 2$ см, з глибини $2 \div 2,5$ см та $3 \div 3,5$ см.

Хід роботи:

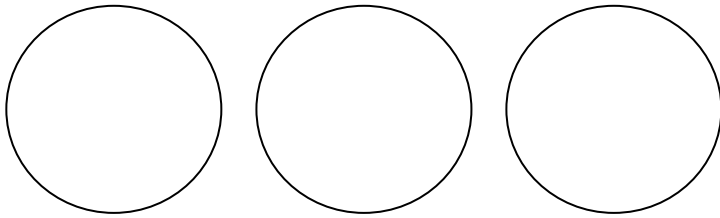
Щоб приготувати мазок-відбиток, із поверхневого шару стерильними ножицями вирізають шматочки м'яса ($0,5 \div 1,0$ г) і зрізом роблять відбитки на предметному склі. Якщо готують відбиток з глибоких шарів, то поверхню шматка м'яса попередньо стерилізують змоченим у спирті ватним тампоном. Потім стерильним скальпелем роблять розріз, розсувають краї пінцетом, вирізають ножицями шматочки тканини на потрібній глибині й

роблять відбитки на предметному склі. Мазки висушують на повітрі, фіксують, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. У кожному мазку проглядають не менше 5 полів зору. У кожному полі звертають увагу на забарвлення бактерій, підраховують окремо коки та паличкоподібні форми, після чого визначають середньоарифметичну кількість в одному полі зору.

М'ясо за свіжістю поділяють на 3 категорії: 1 – свіже, 2 – м'ясо сумнівної свіжості, 3 – м'ясо несвіже. М'ясо “свіже” – у мазках з поверхні спостерігаються поодинокі коки, палички, дріжджі, мікрофлора грампозитивна, в мазках з глибоких шарів мікроорганізми майже або зовсім не виявляються.

М'ясо “сумнівної свіжості” – у мазках з поверхневого шару виявляють декілька десятків мікроорганізмів, із глибинних шарів – не більше 20÷30 бактерій з перевагою коків. Мікрофлора грампозитивна та грамнегативна (на склі помітні сліди розпаду м'язової тканини).

М'ясо “несвіже” – в полі зору мазків з поверхневих та глибинних шарів спостерігається багато мікроорганізмів з перевагою грамнегативних паличок, кокові форми майже відсутні (на склі чітко простежуються сліди розкладеної тканини). Таке м'ясо не можна вживати.



ВИСНОВОК: _____

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. Мікроорганізми були відкриті:

- Г.Галілеєм
- Р.Гуком
- А. ван Левенгуком
- С.М. Виноградським

2. Для клітин прокариот характерні:

- наявність мембранних органел
- наявність нуклеоїда та позахромосомних генетичних елементів
- наявність ядра та інших ДНК-вмісних органел
- поділ мітозом

3. Які кулясті бактерії існують поодинокі (автономно):

- монококи
- сарцини
- тетракоки
- стафілококи

4. Які кулясті бактерії утворюють скупчення клітин, що нагадують грона винограду:

- монококи
- сарцини
- тетракоки
- стафілококи

5. Які кулясті бактерії утворюють скупчення клітин, що нагадують ланцюжок:

- диплококи
- сарцини
- стрептококи
- стафілококи

6. Які звивисті бактерії характеризуються наявністю одного завитка:

- спірили
- спірохети
- вібріони
- стафілококи

7. Які звивисті бактерії характеризуються значною кількістю завитків?

- спірили
- спірохети
- вібріони

- клостридії

8. Паличкоподібна форма притаманна:

- бацилам
- мікрококам
- вібріонам
- спірохетам

9. Куляста форма притаманна:

- клостридіям
- стрептококам
- вібріонам
- спірилам

10. Звивиста форма притаманна:

- стафілококам
- сарцинам
- бацилам
- спірохетам

11. За Грамом грампозитивні бактерії забарвлюються у:

- синьо-фіолетовий колір
- рожевий колір
- безбарвні
- жовто-помаранчевий колір

12. Як називаються бактерії зі значною кількістю джгутиків, розмішених по периметру клітин?

- лофотрих
- перитрих
- монотрих
- амфітрих

13. Щодо джерел вуглецю прокаріот поділяють на:

- аміноавтотрофи, аміногетеротрофи
- автотрофи, гетеротрофи
- фототрофи, хемотрофи, міксотрофи
- ауксотрофи, прототрофи

14. Загальні поживні середовища:

- використовують для виділення й культивування мікроорганізмів одного виду пристосованих для даного середовища
- застосовують для вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів та ідентифікації близькоспоріднених мікроорганізмів

- використовують для виділення й культивування більшості відомих мікроорганізмів
- використовують для виділення й культивування певних груп мікроорганізмів

15. До методів холодної стерилізації відносять:

- кип'ятіння
- автоклавування
- фільтрування крізь мембранні фільтри
- прокалювання.

16. До методів термічної стерилізації відносять:

- УФ-опромінення
- автоклавування
- фільтрування крізь мембранні фільтри
- дію хімічних дезінфекторів

17. Який біотоп людського організму характеризується найбільшою кількістю мікроорганізмів:

- ротова порожнина
- тонкий кишечник
- товстий кишечник
- шлунок.

18. Укажіть представників нормальної мікрофлори кишечника людини:

- біфідобактерії
- сальмонели
- мікоплазми
- хламідії

19. До бактеріальних інфекцій відносять:

- грип
- гепатит А
- дизентерію
- малярію

20. Мікробіологічні досягнення Р.Коха пов'язані з:

- введенням у медичну практику прийомів попередження інфекційного зараження хірургічних ран
- дослідженням збудників туберкульозу, холери, сибірської виразки
- дослідженням процесів бродіння (молочнокислого, спиртового та маслянокислого)
- дослідженням можливості самозародження життя на Землі

21. Мікробіологічні досягнення І.Мечнікова пов'язані з:

- введенням у медичну практику методів попередження інфекційного зараження хірургічних ран
- дослідженням збудників туберкульозу, холери, сибірської виразки
- дослідженням взаємовідносин макроорганізму та мікроорганізму
- введенням у медичну практику вакцинопрофілактики

22. Диференціація кулястих бактерій зумовлена:

- кількістю бактеріальних клітин, що не розходяться після поділу
- розмірами бактерій
- тинкторіальними властивостями
- здатністю утворювати чи не утворювати ендоспори

23. Диференціація паличкоподібних бактерій пов'язана з:

- здатністю клітин продукувати органічні кислоти
- розмірами бактерій
- кількістю площин поділу
- здатністю до утворення ендоспор у несприятливих умовах існування

24. Диференціація звивистих бактерій пов'язана з:

- кількістю бактеріальних клітин, що не розходяться після поділу
- розмірами бактерій
- кількістю та характером завитків, притаманних клітині
- взаємним розміщенням клітин після поділу

25. Фотототаксис – це:

- рух у напрямку хімічних речовин
- здатність переміщуватися за силовими лініями магнітного поля завдяки наявності магнітосом
- характерний для бактерій, що здійснюють оксигенний чи аноксигенний фотосинтез
- здатність реагувати на зміну в'язкості розчину та переміщуватися у напрямку її збільшення чи зменшення

26. Яка стадія росту періодичної культури характеризується максимальною швидкістю?

- початкова
- експоненціальна
- стаціонарна
- кінцева

27. Укажіть органи та тканини локалізації нормальної мікрофлори в організмі людини:

- селезінка
- шкіра
- серце
- печінка

28. Збудники спиртового бродіння:

- лактобацили, стрептококи
- ентеробактерії
- дріжджі, сарцини, ервінії, зимомонас
- пропіонобактерії

29. Адгезія (як фактор вірулентності) - це:

- здатність проникати через слизові та сполучно-тканинні бар'єри в нижчерозміщені тканини (при цьому виділяються ферменти (гіалуронідаза,..))
- процес розмноження мікроорганізмів у місці прикріплення
- процес прикріплення чи прилипання мікробних клітин до поверхні клітин макроорганізму
- пригнічення неспецифічного й імунного захисту організму господаря

30. Виділена культура розщеплює сахарозу, не розщеплює глюкозу, утворює індол. Які властивості культури описані?

- тинкторіальні
- біохімічні
- антигенні
- культуральні

31. Грамнегативні бактерії:

- мають товстий пептидоглікановий шар, пронизаний тейхоевими (ліпотейхоевими) кислотами, який щільно прилягає до ЦПМ
- мають оточений зовнішньою мембраною тонкий пептидоглікановий шар
- за дії етанолу не знебарвлюється
- за Грамом набувають синьо-фіолетового кольору

32. Які компоненти клітинної стінки характерні лише для грамположитивних клітин?

- пептидоглікан
- ліпополісахарид
- тейхоеві та ліпотейхоеві кислоти

- зовнішня мембрана

33. До включень, що є адаптивними структурами бактеріальної клітини, належать:

- магнітосоми, аеросоми
- гранули глікогену, волютинові зерна, ліпідні краплі
- хлоросоми, фікобілісоми, карбоксисоми
- прототоксини бацил

34. R-плазмід:

- кодують утворення статевих ворсинок
- визначають стійкість бактерій до лікарських засобів
- кодують ендонуклеази та метилтрансфери
- кодують ферменти утилізації

35. Під час гомоферментативного молочнокислого бродіння утворюються:

- лактат, ацетат, альдегіди
- лактат, гліцерол, етанол
- лактат;
- лактат, етанол, вуглекислий газ і водень

36. Збудники маслянокислого бродіння бродіння:

- лактобацили, стрептококи
- ентеробактерії
- дріжджі, сарцини, ервінії, зимомонас
- клостридії

37. Нітрифікація – це:

- фіксація атмосферного азоту
- розщеплення органічних азотовмісних сполук
- утворення молекулярного азоту
- окислення аміаку до нітриту та нітратів

38. Як називаються бактерії, здатні отримувати енергію шляхом окислення неорганічних речовин:

- фотоорганотрофи
- хемоорганотрофи
- хемолітотрофи
- фотолітотрофи

39. Специфічна мікрофлора харчових продуктів – це:

- мікроорганізми, що використовуються в рецептурі
- мікроорганізми, що попадають в сировину з навколишнього середовища
- мікроорганізми, що забруднюють продукт при неправильному зберіганні

40. Lactobacillus lactis, присутній у кисломолочних продуктах, належить до:

- специфічної мікрофлори
- неспецифічної мікрофлори

41. Укажіть можливе джерело контамінації готового харчового продукту:

- порушення технологічного режиму
- обсеменення сировини
- працівники
- внесення виробничих штамів

42. Яка мета санітарно-мікробіологічного аналізу харчової продукції:

- забезпеченням епідемічної безпеки харчових продуктів
- регулювання ринку харчової продукції
- контроль якості сировини та режимів зберігання готової продукції
- підвищення конкурентоспроможності та популярності певної продукції

43. Які групи мікроорганізмів відносяться до санітарно-показових:

- КМАФАнМ
- БГКП
- мікроорганізми псування
- САБ

44. Найбільш небезпечним мікроорганізмом серед умовно-патогенних є:

- Bacillus subtilis
- Escherichia coli
- Staphylococcus aureus
- бактерії роду Proteus

45. Серед спороутворюючих аеробних бактерій, що викликають токсикоінфекції, найбільш небезпечною є:

- Bacillus subtilis
- Bacillus cereus
- B. megatericus
- B. pumilus

46. Перше місце серед харчових отруєнь за частотою виникнення займає:

- стафілококове отруєння
- дизентерія
- сальмонельоз
- бруцельоз

Навчальне видання
Технічна мікробіологія
/ Укладачі: Л.М. Васіна, Л.М. Чебан

Відповідальний за випуск
Комп'ютерний набір та верстка

Копильчук Г.П.
Васіна Л.М.

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК №891 від 08.04.2002 р.

Підписано до друку..... Формат 60 x 84/16.