

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

МІКРОБІОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник
для студентів заочної форми навчання

Чернівці
Чернівецький національний університет
2020

УДК 579(076.5)
ББК 28.4я7
В 19

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

Васіна Л.М.

В 19 Мікробіологія: навч.-метод. посібник. – Чернівці: Чернівецький національний університет, 2020. – 88 с.

ББК 28.4я7

У виданні подано короткі відомості про особливості морфологічної та ультраструктурної організації мікроорганізмів, основні процеси їх життєдіяльності та біологічної ролі в кругообігу речовин у природі. Застосовано 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 мікробіології для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів.

© Васіна, 2020

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

ЗНАЙОМСТВО З МІКРОБІОЛОГІЧНОЮ ЛАБОРАТОРІЄЮ. ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЖИВОМУ СТАНІ

Мета заняття: *ознайомитися* з структурою мікробіологічної лабораторії та правилами роботи в ній, з вимогами техніки безпеки; *засвоїти* техніку мікроскопії та дослідження мікроорганізмів у живому стані шляхом приготування препаратів висячої та розплюснutoї краплі.

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.

Мікроорганізми – 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 група організмів, 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.

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 промисловому виготовленні 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. Пастера вивчав молочнокисле, спиртове, маслянокисле бродіння, „хвороби” вина, захворювання тварин і людини, постулював можливість анаеробного існування, запропонував методи профілактики та боротьби з інфекційними хворобами..

Одним з основоположників медичної мікробіології вважається німецький мікробіолог Р. Кох. Він відкрив збудників сибірської виразки, туберкульозу, холери, запровадив введення в мікробіологічну практику методу виділення чистих культур, використання анілінових барвників, імерсійних об’єктивів, мікрофотографування. Основоположником медичної мікробіології справедливо вважають також І.І. Мечникова. Найбільшу зацікавленість у нього викликала проблема вивчення взаємовідносин господаря і мікроорганізму-паразита. В 1883 р. І. І. Мечников сформував фагоцитарну теорію імунітету та є автором теорії 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, а двома роками пізніше встановив мікробіологічну природу анаеробного розпаду рослинних залишків. М. С. Воронін в 1867 р. описав бульбочкові бактерії, а через майже двадцять років Г. Гельригель і Г. Вільфарт показали їх здатність до азотфіксації. П. А. Костичев створив теорію мікробіологічної природи процесів ґрунтоутворення. Значний внесок у розвиток загальної мікробіології внесли російський мікробіолог С. М. Виноградський і голландський мікробіолог М. Бейеринк. 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 ХХ ст. розвиток мікробіології гальмується відставанням біохімії, генетики, біофізики. В той же час активно продовжувалося виділення і вивчення збудників інфекційних захворювань.

5. Молекулярно-генетичний період

6. Біотехнологічний період розвитку мікробіології

Відомо, що існує два типи клітинної організації. Бактерії, як і археї належать до прокаріотів, 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-актиноподібні білки)	Можливий, наявний цитоскелет
Клітинна стінка	Пептидоглікан (переважно)	Целюлоза, хітин, глікокалік
Джгутики	Побудовані з білків, серед яких флагелін	Система мікротрубочок аксономи і базального тільця

Матеріали й обладнання: добові культури *Sarcina flava*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Acetobacter aceti*, знежирені предметні та покривні скельця, фільтрувальний папір, мікроскопи, марлеві серветки, мило, вазелін.

Техніка приготування препаратів:

1)"роздавлена крапля":

- на чисте знежирене предметне скло бактеріологічною петлею нанести краплину суспензії (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. Надлишок відібрати за допомогою фільтрувального паперу.

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

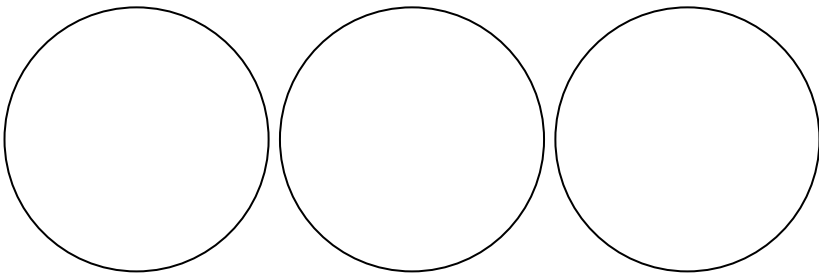
- у центр покривного скельця бактеріологічною петлею або звичайним пером нанести краплю досліджуваного матеріалу;

- 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.

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



ВИСНОВКИ: _____

Лабораторна робота №2

МОРФОЛОГІЧНІ ТИПИ МІКРООРГАНІЗМІВ

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

Найпоширенішу й досить різноманітну групу мікроорганізмів складають бактерії. 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 *напря́м площини* поділу клітини та характер *взаємного розміщення* клітин. Так, розрізняють моно-, дипло-, стрепто-, тетракоки, сарцини та стафілококи (рис. 1.).

Паличкоподібні бактерії – найрізноманітніша і найчисленніша група бактерій. Довжина їх клітин коливається від десятих часток мікрметра 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.

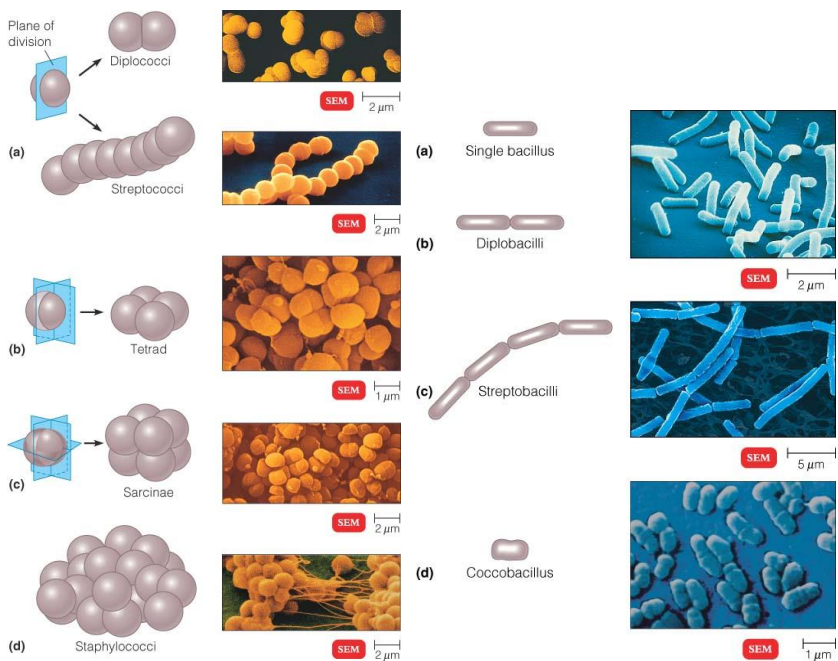
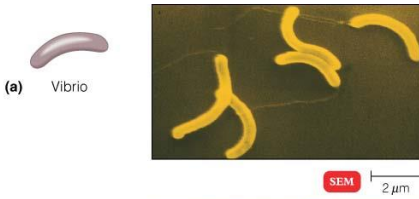


Рис. 1. Різноманітність кулястих та паличковидних бактерій
<http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture2.htm>

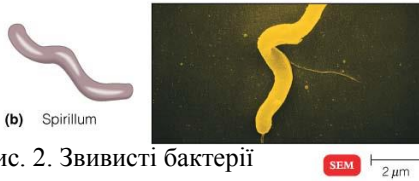
Більшість паличкоподібних мікроорганізмів – форми, що не утворюють спор, отримала назву *бактерій*. Паличкоподібні бактерії, здатні за несприятливих умов формувати спори, прийнято називати *бацилами* або *кlostридіями*. Бактерії і бацили розміщуються поодинокі, попарно або з'єднуються в ланцюжки, в останньому 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):

- *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*);

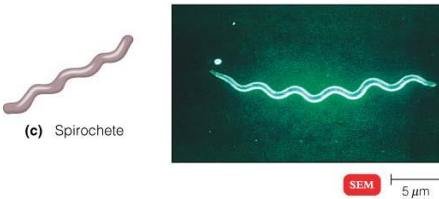


- *спірили* – зігнуті на 2–3 оберти великі клітини, що мають форму латинської букви S (*Spirillum minus*, *Spirillum volutans*);



- *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*

Рис. 2. Звивисті бактерії



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

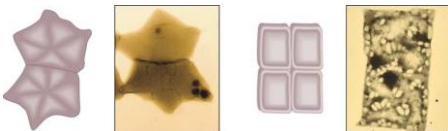


Рис. 3. Рідкісні форми бактерій

(мікобактерії, корине-бактерії, мікобактерії). Виявлені також рідкісні форми бактерій, подібні до нирки людини, нитчасті, шестикутної чи квадратної форми (рис. 3).

Особливе місце в мікросвіті займають актиноміцети. Це бактерії, які галузяться і мають риси подібності з грибами (гіфи, міцелій).

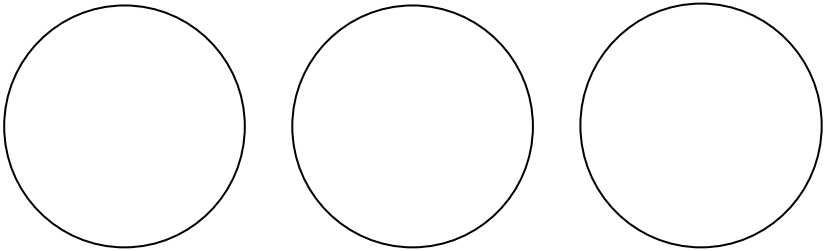
Матеріали й обладнання: водний розчин фуксину, предметні й покривні скельця, мило, бензин, імерсійна олія, промивалка з водою, ванночка зі скляним місточком, мікроскопи, чисті культури мікроорганізмів, настої різних природних

матеріалів (гною, сметани, розсолу огірків, капусти, муки, овочів та ін.).

Техніка приготування забарвленого фіксованого препарату:

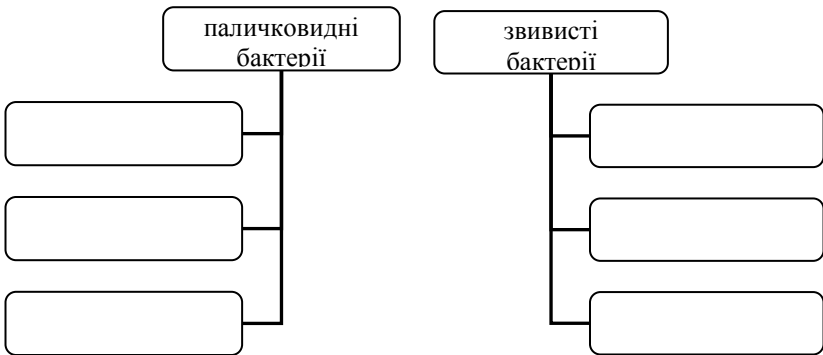
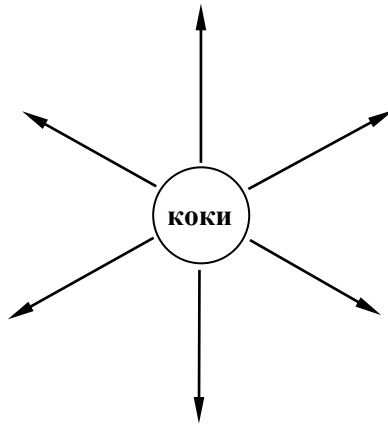
- за допомогою стерильної бактеріологічної петлі нанести на знежирене предметне скло краплю бактеріальної суспензії, зробити мазок і висушити його;
- зафіксувати мазок у полум'ї пальника (час прямої дії полум'я не повинен перевершувати 3–4 с);
- препарат покласти мазком уверх на місток, розташований 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.



Теоретичне завдання:

Закінчити схеми диференціації кулястих, паличкоподібних, звивистих бактерій:



ВИСНОВКИ: _____

Лабораторна робота №3

ПОВЕРХНЕВІ СТРУКТУРИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН

Мета заняття: ознайомитися з особливостями будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій,

типами слизових утворень (капсул, шарів, чохлів) та нитчастих поверхневих структур прокариотичних організмів; *оволодіти* методами виявлення та ідентифікації поверхневих структур бактеріальної клітини.

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. Суть методу полягає в тому, що барвники трифенілметанового ряду в комплексі з йодом утримуються клітинними стінками грампозитивних бактерій при знебарвленні їх спиртом:

- **Грам⁺** – набувають синього або фіолетового забарвлення за рахунок утворення забарвленого комплексу за послідовної дії кристалічного фіолетового (генціанвіолету) та йоду, що не вимивається при подальшій обробці етанолом;
- **Грам⁻** – забарвлений комплекс вимивається етанолом, унаслідок чого клітини знебарвлюються.

При фарбуванні за Грамом слід враховувати такі особливості:

- клітини повинні бути молодого віку (18-24 год), оскільки старим і мертвим клітинам властива зміна здатності зафарбовуватися за Грамом;
- умовою повного вимивання фарби з мазка є робота з

моношаром клітин;

- для уникнення вимивання фарби з грампозитивних клітин знебарвлення необхідно проводити дуже швидко;
- з метою уникнення маскування попередньої фарби додаткове контрастне фарбування повинне бути короткотривалим;
- фарбування досліджуваної культури за Грамом слід проводити паралельно з тест-культурами, для яких відоме й відпрацьоване фарбування за Грамом.

Клітинні стінки грампозитивних і грамнегативних еубактерій кардинально відрізняються як за хімічним складом, так і за ультраструктурою. Так, з'ясовано, що утримування або вимивання утвореного на протопласті забарвленого комплексу при подальшій обробці спиртом визначаються саме особливостями будови клітинної стінки (рис. 4).

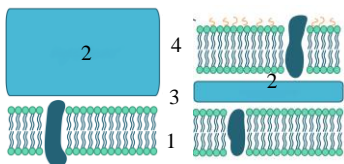


Рис. 4. Будова клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій: 1 – ЦПМ; 2 – пептидоглікан; 3 – міжмембранний простір; 4 – зовнішня мембрана

Особливості клітинної стінки G^+ 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 фосфодієфірними 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).
 - Нещільно 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 прокариот часто оточена різними слизовими утвореннями, які відрізняються за своєю структурою

(капсули, шари, чохли). 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, чохли 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.

Для бактерій характерні направлені рухи таксиси. Залежно від подразника розрізняють хемо-, фото-, магніто-, віскозитаксиси.

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*.

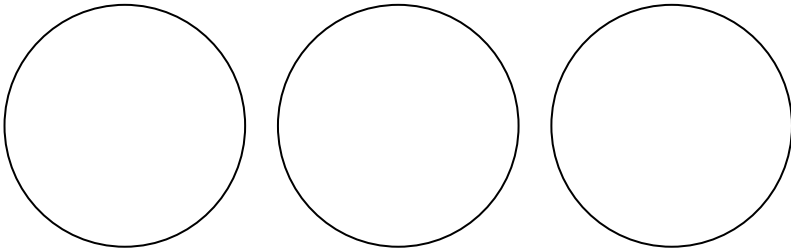
Техніка забарвлення бактерій за Грамом:

- 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.

Техніка виявлення капсул за методом Буррі:

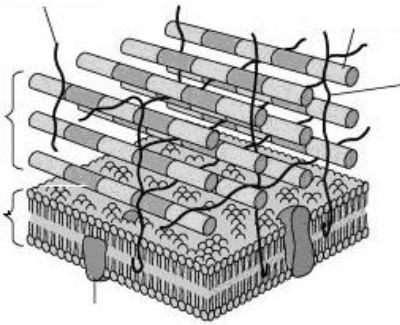
- на чисте знежирене предметне скло нанести краплю туші та змішати її з краплею суспензії *Azotobacter chroococcum* або *Bacillus megaterium*;
- виготовити мазок за типом «мазка крові» і висушити на повітрі;
- промікроскопіювати з імерсією.

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

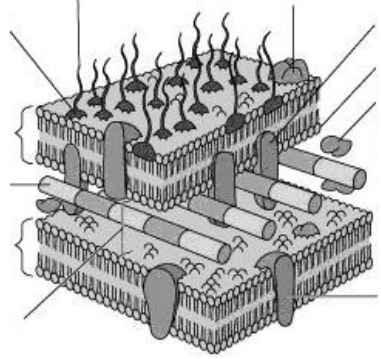


Теоретичне завдання:

1. Вказати, яка з наведених схем характеризує клітинну стінку Γ^+ , яка Γ^- бактерій. Назвати їх структурні компоненти:

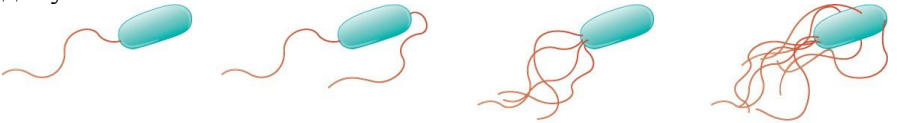


A

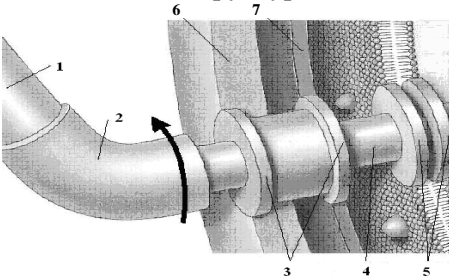


B

2. Як називаються бактерії з відповідним розташуванням джгутиків:



3. Вказати структурні елементи бактеріального джгутика:



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

ВИСНОВКИ: _____

Лабораторна робота №4

ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ СТРУКТУР БАКТЕРІЙ

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

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 прокаріот не виявлено гістонів, тому нейтралізація зарядів здійснюється взаємодією ДНК із поліамінами (сперміном і спермідином), а також з іонами Mg^{2+} , у деяких археобактерій і ціанобактерій виявлені гістони і гістоноподобні білки, пов'язані з ДНК.

Поділ молекули ДНК (реплікація) відбувається за напівконсервативним механізмом і в нормі завжди передуює 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 прокаріот.

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:

- ділянки ДНК, відповідальної за автономну реплікацію плазмід;
- системи генів, що забезпечують можливість перенесення плазмід з однієї клітини в іншу;
- генів, що визначають властивості, корисні для клітини-господаря.

Відмінна особливість плазмід – здатність до автономної реплікації, тому мінімальна кількість ДНК, яка може бути названа плазмідом, – це фрагмент, що забезпечує автономну реплікацію плазмідної ДНК у клітині як єдиного цілого.

Про присутність плазмід у бактеріальній клітині свідчить стійкість до окремих лікарських препаратів, синтез речовин антибіотичної природи, здатність до перенесення генів при кон'югації, використовувати деякі цукри або забезпечувати деградацію ряду речовин. 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;
- плазмід патогенності – контролюють вірулентні властивості бактерій і токсиноутворення;
- бактеріоциногенні – кодують бактеріоцини, що згубно впливають на бактерії того ж виду чи близьких – коліцини, пестіцини, вібріоцини, стафілоцини;
- плазмід, що кодують ендонуклеази і метилтрансферази, які здійснюють захист від фагової інфекції та чужерідної ДНК;
- Ті-плазмід (500 т.п.н.) *Agrobacterium tumerfaciens* індукує утворення пухлин;
- плазмід 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 плазміді; їх реплікація здійснюється під контролем тих же механізмів, що й у відповідній хромосоми або плазміді. 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 (1). У ряді бактерій виявлена універсальна адаптивна реакція у відповідь на різні стресові дії (високі та низькі температури, різкий зсув рН), що проявляється в інтенсивному синтезі групи схожих білків – білків теплового чи холодного шоку (2). Синтез бактеріями ферментів деградації та зміни антибіотиків (3), утворення L-форм (4) та S- і R-модифікації – приклади неспадкової мінливості. 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.

Стрибокподібні зміни в генетичному матеріалі клітини, що приводять до появи нових ознак, називаються **мутаціями**. Спонтанні мутації виникають у популяції особин завжди, часто без видимого впливу на популяцію. Підвищувати частоту мутацій або індукувати їх можуть фізичні, хімічні та біологічні чинники (мутагени).

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

I) 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 клітину 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. Грифїтсом у дослідях 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. Розрізняють 3 типи трансдукції: неспецифічну, специфічну та abortивну, при якій перенесений фагом фрагмент ДНК бактерії-донора не включається в хромосому бактерії-реципієнта, а розміщується в її цитоплазмі і може там функціонувати.

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

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

Прикладом внутрішньоцитоплазматичних включень, що мають адаптивне значення, слугують **магнітосоми** (містять Fe₃O₄ і забезпечують магнітотоксис) і газові вакуолі, або **аеросоми**

(забезпечують плавучість водних організмів та регуляцію глибини).

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-оксимаєляної кислоти. У деяких бактерій, що окислюють вуглеводні, полі-β-оксимаєляна 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 волутинових (термін зумовлений видовою назвою бактерії, де вперше виявлені – *Spirillum volutans*) гранулах (метахроматинових 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 Mg^{2+} .

Для прокаріот, 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.

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.

Техніка приготування препаратів для виявлення клітинних включень:

а) глікогену (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus megaterium*) та гранульози (*Clostridium pasteurianum*):

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

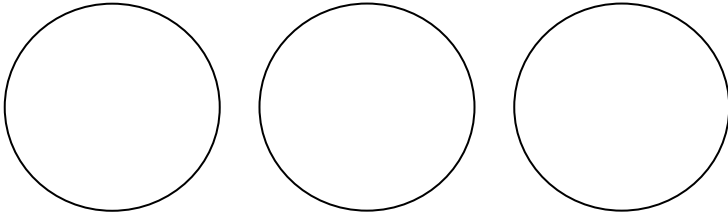
б) волютину у дріжджів (за методом Лефлера):

- 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 і мікроскопіювати з імерсією.

в) 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 і мікроскопіювати з імерсією.

Промікроскопіювати отримані препарати, замалювати їх і назвати мікроорганізми.



ВИСНОВКИ: _____

ОСОБЛИВОСТІ ЖИВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ РІЗНИХ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП

Бактеріальна клітина містить 75-85% води, решта – суха речовина. Спори бактерій містять 40-50% води. За кількісним вмістом у клітині розрізняють органогенні (С, О, Н, 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). **Оліготрофні** бактерії здатні рости за низьких концентрацій органічних речовин у середовищі. На відміну від них – **копіотрофи** надають перевагу високим концентраціям 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 виробництва) поживні 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** поживні 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.

Для вирощування аеробів у лабораторній практиці найчастіше використовується метод поверхневого культивування мікроорганізмів на твердих і рідких середовищах завдяки безпосередньому контакту з киснем повітря. Використовується також метод глибинного культивування мікроорганізмів у рідких поживних 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 поживного 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*, що 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 поживне середовище* – легко втирають матеріал у поверхню середовища, не пошкоджуючи його;
- *в рідке поживне 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 (градуваною чи пастерівською).

Під ростом розуміють незворотне зростання кількості живої речовини, пов'язане зі збільшенням і поділом клітин. У багатоклітинних організмів збільшуються розміри тіла, в одноклітинних зростає кількість клітин. Під час визначення кількості чи маси бактерій користуються гомогенною суспензією клітин в якому-небудь рідкому середовищі та визначають концентрацію бактерій (кількість клітин на 1 мл) чи густину бактерій (в мг/мл). На основі даних про збільшення цих показників у бактеріальній культурі можна обчислити константу швидкості поділу клітин (виражають числом подвоєнь концентрації бактерій за 1 год) і зворотну їй величину – час генерації (інтервал часу, за який кількість клітин подвоюється). Живими вважаються ті клітини, які можуть утворювати колонії на (в) агаризованому середовищі або суспензію в поживному розчині.

При внесенні бактерій у поживне середовище вони ростуть доти, поки вміст будь-якого з необхідних компонентів не досягне мінімуму. Якщо протягом цього часу не добавляти поживних речовин і не видаляти кінцевих продуктів обміну, то отримуємо періодичну культуру. Ріст у такій замкненій системі підлягає закономірностям, властивим не тільки для одноклітинних, а й для багатоклітинних організмів. Періодична культура поводить себе як багатоклітинний організм із генетично обмеженим ростом. Крива, що описує залежність логарифму кількості живих клітин від часу, називається кривою росту. Типова крива має S-подібну форму і

включає кілька фаз:

- Початкова – обмежує проміжок часу між інокуляцією та досягненням максимальної швидкості поділу. Тривалість залежить від попередніх умов культивування, віку інокуляту, середовища. Під час лаг-фази бактерії адаптуються до нового середовища існування (наприклад, синтезують нові ферменти).
- Експоненціальна – характеризується постійною максимальною швидкістю поділу клітин, залежить від виду бактерій і поживного середовища. У лог-фазі спостерігається максимальний ріст.
- Стаціонарна – не збільшується кількість клітин. Швидкість росту дорівнює 0, зростає конкуренція за поживні ресурси. Утворення нових клітин сповільнюється, потім припиняється. Збільшення кількості клітин компенсується одночасною загибеллю, сумарна чисельність – постійна. Перехід до цієї фази зумовлений дією багатьох факторів: виснаженням поживних речовин середовища, нагромадженням токсичних шлаків.
- Відмирання – вивчена недостатньо, спричиняється нестачею поживних речовин, конкурентними взаємовідносинами, виділенням токсичних продуктів. Тому, видаляючи продукти метаболізму чи замінюючи поживне середовище, регулюючи перехід мікробної популяції зі стаціонарної у фазу відмирання, можна створити відкриту біологічну систему. Такий процес вирощування мікроорганізмів називається безперервним культивуванням і дозволяє отримати значні маси бактерій у спеціальних хемостатах і турбідистатах (використовується для виробництва вакцин, біологічно активних речовин). Для вивчення метаболічних процесів використовують синхронні культури (усі члени популяції знаходяться в одній фазі циклу).

Діауксія або двофазний ріст спостерігається під час вирощування прокариот на середовищах, що містять суміш поживних речовин. Наприклад, розвиток кишкової палички у присутності глюкози та сорбітолу. На першому етапі бактерії використовують глюкозу, на другому – відбувається індукційний синтез ферментів для утилізації сорбітолу.

Різні мікроорганізми в результаті розмноження на твердих поживних 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:

- *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 (припіднятість над поверхнею поживного середовища) – може бути конусоподібний, куполоподібний, плаский, кратероподібний тощо;
- *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.

Слід пам'ятати, однак, що 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).

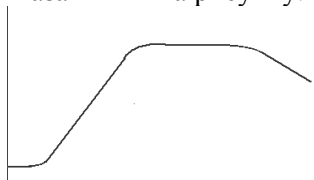
Теоретичне завдання:

1. Охарактеризувати поділ мікроорганізмів щодо:

- **джерел вуглецю:** _____

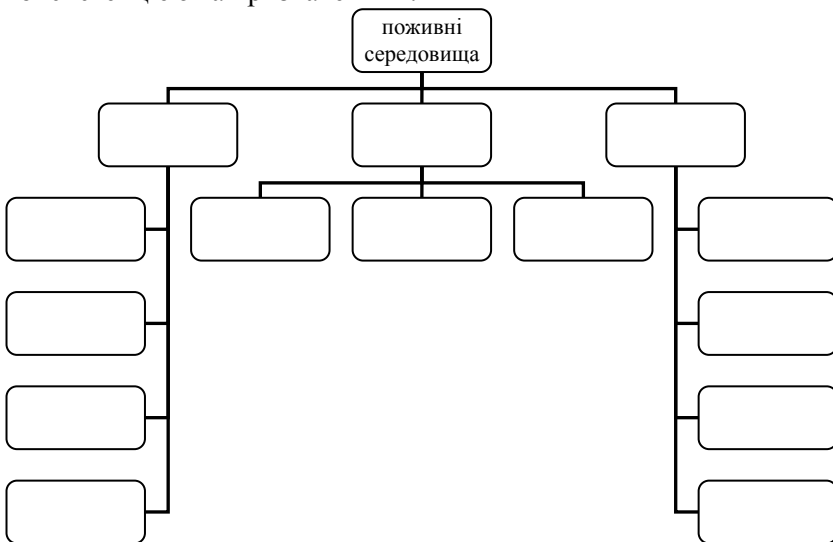
- джерел азоту: _____
- джерел енергії: _____

2. Назвати стадії росту періодичної бактеріальної культури, вказавши їх на рисунку:



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

3. Навести класифікації поживних середовищ за походженням, консистенцією та призначенням:



ВПЛИВ ФАКТОРІВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА НА РІСТ І РОЗВИТОК МІКРООРГАНІЗМІВ

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** (- 10⁰- +20⁰С) - облигатні – 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** (+20⁰- +40⁰С) – більшість бактерій;

- **термофіли**: термотолерантні, факультативні, облигатні, екстремальні. Екстремальні термофіли належать винятково до архей і представлені метанотворюючими 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. Виявилося, що клітинна стінка, мембрани, рибосоми термофілів значно термостабільніші, ніж відповідні структури мезофілів.

Кислотність середовища (концентрація водневих іонів, pH) – важливий чинник, що визначає можливість існування прокаріот.

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 прокаріот, знижується, а розчинність деяких іонів (Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) зростає та досягає рівнів, токсичних для багатьох прокаріот. 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 прокаріот – 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).

Веgetативні клітини багатьох бактерій у певних умовах дають початок структурам, морфологічно відмінним від початкових. Ними можуть бути вегетативні клітини, але зміненої форми, клітинні структури з чітко вираженою функціональною спеціалізацією, різні багатоклітинні утворення. В переважній більшості всі відомі прояви морфологічної диференціації еубактерій спрямовані на підвищення їх виживання. Це виражається у формуванні спеціальних клітин:

- що володіють підвищеною стійкістю до перенесення несприятливих умов (ендоспори, цисти *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, актиноміцети *Methylosinus*, *Rhodomicrobium*, міксобактерії, ковзаючі бактерії, *Azotobacter*, *Bdellovibrio*);
- що забезпечують ефективне розмноження виду (гормогонії та басоцити ціанобактерій),
- що забезпечують фіксацію молекулярного азоту атмосфери (гетероцисти ціанобактерій, бактероїди бульбочкових бактерій).

Цисти зустрічаються в різних груп еубактерій: азотобактера, спірохет, міксобактерій, рикетсій. У більшості міксобактерій утворення цист, що називають міксоспорами, – закономірна стадія їх життєвого циклу. Після закінчення стадії активного розмноження клітини міксобактерій збираються разом і утворюють так звані плодові тіла (маса слизу, в який занурені клітини або диференційовані структури, що підіймаються над поверхнею субстрату). У середині плодових тіл клітини переходять у стан спокою. У одних видів цисти можуть морфологічно не відрізнятися від вегетативних клітин, в інших відбувається потовщення стінки вегетативної клітини, внаслідок чого формуються оптично щільні, оточені капсулою вкорочені палички

або сферичні форми. Утворення мікоспор супроводжується синтезом білка, так що сформована мікоспора містить близько 1/3 новосинтезованого білка. ДНК не синтезується, а переходить із початкових вегетативних клітин.

Поява плодових тіл мікрококів зумовлена нестачею поживних речовин. Представники різних родів формують плодові тіла різною форми, що здійснюються над субстратом на висоту до 0,2 мм і складаються з 10^5 клітин.

У азотобактера утворення цист супроводжується зміною морфології клітини, втратою джгутиків і накопиченням у цитоплазмі у великих кількостях гранул полі- β -оксимасляної кислоти; одночасно відбувається синтез додаткових клітинних покривів.

Клітини стану спокою деяких ціанобактерій, що володіють підвищеною стійкістю до ряду несприятливих чинників (висушування, зниження температури), – акінети. Вони, як правило, більші за вегетативні клітини, мають довгасту або сферичну форму, гранульований вміст і товсту оболонку. Утворення акінет відбувається в період уповільнення росту і починається зі збільшення клітинних розмірів, при цьому в цитоплазмі відбувається накопичення гранул запасуючих речовин (глікогенових, поліфосфатних і ціанофіцинових), а також карбокисом. Одночасно відбувається потовщення пептидогліканового шару клітинної стінки й ущільнення слизистого чохла. У цитоплазмі під час формування акінет відбувається збільшення змісту ДНК, рибосом, але зменшення кількості хлорофілу, фікобілінових пігментів, води.

Утворення екзоспор характерне для стрептоміцетів – грам-позитивних актиноміцетів із високим вмістом ГЦ-пар, типових мешканців ґрунтів і активних продуцентів антибіотиків. В оптимальних умовах мікроорганізми ростуть у вигляді субстратного вегетативного міцелію, а в умовах нестачі поживних речовин – у вигляді повітряного міцелію. На кінцях повітряних гіф утворюються ланцюжки спор (50 і більше). Причому спочатку утворюються регулярно розміщені компартменти, що містять по одній копії геному. Вони диференціюються зі зміною форми та товщини клітинної стінки, перетворюючись у зрілі спори з рельєфною гідрофобною поверхнею. Екзоспори стійкі до

висушування, але чутливі до високих температур. Запуск споруляції зумовлений, ймовірно, зміною рівня ГТФ і ГДФ, ауторегуляторними ендogenousними факторами – індукторами синтезу повітряного міцелію.

Ендоспори формуються ендogenousно, тобто всередині цитоплазми Gr⁺ „материнської клітини” (спорангія), і володіють специфічними структурами (багат шаровими білковими покривами, зовнішньою і внутрішньою мембранами, кортексом) і стійкістю до високих температур, доз радіації, летальних у нормі для вегетативних клітин.

До спороутворюючих належить велика кількість еубактерій приблизно з 15 родів (*Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sulfobacillus*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*, *Actinobifida*, *Sporospirillum*, *Oscillospira*, *Fusosporus*). Вперше утворення спор дослідив К.Еренберг у 1838 році, докладніше вивчив Л.Пастер.

Найкраще процес спороутворення вивчений у представників родів *Bacillus* і *Clostridium*, хоча наявні дані дозволяють зробити висновок про принципovu однотипність цього процесу у всіх видів. У кожній бактеріальній клітині, як правило, формується одна ендоспора. Найчастіше спороутворення спричиняється нестачею поживних речовин, нагромадженням у середовищі шкідливих продуктів обміну, несприятливою температурою, зміною рН. Процес може тривати від кількох годин до доби і відбувається в кілька фаз:

1. Нуклеоїд вегетативної клітини набуває форми видовженого тяжа, що проходить вздовж довгої осі клітини. На цій стадії припиняється реплікація ДНК, відбувається перебудова білків. Вона зворотна, оскільки в разі перенесення клітини у сприятливі умови процес поділу відновлюється.

2. З осевого тяжа відокремлюються 2 частини: мала – нуклеоїд майбутньої спори і велика – нуклеоїд клітини, в якій утворюється ця спора. Малий нуклеоїд локалізується на полюсі клітини. Цей поділ супроводжується появою перегородки внаслідок інвагінації цитоплазматичної мембрани.

3. Мембрана більшої клітини разом із цитоплазмою оточують меншу клітину – утворюється овальна проспора, оточена двома

мембранами, зовнішньою і внутрішньою. Проспора віддаляється від мембрани материнської клітини.

4. Утворення специфічної оболонки спори – кортекса.

5. Формуються покриви спори, що складаються з кількох шарів різної товщини й будови в різних видів бактерій і надають стійкості до дії ферментів, отрут, поверхнево-активних речовин. Споріві покриви, в основному, складаються з білків і невеликої кількості ліпідів і гліколіпідів. Доведено, що спори мутантів, позбавлені покривів, проростають відразу після виходу з материнської клітини, навіть за несприятливих умов.

6. Завершується дозрівання спор, яке супроводжується синтезом дипіколінової кислоти та іншими хімічними змінами. Спори набувають специфічних властивостей (витримують кип'ятіння протягом 2 год, 20 хв залишаються живими в концентрованій HCl). Спороутворення супроводжується активним синтезом білка. Білки ендоспор багаті цистеїном і гідрофобними амінокислотами, з чим пов'язують стійкість спор до дії несприятливих чинників. Генетичний матеріал поступає в спору у вигляді повністю реплікованих молекул ДНК. Спори деяких видів містять по 2 або 3 копії хромосоми. Вміст РНК у спорах нижчий, ніж у вегетативних клітинах, і РНК, значною мірою, синтезується наново. Характерна особливість ендоспор – нагромадження в них дипіколінової кислоти й іонів кальцію в еквімолярних кількостях, що утворюють комплекс у серцевині спори. Крім Ca^{2+} , в ендоспорах збільшується вміст інших катіонів (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}), з якими пов'язують перебування спор у стані спокою та їхню термостійкість.

Спори різних бактерій розрізняються за формою, розміром, характером поверхні та локалізацією у клітині. Розрізняють спори розміщені: бациллярно (в центрі), кластридально (ексцентрално, веретеноподібні), плектридально (на кінцях – як тенісна ракетка).

Клітини еубактерій у стані спокою характеризуються

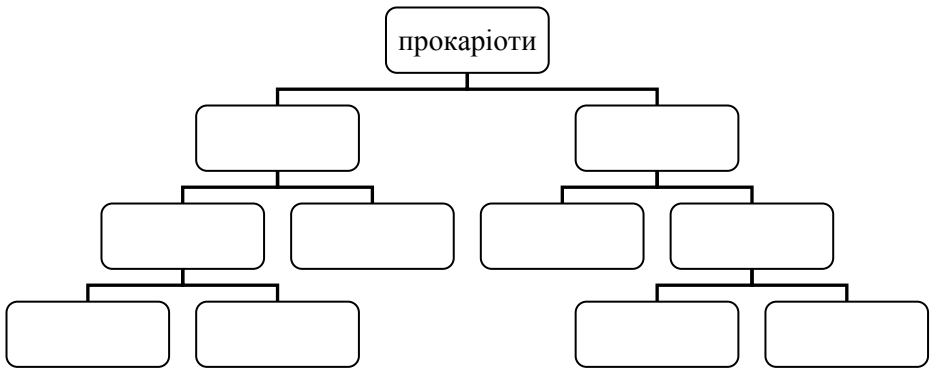
Проростання ендоспор відбувається у сприятливих умовах і супроводжується складними фізіологічними і біохімічними змінами. Починається він з інтенсивного поглинання спорою води і набухання. На першому етапі проростання відбувається активація ферментів (і в першу чергу літичних), різко зростає дихання, тобто мобілізується енергія, відбуваються зміни в хімічному складі (зі

спор видаляється дипіколінова кислота), активно синтезуються білки і РНК. Реплікація ДНК починається не відразу, а через 1–2 год після початку проростання спори. Перш за все відбуваються процеси репарації пошкоджень ДНК, що трапилися в період спокою спори. За час проростання спори втрачають до 1/3 первинної маси. Подальші етапи полягають у руйнуванні кортекса, розриві спорових покривів, виході ростової трубочки, побудові клітинної стінки і поділі сформованої вегетативної клітини.

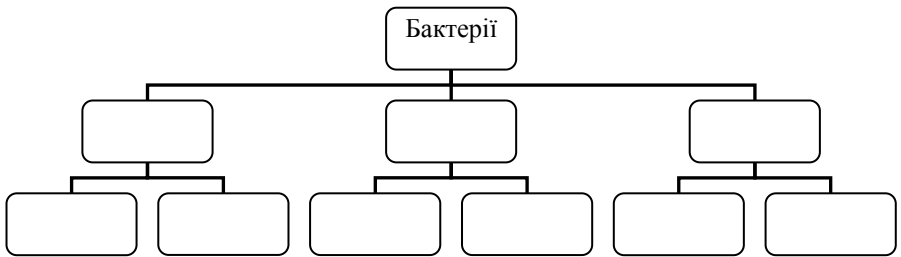
Проте процеси утворення морфологічно відмінних форм до

Теоретичне завдання:

1. Класифікуйте прокаріоти щодо концентрації кисню у середовищі:



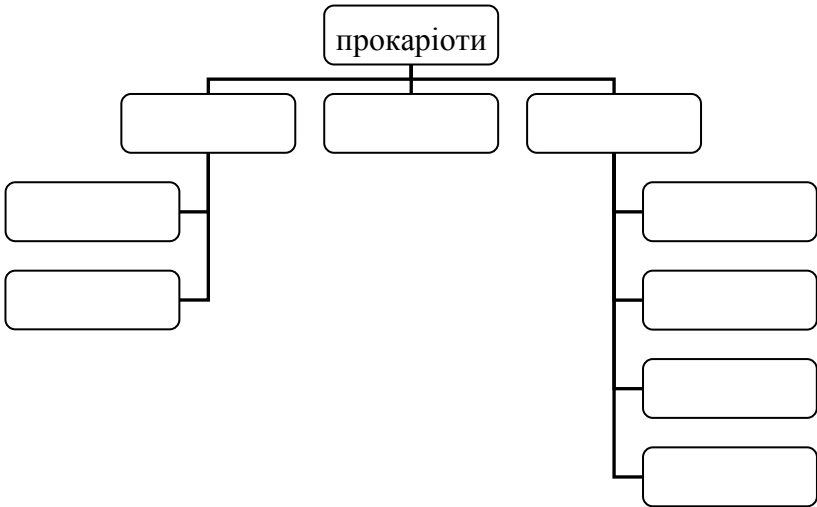
2. Охарактеризуйте прокаріоти щодо рН середовища:



3. Диференціюйте методи стерилізації:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Термічна стерилізація | Фільтрування
Кип'ятіння
УФ-опромінювання
Автоклавування
Антибіотики |
| 2. Холодна стерилізація | Пастерізація
Антисептики
Обжарювання у полум'ї
Дезінфікуючі речовини
γ-опромінення |

4. Як поділяють прокаріот щодо температури у середовищі існування:



Лабораторна робота №5

ВИВЧЕННЯ МІКРОФЛОРИ ДОВКІЛЛЯ ТА ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ

Мета заняття: *познайомитися* з методами дослідження мікрофлори довкілля; *виділити* мікроорганізми з ґрунту, повітря, води й окремих біотопів організму людини; описати їх культуральні й морфологічні властивості.

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, азотфіксуючих 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 гангрени – 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, кластридії, 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, кластридії, 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. **Пилувим** 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.

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.

Мікробіотиопи 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 (нагнивання, 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 евстахієву 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*, *Escherihia 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;

- *пристінкову;*
- *просвітну.*

Слизиста суцільним газом 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, невластивих 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. Найчастіше 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, кишечнику, 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 мікробіосимбіоти 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: еубіотиками (пробіотиками) – живими/ліофілізованими мікроорганізмами, що притаманні для конкретного виду, пребіотиками – речовина немікробного походження, що стимулюють розвиток індигенної мікрофлори, синбіотиками – комплексом з про- та пребіотиків.

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

Техніка визначення загальної кількості мікроорганізмів у ґрунті та воді

Загальну кількість мікроорганізмів у ґрунті визначають

шляхом глибинного посіву розведеного зразку ґрунту (1 мл) у чашку Петрі. 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, виросло з середньому 60 колоній. Отже $60 \times 10000 = 600000$ бактерій міститься з 1 г ґрунту.

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

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.

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 виросло 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:

$$78,5 \text{ см}^2 - 25 \text{ клітин}$$

$$x = 25 \times 100 / 78,5 = 32 \text{ клітин}$$

$$100 \text{ см}^2 - x \text{ клітин}$$

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:

10 л – 32 клітини

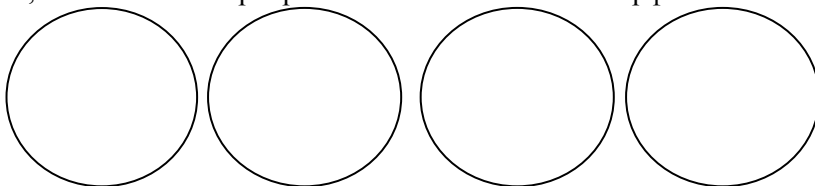
$$x = 32 \times 1000 / 10 = 3200 \text{ клітин}$$

1000 л – x клітин

Для більш точного визначення кількості мікроорганізмів атмосфери сконструйовано спеціальні апарати, в яких повітря продувається й фільтрується через стерильні поживні середовища.

Для проведення дослідження окремих мікробоценозів людського організму 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.

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



ВИСНОВКИ: _____

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ МІКРООРГАНІЗМІВ

Веgetативні клітини і морфологічно змінені форми прокариот потребують постійного притоку енергії, необхідної не лише для створення високої організації клітини, а й для її підтримання.

Енергію будь-який організм отримує у процесі обміну речовин, або метаболізму, при якому відбувається регульований розпад одних речовин і утворення інших.

Обмін речовин включає три складові:

1. Розщеплення полімерних поживних речовин на невеликі фрагменти – розпад, або катаболізм. Енергетичний метаболізм – це потік реакцій, що супроводжуються мобілізацією енергії та перетворенням її в електрохімічну або хімічну (АТФ) форму, яка потім може використовуватися у всіх енергозалежних процесах.

2. Перетворення фрагментів у ряд органічних кислот і фосфорних ефірів – проміжний обмін, або амфіболізм.

3. Біосинтез „будівельних блоків” і полімерів – синтез, або анаболізм. Конструктивний метаболізм – потік реакцій, у результаті яких за рахунок речовин, що надходять ззовні, будується речовина клітин; це процес, пов’язаний зі споживанням вільної енергії (АТФ або інших багатих енергією сполук).

Анаболізм і катаболізм протікають у клітині одночасно і тісно пов’язані між собою. Зв’язок забезпечується кількома каналами:

- через постачання енергії для реакцій біосинтезу та інших енергозалежних функцій;

- надходженням ззовні відновника;

- використанням загальних проміжних продуктів

Основні метаболічні шляхи – ідентичні для всіх живих істот і підтверджують принцип „біохімічної єдності”. Існує лише кілька груп бактерій, в яких основні схеми метаболізму модифіковані, тобто переважають певні шляхи, решта – вкорочені або змінені.

Енергетичний обмін за масштабністю перевищує біосинтетичні процеси. Серед усіх джерел енергії доступні для мікроорганізмів електромагнітна та хімічна. Запасання енергії відбувається в макроергічних сполуках, серед яких:

- сполуки з високоенергетичним фосфатним зв’язком: ацилфосфати, фосфорні ефіри енолів (фосфоенолпіруват), нуклеотидди- і трифосфати, аденозинфосфосульфат;

- сполуки з високоенергетичним тіоефірним зв’язком — ацилтіоефіри.

Центральне місце серед них належить АТФ, що утворюється в реакціях субстратного та мембранозалежного фосфорилування та характеризується наступними критеріями:

- Термодинамічно молекула АТФ нестабільна.
- Хімічно молекула АТФ високостабільна.
- Малі розміри молекули АТФ дозволяють їй легко дифундувати в різні ділянки клітини.

- АТФ на шкалі сполук займає проміжне положення, що дає їй можливість виконувати енергетичні функції: переносити енергію від високоенергетичних до низькоенергетичних сполук.

- Бере участь у реакціях, що протікають у цитоплазмі (у водному середовищі) – більшість біосинтетичних реакцій, підтримання процесів життєдіяльності, осмотична робота, рух клітини, ряд мембранозалежних процесів.

Відкриття другої універсальної форми енергії (у формі трансмембранного електрохімічного градієнта іонів водню) належить Пітеру Мітчелю. Використання цієї форми пов'язане з:

- Синтезом АТФ;
- Синтезом пірофосфату, що каталізується пов'язаним з мембраною ферментним комплексом;
- Зворотним перенесенням електронів, що приводить до відновлення НАД(Ф)⁺;
- Поглинанням ДНК у процесі генетичної трансформації;
- Перенесенням білків через мембрану;
- Рухом багатьох прокариот;
- Активним транспортом молекул і іонів через ЦПМ.

2. Перетворення глюкози у СЗ-сполуки відбувається кількома шляхами:

I) Фруктозобісфосфатним або гліколітичним шляхом або шляхом Емдена-Мейергофа-Парнаса, результатом якого є утворення 2-х молекул пірувату, 2-х молекул АТФ та 2-х молекул НАДН.

II) Пентозофосфатним або гексомонофосфатним, або шляхом Варбурга-Діккенса-Хорекера, результатом якого є утворення рибулозо-5-фосфату, CO₂, 2-х молекул НАДФН.

Вважають, що спочатку цей шлях виник для забезпечення еубактерій пентозами. Подальший його розвиток пов'язаний з енергетичними потребами клітини. Менша частина рибозо-5-фосфату використовувалися як джерело пентоз, а решта, що містила ще значні запаси енергії, піддається подальшим перетворенням:

- За допомогою фосфопентозоепімерази з утворенням ксилулозо-5-фосфату.

- За допомогою пентозофосфокетолази ксилулозо-5-фосфат розщеплюється на 3-фосфогліцеральдегід й ацетилфосфат.

Таке використання пентоз як джерел енергії характерне для гетеро ферментативних молочнокислих бактерій родів *Lactobacillus* і *Leuconostos*. Але й на цьому еволюційний розвиток шляху не зупинився. Сформувалася послідовність реакцій, що замикає його в цикл. При цьому відбувається повна деградація цукрів. За допомогою транскетолаз і трансальдолаз здійснюється перенесення C2 і C3-фрагментів між пентозо-5-фосфатами з утворенням C7, C4, C6, C3-цукрів.

III) Кетодезоксифосфоглюконатним, або шляхом Ентнера-Дудорова (характерний лише для бактерій).

Підсумок шляху – 2 молекули пірувату, по одній молекулі АТФ, НАДН, НАДФН. Вважають, що він сформувався пізніше гліколізу і пентозофосфатного шляху і зумовлений високою потребою клітин у піруваті, до утворення якого призводять не 10 реакцій, а 4. Має важливе значення, коли субстратами слугують глюконова, мананова, гексуронові кислоти та їх похідні.

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 – CO₂ і H₂;

- 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 бродіння (піримідини, пурини).;

- будь-який вид бродіння можна розглядати як двостадійний процес: **перша стадія** – перетворення глюкози до пірвиноградної кислоти одним із трьох відомих шляхів – Ембдена–Меєргофа–Парнаса, Ентнера–Дудорова чи пентозофосфатним, **друга стадія** – використання атомів водню для відновлення пірувату 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*.

Пропіоновокисле бродіння (здійснюється *Propionibacterium*) – перетворення глюкози на пропіонову кислоту, оцтову кислоту, CO₂ і H₂O. Бродіння важливе для дозрівання сирів – зумовлює їх смак і утворення «вічок». Пропіоновокислі бактерії мешкають у рубці та кишечнику жуйних тварин, у товстому кишечнику людини.

Маслянокисле бродіння (здійснюється *Clostridium*) – приводить до утворення масляної кислоти, CO₂, H₂O і проміжних

продуктів – бутилового спирту, ацетону, етанолу, оцтової кислоти. Відкрите Л. Пастером у 1861 році. Використовується в кондитерській і парфумерній промисловості (ефіри як ароматичні речовини). Бактерії роду *Clostridium* завдають значної шкоди, зумовлюючи гниття овочів та псування продуктів.

Утворені у процесі розпаду мономеру сполуки містять ще значну кількість енергії. Повне ступінчасте вилучення енергії відбувається у процесі дихання. Щоб максимально використовувати енергетичні можливості, закладені у процесі перенесення електронів від субстрату на молекулярний кисень, необхідно було:

- сформувані механізми, що дозволяють повністю відщеплювати водень (електрони) від субстрату;
- створити системи, в яких весь відщеплений водень передаватиметься на O₂ найраціональнішим шляхом,
- утворити механізми, за допомогою яких енергія переносу електронів трансформуватиметься в хімічну енергію, доступну для використання в усіх енергозалежних процесах клітини.

Еволюційне розв'язання цих задач наступне:

1. Повне відщеплювання водню від органічного субстрату досягається в результаті функціонування ЦТК або окислювального пентозофосфатного циклу. Якщо енергетичний субстрат – неорганічні сполуки, для їх окислення були сформовані ферментативні реакції, що каталізуються відповідними дегідрогеназами.

2. Перенесення водню на молекулярний кисень здійснюється за допомогою системи структурно і функціонально взаємозв'язаних переносників, що складають "дихальний ланцюг".

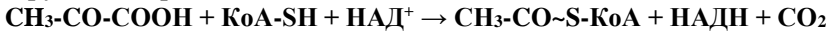
3. Енергетичні можливості перенесення електронів по електрохімічному градієнту реалізуються в результаті функціонування механізмів, що сполучають електронний транспорт з фосфорилуванням.

ЦТК можна розглядати як механізм, що має двояке значення:

- забезпечує повне окислення органічного субстрату і відщеплення водню;
- постачає клітини попередниками для біосинтетичних процесів.

Початковим субстратом ЦТК слугує ацетил-КоА, що

утворюється в аеробів із пірувату в реакції, яка каталізується піруватдегідрогеназним комплексом:



Енергетичним "паливом", що переробляється у ЦТК, слугують не тільки вуглеводи, але і жирні кислоти (після попередньої деградації до ацетил-КоА), а також багато амінокислот (після видалення аміногрупи в реакціях дезамінування або переамінування). В результаті одного обороту циклу відбуваються 2 декарбоксилювання (виведення з циклу 2 атомів вуглецю (2 молекули CO_2), тобто рівно стільки, скільки його поступило у вигляді ацетилової групи), 4 дегідрування (утворюються 3 молекули НАД-Н₂ і 1 молекула ФАД-Н₂) і 1 фосфорилування.

Дефіцит оксалоацетату, внаслідок його використання для процесів біосинтезу, компенсується як у реакціях карбоксилювання пірувату або фосфоенолпірувату, так і за допомогою послідовності з двох реакцій, що отримали назву гліюксилатного шунта.

Групи первинно анаеробних хемогетеротрофів не мають розвиненої системи мембранного електронного транспорту. Повністю сформованою системою дихального електронного транспорту володіють фотосинтезуючі еубактерії: ціанобактерії, багато пурпурних бактерій (найбільшою мірою дихання розвинено в несірчаних пурпурних бактерій). Усі облігатно і факультативно аеробні хемотрофи мають дихальні ланцюги.

У різних груп еубактерій вони значно розрізняються, що виражається в заміні одних переносників іншими зі схожими властивостями (убіхінон — менахінон); додаванні або видаленні якого-небудь переносника (наприклад, цитохрому с); розгалуженні на рівні первинних дегідрогеназ, включенні відновних еквівалентів із субстратів, що окисляються, в ланцюг і галуженні, пов'язаному з присутністю 2 або більше цитохромоксидаз.

Електрони з відновлених переносників (НАДН, НАДФН, ФАДН), що утворюються при функціонуванні ЦТК або окислювального пентозофосфатного циклу, поступають у дихальний ланцюг, де проходять через ряд етапів, опускаючись поступово на все нижчі енергетичні рівні й акцептуються кінцевим акцептором електронів. Перенесення електронів приводить до

значної зміни вільної енергії в системі.

У еубактерій дихальні ланцюги вражають різноманітністю своєї конкретної організації при збереженні принципової схожості в будові та функціонуванні. Компоненти дихального ланцюга занурені в ліпідний шар – це ферменти, коферменти, простетичні групи, гідрогенази і транспортні системи, що беруть участь у переносі електронів і водню. Найважливіші компоненти такі:

Флавопротеїни – ферменти, що містять як простетичну групу ФМН чи ФАД. Переносять водень. Активна група – ізоалоксазинова система, яка діє як зворотна окисно-відновна система. Реагуючими центрами слугують 2 атоми азоту, кожен з яких може зв'язуватися з одним H^+ .

Залізосірчані білки – окисно-відновні системи, що переносять електрони. Вони містять атоми заліза, пов'язані з одного боку з сіркою амінокислоти цистеїну, а з іншого – з неорганічною сіркою. Остання дуже легко відщеплюється у вигляді сірководню при підкисленні. Fe-S центри здатні переносити лише 1 електрон. 80% наявного у цитоплазматичній мембрані заліза заходиться в Fe-S-білках і лише 20% - у цитохромах.

Хінони – у Gr^- - убіхінон, у Gr^+ - нафтохінони. Ліпофільні, локалізовані у бішарі. Можуть переносити водень чи електрони.

Цитохроми – окисно-відновні системи, які переносять лише електрони. До цитохромів електрони поступають від пулу хінонів. Під часу переносу електронів еквівалентна їм кількість протонів переходить у розчин. Простетичною групою слугує гем. Цитохроми беруть участь у переносі електронів на кисень.

Цитохромоксидаза – термінальна оксидаза, що реагує з киснем і передає йому 4 електрони: $O_2 + 4Fe^{2+} = 2O_2^- + 4Fe^{3+}$

Дуже довго вважали, що цитохроми наявні лише в аеробних чи фототрофних бактерій, проте відкриті цитохроми у *Desulfovibrio*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*.

Синтез АТФ із АДФ і Фн каталізується АТФ-синтазою, що приєднує фосфат до АДФ із відщепленням молекули води.

У аеробних умов окремі бактерії здійснюють біоломінісценцію. Це хемоорганотрофи, що за своїми морфолого-фізіологічними властивостями схожі з *Enterobacteriaceae*, тому їх називають морськими ентеробактеріями. Виділяють із морської та солоної води. На м'ясі та рибі вони утворюють природні

накопичувальні культури, не викликають гниття та не утворюють токсинів.

Гр-, мають 1-8 джгутиків, факультативні анаероби, галофіли. Відносять до родів *Photobacterium*, *Beneckea*. В анаеробних умовах більшість здійснює мурашинокисле бродіння чи бродіння змішаного типу. Виділяють мурашину, оцтову, молочну, бурштинову кислоти, спирт, CO₂, ацетоїн.

Ріст і біolumінесценція сильно залежать від складу середовища. Світіння відбувається лише у присутності кисню та розглядається як процес аеробного окислення, що призводить не до утворення АТФ, а збудження проміжного продукту і випускання світла:

Люциферин → світло (O₂, люцифераза).

Беруть участь кілька компонентів: відновлений ФМН, O₂, альдегід із довгим вуглецевим ланцюгом – тетрадеканаль.

Фермент люцифераза – монооксигеназа:

$\text{ФМНН}_2 + \text{O}_2 + \text{R-CHO} \rightarrow \text{ФМН} + \text{H}_2\text{O} + \text{R-COOH} + \text{світло}$.

Світіння головоногих молюсків (каракатиць) і глибоководних риб зумовлене симбіотичними бактеріями, що містяться у спеціальних органах.

Для аеробних організмів кисень необхідний. Проте ще в часи Пастера виявлено, що він токсичний для анаеробів – маслянокислих бактерій. Для аеробів він також може бути токсичним. Тому у більшості організмів є ферменти, здатні захищати клітину від активних форм кисню: каталаза, глутатіонпероксидаза, супероксиддисмутаза.

Багато бактерій навіть в анаеробних умовах, використовують окислююче (електрон-транспортне) фосфорилування. При цьому відбувається перенесення електронів, отриманих при розщепленні субстрату, по вкороченому електронтранспортному ланцюгу на екзогенні (внесені у поживне середовище) чи ендогенні (утворені при розпаді субстрату) акцептори. Акцепторами електронів можуть бути іони нітриту, сульфату, карбонату, фумарату, сірка. Відповідні види бактерій об'єднуються у фізіологічні групи нітратвідновлюючих, денітрифікуючих, сульфатредуючих, метаногенних, ацетогенних бактерій. Усі зазначені бактерії відіграють важливу роль у природному балансі речовин. Електрон-транспортне фосфорилування з фумаратом як акцептором

зустрічається не лише в бактерій, а й у черв'яків і навіть ссавців. Реакцію, що каталізується фумаратредуктазою, можна виявити по нагромадженню чи виділенню сукцинату. Цей процес отримав назву анаеробного дихання. Енергія та склад переносників, що звільняються, визначаються окислювально-відновними потенціалами акцепторів електронів. Анаеробні дихальні ланцюги містять ті ж типи переносників, що й аероби, але цитохромоксидази замінені відповідними редуктазами. Еубактерії, що здійснюють анаеробне дихання, належать до факультативних або облігатних анаеробів.

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 CO₂ 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).

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 листках 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 10⁵ 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), полігалактураназу (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 32-38⁰С 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).

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 (амофікацію), 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 багатозафазовий 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:

Гумусові речовини + O_2 → CO_2 + H_2O + NH_3 .

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

$\text{CO}_2(\text{NH})_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

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:

$\text{NH}_4^+ + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$

- *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 осцидазу. 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 осцидазу 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:

1. **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.

2. **Непряма денітрифікація.** Молекулярний азот виділяється в результаті реакцій між азотистою кислотою й амініними (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 – опущення 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 джгутіками. 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.

Наприкінці XIX ст. С. М. Виноградським відкриті бактерії, що здатні окислювати неорганічні сполуки. До них відносять – тіонові бактерії, нитчасті сіркобактерії, залізобактерії, нітрифікуючі бактерії, водневі бактерії, карбоксидобактерії.

Дихальні ланцюги хемолітотрофів містять ті ж типи переносників, що і хемоорганотрофів. Різноманітність спостерігається тільки на периферійних ділянках енергетичного метаболізму, оскільки для окислення неорганічних сполук, пов'язаного з отриманням енергії, необхідні відповідні ферментні системи.

Неорганічні сполуки, що використовуються як донори електронів, розрізняються окислювально-відновними потенціалами. Це визначає місце включення в дихальний ланцюг електронів субстрату, що окисляється. При окисленні H_2 водневими бактеріями електрони з субстрата включаються в дихальний ланцюг на рівні НАД⁺, при окисленні Fe^{2+} залізобактеріями – на рівні цитохрому *c*, а при окисленні NO_2^- нітрифікаторами – на рівні цитохрому *a*. У зв'язку з цим виникає ряд особливостей:

- в електронтранспортному ланцюзі функціонує тільки один генератор H^+ , тому для забезпечення енергією організму необхідно "переробити" велику кількість енергетичного субстрата;

- у процесі не утворюється відновник НАДН, необхідний для біосинтетичних процесів, тому функціонує зворотний транспорт електронів, що потребує затрат енергії. Частина молекул АТФ, що утворюються за рахунок окислювального фосфорилування на кінцевому етапі дихального ланцюга, витрачається для утворення відновника;

- високий вміст цитохромів *c* і *a*.

Інші групу автотрофних бактерій складають фототрофи. Їх поява пов'язана з утворенням молекул-пігментів, що поглинають кванти світла – бактеріохлорофілів, каротиноїдів, фікобіліпротейнів, бактеріохлорофілів; хлорофілів.

Прокаріоти здійснюють три типи фотосинтезу:

I – залежний від бактеріохлорофілу безкисневий фотосинтез (зелені, пурпурні бактерії і геліобактерії);

II – залежний від хлорофілу кисневий фотосинтез, властивий ціанобактеріям і прохлорофітам;

III – залежний від бактеріородопсину безкисневий фотосинтез, виявлений у екстремально галофільних архей.

Фотосинтетичний апарат прокаріот різноманітний, проте складається з трьох основних компонентів:

1) світлозбираючих пігментів, що поглинають енергію світла і передають її в реакційні центри – хлорофіли, бактеріохлорофіли, фікобіліпротеїни, каротиноїди. Локалізовані: у пурпурних бактерій, геліобактерій і прохлорофіт у комплексі з білками інтегровані в мембрани, у зелених бактерій в хлоросомах, у ціанобактерій – фікобілісомах;

2) фотохімічних реакційних центрів (молекули бактеріохлорофілів чи хлорофілів), де відбувається трансформація електромагнітної форми енергії в хімічну;

3) внутрішньоцитоплазматичних електронтранспортних систем, що забезпечують перенесення електронів, пов'язане із запасанням енергії в молекулах АТФ. Два останні компоненти локалізовані у ЦПМ чи її внутрішньоклітинних похідних.

Під час фотохімічних реакцій відбувається циклічний та нециклічний транспорт електронів. У пурпурних бактерій є лише циклічний транспорт електронів, пов'язаний з функціонуванням однієї фотосистеми. У зелених сіркобактерій і геліобактерій обидва шляхи електронного транспорту теж пов'язані з функціонуванням однієї фотосистеми, а у ціанобактерій і прохлорофіт циклічне перенесення електронів залежить від активності фотосистеми I, а для нециклічного потоку електронів необхідне функціонування обох фотосистем.

Потік електронів по ланцюгу переносників на певних етапах пов'язаний з направленим переміщенням протонів через мембрану, що приводить до створення протонного градієнта, який використовується для синтезу АТФ.

При циклічному електронному транспорті відновник як кінцевий продукт фотоіндукованого процесу не утворюється, оскільки електрон, що покинув молекулу хлорофілу, зрештою знов повертається до неї. Утворення відновника можливо тільки на шляхах нециклічного перенесення електронів.

Як екзогенні донори електронів використовуються органічні і неорганічні сполуки - H_2S , сульфід, молекулярна сірка, тіосульфат, тетратіонат, тіогліколят, молекулярний водень та вода.

Темнова фаза фотосинтезу пов'язана з синтетичними процесами:

- для зелених сіркобактерій характерний циклічний механізм фіксації CO_2 , в основі якого лежать реакції відновного

карбоксилювання органічних кислот. Він отримав назву відновного ЦТК, або циклу Арнона;

- у всіх вищих фотосинтезуючих організмів, починаючи вже з пурпурних бактерій, ціанобактерій і прохлорофіт основним шляхом фіксації CO_2 є відновний пентозофосфатний цикл, або цикл Кальвіна. В цьому циклі вперше акцептором CO_2 виступає активована молекула пентози та функціонують два унікальних ферменти:

- фосфорибулокіназа – активує молекулу акцептора шляхом вторинного фосфорилування;

- рибулозодифосфаткарбоксилаза – каталізує реакцію акцептації рибулозо-1,5-дифосфатом молекули CO_2 і подальше гідролітичне розщеплення гексози на 2 молекули фосфогліцерату, одна з яких в карбоксильній групі містить вуглець з CO_2 .

Молекули фосфогліцерату піддаються серії послідовних ферментативних перетворень, що ведуть до утворення молекули глюкози. Для синтезу 1 молекули глюкози з CO_2 необхідні 6 оборотів циклу.

Види, що відносяться до роду *Halobacterium* являють собою високоспеціалізовану у фізіологічному відношенні групу архей, що існують у висококонцентрованих чи насичених розчинами солі місцях. Клітини забарвлені у жовтий, оранжевий, червоний колір.

Плазмалема галобактерій характеризується наявністю темно-червоних плям діаметром 0,5 мкм, що займають близько половини поверхні клітини (так звана «пурпурна мембрана»). Колір її обумовлений бактеріородопсином. Завдяки йому на світлі створюється протонний градієнт між зовнішньою та внутрішньою сторона мембрани. Пурпурна мембрана виконує функцію протонного насоса. Урівноваження зарядів може супроводжуватися синтезом АТФ.

Лабораторна робота №6

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

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

тетрациклінів, макролідів.

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, кишечного 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;

7. за розповсюдженням – спорадична, епідемія, пандемія.

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 мікробносійство, іноді хвороба закінчується летально (негайна дезінфекція).

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).

2. 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 – гемолізину, 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.

3. 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; фтївазид – аналог ізоніотинової кислоти; нітрофурані – азотистих основ нуклеїнових кислот).

Ще в позаминулому 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, фенікси-метилпеніцилін; 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).

- цефалоспорины – 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-метил-глюкозамін.

- 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 (комплексоутворення 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, фосфорилування 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.

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

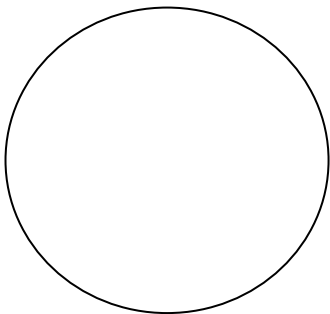
Техніка виконання лабораторної роботи:

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;
- 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:



ВИСНОВКИ: _____

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

Навчальне видання
Мікробіологія
Л.М.Васіна

Відповідальний за випуск
Літературний редактор Крамар В.В.
Технічний редактор.....

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК №891 від 08.04.2002 р.

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

МІКРОБІОЛОГІЯ

