

МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ

ПРАКТИКУМ

для підготовки й проведення лабораторних робіт

Бачинська Я. О., Ликова І. О.



Харків – 2019

**Міністерство освіти і науки України
Харківський національний педагогічний університет
імені Г. С. Сковороди**

Бачинська Я. О., Ликова І. О.

МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ

ПРАКТИКУМ

для підготовки й проведення лабораторних робіт та самостійної роботи
студентів спеціальностей: 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини);
091 Біологія

Харків – 2019

УДК 576.8 (075.5)

Укладачі: Бачинська Я. О., Ликова І. О.

Рецензенти:

Леонтєв Д.В. – доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри ботаніки ХНПУ імені Г.С. Сковороди.

Комісова Т.Є. – кандидат біологічних наук, професор кафедри анатомії та фізіології імені Я.Р. Синельнікова ХНПУ імені Г.С. Сковороди.

Мікробіологія з основами вірусології: Практикум для підготовки й проведення лабораторного робіт та самостійної роботи студентів спеціальностей: 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини); 091 Біологія / ХНПУ ім. Г.С. Сковороди; [кафедра зоології; Розробники: Бачинська Я. О., Ликова І. О.]. – Х. : ХНПУ, 2019. – 110 с.

Практикум складений відповідно до програми дисципліни «Мікробіологія з основами вірусології». Мета видання - доповнити лекційний матеріал і направити студентів на придбання практичних навичок в роботі з мікроскопом і технікою мікроскопіювання, в підготовці різних типів препаратів, а також засвоєння методик проведення кількісного і якісного обліку мікроорганізмів в об'єктах навколишнього середовища, продуктах харчування та збудників хвороб рослин, тварин та людей.

Затверджено редакційно-видавничою радою Харківського національного педагогічного університету імені Г.С. Сковороди
протокол № 4 від 10.05.2019 р.

Видано за рахунок укладачів

©Харківський національний педагогічний
університет імені Г.С. Сковороди

©Бачинська Я.О., Ликова І.О.

ЗМІСТ

| | |
|--|------------|
| Вступ | 4 |
| Лабораторна робота № 1. Організація роботи в мікробіологічній лабораторії. Методи стерилізації та дезінфекції..... | 5 |
| Лабораторна робота № 2. Будова мікроскопа і техніка мікроскопування. Методи виготовлення мікроскопічних препаратів | 10 |
| Лабораторна робота № 3. Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини. Форми бактерій | 14 |
| Лабораторна робота № 4. Грампозитивні та грамнегативні бактерії. Метод фарбування за грамом | 19 |
| Лабораторна робота № 5. Капсули та ендоспори бактерій. Включення клітин мікроорганізмів | 23 |
| Лабораторна робота № 6. Рух бактерій | 28 |
| Лабораторна робота № 7. Будова мікроскопічних грибів. Оцінка якості пресованих і сушених хлібопекарських дріжджів | 31 |
| Лабораторна робота № 8. Мікроскопічне дослідження актиноміцетів | 41 |
| Лабораторна робота № 9. Виготовлення поживних середовищ. Методи виділення і культивування мікроорганізмів | 43 |
| Лабораторна робота № 10. Взяття змивів з обладнання. Санітарно-бактеріологічний аналіз проб повітря, води, змивів з рук | 50 |
| Лабораторна робота № 11. Основні типи бродіння. Спиртове і молочнокисле бродіння | 58 |
| Лабораторна робота № 12. Основні типи бродіння. Маслянокисле і оцтовокисле бродіння | 65 |
| Лабораторна робота № 13. Перетворення азоту мікроорганізмами | 71 |
| Лабораторна робота № 14. Перетворення мікроорганізмами сполук вуглецю..... | 78 |
| Лабораторна робота № 15-16. Інфекційні захворювання та їх профілактика..... | 82 |
| Ситуаційні задачі на тему: Патогенні мікроорганізми. Харчові захворювання та шляхи їх знешкодження | 88 |
| Лабораторна робота № 17. Визначення бактеріального обсіменіння харчових продуктів методом мазка-відбитка | 90 |
| Лабораторна робота № 18. Мікробіологічний аналіз молока і кисломолочних продуктів..... | 96 |
| Контрольні завдання для підсумкового заняття | 100 |
| Література | 102 |
| Додатки | 103 |

ВСТУП

Лабораторний практикум з дисципліни «Мікробіологія з основами вірусології» складено згідно навчальної програми та планам, для студентів, які навчаються за спеціальностями 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини); 091 Біологія. Передбачає лекції та лабораторні заняття, самостійне вивчення окремих тем і, як підсумок, здачу іспиту.

Практикум доповнює лекційний матеріал та направлений на придбання студентами практичних навичок в роботі з мікроскопом і технікою мікроскопіювання, в підготовці різних типів препаратів, а також засвоєння методик проведення кількісного і якісного обліку мікроорганізмів в об'єктах навколишнього середовища, продуктах харчування та збудників хвороб рослин, тварин та людей.

Обов'язки студентів в лабораторії

1. Перед початком роботи черговий групи приймає від викладача навчальний матеріал і роздає його студентам.

2. Під час роботи необхідно:

- дбайливо поводитися з мікроскопом і іншим лабораторним обладнанням;
- під час виконання роботи вести записи й робити малюнки в індивідуальному лабораторному зошиті;
- на пробірках і чашках з посівами позначити номер академічної групи, номер робочого місця і дату;

3. Після закінчення роботи слід:

- відпрацьовані препарати з живих культур, піпетки, шпателі опустити в посудину з дезінфікуючим розчином, а петлі з залишками культури знешкодити прожарюванням в полум'ї пальника;
- привести робоче місце і мікроскоп в початковий стан, вимити руки;
- всі засіяні пробірки і чашки здати черговому для приміщення в термостат.

4. У лабораторії забороняється:

- перебувати в головних уборах і верхньому одязі;
- працювати без халатів;
- приймати їжу, класти на столи сумки;
- переглядати демонстраційні препарати без викладача.

На робочому місці студента повинно бути все необхідне для виконання лабораторних занять з мікробіології:

1. Біологічний мікроскоп.
2. Штатив з пробірками.
3. Набір барвників в крапельницях (фуксин, метиленова синь, генціанвіолет, розчин Люголю, спирт, імерсійне масло, суміш етилового спирту і гліцерину).
4. Пробірка зі стерильною водою, промивалка.
5. Бактеріальні петлі, голки пінцети, шпателі, спиртівки.
6. Предметні і покривні скла, паперові фільтри, марлеві серветки, стерильні чашки Петрі і піпетки.
7. Ємності для відпрацьованих препаратів.

Лабораторна робота №1

ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ДЕЗІНФЕКЦІЇ

Мета: вивчити улаштування мікробіологічної лабораторії, ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії, з технікою безпеки при роботі з мікроорганізмами, а також ознайомитися з методами стерилізації і дезінфекції.

Мікробіологічний словник: автоклав, сухо-жарова шафа, термостат, бактеріальна петля, чашка Петрі, живильні середовища, стерилізація, тиндалізація, дезінфекція.

Завдання 1. Ознайомитися з улаштуванням і обладнанням мікробіологічної лабораторії.

Улаштування мікробіологічної лабораторії :

Сучасна мікробіологічна лабораторія це комплекс приміщень, обладнання і приладів, які забезпечують роботу з культурами мікроорганізмів. Мікробіологічна лабораторія повинна складатися як мінімум з чотирьох приміщень:

1. Кімната, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів.
2. Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – бокс.
3. Автоклавна – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та живильних середовищ.
4. Мийна кімната.

Всі приміщення повинні бути добре освітлені і вентилязовані, стіни на висоту до 170 см від підлоги пофарбовані масляною фарбою або викладені плиткою (для вологого прибирання із застосуванням дезінфікуючих розчинів). Лабораторне приміщення обладнане шафами, де зберігаються апаратура і реактиви, термостатом для вирощування мікроорганізмів і лабораторними столами, покритими термо- і хімічностійким матеріалом, лабораторними стільцями. На лабораторних столах до кожного робочого місця підведено електроенергію і газ (встановлені газові пальники Теклю).

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю повинен складатися з: автоклава (прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів), сухо-жарової шафи (прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду), термостата (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростата (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), ламінару (прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів), водяної бані, люміностантної камери для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, терезів, електричних шейкерів; мікробіологічних пробірок, колб, циліндрів різної форми й об'єму,

піпеток різного об'єму, чашок Петрі різного діаметра, скляних лійок, предметних скелець з лункою та без – всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла, оскільки підлягають нагріванню; бактеріальних петель, голок, шпатель металевих і скляних; ватно-марлевих та гумових пробок; засобів для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо). Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

Завдання 2. Ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії і з технікою безпеки при роботі з мікроорганізмами.

При виконанні робіт необхідно дотримуватися таких правил:

1. У лабораторію заборонено входити у верхньому одязі і класти на лабораторні столи сумки та інші особисті речі, які можуть заважати роботі.
2. У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.
3. Робоче місце має бути обладнане усім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок з культурами, бактеріологічною петлею тощо. За справність приладів несе відповідальність студент.
4. Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет), необхідно прожарювати на вогні.
5. У лабораторії заборонено споживати їжу, пити воду.
6. У випадку попадання досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл необхідно негайно повідомити про це викладача і під його контролем провести дезінфекцію.
7. Усі живі препарати після мікроскопування, а також піпетки і шпателі, якими користувалися, необхідно занурити у склянку з дезінфікуючою рідиною (2% -ний розчин хлораміну).
8. Після закінчення занять необхідно навести порядок на робочому місці.

Правила роботи з чистими культурами мікроорганізмів

Чисті культури – це популяція мікроорганізмів одного виду. Їх використовують для дослідження морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Під час роботи з чистою культурою важливо не допустити її забруднення іншими мікроорганізмами. Часто чисті культури мікроорганізмів вирощують на твердих середовищах у пробірках, які закриті ватними корками. Корки перешкоджають проникненню в них мікроорганізмів з повітря. Щоб не заразити чисті культури сторонніми мікроорганізмами, при виготовленні препаратів і пересівах необхідно дотримуватися певних правил роботи з ними (рис. 1):

1. Запалити спиртівку.
2. Пробірку з культурою взяти в ліву руку так, щоб було видно поверхню середовища з нальотом мікроорганізмів і наблизити до полум'я

спиртівки.

3. У праву руку взяти бактеріологічну петлю і прожарити її у верхній частині полум'я спиртівки. Металеву частину держака повільно пронести через вогонь два-три рази.

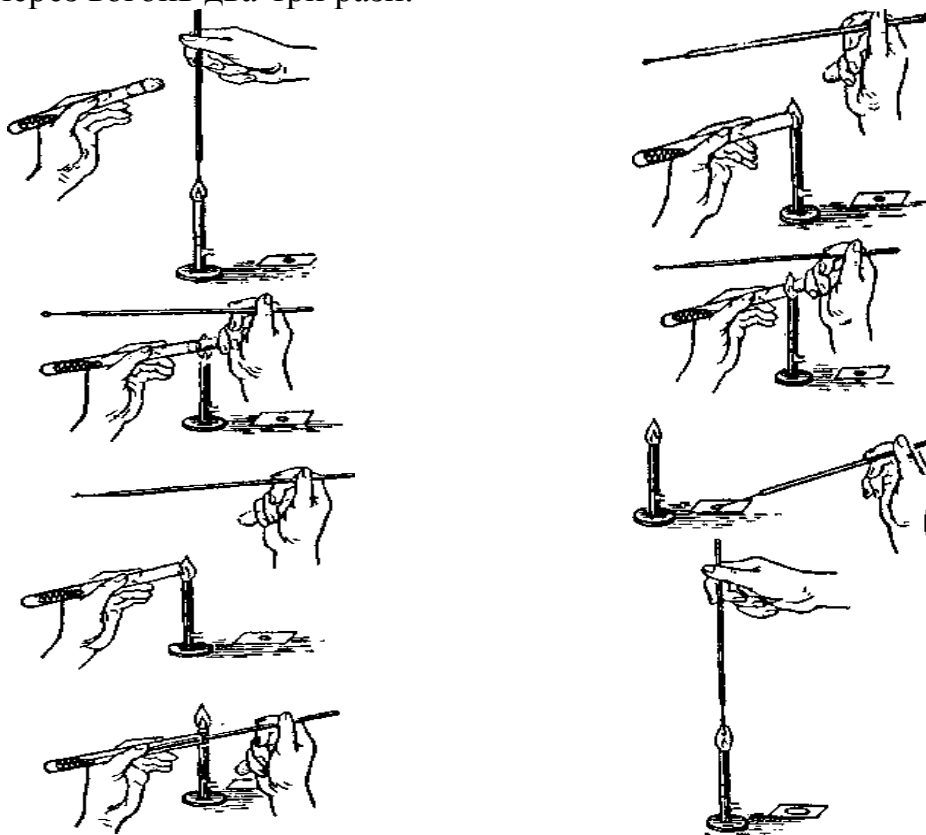


Рис. 1. Стерильний відбір мікроорганізмів бактеріологічною петлею

4. Не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцями правої руки притиснути ватний корок до долоні, витягнути його з пробірки і тримати так, не доторкаючись оточуючих предметів.

5. Край відкритої пробірки пронести через полум'я спиртівки.

6. Ввести в пробірку стерильну петлю, охолодити її, торкаючись внутрішніх стінок пробірки або поверхні агару, а потім взяти петлею невелику кількість мікробної маси.

7. Шийку пробірки і ватну пробку одночасно провести через верхню частину полум'я пальника і закрити пробірку пробкою.

8. Пробірку поставити в штатив, а відібрану петлею мікробну масу використати для виготовлення препарату або посіву.

9. Залишки мікроорганізмів на петлі спалити в полум'ї спиртівки.

Завдання 3. Ознайомитися з методами стерилізації і дезінфекції.

Стерилізація (від лат. *sterilis* – безплідний) – повне знищення усіх живих мікроорганізмів у різних матеріалах, середовищах, предметах. **Стерильність** – відсутність мікроорганізмів у середовищі, об'єкті, організмі.

Дезінфекція (від фр. *des* – від + лат. *infecere* – заражати, псувати) – знищення організмів, у т. ч. мікроорганізмів, здатних викликати хворобу

спеціальними засобами (хімічними, фізичними, біологічними).

Термічна стерилізація

1. Прожарювання вогнем (фламбування) застосовують для стерилізації петель, голок, пінцетів, ножиць, шпатель та ін. дрібного інструменту безпосередньо перед використанням.

2. Стерилізацію сухим жаром при температурі 165°-170°C протягом 1–2 годин здійснюють у сушильних шафах. Цей прийом використовують для стерилізації посуду: чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо.

3. Кип'ятіння у воді використовують для стерилізації шприців, голок, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду, фільтрів. При цьому гинуть переважно вегетативні клітини, спори бактерій зберігають життєздатність.

4. Пастеризація – одноразове короткочасне прогрівання матеріалу при температурах, що забезпечують знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Л. Пастер. Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості для оброблення продуктів, які втрачають смакові і поживні якості при кип'ятінні: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін. У мікробіологічній практиці пастеризацію часто застосовують для одержання нагромаджувальних і чистих культур спороутворюючих бактерій і для виявлення здатності бактерій утворювати спори. Пастеризацію зазвичай проводять при 60°– 75°C протягом 15–30 хвилин або при 80°C – 15 хвилин. Інколи нагрівають матеріал до 90°C й одразу ж охолоджують. Режим пастеризації визначається термостійкістю субстрату, можливістю інфікування його мікроорганізмами і метою роботи. У лабораторних умовах матеріал пастеризують в ультратермостаті або на водяній бані.

5. Тиндалізація – три-шестикратне нагрівання (дробна стерилізація) протягом 20-60-ти хвилин при 55-80°C з інтервалом у 24 години. У проміжках між нагріванням стерилізуючий матеріал витримують при 24 - 37 C для можливості проростання спор, які гинуть при черговій стерилізації. Цим методом стерилізують середовища, які містять кров, сироватку та ін. термолабільні компоненти.

6. Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) – найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації поживних середовищ і посуду. Він ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску, вищому від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні її тиску.

Наприклад, при тиску в 1,5 атм температура пари 112 °C, в 2 атм – 121 °C, в 3 атм – 134°C (1 атм дорівнює 1010 ГПа). Вважається, що при 121 °C вегетативні клітини гинуть за 10, а спори бактерій – за 15-25 хвилин.

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини і спори. Стерилізують парою під тиском у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах. Працювати з автоклавом слід обережно, додержуючись інструкції.

Хімічна стерилізація

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

Для стерилізації цим методом застосовують солі важких металів (найчастіше ртуті, міді, цинку), 50-70%-ний розчин етилового спирту, 8-оксихінолін, лізол, формалін (40%-ний розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, H_2O_2 , $KMnO_4$, β -пропіолактон, йод, йодоформ, озон, детергенти та інші хімічні сполуки. Дія цих речовин залежить від концентрації і температури, а також від виду, віку і фізіологічного стану мікроорганізму, його чутливості до агенту. Речовини, які знижують поверхневий натяг (мило та інші поверхнево-активні речовини), підвищують ефективність дезінфекції.

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

Стерилізація опроміненням

Стерилізуючого ефекту досягають за допомогою різних видів опромінення: інфрачервоного, ультрафіолетового, рентгенівськими променями, α -, β -, γ -променями радіоактивних елементів.

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

Стерилізація фільтруванням

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

У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують:

1. Мембранні (колоїдні) фільтри;
2. Азбестові фільтри;
3. Скляні фільтри

Контрольні питання:

1. Улаштування мікробіологічної лабораторії.
2. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії.
3. Правила роботи з чистими культурами.
4. Методи стерилізації і дезінфекції.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота №2

БУДОВА МІКРОСКОПА І ТЕХНІКА МІКРОСКОПУВАННЯ. МЕТОДИ ВИГОТОВЛЕННЯ МІКРОСКОПІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Мета: вивчити облаштування мікроскопа, опанувати методики приготування препаратів і прийоми мікроскопії при їх перегляді.

Мікробіологічний словник: відбиток, мазок, фіксування мазка, барвники, імерсійна система мікроскопа, люмінесцентна мікроскопія, фазово-контрастна мікроскопія, окуляр-мікрометр, об'єкт-мікрометр.

Завдання 1. Ознайомитися з будовою і правилами роботи з мікроскопом.

Мікроскоп – оптичний прилад, призначений для вивчення об'єктів, які невидимі для неозброєного ока. В мікробіологічній практиці мікроскоп використовують для вивчення форми та будови клітин мікроорганізмів, спостереження за їх ростом і розвитком. Як відомо, конструкція світлового мікроскопа складається з механічної частини (остов мікроскопа, предметний столик, тубусотримач, тубус, кронштейн для конденсора, револьвер об'єктивів, гвинт для переміщення конденсора, рукоятки мікро- та макрометричних гвинтів, клеми), оптичної частини (окуляр, об'єктиви, конденсор) і системи освітлення (дзеркало або освітлювач).

Окуляри мікроскопа складаються з двох лінз і відрізняються збільшенням (7х, 10х, 15х), яке обирають в залежності від об'єкта дослідження.

Об'єктиви – багатолінзові системи, в яких нижня лінза (фронтальна, та, що звернута до об'єкта) дає збільшення, а інші лінзи використовуються для корекції зображення. Найчастіше у мікробіологічній практиці використовують: 8х (10х) – мале збільшення, 40х (60х) – середнє збільшення і 90х (100х) – велике збільшення. Чим більше збільшення об'єктива, тим менше повинна бути відстань від об'єкта до фронтальної лінзи (наприклад, 13.8мм для 8х і 0.12мм для 90х). Об'єктиви, в яких між фронтальною лінзою й

об'єктом є повітря, називаються сухими, при роботі з ними частина світлових променів відхиляється та не попадає в око через різницю коефіцієнтів заломлення скла та повітря.

Для зменшення кількості відхилених променів (і водночас покращення зображення об'єкта) використовують імерсійні системи з об'єктивами, фронтальну лінзу яких можна занурювати в імерсійну рідину; такі об'єктиви мають чорну стрічку на металевій оправі. Імерсійні рідини (вода, гліцерин, кедрове, вазелінове або терпенове масло, монобромфталейн) мають коефіцієнти заломлення, наближені до показника заломлення скла (1.52).

Порядок роботи з мікроскопом (при використанні імерсійної системи)

Для отримання достовірної інформації про тонку будову клітини мікроорганізму необхідно правильно виставляти освітлення об'єкта.

1. Встановити освітлювач у штатив мікроскопа й увімкнути.
2. Підняти тубус мікроскопа та встановити об'єктив 8х.
3. Підняти конденсор уверх до упору та повністю відкрити діафрагму конденсора.
4. Послабити гвинт, який тримає патрон освітлювача та плавними рухами повернути патрон, дивлячись у окуляр, візуально встановити максимальне освітлення та гвинтом закріпити патрон у даному положенні.
5. На абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички нанести 1-2 краплі імерсійного масла.
6. За допомогою клем закріпити препарат на предметному столику мікроскопа.
7. Прикрити діафрагму конденсора та, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення рівномірно пофарбованої і тонкої ділянки мазка, предметне скло при цьому можна пересувати.
8. Не піднімаючи тубус, повернути револьвер і встановити об'єктив 90х, при цьому він повинен зануритися в імерсійне масло. Якщо цього не відбулося, опустити об'єктив у масло за допомогою макрометричного гвинта.
9. Повністю відкрити діафрагму конденсора та за допомогою мікрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення об'єкта.
10. Для вивчення іншого об'єкта необхідно підняти тубус мікроскопа, перевести револьвер з об'єктивами на пусте гніздо, або на мале збільшення і тільки після цього встановити інший препарат.
11. Після роботи ватую, змоченою етиловим спиртом, зняти залишки масла з імерсійного об'єктива.

Завдання 2. Ознайомитися з методами виготовлення мікробіологічних препаратів.

Для вивчення мікроорганізмів за допомогою світлового мікроскопу найчастіше використовують метод фіксованих забарвлених препаратів. Виготовлення мікробіологічного препарату даним методом включає ряд послідовних операцій:

1. **Виготовлення мазка.** На чисте знежирене предметне скло нанести невелику краплю дистильованої води, в неї за допомогою стерильної бактеріальної петлі внести невелику кількість маси мікроорганізмів і розподілити по поверхні скла. Мазок повинен бути тонким, діаметром близько 1 см. Якщо культура мікроорганізмів вирощувалася на рідкому живильному середовищі, за допомогою стерильної піпетки на чисте знежирене предметне скло наносять невелику краплю культуральної рідини, яка містить мікроорганізми. Краплю, яка містить мікроорганізми можна розподілити по склу за допомогою стерильної бактеріальної петлі, або розподілити за допомогою грані іншого предметного (покривного) скла.

2. **Висушування мазка.** Проводять без нагрівання, при кімнатній температурі до повного випаровування води з поверхні предметного скла.

3. **Фіксація мазка.** Проводиться з метою: а) вбити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними; б) прикріпити мазок до поверхні скла, щоб він не змився при подальших маніпуляціях; в) зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин. Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3-4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутріклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96%), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном, тощо.

4. **Забарвлення мазка.** Може бути простим (використовується один барвник) і диференціальним (використовується кілька барвників у певній послідовності). На охолоджений після фіксування мазок піпеткою наносять кілька крапель барвника (мазок повинен бути повністю вкритий шаром барвника), при цьому піпетка не повинна торкатися поверхні скла. Для кожного барвника існує свій час контакту з поверхнею зафіксованих клітин. У разі диференціального забарвлення барвники витримують на мазку вказаний у методиці час і змивають водою або певним розчином.

5. **Промивання препарату.** Проводять дистильованою водою до “чистої води”, тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом і струм води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

6. **Висушування препарату.** Промите скло ретельно витирають з нижнього боку клаптиками фільтрувального паперу, а з іншого боку – обережно промокають воду з залишками барвника та висушують на повітрі або над полум'ям пальника. У разі неякісного висушування скла погіршується якість зображення під мікроскопом.

Виготовлення препаратів живих мікроорганізмів:

Виготовлення препарату «роздавлена крапля»

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.
2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.
3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було пухирців повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою

фільтрувального паперу.

4. Розглянути препарат при збільшенні об'єктива 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

Препарат «роздавлена крапля» дозволяє встановити форму клітин досліджуваних мікроорганізмів, їх розміри, розташування і спосіб спороутворення, а також наявність або відсутність рухливості.

Виготовлення препарату «**висяча крапля**».

1. Краплину суспензії мікроорганізмів наносять на покривне скло і перевернувши його краплиною вниз, розміщують на спеціальне предметне скло з заглибленням у центрі.

2. Крапля повинна вільно висіти, не торкаючись країв та дна заглиблення (краї заглиблення попередньо змазують вазеліном).

3. Препарат «висяча крапля» використовують для виявлення рухливості, розмноження мікроорганізмів та проростання спор, відношення клітин до хімічних подразників.

Виготовлення препарату «**відбиток**»

1. З агаризованого середовища у чашці Петрі, на якому досліджувані мікроорганізми ростуть суцільним газоном чи у вигляді окремих колоній, вирізати скальпелем невеликий блок і перенести його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була повернута вгору.

2. Чисте покривне скло покласти на поверхню блока, злегка натиснути і відразу зняти, не зсуваючи на бік.

3. Помістити одержаний препарат (відбитком вниз) у краплю води на предметне скло.

4. Розглянути препарат під мікроскопом у сухій чи імерсійній системі.

Препарати зручні при вивченні природного розташування клітин в колоніях мікроорганізмів і, особливо, при дослідженні форми спор та спороносців.

Завдання 3. Із елективної культури *Bacillus subtilis* виготовити препарат «роздавлена крапля» і фіксований забарвлений мазок. Розглянути препарати під мікроскопом (мазок розглянути в імерсійній системі) і замалювати в робочий зошит.

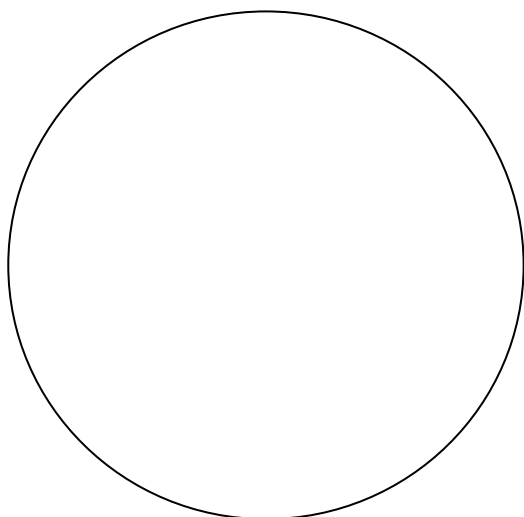


Рисунок 1. _____

Контрольні питання:

1. Типи мікроскопії.
2. Будова мікроскопу. Правила роботи з мікроскопом. Мікроскопування з імерсійною системою.
3. Методика забарвлених фіксованих мікробіологічних препаратів.
4. Методи виготовлення препаратів живих мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 3

МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ І СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. ФОРМИ БАКТЕРІЙ

Мета: ознайомитися з морфологією мікроорганізмів та структурою бактеріальної клітини, вивчити основні форми бактерій.

Мікробіологічний словник: нуклеоїд, муреїн, мезосоми, аеросоми, хлоросоми, карбоксисоми, коки, диплококи, тетракоки, сарцини, стафілококи, стрептококи, диплобактерії, стрептобактерії, вібріони, спірили, спірохети.

Завдання 1. Ознайомитися з морфологією мікроорганізмів та структурою бактеріальної клітини. Позначити на рисунку структурні компоненти бактеріальної клітини.

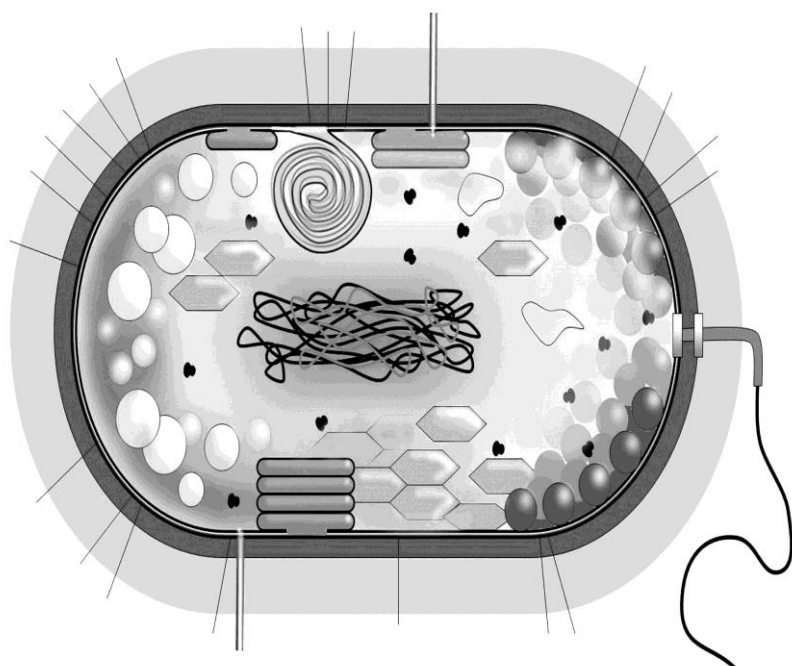


Рисунок 1. Морфологія бактеріальної клітини

Завдання 2. Ознайомитися з основними формами бактерій та замалювати їх в робочий зошит.

Бактерії – це різноманітна і дуже поширена в природі група мікроорганізмів. Розміри їхні коливаються в межах 0,5-10 мкм. Клітини більшості бактерій мають сферичну, циліндричну чи звивисту форму. Крім того, існують галузисті і нитчасті бактерії; бактерії, які утворюють простеки (вирости); бактерії у вигляді півкола, незамкненого кільця (тороїди), правильної шестикутної зірки, трикутної та прямокутної форми тощо.

Форма клітини прокаріотів визначається жорсткою (ригідною) клітинною стінкою. Але у деяких бактерій клітинна стінка еластична (спірохети, міксобактерії, флексибактерії) чи зовсім відсутня (мікоплазми і L-форми).

Бактерії сферичної форми – **коки** – мають форму правильної кулі. Величина коків коливається в межах 1,2–5 мкм. Переважно це нерухомі поодинокі коки, які не утворюють ендоспори (*Micrococcus lysodeikticus*, *M. radiodurans*). Коки здатні утворювати різні угруповання клітин:

диплококи – подвійні коки (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*)

тетракоки – поєднання чотирьох коків (*Tetracoccus casei*, *T. mycodermatis*, *Pediococcus acidilactici*)

стрептококи – ланцюжки з коків (*Streptococcus lactis*, *S. cremaris*, *S. mutans*);

стафілококи – скупчення коків у вигляді грон винограду (*Staphylococcus albus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*);

сарцини – пакети з 8-ми, 16-ти, 32-х і т.д. (*Sarcina ureae*, *S. ventriculi*).

Найбільш численною і різноманітною групою бактерій є паличкоподібні (циліндричні) форми, розміри яких – довжина і ширина – коливаються у різних видів. Паличкоподібні бактерії, які утворюють ендоспори, називають **бацилами** (*Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *Clostridium pasteurianum*, *C. tetani*). Нездатні до спороутворення палички називають **бактеріями** (*Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*, *Acetobacter aceti*). Бактерії і бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді **диплобактерій (диплобацил) і стрептобактерій (стрептобацил)**. У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин вкриті спільною оболонкою (піхвою) і утворюють трихом (*Thriotryx nivea*, *Beggiatoa alba*, *B. gigantea*).

Паличкоподібні бактерії деяких родів можуть злегка галузитися (*Artrobacter globiformis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Propioni bacterium freudenreichi*), а деяких – навіть утворювати слабозвинений міцелій, який з часом розпадається на паличкоподібні і сферичні фрагменти (**коринеформні бактерії**) (*Nocardia rugosa*, *Mycobacterium luteum*, *M. tuberculosis*), або розвинений розгалужений несептований міцелій (**актиноміцети**) (*Streptomyces griseus*, *S. aureofaciens*, *Actinomyces lividans*, *A. albus*). Частина міцелію актиноміцетів занурюється у субстрат, частина піднімається над субстратом, утворюючи спороносні гіфи, на яких розвиваються екзогенні

спори.

Звивисті бактерії, залежно від ступеня звивистості, поділяють на:

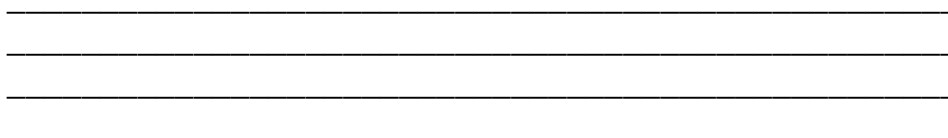
вібріони – вигнуті у вигляді коми палички (*Vibrio cholerae*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Desulfovibrio desulfuricans*);

спірили – бактерії, які утворюють один чи декілька завитків (*Rhodospirillum rubrum*, *Spirillum volutans*, *Thiospira winogradskyi*);

спірохети – утворюють багато завитків і петель, але їхня звивиста форма зумовлена відсутністю жорсткої стінки і специфічним характером руху (*Treponema pallidum*, *Leptospira dentium*).

Виявлено бактерії у формі замкненого або незамкненого кільця (тороїд) – рід *Micrococcus*; бактерії, які мають вирости цитоплазми (простекобактерії). Серед археобактерій виявлено бактерії незвичної форми: трикутника, прямокутника; бактерії плоскої форми, які нагадують уламки скла (*Haloarcula*). Замалюйте їх (див. Додаток).

Рисунок 2. Основні форми бактерій



Завдання 3. Ознайомитися з нитчастими і новими формами бактерій та замалювати їх в робочий альбом.

Нитчасті форми бактерій належать до багатоклітинних мікроорганізмів. Їхні нитки складаються з циліндричних або дископодібних клітин. Іноді довжина таких ниток може досягати 40 і більше мікрометрів. Живуть нитчасті бактерії в морських та прісних водах, ґрунтах і на загниваючих органічних рештках. Найкраще вивченими представниками нитчастих форм бактерій є залізо – і сіркобактерії. Для ознайомлення з цими бактеріями рекомендується брати пробу води з водойм, де є вохристий осад. Замалюйте їх (див. Додаток).

Рисунок 3. Різноманітність форм прокаріот

Завдання 4. На прикладі *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* і *Sarcina flava* вивчити основні форми бактерій

Хід роботи:

1. Виготовити мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником метиленовий синій (час контакту з клітинами – 3-5 хв.), промити водою та висушити.
2. Виготовити мазок культури *Staphylococcus aureus* (стафілокок золотистий) або (сарцина жовта), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником фуксин (час контакту з клітинами – 1-2 хв.), промити водою та висушити.
3. На обидва препарати нанести імерсійне масло та роздивитися за допомогою імерсійної системи мікроскопа.
4. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

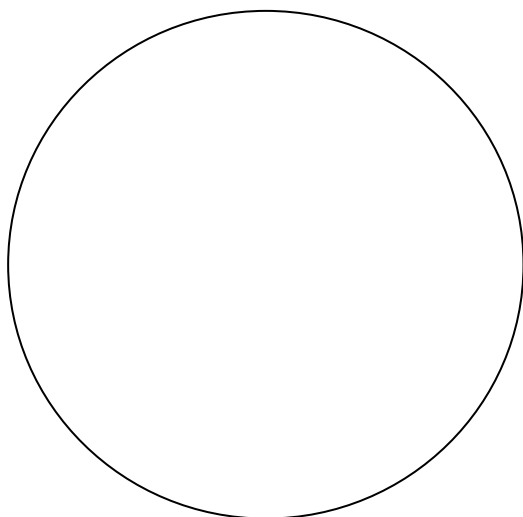


Рисунок 4. _____

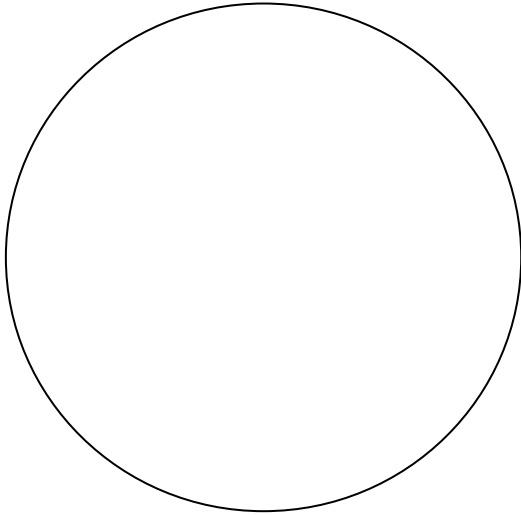


Рисунок 5. _____

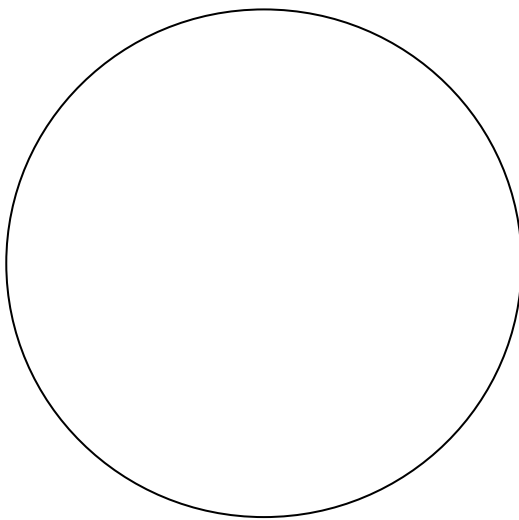


Рисунок 6. _____

Контрольні питання:

1. Особливості морфології мікроорганізмів.
2. Зовнішні структури бактеріальної клітини.
3. Цитоплазма та органоїди бактеріальної клітини.
4. Генетичний апарат бактеріальної клітини.
5. Основні форми бактерій.
6. Нитчасті бактерії. Різноманітність форм бактерій.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота №4

ГРАМПОЗИТИВНІ ТА ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ.

МЕТОД ФАРБУВАННЯ ЗА ГРАМОМ

Мета: ознайомитися з особливостями будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій. Ознайомитись з методикою і оволодіти технікою фарбування бактерій за Грамом.

Мікробіологічний словник: грампозитивні та грамнегативні бактерії, клітинна стінка, тейхоеві та тейхуронові кислоти, сферопласти, протопласти, бактерії L-форми.

Завдання 1. Ознайомитися з особливостями будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 датським вченим Г. Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні), а інші бактерії забарвлюються у червоний або рожевий колір (грамнегативні).

Опорним скелетом клітини є її стінка, до складу якої входять різноманітні компоненти (пептидоглікан, білки, ліпополісахариди, тейхоеві кислоти та ін.). Одним із основних компонентів бактеріальної клітинної стінки, який забезпечує її ригідність, є полімер пептидоглікан – муреїн. Він має вигляд сітки, що складається з гетерополімерних гліканових ланцюгів, з'єднаних між собою поперечними короткими тетрапептидними ланцюжками.

Клітинна стінка бактерій містить цілий ряд речовин, які не зустрічаються у тварин і рослин та є характерними тільки для бактерій:

N-ацетилмурамова кислота, мезо- та L,L-діамінопімелінові кислоти, D - форми аланіну і глютамінової кислоти, тейхоеві кислоти. Під дією деяких речовин (ферментів, наприклад, лізоциму; антибіотиків, наприклад, пеніциліну) у бактерій порушується синтез пептидоглікану або він руйнується. В результаті цього виникають особливі форми бактерій – сферопласти, протопласти та L-форми.

Сферопласти – це форма грамнегативних бактерій, позбавлених частини клітинної стінки, які мають сферичну або напівсферичну морфологію. У звичайних умовах вони гинуть у результаті осмотичного лізису, а в умовах підвищеного осмотичного тиску здатні деякий час виживати, рости і навіть розмножуватися, не втрачаючи при цьому деяких властивостей бактерій, наприклад, чутливості до фагів. При видаленні з середовища речовини, що призвела до втрати клітинної стінки, при наявності желатини частина сферопластів реверсує у вихідну форму.

Протопласти – це форма грам позитивних бактерій, повністю позбавлених клітинної стінки, які мають сферичних форму. На відміну від

сферопластів, вони повністю резистентні до дії фагів. У середовищах з підвищеним осмотичним тиском протопласти здатні деякий час виживати, метаболізувати та розмножуватися. При відміні дії факторів, що викликали появу протопластів та наявності у середовищі желатини та низки стабілізуючих речовин, частина протопластів перетворюється у вихідну форму із частковою втратою деяких фізіологічних властивостей.

L-форми – це адаптивні, а інколи інволюційні форми бактерій, які повністю або частково втратили здатність синтезувати компоненти клітинної стінки, особливо пептидоглікану. На відміну від прото- та сферопластів вони здатні до тривалого виживання та розмноження в макроорганізмах та на поживних середовищах. Морфологічно L-форми дуже різноманітні (округлі та нитковидні різних розмірів); відрізняються від вихідних форм бактерій метаболізмом, способами розмноження, стійкістю до хіміотерапевтичних речовин. Дуже часто хронізація інфекційних хвороб бактеріальної етіології та складність їх діагностики пов'язані з переходом збудника у L-форму.

L - форми виявлено у мікобактерій, коренебактерій, гонококів та ін.

Завдання 2. Позначити на рисунку структури клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій

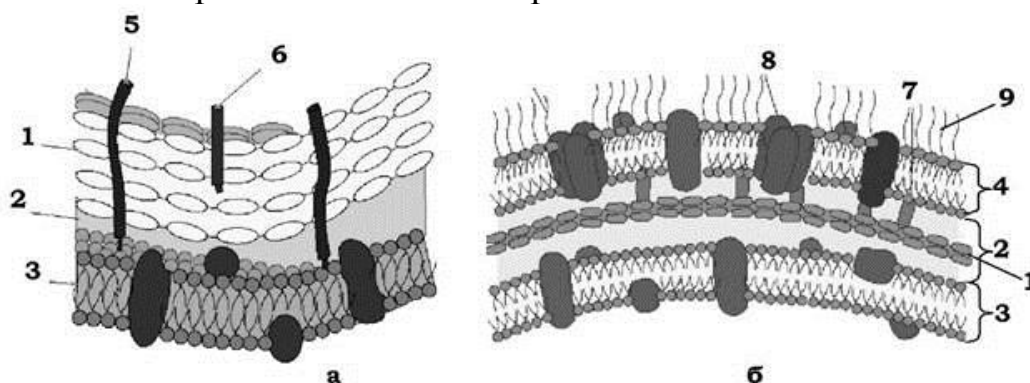


Рисунок 1. Модель організації клітинної стінки грамнегативних (а) і грампозитивних (б) бактерій: _____

Завдання 3. Ознайомитись з методикою і оволодіти технікою фарбування бактерій за Грамом.

Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового фіолетового барвника (генціан-віолет) з йодом після обробки мазка спиртом утримується клітинними покривами одних бактерій і вимивається з покривів інших, тому для їх визначення необхідно використовувати додатковий барвник, і для полегшення диференціювання обирають контрастний – червоний. Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синє-фіолетовий колір відображає фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів. Донедавна розглядалися різні теорії, що пояснюють диференційне

забарвлення бактерій за Грамом (наприклад, хімічна, мембранна, ізоелектрична). Згідно сучасних уявлень, після проникнення у клітини розчинна хлорна форма генціан-віолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає у осад, при цьому забарвлюється цитоплазма клітини. При обробці препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) із цитоплазматичної мембрани екстрагуються ліпіди, це призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціан-віолет-йод. Але зазвичай клітина має муреїновий шар (різної товщини та пористості у різних бактерій), який характеризується високою стійкістю до органічних розчинників. Багатошаровий малопористий муреїновий шар перешкоджає вимиванню барвника – клітини забарвлюються у синє-фіолетовий колір (грампозитивно), а при наявності моношару муреїну із крупними порами, клітини забарвлюються за Грамом негативно. Слід зауважити, що характер забарвлення прокаріот за Грамом залежить від віку культури, факторів зовнішнього середовища тощо.

Диференціальний спосіб забарвлення бактерій за Грамом (класичний)

Класичний спосіб забарвлення, запропонований Грамом, був дороблений і модифікований багатьма вченими, існує навіть експрес-метод визначення грампозитивності і грамнегативності (жива культура грамнегативних бактерій утворює слиз при обробці 3% КОН протягом 5-10 секунд).

Хід роботи:

1. На одному предметному склі по черзі приготувати мазки *Escherichia coli* (кишкова паличка) та *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка).
2. На зафіксовані у полум'ї пальника мазки покласти невеликі клаптики фільтрувального паперу та нанести на нього генціановий фіолетовий барвник так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла, легко натиснути на папір бактеріальною петлею.
3. Через 5-6 хв. пофарбований папір зняти та забарвити препарати розчином Люголю – 1 хв., при цьому препарати потемніють.
4. Розчин Люголю злити й обробити препарати 96% етиловим спиртом – 30-60 сек. (нанести кілька крапель спирту, зачекати 10-15 сек., злити, процедуру повторити 2-3 рази, в залежності від товщини мазків та інтенсивності попереднього фарбування).
5. Препарати промити до “чистої води”.
6. Дофарбувати препарати фуксином протягом 1-2 хв.
7. Барвник змити водою, препарати висушити та мікроскопіювати з імерсійним маслом.
8. Визначити, яка з запропонованих культур є грампозитивною, а яка – грамнегативною, якщо відомо, що *Bacillus mesentericus* – спороутворювальна бактерія, тому у полі зору будуть спостерігатися слабкозабарвлені овальні тільця – спори, також бактерія утворює довгі ланцюги клітин. Кишкова паличка спор не утворює, зрідка в полі зору можуть траплятися короткі

ланцюжки по 2-3 клітини. Зробити схематичні рисунки досліджених мікроорганізмів.

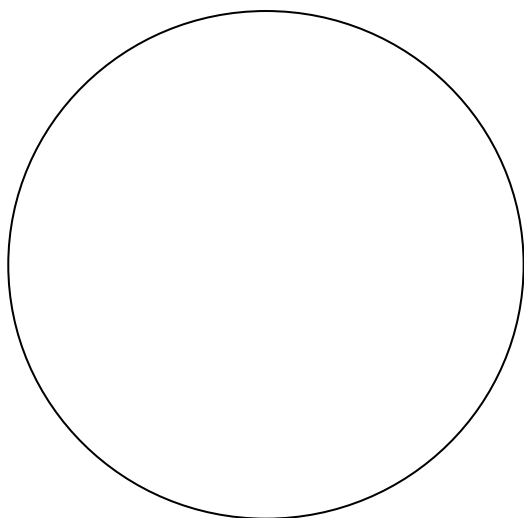


Рисунок 2. _____

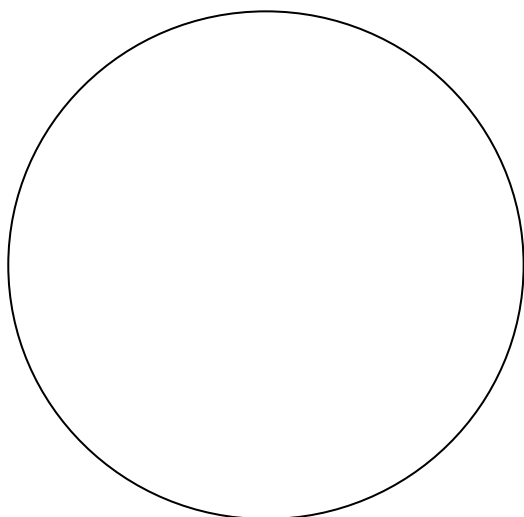


Рисунок 3. _____

Контрольні питання:

1. Особливості будови клітинної стінки грампозитивних бактерій.
2. Типи будови клітинної стінки грамнегативних мікроорганізмів.
3. Методика і техніка фарбування бактерій за Грамом.
4. Використання методики фарбування бактерій за Грамом у сучасних мікробіологічних лабораторіях.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 5

КАПСУЛИ ТА ЕНДОСПОРИ БАКТЕРІЙ. ВКЛЮЧЕННЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета: Ознайомитися з будовою капсул і ендоспор у бактерій. Розглянути включення мікробної клітини при фарбуванні різними методами.

Мікробіологічний словник: капсула, ендоспора, глікоген, гранульоза, волютин.

Завдання 1. Ознайомитися з будовою капсул і ендоспор у бактерій.

Капсула – це слизовий шар, який розташований над клітинною стінкою бактерій, має товщину 0,2-200 нм і синтезується за певних умов. За будовою та хімічним складом розрізняють декілька типів капсул:

Таблиця 1.

Типи капсул бактерій

| Тип капсули | Склад капсули | Приклади |
|------------------------------------|--------------------------------|--|
| Рівномірний шар | Полісахариди чи поліпептиди | <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Bacillus anthracis</i> |
| Шар із попереково-смугастих фібрил | Екстрацелюлярні нитки целюлози | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| Складні капсули | Полісахариди та поліпептиди | <i>Bacillus megaterium</i> |

Ендоспори бактерій – це унікальні за будовою і властивостями утворення клітини, що забезпечують виживання в несприятливих умовах та збереження спороутворюючих видів. У середині вегетативної клітини утворюється одна ендоспора. Ендоспори мають ряд особливостей:

- термостійкість (можуть витримувати температуру 100° С протягом 180 хвилин);
- стійкість до висушування;
- стійкість до хімічних речовин;
- низький вміст води;
- присутність кальцієвої солі дипіколінової кислоти, яка відсутня у вегетативних клітинах.

Стадії спороутворення у бактерій:

1. Поділ нуклеоїда;
2. Відшнурування частини протопласта;
3. Утворення поперечної перегородки біля полюса клітини;
4. Утворення проспори;
5. Синтез матеріалу кортексу;
6. Утворення поверхневих оболонок.

Спора оточена багатьма оболонками. Основні з них це:

1. Внутрішня цитоплазматична мембрана;
2. Зародкова клітинна стінка;
3. Кортекс;
4. Внутрішня оболонка спори;
5. Зовнішня оболонка спори;
6. Екзоспориум.

Спори різних бактерій відрізняються за формою (круглі або еліпсоїдні), розмірами (0,3-1,9 мкм), розміщенням у клітині.

Властивість утворювати спори характерна для деяких родів бактерій, наприклад: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*.

Таблиця 2.

Розташування спор у клітинах

| Зі спорою | Розташування спор у клітині | Приклади |
|--|--|---|
| Бацилярний (найменший діаметр спори не перевищує діаметр клітини) | Центральне Ексцентральне Термінальне | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| Клостридіальний (найменший діаметр спори перевищує діаметр клітини) | Центральне Ексцентральне | <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Bacillus laterosporus</i> <i>Clostridium butyricum</i> |
| Плектридіальний (найменший діаметр спори перевищує діаметр клітини) | Термінальне | <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Clostridium tetani</i> |

Спори мають складну структурну та хімічну будову, відрізняються здатністю заломлювати світло, стійкістю до кислот. При звичайному фарбуванні ендоспори не забарвлюються через слабку проникність барвників крізь їх оболонки. Враховуючи це, для виявлення ендоспор застосовують комплексні методи фарбування.

Завдання 2. Виявити капсулу у культур мікроорганізмів використовуючи метод Антоні. Замалювати препарат.

Хід роботи:

Для виявлення капсул за методом Антоні слід виконати такі процедури:

1. Приготувати препарати та зафіксувати жаром.
2. На препаративні мазки нанести 1% водний розчин кристалічного фіолетового та фарбувати протягом 2 хвилин.
3. Промити препарати 20%-м водним розчином сульфату міді, нанести на них свіжий розчин сульфату міді і витримати протягом 1-2 хвилин.

4. Не промиваючи водою, підсушити препарати на повітрі та промікроскопіювати з імерсією. **У полі зору: клітини бактерій – темно-фіолетові, капсули – світло-блакитні.**

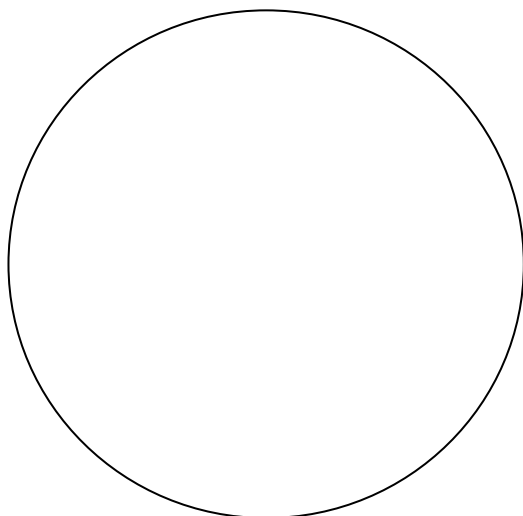


Рисунок 1. _____

Завдання 3. Виявити ендоспори у бацил за методом Шефера-Фултона та замалювати.

Хід роботи:

Для виявлення ендоспор бактерій можна застосувати метод Шефера-Фултона.

Для проведення цього фарбування слід виконати наступні дії:

1. На знежирене предметне скло нанести дві краплі стерильної води .
2. Петлею внести культури та суспензувати їх.
3. Висушити препарат на повітрі, зафіксувати жаром.
4. На препарат покласти смужки фільтрувального паперу, наситити їх розчином малахітового зеленого і щільно притиснути папір до мазків. Барвник нагрівати на водяній бані протягом 10 хвилин або над полум'ям пальника протягом 5 хвилин, не допускаючи висихання. При необхідності слід додавати барвник.

5. Препарат добре промити водою.

6. Препарат додатково дофарбувати водним розчином фуксину протягом 30 с.

7. Препарат промити і висушити на повітрі та промікроскопіювати з імерсією. **У полі зору: спори яскраво-зелені, а клітини – червоні.**

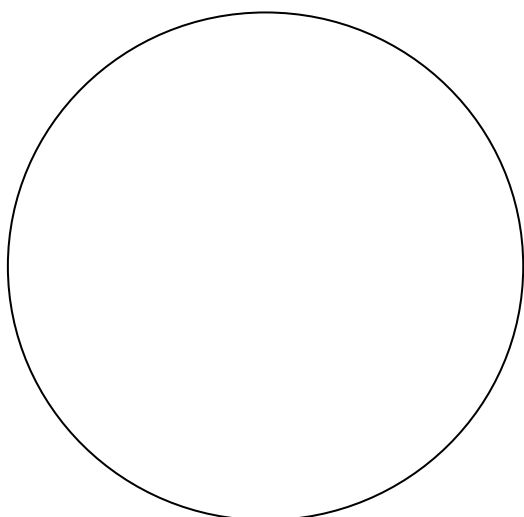


Рисунок 2. _____

Завдання 4. Ознайомитися з включеннями мікробної клітини.

Включення – це такі структури, які не є абсолютно необхідними для життєдіяльності клітини і можуть бути присутніми або відсутніми. Вони є досить різноманітними за хімічним складом (полісахариди, білки, жироподібні речовини, поліфосфати, сірка, залізо) та виконують, в основному, функцію запасних поживних речовин, утворення яких залежить від умов культивування бактерій. Виявити включення бактеріальної клітини можна за допомогою спеціальних методів фарбування.

Запасні речовини накопичуються клітинами мікроорганізмів при надлишку екзогенних субстратів, насамперед енергетичних, і використовуються клітиною при недостатці подібних речовин, а також в період адаптації клітин до середовища.

Включення мікробної клітини виявляють різними методами, враховуючи їх хімічний склад та деякі специфічні властивості.

Волютин, наприклад, стійкий до дії мінеральних кислот, ліпідні гранули вибірково зв'язуються з Суданом, **гранульоза** – з йодом і т.п. Під час ендоспороутворення у клітинах деяких бактерій з'являються специфічні білкові структури – **параспиральні кристали** (тільця). Вони мають ентомопатогенні властивості і використовуються як засіб боротьби з комахами. Кристали бувають різної форми (ромбовидні, кубічні), заломлюють світло подібно до спор, добре фарбуються основними та кислими барвниками.

Поліфосфатні включення називають ще гранулами волютину чи метакрохроматиновими зернами. У молодих клітинах поліфосфатів більше, ніж у старих. Виявлення поліфосфатів базується на властивості волютину змінювати колір барвника. Наприклад, при фарбуванні метиленовим синім поліфосфати набувають червоно-синього кольору. В основі такого фарбування лежить взаємодія полікатіонів основних барвників з поліаніонами поліфосфатів, що зумовлює зсув максимуму поглинання барвників у сторону більшої довжини хвилі. Виявлення поліфосфатів інколи базується на їх стійкості до розчинів кислот. При обробці профарбованих клітин кислотою, барвник, що зв'язався з поліфосфатом, не знебарвлюється.

Гранульоза – це крохмалеподібний полісахарид, який зустрічається в клітинах маслянокислих бактерій. При взаємодії з розчином йоду гранульоза набуває темно-синього забарвлення.

Глікоген – це полімер глюкози, який накопичується в клітинах дріжджів та бактерій. Виявити глікоген можна реакцією з йодом, при взаємодії з яким, він набуває червоно-коричневого забарвлення.

Полі- β -оксимасляна кислота – це жироподібна речовина. Вона інтенсивно накопичується при культивуванні мікроорганізмів в умовах недостатньої кількості азоту та надлишку вуглецю у середовищах. Ці включення виявляють за допомогою спиртових розчинів судану чорного або червоного, які розчиняються у жирах і забарвлюють полі- β -оксимасляну кислоту у відповідні кольори. Цитоплазма при цьому залишається не забарвленою.

Завдання 5. Виявити гранули волютину у клітинах дріжджів за методом Леффлера та замалювати.

Хід роботи:

Для виявлення гранул волютину у клітині дріжджів можна використати фарбування фіксованих препаратів за методом Леффлера.

Для цього потрібно виконати наступні дії:

1. На знежирене предметне скло нанести краплю стерильної води і суспендувати в ній культуру.
2. Препарат висушити на повітрі, зафіксувати жаром.
3. На препарат нанести розчин метиленового синього за Леффлером і витримати протягом 1-2 хвилин.
4. Препарат промити водою.
5. На препарат нанести 1%-вий розчин H_2SO_4 на 1 хвилину. При цьому клітини знебарвлюються, а волютин залишається зафарбованим.
6. Препарат промити водою.
7. Препарат дофарбувати розчином метиленового синього, розбавленого 1:100 протягом 30-40 секунд.
8. Препарат промити водою, висушити і промікроскопіювати з імерсією.

У полі зору: гранули волютину – червоного кольору, а клітини – сині.

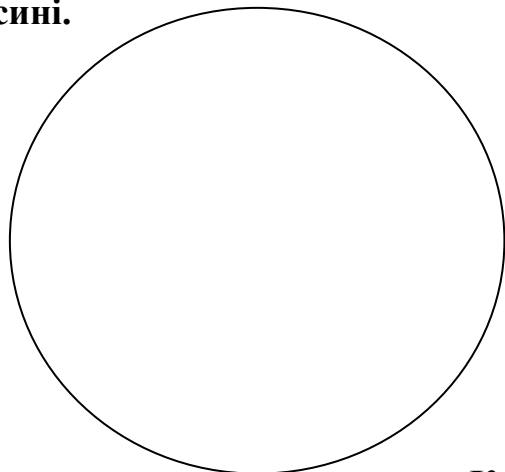


Рисунок 3. _____

Контрольні питання:

1. Типи капсул бактерій.
2. Спороутворення у бактерій.
3. Значення формування ендоспор у бактерій.
4. Включення мікробної клітини.
5. Методи виявлення капсул і ендоспор у бактерій.
6. Методи виявлення включень у бактерій.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 6

РУХ БАКТЕРІЙ

Мета: дослідити механізм руху бактерій, розглянути рух бактерій за допомогою препаратів “роздавлена крапля” і “вісяча крапля”.

Мікробіологічний словник: бактеріальні джгутики, джгутикова нитка, крюк, базальне тільце, плаваючий і ковзаючий рух.

Завдання 1. Ознайомитися з механізмом руху бактерій

Бактерії розподіляються на рухомі (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і нерухомі (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*). До руху здатні бактерії, що мають джгутики (плаваючий рух) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (ковзний тип руху). Здатність бактерій до активного руху була описана у 1676 р. А. Левенгуком, а у 1876 р. Р. Кох сфотографував джгутики та запропонував метод їх фарбування.

Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур – нитки, крюка та базального тільця. Нитка джгутика виступає над поверхнею бактеріальної клітини, далі біля поверхні клітини вона приєднується до крюка, який з'єднується з базальним тільцем, що повністю занурене в клітинні покриви та частково – у цитоплазму. До складу базального тільця входить вісь із нанизаними на неї кільцями – у грамнегативних бактерій це кільце L (вбудоване у зовнішню мембрану), кільце P (знаходиться в муреїновому шарі), MS-кільце (інтегроване в ЦПМ) і кільце C (частково інтегроване в ЦПМ, частково – занурене в цитоплазму). Також базальна структура має секреторну систему, по якій експортуються білкові субодиниці для збірки джгутикового апарату.

Функцією перших двох кілець є підтримка осі базальної структури. Кільце MS є елементом, до якого прикріплюються субодиниці осі, ротора, перемикача напрямку оберту та компоненти експортного апарату. С-кільце виконує функцію перемикача напрямку оберту клітини.

У грампозитивних бактерій відсутні L і P кільця. Рух джгутиків виконується завдяки “мотору”, що входить до складу базального тільця, а саме завдяки його основному компоненту – ротору, який локалізований в MS-кільці. Оберт ротора “мотора” забезпечується трансмембранною протон рушійною силою (або, як виключення, енергією градієнта катіонів натрію), енергія АТФ при цьому не витрачається. Але енергія АТФ витрачається на побудову компонентів джгутикового апарату та на роботу регуляторних систем клітини, які забезпечують оберти джгутика – за годинниковою стрілкою або проти.

Завдання 2. Виготовити мікропрепарати і провести спостереження за рухом бактерій

Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина – до 15 мкм, а діаметр – 12-18 нм). Простіше спостерігати рух живих бактерій у рідкому середовищі.

Виготовлення накопичувальної культури маслянокислих бактерій

Маслянокислі бактерії (представники р. *Clostridium*) зброджують вуглеводи та деякі органічні кислоти до масляної і ацетатної кислот, H_2 і CO_2 . Клостридії – рухомі (перитрихи) анаеробні бактерії, що мешкають у ґрунті й утворюють спори за клостридіальним або плектридальним типом.

Хід роботи:

1. Подрібнити нечищену сиру картоплю.
2. Пробірку заповнити шматочками сирого картоплі на 1/3.
3. Для нейтралізації середовища додати невелику кількість крейдового порошку. Суміш залити водопровідною водою, перемішати, закрити пробкою. Пробірки пастеризувати на водяній бані при $80^\circ C$ протягом 20 хв.
4. Після пастеризації пробірки поставити у термостат при температурі $30^\circ C$ на кілька днів.

Виготовлення препаратів “роздавлена крапля” і “висяча крапля”

Дані типи препаратів використовують для спостереження за живими бактеріями, в тому числі, рухомими. Для виготовлення таких препаратів використовують знежирені предметні та покривні скельця, а також предметні скельця з лунками.

Метод “роздавленої краплі”

Хід роботи:

1. На предметне скло за допомогою піпетки нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії, у даному випадку – бродильну рідину з клостридіями.
2. До краплі додати розчин Люголя та накрити покривним скельцем так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Лишки рідини видалити фільтрувальним папером.
3. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини жовтувато-зеленуватого кольору. Зробити схематичний рисунок.

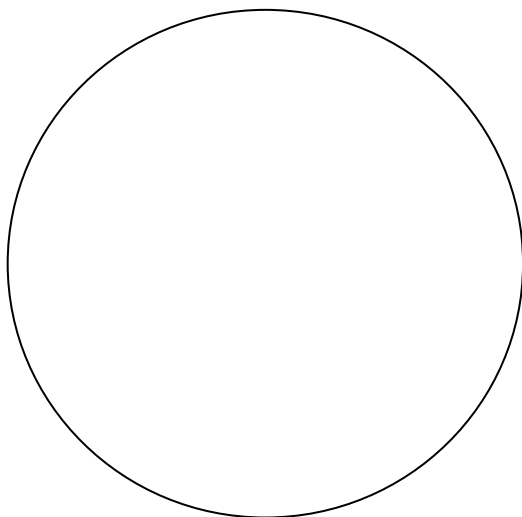


Рисунок 1. _____

Метод “вісячої краплі”

Хід роботи:

1. На покривне скельце нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії.
2. По кутам покривного скла за допомогою препарувальної голки нанести невелику кількість вазеліну.
3. Покривне скло накрити предметним склом із лункою та легко натиснути на нього. Предметне скло з приклеєним до нього покривним обережно перевертають покривним склом угору. У разі правильного виготовлення препарату крапля не торкається стінок лунки, а завдяки силі поверхневого натягнення тримається на покривному склі та вільно провисає у лунці предметного скла.
2. Препарат мікроскопіювати під об’єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини.

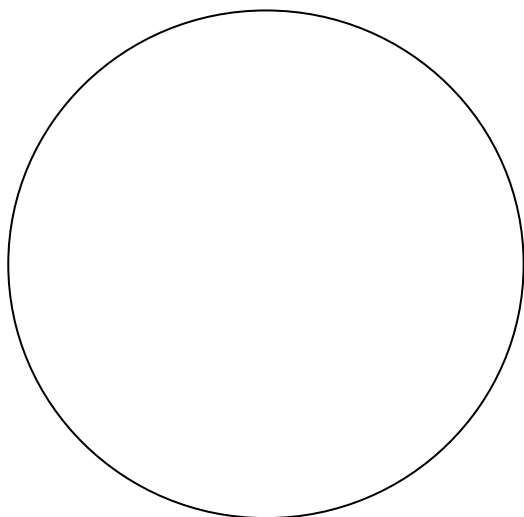


Рисунок 2. _____

Контрольні питання:

1. Типи руху бактерій.
2. Особливості будови джгутика грампозитивних і грамнегативних бактерій.
3. Фактори, які впливають на активність руху бактерій.
4. Методи дослідження руху бактерій.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 7

БУДОВА МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ

Мета: ознайомитися з будовою гіфальних та дріжджових грибів, замалювати форми спороношення у цвільових грибів, клітин та міцелію дріжджів. Дослідити будову і розмноження дріжджових грибів і включення дріжджової клітини. Освоїти техніку приготування препаратів для дослідження якості пресованих і сушених хлібопекарських дріжджів.

Мікробіологічний словник: цвільові гриби, дріжджові гриби, різоморфи, спорангій, аскоспора, перитецій, клейстотецій, конідії, пресовані та сушені хлібопекарські дріжджі

Завдання 1. Ознайомитися з будовою гіфальних грибів та формами спороношення у цвільових грибів.

Мікроскопічні гриби – це еукаріотичні одноклітинні або багатоклітинні організми. Серед мікроскопічних грибів є гіфальні та дріжджі. Велику групу серед гіфальних грибів складають цвільові. Вони широко розповсюджені у навколишньому середовищі в умовах з підвищеною вологістю, здатні утворювати на твердих поживних середовищах пухнасті та ватоподібні різнокольорові колонії. Колонії грибів характеризуються просторовою агресивністю, розподілом на центральну, передкрайову та крайову зони, відрізняються забарвленням субстратного та повітряного міцелію. Гіфи цвільових грибів утворюють повітряний та субстратний міцелій, який у нижчих грибів – несептований, у вищих – септований, багатоклітинний. Сполучення між паралельно розташованими гіфами (анастомози) сприяють утворенню видозмін міцелію – тяжів, різоморф.

Морфологічні відмінності грибів у значній мірі залежать від особливостей статевого та нестатевого розмноження. Спори нестатевого розмноження можуть утворюватися в замкнених спорангіях на кінці гіфи – спорангієспори (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), або розташовуватися вільними ланцюжками на кінцевих булавовидних клітинах (стеригмах) гіфи-конідієносія – конідієспори (*Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) (рис. 1). Утворення статевих спор у грибів пов'язане з різними морфологічними структурами. У нижчих мукових грибів результатом статевого процесу є утворення зигоспори. У вищих грибів, зокрема аскоміцетів, наслідком статевого процесу є утворення аска, в якому розвиваються аскоспори. Утворення асків у більшості випадків відбувається у плодових тілах. Плодові тіла – це ділянки міцелію, де визрівають статеві спори гриба. Розрізняють три форми плодових тіл: клейстотеції (повністю закриті); перитеції (шишкоподібні); апотеції (відкриті, чашеподібні) (рис 2).

До цвільових грибів належать як представники нижчих грибів, наприклад, мукові (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), так і представники вищих – аскоміцетів, зокрема мітоспорових грибів (*Aspergillus*, *Penicillium*).

Цвільові гриби представляють великий інтерес як продуценти різноманітних ферментів, антибіотиків, органічних кислот та ін.

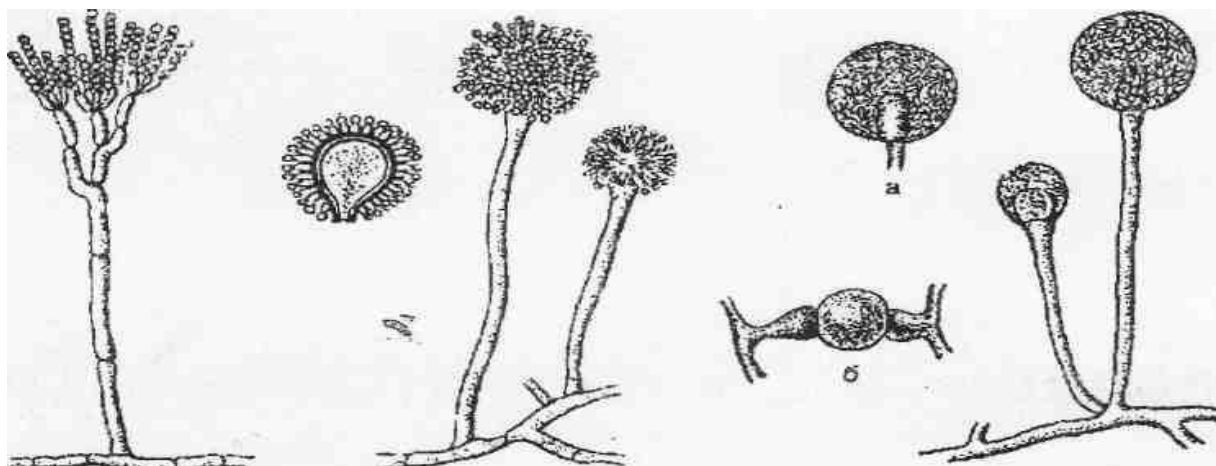


Рис. 1. Форми спороношення у цвільових грибів:

1. Кистьовидно розгалужений конідієносець з конідіями у *Penicillium*
2. Лійкоподібний конідієносець з конідіями у *Aspergillus*
3. Головчастий спорангіоносець зі спорами у *Mucor*: а) спорангій;
б) зигоспора

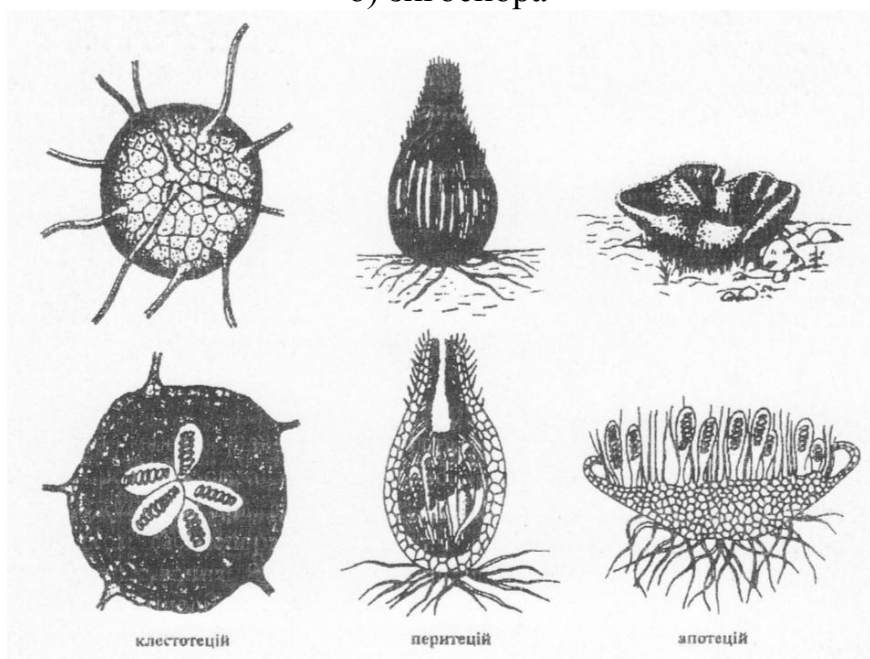


Рис. 2. Зовнішній вигляд та поперечні розрізи плодових тіл: клейстотецій, перитецій та апотецій.

Завдання 2. Ознайомитися з будовою дріжджових грибів, замалювати форми клітин та міцелію дріжджів.

Окрім гіфальних грибів відомі також *дріжджі* – одноклітинні гриби. Колонії дріжджів мають глянцеvu поверхню, пастоподібну консистенцію, подібні до бактеріальних.

Дріжджі мають різноманітну форму клітин, найчастіше овальну або видовжену, відрізняються за розмірами (рис. 3).

Розмножуються дріжджі брунькуванням, бінарним поділом і лише іноді статевим шляхом (аскоспорами). Типовим способом нестатевого розмноження дріжджієв є брунькування. Якщо клітини після брунькування не розходяться, вони утворюють псевдоміцелій (рис. 4).

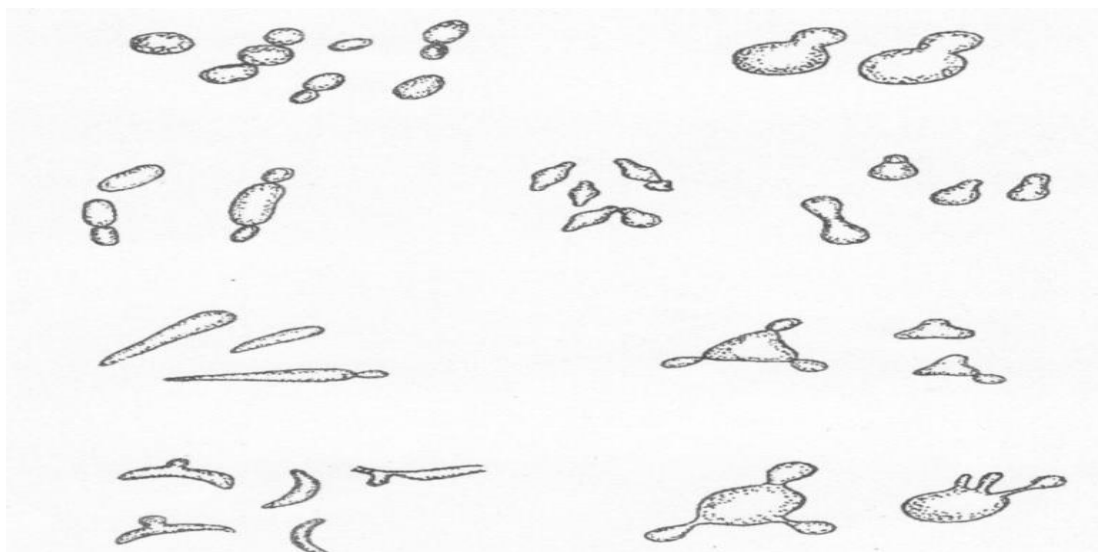


Рис. 3. Форми клітин дріжджів

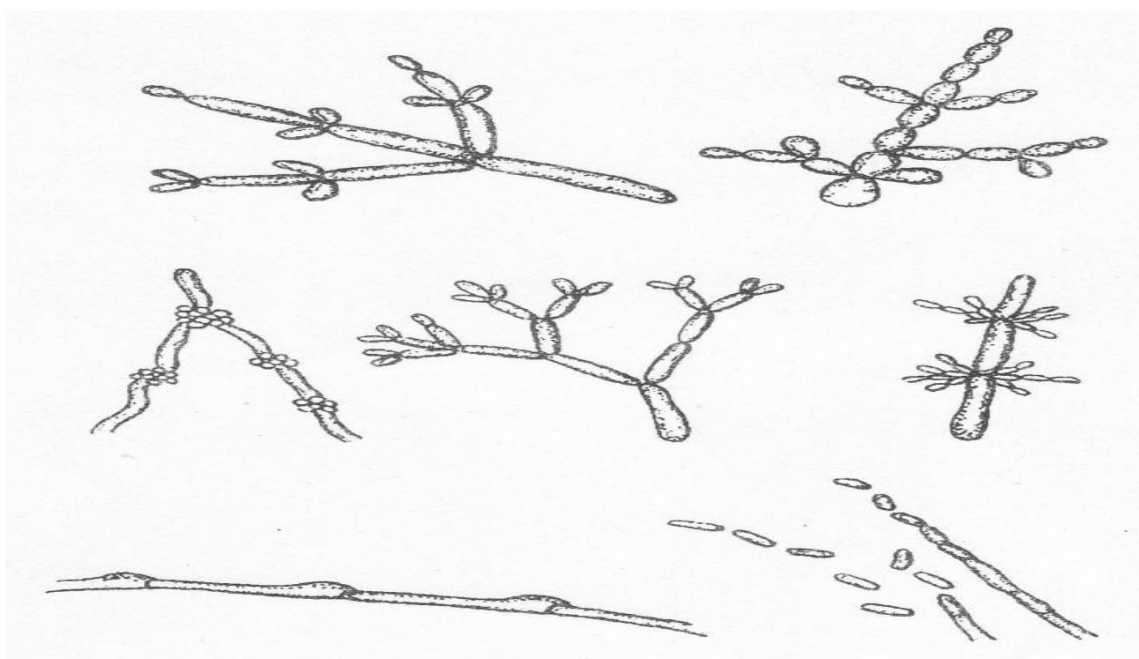


Рис. 4. Форми міцелію у дріжджів

Велику групу дріжджів складають аспорогенні гриби, що втратили здатність до статевого розмноження. Їх називають дріжджеподібними грибами.

Дріжджі дуже поширені в природі, особливо на субстратах, які містять цукристі речовини. Багато видів дріжджів є збудниками спиртового бродіння і здавна використовуються при виготовленні вина, пива та випіканні хліба. Серед дріжджеподібних грибів відомі збудники хвороб.

Цитоморфологічні особливості та практичне значення мікроскопічних грибів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Цитоморфологічні особливості та практичне значення мікроскопічних грибів

| | <i>Морфологічна особливість</i> | | <i>Представники</i> | <i>Значення</i> |
|----------------|---|--|--|--|
| Цвільові гриби | Ендогенні спори нестатевого розмноження в спорангіях головчатої форми | Моноподіальне галуження спорангієносців | <i>Mucor nigricans</i> | Рослинний сапрофіт |
| | | | <i>Mucor hiemalis</i> | Продуцент амілолітичних ферментів |
| | | Симподіальне та дихотомічне галуження. Столони та ризоїди для прикріплення до субстрату | <i>Rhizopus cohnii</i> | Продуцент амілолітичних та ліполітичних ферментів |
| | | | <i>Absidia spinosa</i> | Рослинний сапрофіт |
| | Екзогенні спори нестатевого розмноження (конідії) на повітряних конідієносцях | Одиночні конідієносці з роздутою апікальною клітиною і радіальними стеригмами з конідіями (лійкоподібна форма) | <i>Aspergillus flavus</i> | Збудник мікотоксикозів – отруєнь афлатоксином |
| | | | <i>Aspergillus niger</i> | Продуцент цитринової кислоти |
| | | | <i>Aspergillus oryzae</i> | Продуцент амілолітичних та протеолітичних ферментів |
| | | Одиночні конідієносці з фіалі дою (пучком стеригм) і ланцюжками конідій | <i>Stachybotrys alternans</i> | Збудник стахіботріотоксикозу худоби – отруєння токсином, який викликає некрози слизових оболонок та лейкопенію |
| | | | <i>Stachybotrys chartarum</i> | Рослинний сапрофіт, целюлозолітичний гриб |
| | | Кистьовидно розгалужені конідієносці з багатоярусними стеригмами, що несуть ланцюжки конідій | <i>Penicillium notatum</i> <i>P. chrysogenum</i> | Продуценти антибіотика пеніциліну |
| | | | <i>Penicillium nigricans</i> | Продуцент антибіотика гризеофульвіну |
| | | | <i>Penicillium roqueforti</i> | Використовується у сироварних виробництвах |
| Дріжджі | Аскоспори в перитеціях (пляшковидних плодових тілах) | Перитеції з виростами, які дихотомічно галузяться | <i>Chaetomium globosum</i> | Рослинний сапрофіт целюлозолітичний гриб |
| | Аскоспори в клейстотеціях (закритих плодових тілах) | | <i>Eurotium</i> , <i>Emericella</i> <i>Eupenicillium</i> , <i>Talaromyces</i> | Телеоморфи <i>Aspergillus</i> Телеоморфи <i>Penicillium</i> |

| | | | | |
|----------------------|------------------------------------|--|---------------------------------|--|
| Дріжджоподібні гриби | Аскоспори в асках без плодових тіл | Часто розмножуються вегетативно брунькуванням | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Хлібопекарські та пивні дріжджі |
| | | | <i>Hansenula anomala</i> | Контамінант дріжджових виробництв |
| | | | <i>Torula cremoris</i> | Продуцент ферменту β -галактозидази |
| | | | <i>Pichia guilliermondii</i> | Деструктор вуглеводнів нафти |
| | Аспорогенні дріжджі | Розмножуються вегетативно – фрагментацією міцелію та брунькуванням | <i>Candida albicans</i> | Збудник мікозів (кандидозів) |
| | | | <i>Cryptococcus neoformans</i> | Збудник бластомікозів |
| | | | <i>Endomyces lactis</i> | Представник мікрофлори молочнокислих продуктів |
| | | | <i>Pullularia pullulans</i> | Фітопатогенний гриб |

Завдання 3. Дослідити будову і розмноження дріжджових грибів і включення дріжджової клітини.

Хід роботи:

Для вивчення морфології дріжджоподібних грибів найкраще використовувати чисті культури дріжджів, які можна одержати на місцевому дріжджовому або спиртовому заводі. Їх також можна виростити в лабораторії на рідкому 6-7%-му суслі або сусло-агарі. Із цих культур виготовляють живі препарати «роздавлена крапля» або «висяча крапля». Найчастіше використовуються звичайні хлібопекарські дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*).

1. Невеличкий шматочок (3-5 г) дріжджової маси помістити у теплу підцукрену воду.

2. Через 10-15 хв., коли розчин стане мутним, нанести краплину на предметне скельце, накрити і вивчати під мікроскопом.

3. Вивчити морфологію і будову клітини, характер вегетативного розмноження (брунькування).

4. Замалювати розмноження (брунькування) дріжджових клітин у робочий зошит.

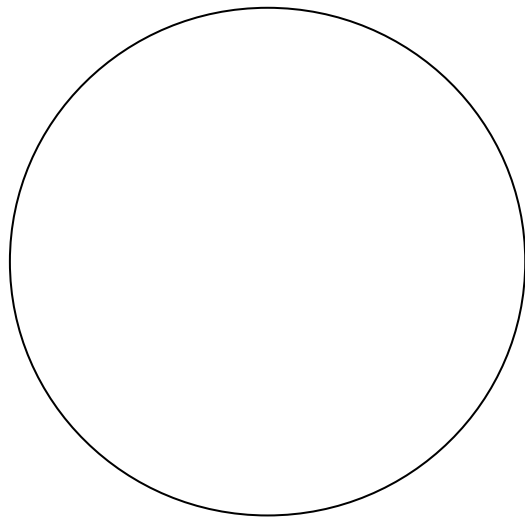


Рисунок 1. _____

Для вивчення включень дріжджових клітин використовують серію забарвлень:

1. Виявлення глікогену

У краплю суспензії досліджуваних дріжджів внести краплю розчину Люголя (I_2 в KI). Накрити краплю покривним скельцем і розглянути під мікроскопом (об'єктив 40х). **Глікоген забарвлюється розчином Люголя в червоно-коричневий колір.**

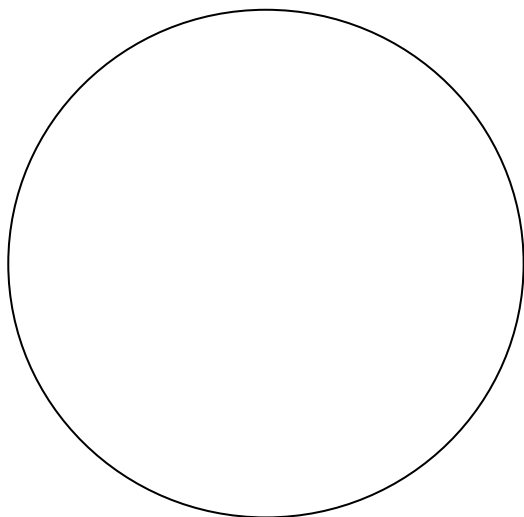


Рисунок 2. _____

2. Виявлення волютину

Фіксований над полум'ям спиртівки мазок з культури досліджуваних дріжджів зафарбувати синькою Лефлера. Через 5 хв фарбу злити, препарат промити водою і нанести на нього краплю 1%-ного розчину сірчаної кислоти. Мазок накрити покривним скельцем і мікроскопувати з об'єктивом 90х. **Волютин має вигляд гранул синьо-фіолетового кольору на блакитному фоні цитоплазми.**

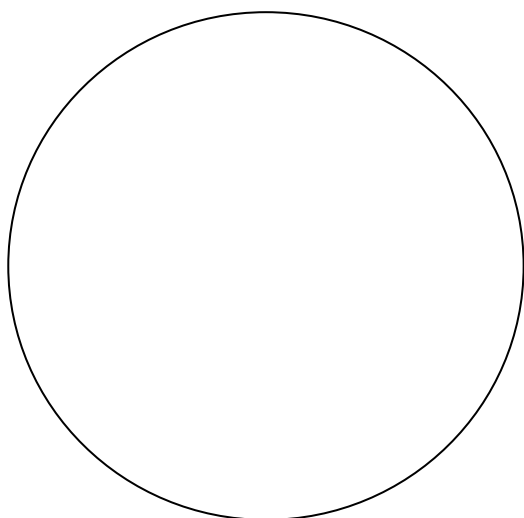


Рисунок 3. _____

Завдання 4. Дослідити якість пресованих та сухих хлібопекарських дріжджів.

Пресовані хлібопекарські дріжджі

Пресовані дріжджі – продукт у вигляді брикету сірувато-жовтого кольору, крихкої консистенції, який швидко псується. Вологість при випуску із заводу - 74-75 %. Брикет складається із мільярдів мікроскопічних клітин овальної, продовгуватої або круглої форми. Хлібопекарськими дріжджі називаються тому, що вони використовуються у хлібопекарній промисловості при виробництві хліба. Потрапляючи в тісто, дріжджі розщеплюють цукри з утворенням спирту і вуглекислого газу. Пухирці газу, розподіляючись в тісті, збільшують його об'єм і розпушують тісто.

Хід роботи:

Приготування препарату: шматок пресованих дріжджів (0,5 г) опускають в склянку з водопровідною водою (50-75 мл) і добре розмішують до отримання однорідної маси. Потім скляною паличкою наносять розчин на предметне скло і накривають покривним склом. Препарат розглядають під мікроскопом спочатку при об'єктиві 8х, а потім при об'єктиві 40х. Для проведення аналізу в полі зору повинно бути не більше 20-30 клітин дріжджів. Якщо їх буде більше, то слід підняти покривне скло і додати краплю води, знову змішати і знову накрити покривним склом. При об'єктиві 8х проглядають форму клітин і загальний вигляд препарату. При об'єктиві 40х проглядають та спостерігають брунькування клітин та їх внутрішню будову.

У брикеті містяться клітини хлібопекарських дріжджів овальної, еліпсоподібної або майже круглої форми і дріжджеподібні гриби. Клітини дріжджеподібних грибів мають більш видовжену форму і вони дрібніші за клітини дріжджів. На поверхні деяких клітин є виступи різних розмірів - бруньки (утворюються нові клітини). Клітини дріжджеподібних грибів при брунькуванні утворюють часто об'єднання з декількох клітин, так званий псевдоміцелій. Наявність великої кількості дріжджеподібних грибів знижує якість пресованих хлібопекарських дріжджів, головним чином їх здатність піднімати і розпушувати тісто (дріжджеподібні гриби не мають підйомної сили). Чим більше міститься дріжджеподібних грибів, тим слабша підйомна сила хлібопекарських дріжджів.

Для оцінки якості пресованих дріжджів слід підрахувати кількість дріжджових клітин і кількість дріжджеподібних грибів, потім обчислити їх відсоткове співвідношення.

Оцінка якості: наявність до 15 % дріжджеподібних грибів - дріжджі доброї якості, до 40 % - задовільної, більше 40 % - дріжджі незадовільної якості.

Приклад: у полі зору мікроскопа підраховано 20 клітин хлібопекарських дріжджів і 15 клітин дріжджеподібних грибів, всього 35.

$$35 - 100 \%$$

$$15 - x \%$$

$$x = 42,85 \% \text{ – сторонні гриби}$$

Висновок: даний зразок дріжджів незадовільної якості.

Приготувати препарати для оцінки якості пресованих хлібопекарських дріжджів. Препарати продивитись, відмітити наявність брунькування, форму і будову клітин. Підрахувати кількість дріжджових клітин і дріжджеподібних грибів, їх відсоткове співвідношення і зробити висновок про якість пресованих хлібопекарських дріжджів.

РОЗРАХУНКИ:

Сушені хлібопекарські дріжджі

Сушеними дріжджами називаються висушені пресовані хлібопекарські дріжджі в спеціальних сушках до вологості 7-9%. Сушені дріжджі довго зберігаються при температурі 15-28 °С і не втрачають свою активність (здатність піднімати тісто). Активність дріжджів залежить у значній мірі від кількості клітин, які залишилися життєздатними, тому що при висушуванні частина клітин відмирає. Чим більше життєздатних клітин і чим менше мертвих, тим краща якість сушених дріжджів. При визначенні якості сушених дріжджів визначають відсоток відмерлих клітин в них.

Хід роботи:

Приготування препарату: 0,2-0,3 г сушених дріжджів вносять у склянку з водопровідною водою (50 мл) і дають їм розмокнути протягом 30 хв. Потім розмішують скляною паличкою і нею ж наносять краплю суспензії на предметне скло. Поруч наносять краплю метиленової синьки, розбавленої у буферному розчині. Обидві краплі змішують краєм покривного скла і цим же склом накривають. Приготований препарат продивляються при об'єктиві 40х. У полі зору спостерігають клітини дріжджів (загальна кількість клітин не повинна перевищувати 30-40 у полі зору). Частина клітин буде забарвлена у синій колір, інша частина - незабарвлена. Забарвлені клітини – мертві, тому їх оболонка безперешкодно пропускає фарбу всередину клітини. Оболонка живих клітин не пропускає фарбу і тому вони залишаються незабарвленими. Для визначення відсотка мертвих клітин підраховують в 2-3-х полях зору окремо забарвлені і незабарвлені клітини, а потім визначають відсоток.

Оцінка якості: активні сушені хлібопекарські дріжджі повинні містити не більше 30 % мертвих клітин.

Приклад: загальна кількість живих клітин 88 шт., мертвих 18 шт. Всього

клітин 106 шт. Складаємо пропорцію:

$$106-100\%$$

$$18-x\%$$

Кількість мертвих клітин $x = 16,98 \%$.

Висновок: дані сушені дріжджі є активними.

Приготувати препарати для дослідження і оцінки якості сушених хлібопекарських дріжджів. Препарати продивитись, відмітити кількість забарвлених і безбарвних клітин, зробити висновок про активність сушених хлібопекарських дріжджів.

РОЗРАХУНКИ:

Завдання 5. Дослідити морфологічні та культуральні властивості міцеліальних грибів.

Хід роботи:

1. Підготувати заздалегідь шматочки зіпсованих продуктів (хліб, сир, пляшечка йогурту або сметани та ін.) на яких з'явилася цвіль.

2. Розглянути за допомогою лупи колонії і дослідити культуральні властивості грибів. Особливу увагу слід звернути на характер повітряного міцелію (щільний, пушистий, висота, забарвлення тощо).

3. Замалювати колонії міцеліальних грибів у робочий зошит.

*При культивуванні цих грибів на поживних середовищах у них зазвичай відзначається радіальне розрастання грибниці та утворення круглястих колоній. У деяких видів грибів спостерігається характерне забарвлення міцелію, завдяки відкладанню в ньому пігментів, наприклад, у пеніциліну – зелене, аспергилу – чорне, фузаріума – рожеве. Міцелій різопуса забарвлений у темно-бурий колір, ботритис – у сірий. Молочна цвіль має біле забарвлення.

4. Для вивчення морфологічних властивостей із культури гриба виготовити препарат «роздавлена крапля». Бактеріологічною петлею відібрати шматочок колонії і внести її у краплину суміші спирту і гліцерину (1:1) на предметному склі.

5. За допомогою двох препарувальних голокобережно розправити міцелій тонким шаром і покрити накривним скельцем.

6. Виготовлений препарат вивчити під мікроскопом при малому і великому збільшенні. Визначити будову міцелію (одноклітинні або багатоклітинні гіфи), органів розмноження спорангіїв або конідій, замалювати в робочий зошит.

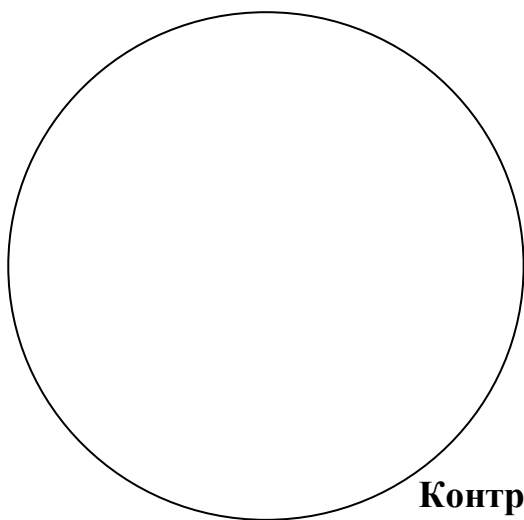


Рисунок 4. _____

Контрольні питання:

1. Особливості будови гіфальних грибів.
2. Форми спороношення у цвільових грибів.
3. Цитоморфологічні особливості та практичне значення мікроскопічних грибів.
4. Особливості будови і розмноження дріжджових грибів.
5. Включення дріжджової клітини.
6. Морфологічні та культуральні властивості міцеліальних грибів.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 8 **МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИНОМІЦЕТІВ**

Мета: Ознайомитися з біологією актиноміцетів, дослідити колонії актиноміцетів на поживному середовищі, замалювати будову міцелію актиноміцетів.

Мікробіологічний словник: актиноміцети, міцелій, гіфи, пігментоутворення, антибіотики, біологічно активні речовини

Завдання 1. Ознайомитися з біологією актиноміцетів, замалювати будову міцелію актиноміцетів.

Актиноміцети – це бактерії з міцеліальним типом будови прокаріотичної клітини. За деякими морфологічними ознаками вони подібні до грибів, тому що здатні до формування міцелію (субстратного та повітряного) і розмноження спорами, фрагментацією міцелію. На щільних

поживних середовищах актиноміцети утворюють шкірясті колонії, що характеризуються матовою оксамитовою поверхнею та здатністю вrostати в агар. Різні представники актиноміцетів відрізняються за складом хімічних компонентів клітин та морфологічними ознаками: структурою міцелію, типом галуження спороносних гіфів, пігментоутворенням та ін. (рис. 1).

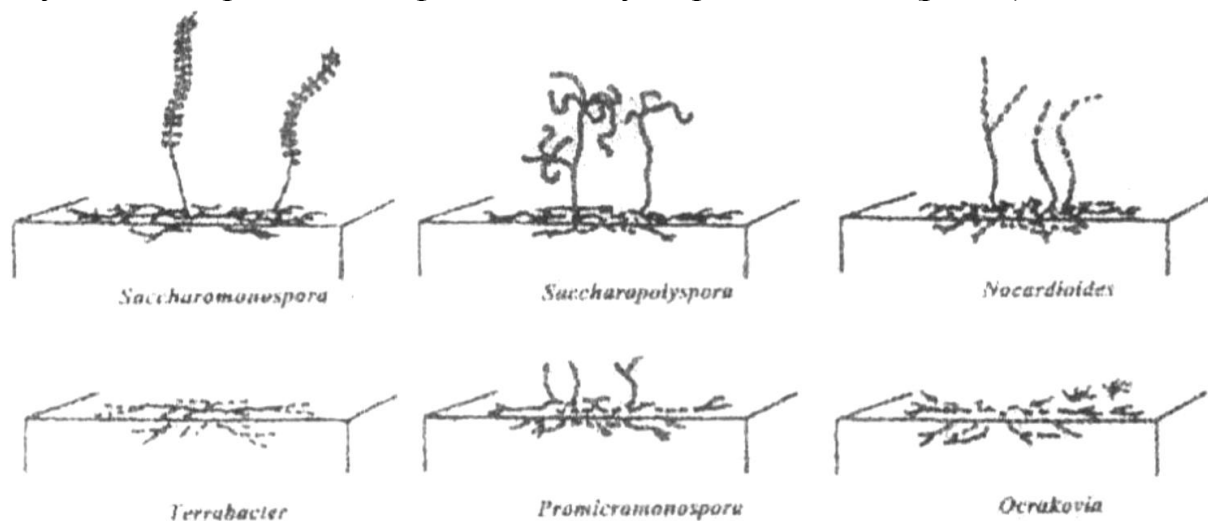


Рис. 1. Схеми будови міцелію актиноміцетів

Багато представників цієї групи є продуцентами антибіотиків та ряду біологічно активних речовин (таблиця 1).

Таблиця 1

Практичне значення актиноміцетів

| Актиноміцети - продуценти | Біологічно активні речовини |
|----------------------------------|--|
| <i>Streptomyces griseus</i> | Аміноглікозидний антибіотик стрептоміцин, протеолітичні ферменти |
| <i>S. antibioticus</i> | Макролідний антибіотик олеандоміцин, протипухлинні актиноміцинові антибіотики |
| <i>S. aureofaciens</i> | Тетрациклінові антибіотики, вітаміни групи В |
| <i>S. olivaceus</i> | Оліванова кислота – інгібітор β -лактамаз (некласичні β -лактамні антибіотики), вітаміни групи В |
| <i>S. clavuligerus</i> | Клавуланова кислота – інгібітор β -лактамаз, цефаміцинові β -лактамні антибіотики |
| <i>S. fradiae</i> | Макролідний антибіотик тілозин, протеолітичні ферменти |
| <i>S. noursei</i> | Полієновий антибіотик ністатин |
| <i>Nocardia</i> | Нокардіоцини (некласичні β -лактамні антибіотики), антибіотики ріфаміцини |
| <i>Saccaropolyspora erythrae</i> | Макролідний антибіотик еритроміцин |
| <i>Micromonospora purpurea</i> | Аміноглікозидний антибіотик гентаміцин |
| <i>M. olivoasterospora</i> | Аміноглікозидний антибіотик фортіміцин |
| <i>M. galomices</i> | Ріфаміцинові антибіотики (галоміцини) |

За складністю морфології та особливостями розмноження актиноміцети подібні до грибів, проте існує ряд чітких ознак для їх морфологічної диференціації (таблиця 2).

Таблиця 2

Відмінність актиноміцетів від гіфальних мікроскопічних грибів

| Критерії диференціації | Актиноміцети | Мікроскопічні гриби |
|-------------------------|---|---|
| Організація клітини | Прокаріоти | Еукаріоти |
| Міцелій | Гіфи діаметром 1-1,5 мкм, що утворені розгалуженою клітиною | Гіфи діаметром 5-50 мкм, багатоклітинні (септовані або несептовані). |
| Колонії | З оксамитовою поверхнею, чітким рельєфом | Пухнасті, ватоподібні з концентричними зонами, мають необмежений ріст |
| Розмноження | Фрагментацією міцелію або фрагментами спороносною гіфи (спорами) | Вегетативне (фрагментацією міцелію); нестатевими спорами - спорангіоспорами або конідіями (анаморфізм); статевим спорами - аскоспорами (телеоморфізм) |
| Особливості мікроскопії | Препарати-відбитки із застосуванням імерсійного об'єктиву (90х; 100х) | «Роздавлена крапля» із застосуванням об'єктивів 8х, 20х, 40х ; біокулярна лупа |

Завдання 2. Дослідити колонії актиноміцетів на поживному середовищі і замалювати їх в робочий зошит.

Хід роботи:

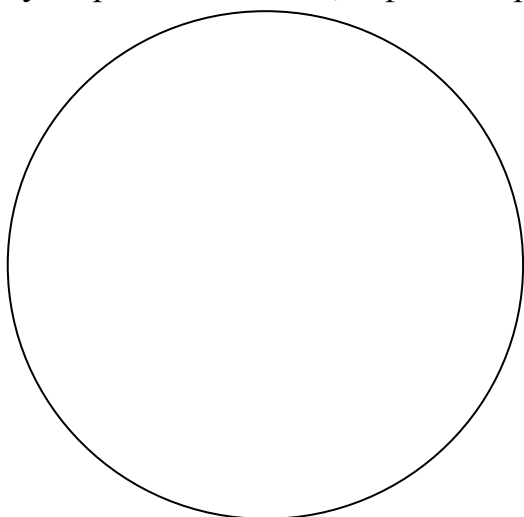
1. В стерильні чашки Петрі та пробірки залити розплавлений голодний агар і залишити для утворення агарових пластинок.

2. Відібрати наважку (15 - 20 г) повітряно-сухого ґрунту, розтерти його в ступці й просіяти крізь сито з діаметром отворів 0,25мм. Одержаний дрібнозем рівномірно розсіяти у чашки Петрі на агарові пластинки.

3. Засіяні чашки розмістити у термостаті для пророщування при температурі 25-28 °С на 5-7 діб. За цей час довкола ґрунтових частинок розвиваються колонії актиноміцетів.

4. Для мікроскопування вирізати блок агарової пластинки з колоніями актиноміцетів, розмістити його на предметному склі й вивчати під мікроскопом при малому збільшенні. В полі зору добре видно прозорий субстратний міцелій, гіфи повітряного міцелію та розміщення спороносців.

Рисунок 1. _____



Контрольні питання:

1. Особливості біології актиноміцетів.
2. Особливості будови міцелію актиноміцетів.
3. Практичне значення актиноміцетів.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 9

**ВИГОТОВЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.
МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Мета: ознайомитися з методами приготування поживних середовищ та методами виділення і культивування мікроорганізмів.

Мікробіологічний словник: поживне середовище, агар, желатин, пептон, сусло.

Завдання 1. Ознайомитися з методами приготування поживних середовищ

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні та неорганічні субстрати, які їм надають енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи живлення вони отримують із навколишнього середовища. При культивуванні у лабораторних умовах застосовують поживні середовища, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітини потребують для свого розвитку мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь та ін.). Для деяких мікроорганізмів необхідні додатково фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) та вітаміни. Таким чином, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту та розвитку мікроорганізмів.

Поживні середовища повинні відповідати наступним вимогам:

- містити всі необхідні джерела макроелементів, мікроелементів, а при необхідності вітамінів та факторів росту;
- всі сполуки, що входять до їх складу, повинні бути у певному збалансованому співвідношенні;
- містити необхідну кількість води у своєму складі;
- мати оптимальні для мікроорганізмів значення pH;
- бути ізотонічними, тобто мати такий же осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;

➤ бути стерильними.

Середовища, які використовуються в мікробіології, поділяють на групи за: походженням, консистенцією, призначенням.

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів, для вивчення їх фізіолого-біохімічних особливостей та ін.

Напіврідкі середовища містять 0,75-1% агар-агару (полісахарид з бурих водоростей, температура плавлення біля 100°C) або 5-7,5% желатини (речовина білкової природи з сполучної тканини тварин, температура плавлення 25°C) і використовуються для визначення газоутворення та характеру росту мікроорганізмів.

Щільні середовища містять 1,5-2% агар-агару або 10-15% желатини. Вони використовуються для виділення чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх культуральних особливостей та антагоністичних властивостей.

Сипучі середовища (розварене зерно, а також сипучі субстрати, що просочені поживними речовинами) використовуються, як правило, в промисловості.

Натуральні середовища мають рослинне або тваринне походження та невизначений склад. Це – відвари злаків, фруктів та овочів; молоко, кров, сироватка, сеча, тваринні тканини, яйця птахів та їх зародки; дріжджовий автолізат; відвари м'яса; витяжки гною і ґрунту; вода озер і морів. До них належить м'ясо-пептонний бульон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонна желатина (МПЖ) та ін.

Синтетичні середовища готуються з певних хімічно-чистих речовин у точно вказаних концентраціях. Вони мають визначений склад і легко відтворюються. Наприклад, середовище Чапека для цвільових грибів, середовище Ешбі для азотфіксуючих бактерій та ін.

Напівсинтетичні середовища мають частково невизначений склад. Вони містять як хімічно чисті сполуки (вуглеводи, фосфати, нітрати), так і компоненти чітко не встановленого складу (дріжджовий екстракт, пивне сусло, пептон).

Середовища загального призначення використовуються для культивування більшості відомих мікроорганізмів. Наприклад, МПБ, МПА, МПЖ.

Середовища спеціального призначення готуються з певною метою для конкретних потреб. Серед них розрізняють *елективні середовища*, які забезпечують оптимальні умови лише для певних мікроорганізмів (наприклад, середовище Ешбі для азотфіксаторів); та *диференційно-діагностичні середовища*, що використовують для ідентифікації мікроорганізмів (наприклад, середовище з кров'ю для визначення гемолітичної активності, середовище Ендо для виявлення кишкової палички).

Найважливіші хімічні елементи (вуглець, азот, фосфор та сірку) мікроорганізми споживають у різних формах.

Джерелами вуглецю можуть бути органічні речовини – цукри, спирти, органічні кислоти, амінокислоти та неорганічні – карбонати, диоксид та моно оксид вуглецю.

Джерелами азоту можуть бути неорганічні сполуки (амонійні солі, нітрати, молекулярний азот) та органічні (амінокислоти). Найбільш доступним джерелом азоту для мікроорганізмів є амонійний азот, який має ступінь окислення (N^{3-}), тому що саме в такому вигляді він включається в процес біосинтезу амінокислот. Для включення нітратного азоту в біосинтез, мікроорганізмам потрібно спочатку його відновити від N^{5+} до N^{3-} . Цей процес називається *асимільаторною нітратредукцією* і потребує затрат енергії. Зв'язування молекулярного азоту називається *азотфіксацією* і є ще більш енергозатратним, тому азотфіксація притаманна лише певним групам мікроорганізмів. Деякі мікроорганізми використовують як джерело азоту амінокислоти, які одночасно можуть бути і джерелом вуглецю.

Універсальним джерелом фосфору для мікроорганізмів є фосфатні солі.

Джерелом сірки для більшості мікроорганізмів є сульфати. Для включення сульфатної сірки у біосинтез, її спочатку необхідно відновити від S^{6+} до S^{2-} . Цей процес називається *асимільаторною сульфатредукцією* і потребує затрат енергії.

Речовини, що поглинаються мікроорганізмами, мають забезпечити їх енергією, що необхідна для активного біосинтезу, відновленими еквівалентами (тобто електронами), які необхідні для функціонування дихального ланцюга, фотосинтетичних електротранспортних систем та процесів анаболізму, і вуглецем, який є основним компонентом клітини.

За джерелом енергії мікроорганізми поділяють на хемо- та фототрофів.

Хемотрофи одержують енергію за рахунок хімічних реакцій, а *фототрофи* – в результаті перетворення енергії світла.

За походженням джерела електронів мікроорганізми поділяють на орґано- та літотрофів.

Органотрофи одержують електрони в процесі окислення органічних сполук, а *літотрофи* – неорганічних.

За походженням джерела вуглецю мікроорганізми поділяють на авто- та гетеротрофів.

Автотрофи споживають неорганічні джерела вуглецю, а *гетеротрофи* – органічні.

На відміну від вищих організмів, мікроорганізми мають дуже різноманітні варіанти метаболізму, які представлені в таблиці 1.

Загальна назва, що характеризує метаболічні особливості мікроорганізма, складається з 4-х коренів, наприклад, хемо-літо-гетеротрофи:

- перший корінь вказує на джерело енергії, що її використовує мікроорганізм;
- другий корінь вказує на походження електронів;
- третій корінь вказує на джерело вуглецю.
- четвертий походить від грецького *trophe* – живлення.

Таблиця 1

Типи метаболізму мікроорганізмів

| Джерела енергії | Енергія хімічних реакцій | Джерела електронів | Джерела вуглецю | |
|-----------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | Органічні речовини | Неорганічні речовини |
| | | Органічні речовини | Хемоорганогетеротрофи | Хемоорганогетеротрофи |
| | | Неорганічні речовини | Хемолітогетеротрофи | Хемолітогетеротрофи |
| | Енергія світла | Органічні речовини | Фотоорганогетеротрофи | Фотоорганогетеротрофи |
| | | Неорганічні речовини | Фотолітогетеротрофи | Фотолітогетеротрофи |

Завдання 2. Виготовити щільне натуральне загальноживане середовище – м'ясо-пептонний агар (МПА).

Хід роботи:

Для приготування м'ясо-пептонного агару (МПА) використовують виготовлений промисловим способом сухий порошок, який містить всі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю і простотою приготування.

До його складу входять гідролізат м'яса або риби – 17,9 г/л, пептон – 10 г/л, NaCl – 5 г/л, агар-агар – 20 г/л.

1. Вказану в інструкції кількість сухого порошку слід розмішати у колбі з 1000 мл холодної дистильованої води.
2. Перевірити рН і при необхідності довести його значення до 7,2-7,4 розчином NaOH.
3. Потім, при постійному перемішуванні, довести розчин до кипіння та повного розчинення інгредієнтів.
4. Отримане середовище профільтрувати у гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр.
5. Стерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) протягом 15-20 хвилин.

Завдання 5. Ознайомитися з методами виділення і культивування мікроорганізмів.

Якщо в досліджуваному матеріалі містяться різні види мікроорганізмів, то основним завданням є одержання ізольованих колоній цих мікробів шляхом пересівання їх на поверхні твердого поживного середовища. Для цього застосовують: *метод розведень, метод виділення чистої культури з окремої колонії, метод виділення чистої культури з однієї клітини та інші.*

Метод розведень ввів у практику Л. Пастер. Згідно з цим методом досліджуваний матеріал, який містить мікроорганізми, за допомогою петлі переносять у пробірку з рідким стерильним поживним середовищем і старанно розмішують. Потім з цієї пробірки петлею переносять матеріал у нову, і так повторюють, змінюючи 5–6 пробірок, доти, поки не одержать розведення, в

якому буде тільки одна клітина. Проте цей метод зараз майже не застосовують, оскільки він має ряд недоліків.

При виділенні чистих культур і культивуванні мікробів часто проводять їх **посіви** і **пересіви**. Техніка посіву є простою. Наприклад, невеличку кількість досліджуваного матеріалу петлею вносять у посудину з рідким поживним середовищем.

Тверде поживне середовище треба спочатку приготувати: розлити розплавлений і охолоджений до 50 °С МПА чи інше середовище. Стерильні чашки Петрі виставляють на рівну поверхню, обпалюють на спиртівці отвір пробірки з середовищем, піднявши кришку чашки з одного боку, наливають поживне середовище, обережно закривають чашку кришкою і заливають до застигання агару.

Посів у чашки Петрі. Піднявши край чашки, проводять посів петлею або шпателем (рис. 1) і закривають чашку. Позначають і розміщують її у термостаті догори дном, щоб крапельки води, які утворюються з пари на кришці чашки, не потрапили на поверхню середовища і не розмивали ізольовані колонії.

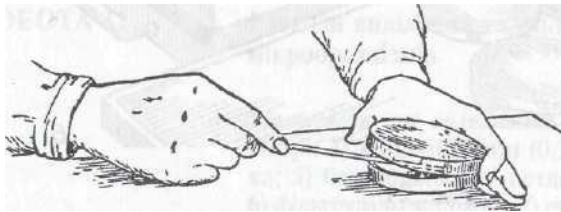


Рис.1. Посів на пластинку МПА в чашці Петрі.

Посів на косий агар у пробірках. Лівою рукою горизонтально тримають пробірку з середовищем. Правою рукою беруть петлю, обпалюють її на полум'ї спиртівки, охолоджують і вводять у посудину з досліджуваним матеріалом. Виймають пробку з пробірки, обпалюють отвір пробірки на спиртівці, вводять петлю в пробірку і зигзагоподібними рухами розсівають культуру по поверхні косоного агару. Виймають петлю, знову обпалюють край пробірки (і пробку), закривають пробірку і ставлять у термостат.

Посів уколом у стовпчик МПА застосовують для вирощування анаеробів, для виявлення характерних ознак бактерій або з метою тривалого зберігання культур (рис. 2.).

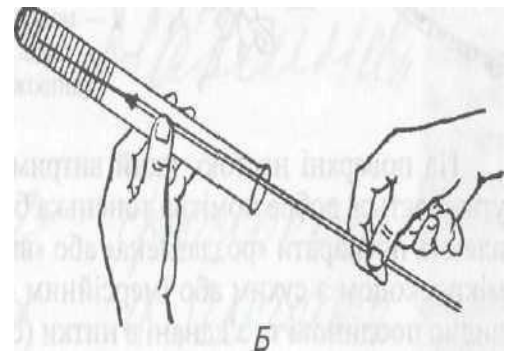
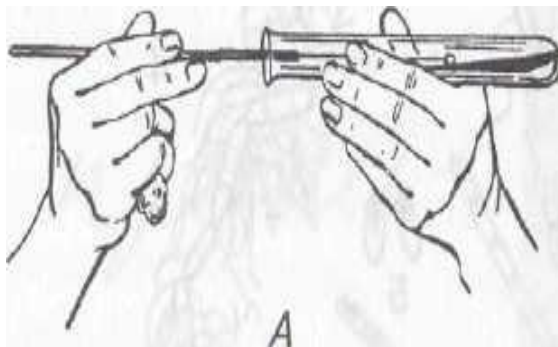


Рис. 2. Методи посіву мікроорганізмів:

А – на косий агар у пробірках; Б – уколом у стовпчик МПА.

Отже, у дослідженнях по виділенню чистих культур різних організмів (бактерій тощо) входять такі **основні операції**:

- 1) посів досліджуваного матеріалу;
- 2) виділення чистої культури;
- 3) ідентифікація цієї культури.

Умови культивування мікроорганізмів:

1. Залежно від видової належності мікроорганізмів поживне середовище повинно містити всі фактори росту.
2. Поживне середовище має мати певне рН.
3. Під час культивування для кожного виду мікроорганізму важливо дотримуватись температурного оптимуму.
4. В залежності від виду мікроорганізму правильно вибирати освітленість.
5. Враховувати відношення мікроорганізму до кисню.

Таблиця 2

Вимоги до культивування деяких фізіологічних груп мікроорганізмів

| Фактори | Назва фізіологічної групи | Оптимальні умови культивування | Засоби створення оптимальних умов |
|-------------|---------------------------|--|--|
| Температура | Мезофіли | 20-45°C | Термостати або термостатовані кімнати з певною температурою |
| | Психрофіли | Нижче 20°C | |
| | Термофіли | Вище 45°C | |
| Світло | Фототрофи | При освітленні | Флуоресцентні лампи або лампи накаливання |
| | Хемотрофи | У темряві | - |
| Кисень | Аероби | Середовища, насичені киснем | Інтенсивне перемішування рідкого середовища на качалках; посуд для культивування закривається так, що забезпечується надходження у нього кисню (наприклад, під ватно-марлевими пробками) |
| | Мікроаерофіли | Середовища з низькими концентраціями кисню | Культивування здійснюється в анаеростатах із зниженим вмістом кисню або мікроорганізми висіваються на щільне середовище |
| | Анаероби | Безкисневі середовища з додаванням відновників (сульфіду натрію, солей заліза-II або цитрату титану-III) | Культивування здійснюється в анаеростатах або герметично закритому посуді з повним видаленням кисню та заповненням газової фази інертними газами (наприклад, аргонном) |

Контрольні питання:

1. Типи метаболізму мікроорганізмів.
2. Типи дихання мікроорганізмів.
3. Класифікація поживних середовищ.
4. Методи виділення і культивування мікроорганізмів
5. Методи посіву мікроорганізмів.
6. Вимоги мікроорганізмів до культивування.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 10

ВЗЯТТЯ ЗМИВІВ З ОБЛАДНАННЯ. САНІТАРНО-БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОБ ПОВІТРЯ, ВОДИ, ЗМИВІВ З РУК

Мета: оволодіти навичками взяття змивів. Навчитися проводити санітарно-бактеріологічний аналіз проб повітря, води, змивів з обладнання.

Мікробіологічний словник: седиментація, фільтрація, аспірація, мікробне число, колі-титр, колі-індекс.

Завдання 1. Визначити загальну мікробну забрудненість поверхні столу методом змиву.

Хід роботи:

1. Обмежити поверхню столу дротяної рамкою-шаблоном (трафаретом) площею 25 см.
2. Стерильним пінцетом взяти з чашки Петрі заздалегідь заготовлені серветки (5 см x 5 см), зволожити їх, опустити в колбу з 2 мл фізіологічного розчину.
3. Ретельно протерти обмежену поверхню столу, ввести серветку в ту ж колбу і долити в неї 8 мл фізіологічного розчину.
4. Після струшування колбочки (протягом 3 хв.) Відібрати піпеткою 1 мл суспензії та внести на дно стерильної чашки Петрі.
5. Залити в чашку Петрі заздалегідь розтоплений і охолоджений до 50 °С МПА, перемішати середу і суспензію і після ущільнення агару поставити чашку в термостат при температурі 37 °С.
6. Провести підрахунок колоній мікроорганізмів, які вирости на твердих поживних середовищах. Для підрахунку кількості колоній чашку Петрі з

нижньої сторони ділять на сектори. У кожній з них колонії підраховують окремо, а потім підсумовують їх загальна кількість.

Завдання 2. Визначити мікробне число досліджуваної поверхні, висловити його кількістю мікробів на 1 см² поверхні. З цією метою підрахувати кількість колоній, що вирости на МПА і визначити мікробне число за формулою:

$$M = \frac{n \cdot 10}{S},$$

де М - мікробне число,

n - кількість колоній, що вирости в чашці,

10 - вихідне розведення змиву,

S - число см², з яких зроблений змив.

Завдання 3. Провести санітарно-мікробіологічне дослідження змиву рук персоналу.

Хід роботи:

1. Марлеву серветку в 2 мл фізіологічного розчину в колбі віджати стерильним пінцетом і дати в руки обстежуваному. Обстежуваний протирає нею ліву, а потім праву руку в такій послідовності: тил кисті, долонна поверхня, міжпальцевий простір і нігтьові ложа.

2. Після закінчення змиву серветку перенести в колбу, в якій вона перебувала до вживання.

3. Сухою серветкою протерти руки та опустити серветку в ту ж колбу.

4. Провести посів на МПА і поставити в термостат при температурі 37°C.

Завдання 4. Визначити кількість мікроорганізмів на поверхні рук.

Підрахувати загальну кількість колоній, що вирости при посіві 1 мл суспензії, і помножити на 10 (вихідне розведення змиву фізіологічним розчином).

$$M = a \cdot 10,$$

де М - мікробне число,

a - кількість колоній, що вирости в чашці,

10 - вихідне розведення змиву,

Результати дослідження записати у вигляді таблиці:

Таблиця 1

Результати санітарного стану рук, столу та інвентарю

| Найменування предмета | Мікробне число | Висновок про санітарний стан |
|-----------------------|----------------|------------------------------|
| | | |

**Санітарний стан поверхні вважається відмінним, якщо загальна кількість мікроорганізмів на 1 см² від 0 до 100,
 добрим - 100-1000,
 задовільним - більше 1000,
 поганим - 10000.**

Завдання 5. Ознайомитися з основними методами аналізу мікрофлори повітря.

Повітря не є середовищем, сприятливим для існування і розвитку мікроорганізмів. Потрапляючи в повітря, вони швидко гинуть внаслідок висихання, дії сонячних променів і нестачі поживних речовин. Склад мікрофлори повітря дуже різноманітний. Він залежить від ступеня забрудненості повітря мінеральними та органічними речовинами, температури, вологості тощо. Серед мікроорганізмів, які найчастіше виявляються в повітрі, переважають спороносні бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, цільові гриби, які найбільш стійкі до висихання, а також пігментовані бактерії родів *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, які стійкі до дії ультрафіолетових променів. Мікроорганізми у повітрі потрапляють, головним чином, з ґрунту.

Людина в середньому за добу вдихає 12000-14000 л повітря, при цьому 99,8% мікробів, які містяться в повітрі, затримуються у дихальних шляхах. У повітрі закритих приміщень виявляють бактерії, які виділяються зі слизових оболонок верхніх дихальних шляхів людини при чханні, кашлі, розмові. Від хворих у повітря виділяються поряд з умовно-патогенними мікроорганізмами (стафілококами, стрептококами) патогенні мікроби (гемолітичні стрептококи, бактерії дифтериту, кашлюку, мікобактерії туберкульозу та інші). При дослідженні повітря закритих приміщень важливим є метод вловлювання мікроорганізмів із повітря. Залежно від цього розрізняють **седиментаційні, фільтраційні та аспіраційні** методи дослідження повітря.

В основі усіх методів лежить однаковий принцип підрахунку бактерій. Вважають, що кожна бактерія, яка потрапила на агаризоване поживне середовище, розмножується, утворюючи колонію, яку можна побачити неозброєним оком. За кількістю підрахованих колоній розраховують кількість бактерій, вловлених при аналізі повітря.

Метод вловлювання повітря рідинami належить до фільтраційних методів. Певний об'єм повітря продувають через певний об'єм рідини (стерильна вода, буфер, рідке поживне середовище). По 0,1 мл цієї рідини висівають у чашки Петрі на тверде поживне середовище. Чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, що вирости на чашках. При обчисленні кількості мікроорганізмів у повітрі враховують об'єм рідини-поглинача та об'єм повітря, яке пройшло через рідину.

Аспіраційний метод з використанням апарата Кротова. Конструкція апарата Кротова ґрунтується на принципі ударної дії струменя повітря. Апарат

складається з трьох частин: вузла для відбору проб повітря, мікроманометра та електромотора. Апарат може пропускати від 25 до 50 л повітря за хвилину.

«Засіяні повітрям» чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, які вирости на них. Результати аналізу виражають найчастіше мікробним числом – кількістю мікроорганізмів у 1м³ повітря.

Метод осадження Коха належить до седиментаційних. Метод дає можливість виявити лише 35-60 % мікробів повітря і дозволяє тільки орієнтовано оцінити чистоту повітря. Принцип методу полягає в тому, що мікроорганізми повітря досліджуваного приміщення разом з пилом осаджуються на поверхню поживного агару в чашці Петрі. Час осадження залежить від забрудненості повітря. «Засіяні повітрям» чашки інкубують у термостаті, а через 2-3 дні підраховують кількість колоній на них. Розрахунки мікробного числа виконують за формулою Омелянського:

$$X = \frac{n * 5 * 10^4}{t * \pi r^2}$$

де х – кількість мікроорганізмів у 1 м³ повітря;

n – кількість колоній мікроорганізмів, які вирости у чашці Петрі;

t – час осадження, хв;

r² – площа чашки Петрі, см². Площа чашки Петрі дорівнює 78,5 см²;

5 і 10⁴ – коефіцієнти для перерахунку кількості мікроорганізмів у 1 м³.

Для визначення загального мікробного забруднення проби повітря “висівають” на МПА. Для виявлення у повітрі дріжджів та цвілей використовують сусло-агар. Патогенні мікроорганізми виявляють на відповідних диференційно-діагностичних живильних середовищах, зокрема, гемолітичні стрептококи та стафілококи на кров’яному агарі.

Офіційних стандартів чистоти повітря не розроблено, але прийнято показники оцінки ступеня мікробного забруднення приміщень (таблиця 2).

Таблиця 2

Число мікроорганізмів у 1м³ повітря

| Оцінка чистоти повітря | Літній період | | Зимовий період | |
|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | всього мікроорганізмів | гемолітичні бактерії | всього мікроорганізмів | гемолітичні бактерії |
| Чисте | <1500 | <16 | <4500 | <36 |
| Забрудне | >2500 | >36 | >7000 | >124 |

Завдання 6. Приготувати живильне середовище і зробити посів мікрофлори повітря приміщень.

Хід роботи:

1. У чашки Петрі розливають з пробірок розплавлений на водяній бані мясопептонний агар. При розливі кришку чашки Петрі відкривають в повному

обсязі, а так, щоб під неї увійшло горлечко пробірки. Верхню частину пробірки при розливі обпалюють над полум'ям пальника. Після того як агар виллють в чашку і закриють її кришкою, чашку рухають по столу обертальними рухами до застигання агару.

2. Провести посів мікрофлори повітря. Чашки ставлять на горизонтальну поверхню і відкривають кришки на 5 хвилин. Дослідник повинен знаходитися далеко від чашок. Потім чашки закривають, позначають восковим олівцем і поміщають в термостат при температурі 25°C на 48 годин.

3. Підрахувати кількість колоній, що вирости на чашках. Щоб не помилитись при підрахунку, кожену колонію необхідно відмічати з дна чашки маркером. Заміряти діаметр чашки за допомогою лінійки. Обчислити мікробне число за формулою Омелянського. Оцінити якісний склад бактерій повітря досліджуваних приміщень. Результати занести до таблиці, наведеної нижче:

Таблиця 3

Якісний склад бактерій повітря досліджуваних приміщень (приклад)

| Досліджене приміщення | Час експозиції | Число колоній на 1 дм ² поверхні агарової пластинки | |
|-----------------------------|----------------|--|-------|
| | | Бактерії | Гриби |
| Кабінет | 5 | 17 | 1 |
| Коридор навчального корпусу | 5 | 56 | 4 |
| Їдальня | 5 | 104 | 6 |

Таблиця 4

Якісний склад бактерій повітря досліджуваних приміщень

| Досліджене приміщення | Час експозиції | Число колоній на 1 дм ² поверхні агарової пластинки | |
|-----------------------|----------------|--|-------|
| | | Бактерії | Гриби |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

РОЗРАХУНКИ:

Завдання 7. Провести посів води на поживне середовище. Сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів є вода річок, ставків та інших водойм. Чисельність та різноманітність видів мікроорганізмів у воді залежить

від вмісту в ній органічних речовин. Особливо багато мікроорганізмів у стічних водах. Їх кількість у забрудненій воді може сягати кількох мільярдів в 1 мл.

Санітарно-бактеріологічне дослідження води включає:

- визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води;
- визначення колі-титру або колі-індексу та, в окремих випадках (при несприятливих епідеміологічних показниках – спалахи холери, тифу, дизентерії та ін.), визначення патогенних мікроорганізмів, їх токсинів та фагів.

Правила відбору зразків води для аналізу

Зразки води відбирають у стерильні 0,5 л флакони із водогінних кранів, насосів, труб та ін. Для цього останні попередньо обпалюють полум'ям ватного тампону, змоченого у спирті, потім спускають воду протягом 10 хв. для того, щоб змити бактерії, які знаходились у верхній частині труб, і лише потім відбирають зразки. З відкритих водойм воду для дослідження відбирають за допомогою батометра – спеціального приладу, що представляє собою металевий каркас, всередині якого встановлюється стерильний посуд. Батометр дає змогу відбирати зразки з будь якої глибини. Дослідження відібраних зразків води необхідно проводити не пізніше 2 год від моменту забору. Як виняток їх можна досліджувати пізніше, але слід пам'ятати, що після 6 год зберігання зразки води не підлягають бактеріологічному дослідженню, оскільки кількість мікроорганізмів у них суттєво змінюється.

Визначення загальної кількості мікроорганізмів у зразках води

Визначення загальної кількості мікроорганізмів (ЗКМ) проводять шляхом глибинного посіву в розплавлений та охолоджений до 45°C МПА у стерильній чашці Петрі. Чисту воду сіють в об'ємі 1 мл, при підозрі на забрудненість її розводять стерильним фізіологічним розчином від 1:10 до 1:1000 і висівають не менше двох розведень по 1 мл.

Для цього готують титраційний ряд пробірок з 9 мл фізіологічного розчину. У першу пробірку ряду вносять 1 мл досліджуваного зразка, перемішують і переносять у наступну пробірку 1 мл. Таким чином титрують далі. У кінцевому рахунку одержують розведення 1:10, 1:100; 1:1000 і т. д. Як правило на чашки Петрі висівають не менше двох розведень, кожне з яких у 2-х повторях.

Спочатку на дно стерильної чашки Петрі вносять краплинами 1 мл досліджуваної води або відповідного розведення і заливають 15 мл розплавленим та охолодженим до 45°C МПА. Обережно круговими рухами перемішують, не допускаючи попадання середовища на кришку чашки Петрі та не відриваючи її від поверхні стола. Після застигання агару чашки поміщають в термостат при 28°C.

Якщо досліджуваний зразок води містить значну кількість мікроорганізмів, то можна зробити висів газоном 0,2 мл води на поверхню чашки Петрі.

Відповідно до санітарних вимог питна водогінна вода повинна містити не більше 100 мікробних клітин в 1 мл. Мікробне число у воді колодязів та відкритих водойм не повинне перевищувати 1000.

Визначення колі-індексу у зразках води

Мікробне число – кількість мікроорганізмів у літрі води, або в кілограмі продукту чи в грамі ґрунту. Для води централізованого водопостачання цей показник повинен бути не більше 100. Визначають методом висівання на агаризовані середовища, рідше прямим підрахунком під мікроскопом.

Колі-титр – найменший об'єм води (в мл) або щільної речовини (в г), в якому виявляють одну бактерію групи кишкової палички. Визначають бродильним методом або методом мембранних фільтрів. Для централізованої питної води цей показник має бути не менше 300.

Колі-індекс – кількість бактерій групи кишкової палички (колі формних бактерій) у літрі води. **Колі-індекс питної води не має перевищувати 3.** Визначають методом мембранних фільтрів.

Колі-індекс також визначають висівом зразка води на диференційно-діагностичне середовище Ендо. *Escherichia coli* на середовищі Ендо утворює темно-червоні колонії з характерним металевим блиском, тому її легко діагностувати. Наявність кишкової палички свідчить про фекальне забруднення води. Воду висівають безпосередньо в товщу чи на поверхню середовища Ендо, або попередньо концентрують клітини фільтруванням досліджуваного зразка крізь мембранні фільтри.

Якщо через 18-24 год культивування при 37°C виростають червоні колонії з металевим блиском, то ці колонії фарбують за Грамом, мікроскопіюють, перевіряють на наявність оксидази і здатності утворювати газ при рості на лактозі. Виявлення у мазках грамнегативних паличок, газоутворення і відсутність оксидази свідчать про наявність у воді *E. coli*. Розраховують кількість клітин кишкової палички на 1л води.

Відповідно до санітарних норм питна водогінна вода повинна містити не більше 3 клітин *E. coli* в 1л, тобто колі-індекс повинен бути ≤ 3 .

Завдання 8. Провести підрахунок мікроорганізмів, що розвинулися в чашках Петрі і визначити кількість мікроорганізмів в 1 мл води.

Хід роботи:

1. На заздалегідь заготовлених пробірках з 9 мл стерильної води позначають розведення 1:10, 1: 100, потім в 1 пробірку додають за допомогою градуйованою піпетки 1 мл досліджуваної води і ретельно струшують. З 1-ої пробірки (з розведенням 1:10) другою піпеткою переносять 1 мл в другу, де вийде розведення 1: 100 і т. д.

2. З пробірки останнього розведення після перемішування води проводять посів мікроорганізмів. У стерильну чашку Петрі переносять розплавлену на водяній бані живильне середовище в кількості 10 мл (2/3 пробірки), чашку закривають і дають охолонути платівці. Потім з пробірки

останнього розведення стерильною гашеткою беруть 0,2 мл води, піднімаючи кришку чашки, виливають на поверхню пластинки воду з гашетки і розрівнюють її по поверхні, використовуючи стерильний скляний шпатель. Чашку закривають та підписують. Слід дати воді вбратися в пластинку, після чого чашку поміщають в термостат при t 20-25 ° С, поклавши її догори дном, щоб уникнути конденсації пари на кришці.

3. 1 мл води з пробірки останнього розведення виливають на дно стерильної чашки Петрі і зверху заливають розплавленої живильним середовищем, температура якої не повинна перевищувати 45 °С. Чашку закривають і обережним погойдуванням чашки розмішують воду з живильним середовищем, дають охолонути платівці, чашку підписують і поміщають в термостат. Дані поміщають і оформляють у вигляді таблиці на наступному занятті.

Провести підрахунок мікроорганізмів, що розвинулися в чашках Петрі і визначити кількість мікроорганізмів в 1 мл води (середня кількість колоній множать на розведення). Дати санітарну оцінку якості води.

**Вода вважається чистою, якщо зростає від 0-100 - мікробів;
101-1000 - сумнівною;
Від 1000 і більше - непридатною.**

РОЗРАХУНКИ:

Контрольні питання:

1. Методика проведення різних видів змивів.
2. Методи дослідження мікрофлори повітря.
3. Методи визначення мікрофлори ґрунту.
4. Методи визначення мікрофлори води.
5. Колі-титр і колі-індекс. Методика їх визначення.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота №11

ОСНОВНІ ТИПИ БРОДІННЯ. СПИРТОВЕ І МОЛОЧНОКИСЛЕ БРОДІННЯ

Мета: ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками спиртового та молочнокислого бродіння.

Мікробіологічний словник: катаболізм, дихання, бродіння, гліколіз, гомоферментативне бродіння, гетероферментативне бродіння, молочна кислота, пробіотики.

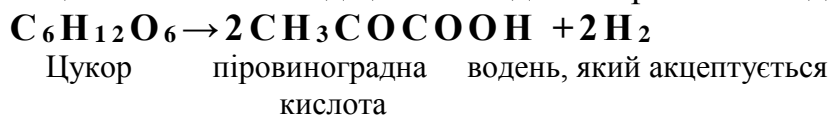
Завдання 1. Ознайомитися з механізмом бродіння.

У мікроорганізмів існує дві основні форми енергетичного обміну (катаболізму) – дихання і бродіння. Як під час дихання, так і під час бродіння відбуваються процеси розпаду поживних речовин, в основному, внаслідок реакції окислення.

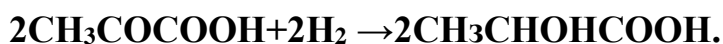
Залежно від умов середовища безазотні органічні речовини розкладаються аеробними або анаеробними мікроорганізмами. Кінцевими продуктами розкладу вуглецевих сполук аеробними мікробами є вуглекислий газ і вода, анаеробними – продукти неповного розкладу (кислоти, спирти тощо). Від основного продукту, який утворився при перетворенні безазотних органічних речовин, насамперед вуглеводів, ці процеси дістали назву: маслянокислого, молочнокислого, спиртового бродіння тощо.

Найчастіше в процесах бродіння мікроби використовують вуглеводи, зокрема глюкозу. Полісахариди, зазвичай, перед бродінням гідролізуються до моносахаридів.

Кожен тип бродіння спричинюється особливою групою мікроорганізмів, і при цьому утворюються специфічні кінцеві продукти. Поряд з цим будь-який вид бродіння можна розглядати як двостадійний процес. Перша стадія включає перетворення глюкози до піровиноградної кислоти. При цьому відбувається розрив ланцюга глюкози і відщеплення двох пар атомів водню:



На другій стадії атоми водню використовуються для відновлення піровиноградної кислоти або утворення з неї сполук. Під час молочнокислого бродіння піровиноградна кислота відновлюється за такою схемою:



В інших видах бродіння (спиртовому, маслянокислому, пропіоновокислому тощо) друга стадія перебігає інакше.

У мікроорганізмів відомо три шляхи перетворення глюкози до

піровиноградної кислоти: перший – шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, або гліколіз, другий – шлях Ентнера-Дудорова. Якщо гліколіз вперше було відкрито у м'язах, дріжджах, а потім і в деяких бактерій, то шлях Ентнера-Дудорова знайдено тільки у бактерій. Нарешті, третій шлях перетворення глюкози трапляється у багатьох мікроорганізмів – це пентозофосфатний шлях, або пентозофосфатний цикл.

Завдання 2. Ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками спиртового бродіння.

Одним із найпоширеніших і достатньо вивчених типів бродіння є спиртове. Спирт – один з найрозповсюдженіших продуктів зброджування вуглеводів мікроорганізмами. Збудники спиртового бродіння широко розповсюджені в природі – особливо у середовищах з високим вмістом вуглеводів.

Для одержання спирту використовують різні мікроорганізми: дріжджі, бактерії *Zyotomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, гриб *Aspergillus oryzae*. Однак важливе практичне значення мають тільки дріжджі. В бродильній промисловості використовують дріжджі з класу сумчастих грибів (*Ascomycetes*) родів *Saccharomyces* та *Shizosaccharomyces*. Дріжджі *Sacch. cerevisiae* – одноклітинні, нерухомі, сферичні, еліпсоїдальні, розміром 8-10 мкм. Клітини багаті на включення: краплі жиру, волютин, глікоген, білкові зерна, оптимальне рН для росту – від 3,5 до 6,5. Розмножуються дріжджі переважно вегетативно: брунькуванням, рідше поділом. Дріжджі є аеробними організмами, їх вирощують на заводах кормових дріжджів та на дріжджзаводах при посиленій аерації. В анаеробних умовах для підтримання своєї життєдіяльності дріжджі зброджують вуглеводи за типом спиртового бродіння.

Дріжджі поширені у природі: вони трапляються на листках, квітках, плодах, на харчових продуктах, у повітрі, ґрунті тощо. Описано понад 200 видів сахароміцетів. Найважливіше значення для людини має *Saccharomyces cerevisiae*. Найхарактернішою ознакою всіх видів дріжджів цього роду є їхня здатність до активного зброджування моно- і дисахаридів з утворенням етилового спирту і CO₂ за такою схемою:



Спиртове бродіння лежить в основі виноробства, пивоваріння, хлібопечення і виробництва спирту.

Оптимальна температура для спиртового бродіння дорівнює 28–35 °С. серед дріжджів, які застосовуються у виробництві, розрізняють – *верхові* (хлібопекарські, спиртові, винні) та *низові* (пивні). На діяльності дріжджів оснований такі виробництва: винокуріння, виноробство, пивоваріння, випікання хліба тощо.

Завдання 3. Виконати практичні завдання по дослідженню процесу спиртового бродіння:

1. Провести якісну реакцію на етиловий спирт.
2. Розглянути дріжджі під мікроскопом.

Хід роботи:

1. Виготовити синтетичне середовище такого складу (г): сахароза – 10; пептон – 1; KH_2PO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,03; вода дистильована – 300 мл. У колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл внести 40 мл середовища (рН 5,5) і близько 1 г пресованих пекарських дріжджів. Колбу закрити гумовим корком з газовивідною трубкою, зважити на вазі з точністю до 0,1 г і помістити в термостат з температурою 30°C на три доби.

2. Виготовити препарат “роздавлена крапля” з додаванням до краплі культури на предметному склі 1 краплі метиленової синьки. Мертві клітини швидко зафарбовуються у синій колір. Підрахувати кількість живих і мертвих клітин дріжджів у полі зору мікроскопа 40×. Відшукати клітини в стадії брунькування і замалювати їх (див. додаток).

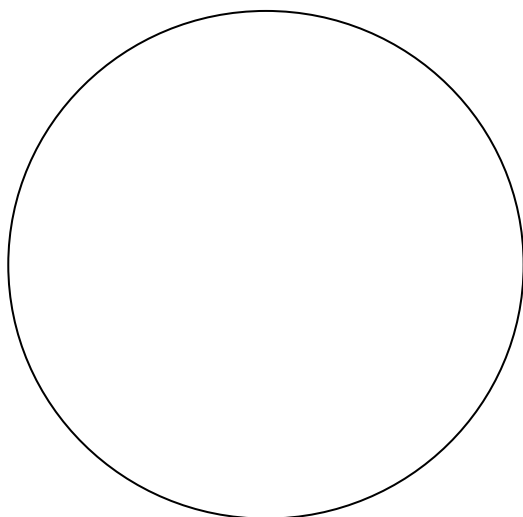
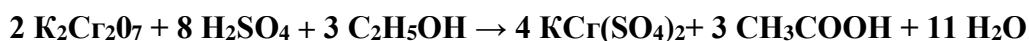


Рисунок 1. _____

3. Якісна реакція на етиловий спирт.

До 1-2 мл бражки додати 1-2 мл концентрованої сірчаної кислоти і по краплях 1%-го розчину біхромату калію, поки оранжеве забарвлення цього реактиву не зміниться на синьо-зелене внаслідок взаємодії біхромату з етанолом за рівнянням:



Спостереження:

Завдання 4. Ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками

молочнокислого бродіння.

Перетворення цукру молочнокислими бактеріями до (переважно) молочної кислоти дістало назву *молочнокислого бродіння*. Збудники цього процесу – молочнокислі бактерії – дуже поширені в природі. Їх можна знайти скрізь: у повітрі, воді, ґрунті, на поверхні овочів, фруктів і, насамперед, у молоці, кишечнику людини і тварин тощо.

Молочнокислі бактерії мають кулясту і паличкоподібну форми, не утворюють спор, нерухливі, грампозитивні. За характером бродіння їх поділяють на дві групи: гомоферментативні, що утворюють при зброджуванні як основний продукт молочну кислоту, і гетероферментативні, які крім молочної кислоти утворюють низку інших продуктів: оцтову і янтарну кислоти, спирт, CO₂ тощо.

Сумарне рівняння гомоферментативного бродіння має такий вигляд:



Загальну схему гетероферментативного молочнокислого бродіння можна подати таким сумарним рівнянням:



Молочнокислі бактерії здійснюють найбільш розповсюджений у природі процес молочнокислого бродіння, який, завдяки консервуючій і стерилізуючій дії, що ґрунтується на підкисленні середовища до значення pH<5 широко використовується в сільському та домашньому господарстві, у молочній промисловості.

Їх представники, що наведені у табл. 1, мають такі основні властивості:

- утворюють молочну кислоту;
- позитивно фарбуються за Грамом;
- не утворюють спори;
- нерухливі;
- коки чи палички;
- вимогливі до джерела азоту;
- не утворюють каталазу;
- анаероби (мають бродильний тип метаболізму);
- аеротолерантні.

При виготовленні кисломолочних продуктів мають місце процеси, в яких бактерії розщеплюють вуглеводи молока з утворенням молочної кислоти та деяких інших речовин. Молочна кислота денатурує білок казеїн, в результаті чого він випадає в осад. В залежності від виду молочнокислих бактерій, а також від властивостей вихідного матеріалу бродіння, одержують той чи інший продукт з характерним смаком, ароматом та іншими властивостями.

Таблиця 1

Бактерії, що здійснюють молочнокисле бродіння

| Форма клітини | Гомоферментативне | | Гетероферментативне | |
|---------------|---|------------------------------|---|------------------------------|
| | Основний продукт – молочна кислота | | Окрім молочної кислоти утворюють значну кількість оцтової, янтарної кислот, етиловий спирт та вуглекислий газ | |
| | Представники | Розповсюдження | Представники | Розповсюдження |
| Коки | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> | Молоко та молочні продукти | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> | Рослини та рослинні залишки |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i> | Кишковик та слизові оболонки | | |
| Палички | <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> | Молоко та молочні продукти | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus viridescens</i> | Рослини та рослинні залишки |
| | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> | Рослини та рослинні залишки | <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Кишечник та слизові оболонки |

При виробництві сиру тверді згустки, які складаються з білка і жирів, відокремлюють від сироватки і потім інокують різними видами молочнокислих бактерій і (або) мікроскопічними грибами. Деякі знамениті сорти сиру визрівають, набуваючи специфічних смакових властивостей, завдяки життєдіяльності різних видів *Penicillium*.

Молочнокислі бактерії застосовують також для приготування різноманітних солонин і маринадів, для сквашування овочів. При цьому рослинна сировина витримується у сольовому розчині, де під впливом спонтанної мікрофлори розпочинається молочнокисле бродіння. Наприклад, у дрібно посічених, посолених та добре спресованих капусті бродіння проходить за участю *Leuconostoc* (з утворенням CO²), а потім *Lactobacillus plantarum*. У розсолі огірків розвивається огіркова паличка *Lactobacillus cucumeris*.

Таблиця 2

Продукти молочнокислого бродіння та культури, що входять до складу заквасок

| Продукт | Культури, що входять до складу заквасок |
|----------------|--|
| Вершкове масло | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> |
| Сметана | <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> |
| Йогурт | <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> |
| Кефір, кумис | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> дріжджі <i>Torula</i> |
| М'які сири | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> |
| Тверді сири | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> |

Молочнокислі бактерії, що мешкають на рослинах відіграють основну роль при силосуванні кормів. Вони зброджують цукри рослин до молочної і частково оцтової кислот, знижуючи рН соковитих кормів до 4,2-4,0. Це призводить до пригнічення розвитку гнилісних та інших бактерій, що спричиняють псування кормів. Для силосування сировина повинна мати достатній вміст цукрі, тому інколи додатково додають мелясу. Важливо також створити анаеробні умови шляхом пересування кормів.

Недотримання умов силосування кормів, технології виготовлення та вимог до зберігання кисломолочних продуктів та сквашених овочів сприяє розвитку інших мікроорганізмів та пригніченню молочнокислих бактерій. За таких обставин у складі мікрофлори розсолів тощо можлива присутність дріжджів, дріжджоподібних грибів (*Oidium lactis* – молочна цвіль), гіфальних грибів, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій, бацил, мікрококів та ін.

Молочна цвіль окислює молочну кислоту, яку продукують бактерії, до CO₂ та H₂O. При цьому знижується кислотність, що створює сприятливі умови для розвитку гнилісних бактерій. Показниками якості молочнокислих продуктів є наявність активної мікрофлори та молочної кислоти.

Завдання 5 Виконати практичні завдання по дослідженню процесу молочнокислого бродіння:

1. Визначити кількість утвореної молочної кислоти;

2. Провести якісну реакцію на молочну кислоту;
3. Розглянути під мікроскопом молочнокислі бактерії.

Хід роботи:

1. *Визначення кількості молочної кислоти.* У хімічну склянку налити 10 мл кисломолочного продукту і відтитрувати його 0,1 н NaOH у присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Визначити процентний вміст молочної кислоти та кислотність продукту в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$). Обчислення проводити, враховуючи, що 1 мл 0,1н NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, а 1 мл 0,1н NaOH, що йде на титрування 100 мл продукту, відповідає 1°T .

Оцінити якість кисломолочного продукту (кислотність солодкого молока $15-18^{\circ}\text{T}$, кисломолочних продуктів $65-95^{\circ}\text{T}$).

Дослід на молочнокисле бродіння закласти у 2 широких пробірках, в які налити по 10 мл свіжого молока, закрити ватними корками і помістити в термостат при температурі 30°C на 4-5 днів.

На наступному занятті вміст однієї пробірки перелити в колбу на 100 мл (перемішуючи скляною паличкою і поступово ополіскуючи в 20 мл дистильованої води). Додати 2-3 краплі фенолфталеїну і титрувати 0,1н розчином NaOH. Визначити градуси Тернера і кількість утвореної молочної кислоти. За різницею (мг) молочної кислоти в молоці до і після дослідів розрахувати, яка її кількість утворилась при молочнокислому бродінні.

РОЗРАХУНКИ:

2. *Мікроскопування молочнокислих бактерій.* Для вивчення молочнокислих бактерій приготувати мазок з кислого молока. Набрати петлею згусток, розмазати по склі і висушити на повітрі. Мазок зафіксувати сумішшю спирту з ефіром (1:1), кілька разів наливаючи її на предметне скло. При такій фіксації мікроорганізми прилипають до скла а жир розчиняється і вимивається з мазка. Після фіксації препарат зафарбувати метиленовою синькою (протягом 5 хв), розглянути в імерсійній системі і замалювати.

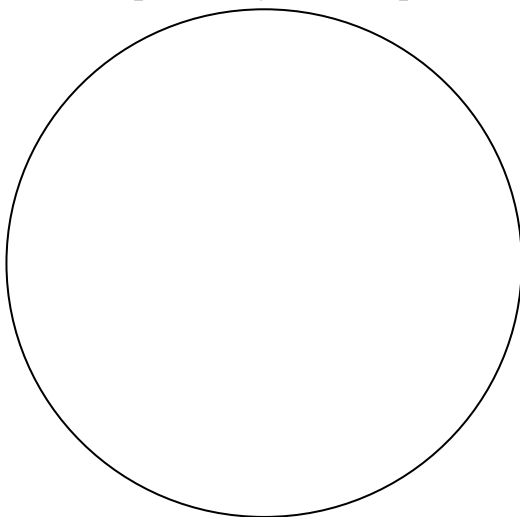


Рисунок 2. _____

Контрольні питання:

1. Суть процесу бродіння. Які розрізняють типи бродіння?
2. Які продукти утворюються в результаті спиртового бродіння? Яке промислове значення має цей тип бродіння?
3. Назвіть збудників спиртового бродіння.
4. Якісна реакція на етиловий спирт.
5. Збудники молочнокислого бродіння. Основні властивості молочнокислих бактерій.
6. Охарактеризуйте типи молочнокислого бродіння.
7. Яким чином визначається кількість молочної кислоти, утвореної в результаті молочнокислого бродіння?
8. Якісна реакція на молочну кислоту.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота №12

ОСНОВНІ ТИПИ БРОДІННЯ. МАСЛЯНОКИСЛЕ І ОЦТОВОКИСЛЕ БРОДІННЯ

Мета: ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками маслянокислого, оцтовокислого бродіння. Ознайомитись з особливостями процесу бродіння пектинових речовин і замалювати збудників

Мікробіологічний словник: масляна кислота, мінералізація органічних решток, пектинові речовини, клітковина.

Завдання 1. Ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками маслянокислого бродіння.

Розклад вуглеводів мікробами з утворенням масляної кислоти та інших продуктів дістав назву *маслянокислого бродіння*.

Типовими збудниками цього виду бродіння є маслянокислі бактерії, які належать до роду *Clostridium*. Ці палички з перетрихальним розміщенням джгутиків у молодому віці є дуже рухливими. З розвитком вони втрачають джгутики, набувають веретеноподібної форми (завдяки кlostридіальному розміщенню спор) і нагромаджують у клітинах гранульозу, яка з йодом дає синє забарвлення.

Маслянокислі бактерії – облігатні анаероби, спороносні,

хемоорганотрофи, дуже чутливі до кислотності середовища (для них оптимальна величина $\text{pH} = 7 \dots 7,3$). Вони зброджують вуглеводи за такою схемою:



Деякі види маслянокислих бактерій мають здатність утворювати фізіологічно активні речовини, а інші – фіксувати молекулярний азот атмосфери. За характером утворення переважної більшості тієї чи іншої речовини серед кінцевих продуктів, маслянокисле бродіння поділяють на такі види: справжнє; ацетонобутилове; бродіння пектинових речовин; анаеробний розклад клітковини.

Маслянокисле бродіння має дуже важливе значення, оскільки його збудники беруть безпосередню участь у процесах мінералізації органічних решток у ґрунті, фіксують азот повітря, використовуються в промисловості для виробництва масляної кислоти. Проте маслянокисле бродіння може задавати й значної шкоди, зумовлюючи загнивання картоплі, овочів і фруктів, силосу, псування сиру, масла, консервів тощо.

Завдання 2. Виконати практичні завдання по дослідженню процесу маслянокислого бродіння:

1. Виявити масляну кислоту;
2. Провести якісні реакції на масляну кислоту;
3. Промікроскопіювати маслянокислі бактерії.

Хід роботи:

1. Пробірку на 1/3 об'єму наповнити картопляним лушпинням (джерело крохмалю і маслянокислих бактерій), внести близько 1 г CaCO_3 для нейтралізації масляної кислоти, яка утворюється в процесі бродіння. Пробірку залити на 2/3 об'єму водопровідною водою і закрити гумовим корком з газовивідною трубкою. Пробірку поставити у водяну баню і витримати 10 хв при температурі 80°C . При цій температурі гинуть всі безспорові форми мікроорганізмів. Після пастеризації пробірку помістити в термостат з температурою 30°C на 2-3 доби.

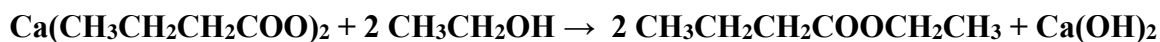
Завдяки елективним умовам: анаеробіозу, наявності джерела вуглецю – крохмалю, який розкладається мікробним ферментом амілазою, знищенню неспороутворюючих мікроорганізмів при пастеризації, забезпечується переважне розмноження маслянокислих бацил.

Після закінчення бродіння у бражці виявити масляну кислоту і розглянути збудників бродіння.

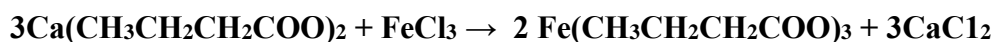
2. Якісні реакції на масляну кислоту. Масляна кислота має характерний запах загірклого коров'ячого молока. Проте при взаємодії зі спиртами утворює складні ефіри з приємним запахом:

Одержання масляно-етилового ефіру (есенції). Для одержання ефіру до 4-5 мл збродженої рідини додати 0,5 мл 96%-ного етилового спирту і 1-2

мл міцної сірчаної кислоти. При нагріванні з'являється характерний запах ефіру. Реакція відбувається за рівнянням:



Реакція з хлоридом заліза (III). Нейтральні розчини бутиратів при нагріванні з FeCl_3 дають коричневе забарвлення. Реакція відбувається за таким рівнянням:



У пробірку налити приблизно 5 мл культуральної рідини і додати 2 мл 5%-ного розчину FeCl_3 . При нагріванні отримують коричневе забарвлення внаслідок утворення бутирату заліза.

3. *Мікроскопування маслянокислих бактерій.* Після закінчення бродіння краплю збродженої рідини перенести на предметне скло і змішати з краплею розчину Люголя, накрити покривним склом, надлишок рідини відтягнути фільтрувальним папером. Препарат розглянути в імерсійній системі мікроскопа. Знайти булавовидні потовщені палички *Clostridium*, у клітинах яких видно спори, і замалювати.

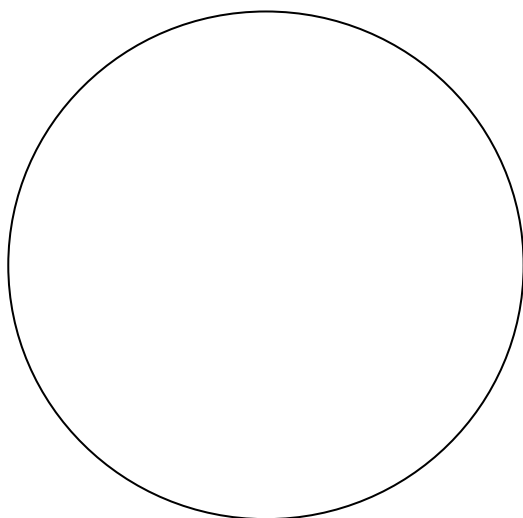


Рисунок 1. _____

Завдання 3. Ознайомитись з особливостями процесу бродіння пектинових речовин і замалювати збудників в робочий зошит.

Пектинові речовини належать до складних цукрів рослин. Основою їхньої будови є ланцюг залишків галактуронової кислоти, з'єднаних один з одним 1,4-глікозидними зв'язками. Відомо три типи пектинових речовин: пропектин, пектин і пектинова кислота. Ці речовини входять до складу первинної клітинної стінки, міжклітинної речовини, клітинного соку. Чимало їх у шкірці та м'якуші яблук, груш, цитрусових, винограду, в листках і коренеплодах.

Мікроорганізми мають здатність розкладати всі три види пектинових

речовин. Вони синтезують три групи екзоферментів: пропектиназу, яка розкладає пектин до розчиненого пектину; пектазу, що гідролізує метилефірний зв'язок пектину з утворенням пектинової кислоти і метилового спирту; полігалактуранази, яка руйнує зв'язки між структурними одиницями галактуранової кислоти, пектину або пектинової кислоти.

Збудники маслянокислого бродіння пектинових речовин (*Clostridium pectinovorum*, *C. felsineum*) – облигатні анаероби, рухливі, спороносні, зброджують пектин, крохмаль, арабінозу, глюкозу, не зброджують клітковину. Цей вид бродіння має важливе практичне значення. На ньому ґрунтується спосіб вимочування льону, конопель та інших прядивних культур.

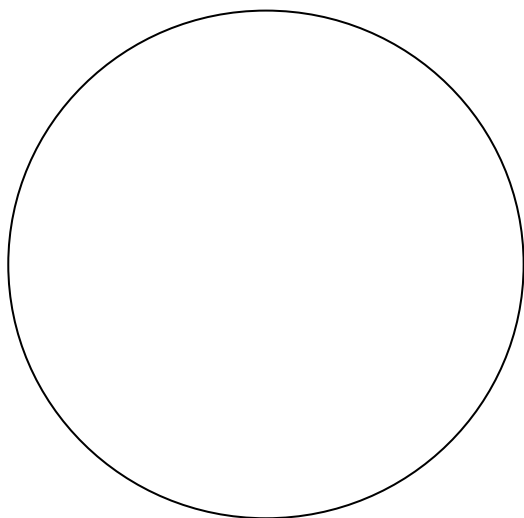


Рисунок 2. _____

Завдання 4. Ознайомитись з особливостями процесу бродіння клітковини і замалювати збудників в робочий зошит.

Основним складником оболонок рослинних клітин є клітковина $(C_6H_{10}O_5)_n$. Вона є найпоширенішим полісахаридом рослинного світу. В ній міститься 50 % усього вуглецю біосфери.

Розклад клітковини в природі відбувається за допомогою бактерій, актиноміцетів, грибів за анаеробних і аеробних умов. По суті бродіння клітковини є особливим видом маслянокислого бродіння. Процес починається з ферментативного гідролізу клітковини під впливом ферменту целюлози, в результаті чого утворюється дисахарид – целобіоза. Остання під впливом ферменту целобіази перетворюється на глюкозу. Глюкоза в анаеробних умовах зброджується за типом маслянокислого бродіння. Схематично ці процеси можна подати так:



Склад кінцевих продуктів значною мірою залежить від мікроорганізмів і умов, у яких вони розкладають клітковину.

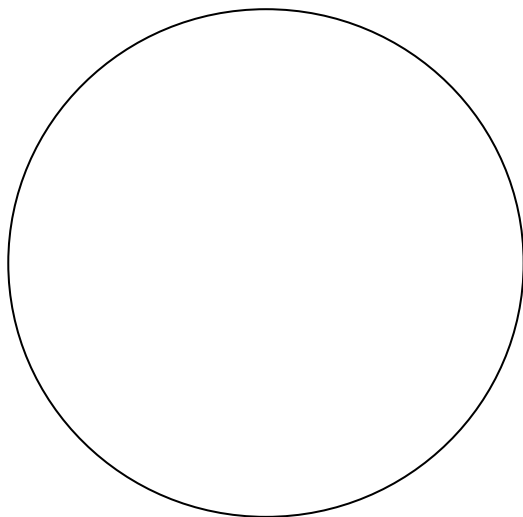


Рисунок 3. _____

Завдання 5. Ознайомитися з особливостями перебігу і збудниками оцтовокислого бродіння.

Перетворення бактеріями етилового спирту на оцтову кислоту є процесом неповного окислення органічних сполук в аеробних умовах. Він відбувається за такою схемою:



Цей процес спричинюється великою групою бактерій, що належать до облігатних аеробів. Це представники роду *Acetobacter*: паличкоподібні, грамнегативні бактерії. Оцтовокислі бактерії повсюдно поширені в природі.

Серед них краще вивчені: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter orleanse*, *Acetobacter schutzenbachii* та інші. Оцтовокислі бактерії використовуються для промислового виробництва оцту з натурального вина або яблучного соку. В інших випадках вони завдають шкоди, оскільки можуть псувати вино, пиво тощо.

Завдання 6. Виконати практичні завдання по дослідженню процесу оцтовокислого бродіння:

1. Одержати елективну культуру оцтовокислих бактерій.
2. Промікроскопіювати оцтовокислі бактерії.
3. Виявити оцтову кислоту.

Хід роботи:

1. В колби Ерленмеєра розлити свіже пиво шаром в 1 см і додати (10% від об'єму пива) 6%-ї оцтової кислоти і 0,5-1,0 мл етилового спирту.

2. Колби закрити ватою і інкубувати 4-5 днів у термостаті при температурі 25-30 °С.

3. Після інкубування на поверхні середовища утворюється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій. З цієї плівки виготовити мікропрепарат "роздавлена крапля", пофарбувати розчином Люголя і вивчити під мікроскопом. *Acetobacter acetiz* забарвлюється йодом у жовтий колір, а *Acetobacter pasteurianum* – в синій.

4. Для визначення наявності оцтової кислоти в пробірку з 5 мл бродильного субстрату додати трошки соди і кілька краплин розчину хлориду заліза (III). Суміш збовтати і нагріти. Виникнення темно-червого забарвлення свідчить про присутність у бродильній рідині CH_3COOH .

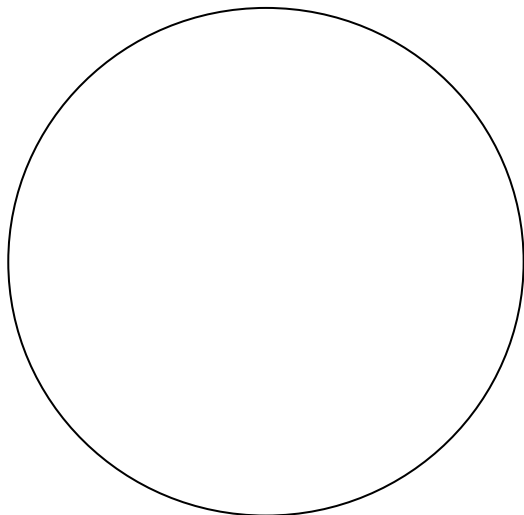


Рисунок 4. _____

Контрольні питання:

1. Назвіть та охарактеризуйте збудників маслянокислого бродіння.
2. Які продукти утворюються в результаті маслянокислого бродіння?
3. Якісні реакції на масляну кислоту.
4. Назвіть і охарактеризуйте збудників бродіння пектинових речовин.
5. Назвіть і охарактеризуйте збудників бродіння клітковини.
6. Назвіть і охарактеризуйте збудників оцтовокислого бродіння.
7. Промислове виробництво оцту.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 13 ПЕРЕТВОРЕННЯ АЗОТУ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Мета: Ознайомитися з процесами перетворення азоту в ґрунті, з процесами амоніфікації та нітрифікації.

Мікробіологічний словник: амоніфікація, нітрифікація, денітрифікація, азотфіксація, бактероїд, вірулентність, ризосфера, асоціативна азотфіксація, бактеріальні добрива.

Завдання 1. Ознайомитися з процесами перетворення азоту в ґрунті.

Молекула азоту є однією із найінертніших. Д. Резерфорд, який вперше (1772) виділив азот з повітря, назвав його нежиттєвим тому, що він не підтримує ні дихання, ні горіння. Проте тепер усім відомо, що азот є необхідною складовою частиною нуклеїнових кислот, амінокислот, білків, фосфоліпідів, численних ферментів і вітамінів, АТФ, НАД і НАДФ та інших важливих сполук усіх живих організмів.

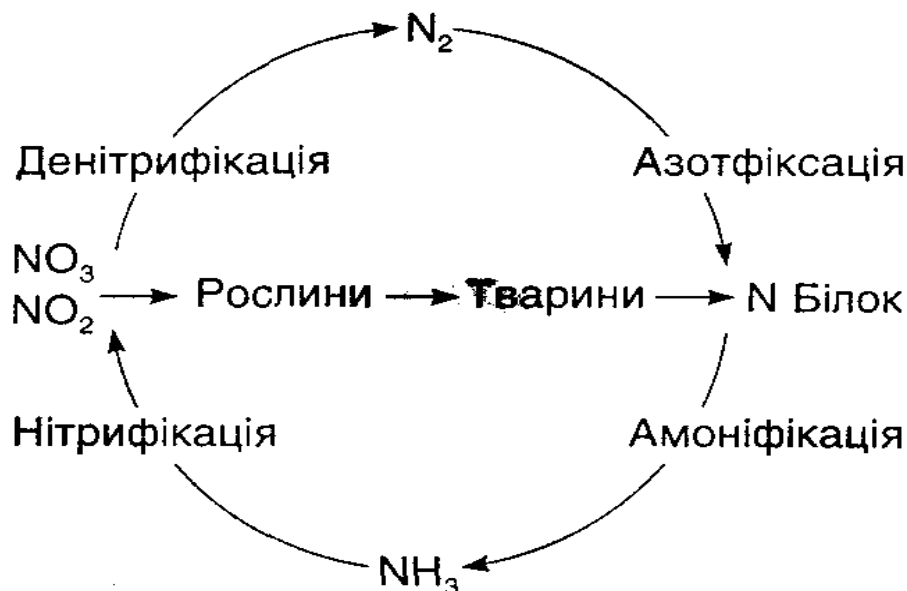


Рис. 1 Схема перетворення азоту мікроорганізмами

Азот є одним із елементів, від якого залежить доля врожаю рослин. У середовищі, яке оточує рослину, азот перебуває у вигляді газоподібної молекулярної сполуки (N_2), що становить близько 80% об'єму повітря, а також у вигляді різних мінеральних і органічних сполук, які містяться в ґрунті, морях та океанах. Зокрема в ґрунті зв'язаний азот трапляється у вигляді солей амонію (NH_4^+), нітратного і нітритного азоту (NO_2^- , NO_3^-), білкового азоту (рештки рослинних і тваринних організмів) і азоту, що входить до складу ґрунтового гумусу.

Перетворення азоту в ґрунті – складний процес. Він відбувається по-різному: гниття білків, або *амоніфікація*; окислення амонійних форм азоту, або *нітрифікація*; відновлення нітратів до молекулярного азоту – *денітрифікація*; *фіксація молекулярного азоту* атмосфери вільноживучими і симбіотичними мікроорганізмами.

Завдання 2. Ознайомитися з процесами амоніфікації.

Амоніфікація білкових речовин.

Амоніфікацію викликають ґрунтові мікроорганізми, бактерії, актиноміцети, цвільові гриби та інші. Мікроби-амоніфікатори виділяють у довкілля протеолітичні ферменти, які розкладають білки до амінокислот. Потім амінокислоти дезамінуються, внаслідок чого утворюються органічні

кислоти, аміак, сірководень та інші продукти розпаду.

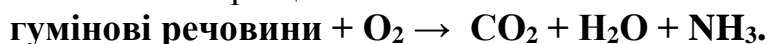
Амоніфікація білків може відбуватися як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Кінцевими продуктами аеробної мінералізації білка є CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S , солі сірчані і фосфорної кислоти. При амоніфікації білків в анаеробних умовах не відбувається їхньої повної мінералізації, тому крім CO_2 і NH_3 утворюється ще низка речовин, наприклад органічні кислоти, спирти, аміни, а при розкладі амінокислот ароматичного ряду ще й фенол, крезол, скатол, індол, які мають дуже неприємний запах.

Регулювання процесів амоніфікації в ґрунті має, насамперед, дуже важливе практичне значення, зокрема для раціонального внесення органічних добрив. Так, при неглибокому внесенні гною та інших органічних добрив виділяється велика кількість аміаку, що спричинює підлугування ґрунту і прискорення амоніфікації. При глибокому внесенні гною, навпаки, анаеробні умови розкладу органічних решток призводять до часткового підкислення середовища, що сповільнює процеси амоніфікації і негативно позначається на кількості та якості врожаю.

При **амоніфікації білків** в анаеробних умовах можуть утворюватися і токсичні речовини, наприклад діаміни, до яких належать кадаверин і путресцин.

Амоніфікацію білків зумовлюють різні види аеробних і анаеробних мікроорганізмів. Особливо активними амоніфікаторами є представники роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*), *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*), *Clostridium* (*C. sporogenes*, *C. putrificus*), *Proteus vulgaris* та інші.

Амоніфікація гумусових сполук – процес дуже повільний. У помірному кліматі протягом року розкладається приблизно 1–3% загального запасу ґрунтового гумусу. Амоніфікацію гумінових речовин мікробами можна зобразити такою спрощеною схемою:



У цьому важливому процесі беруть участь аеробні і анаеробні мікроорганізми.

Розклад нуклеїнових кислот. Під впливом ферментів рибонуклеази і дезоксирибонуклеази, які синтезуються деякими видами грибів, актиноміцетів і бактерій, нуклеїнові кислоти розкладаються до мононуклеотидів. Останні під дією нуклеаз розщеплюються на фосфорну кислоту, цукор, пуринові і піримідинові основи.

Гідроліз сечовини. До поширених у природі азотовмісних сполук належать також сечовина, сечова і гіпурова кислоти, які містяться в сечі людини і тварин.

Розклад сечовини у ґрунті зумовлює особлива група уробактерій. Найенергійнішими збудниками цього процесу є *Micrococcus ureae*, *Sporosagcina ureae*, *Bacillus pasteurii*.

Завдання 3. Ознайомитися із методикою дослідження амоніфікаторів білкових речовин і замалювати їх в робочий альбом (див. додадот).

Хід роботи.

1. У стерильні колби об'ємом 100-150 мл розлити по 30-40 мл м'ясного бульйону з 3% пептоном.
2. Поживне середовище заразити грудочкою ґрунту.
3. Колби закритими ватними корками, під які підвісити стрічки лакмусового паперу, змоченого в дистильованій воді (для виявлення аміаку), і фільтрувального паперу, змоченого розчином ацетату свинцю (для виявлення сірководню і меркаптану). Папірці не повинні торкатися поживного середовища.
4. Колби інкубувати в термостаті 3-4 дні при температурі 28-30 °С.
5. По закінченні інкубації визначити продукти життєдіяльності амоніфікуючих бактерій, визначивши реакції, які відбулися на лакмусовому і фільтрувальному папері (лакмусовий папір синіє в присутності аміаку; сірководень забарвлює смужку фільтрувального паперу в чорний колір; сріблястий наліт на папері вказує на виділення меркаптану).
6. Виготовити із поживного середовища, в якому накопичилися культури мікроорганізмів, фіксований мазок і препарат "роздавлена крапля". Вивчити під мікроскопом і замалювати в робочий альбом збудників амоніфікації білкових речовин.

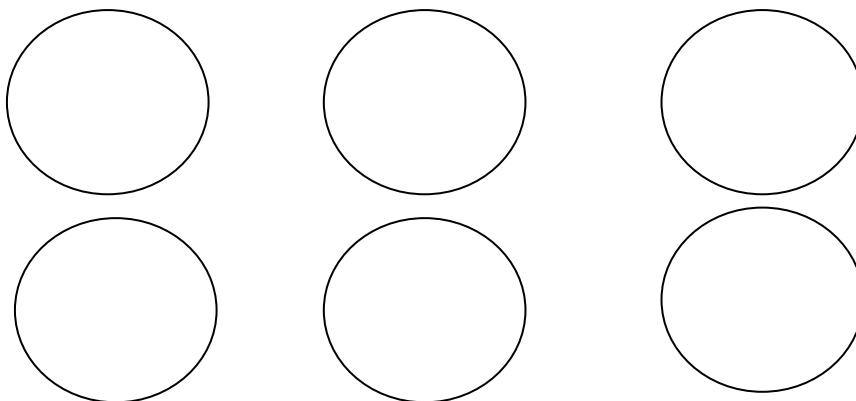
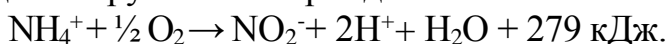


Рис. 2. Найпоширеніші спороносні бактерії-амоніфікатори та їхні колонії:

I – палички; II – колонії (1 – *B. megaterium*; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. mycoides*; 4 – *B. mesentericus*)

Завдання 4. Ознайомитися з процесами нітрифікації.

Процес окислення аміаку і солей амонію в азотну і азотисту кислоти дістав назву *нітрифікації*. Ще Л. Пастер висловив припущення, що цей процес є результатом життєдіяльності мікробів. С.М. Виноградський встановив, що нітрифікація – це процес послідовної дії двох груп мікроорганізмів. Спочатку аміак окислюється однією групою бактерій до азотистої кислоти:



Друга група бактерій окислює азотисту кислоту до азотної:



Першу фазу нітрифікації здійснюють бактерії *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*, другу – *Nitrobacter*, *Nitrospina*. Нітрифікуючі бактерії належать до типових хемолітоавтотрофів і є облигатними аеробами.

Завдання 5. Ознайомитися з процесами денітрифікації.

Відновлення нітратів до молекулярного азоту називається *денітрифікацією*. Цей процес відбувається у багатьох бактерій під час дихання, а тому його ще називають нітратним диханням. Його можна виразити таким рівнянням:



Розрізняють пряму і непряму денітрифікацію: пряма – це результат життєдіяльності особливої групи денітрифікуючих бактерій; непряма відбувається внаслідок хімічних реакцій між азотистою кислотою та амініними і амідними сполуками. Роль мікробів при цьому зводиться тільки до утворення нітратів і аміносполук. Більшість денітрифікаторів належать до родів *Pseudomonas* (*P. denitrificans*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*) і *Micrococcus denitrificans*. Денітрифікація вважається процесом, який збіднює ґрунти на доступні для рослин форми азоту.

Завдання 6. Ознайомитися з процесами біологічної фіксації атмосферного азоту. Замалювати в робочий альбом бульбочкові бактерії.

Запаси газоподібного азоту в атмосфері величезні: над кожним квадратним кілометром земної поверхні в повітрі міститься близько 8 млн. т азоту. Проте цей азот ні для рослин, ні для тварин недоступний. Лише деякі мікроорганізми, які вільно живуть у ґрунті або перебувають у симбіозі з рослинами, можуть засвоювати азот безпосередньо з повітря і будувати з нього білкові сполуки свого тіла.

Процеси зв'язування молекулярного азоту атмосфери мікроорганізмами мають винятково велике значення в азотному балансі ґрунту, підвищуючи значною мірою його родючість.

Відомо два основних природних шляхи зв'язування молекулярного азоту – фізико-хімічний і біологічний. Перший пов'язаний з впливом на молекулярний азот електричних розрядів, які бувають під час грози.

Другий пов'язаний з життєдіяльністю мікроорганізмів, що належать до двох груп: мікроби, які перебувають у симбіозі з рослинами, та азотфіксатори, що вільно живуть у ґрунті та воді.

Бульбочкові бактерії, які живуть у симбіозі з бобовими рослинами, належать до роду *Rhizobium*. У молодих бульбочках вони мають форму рухливих паличок з перитрихальним розміщенням джгутиків. З розвитком бульбочки бактерії втрачають джгутики, стають нерухомими, розростаються і перетворюються на розгалужені форми – так звані *бактероїди*. Дослідження показують, що саме в цій стадії відбувається найінтенсивніше зв'язування бактеріями молекулярного азоту.

Бульбочкові бактерії характеризуються вірулентністю, специфічністю і активністю.

Вірулентність – здатність бактерій проникати в тканину кореня, розмножуватися там і спричиняти утворення бульбочок. Бульбочкові бактерії можуть заражати лише певну групу бобових рослин. Вибіркова здатність їх відносно рослин дістала назву *специфічності*, а здатність у симбіозі з рослинами асимілювати молекулярний азот – *активності*.

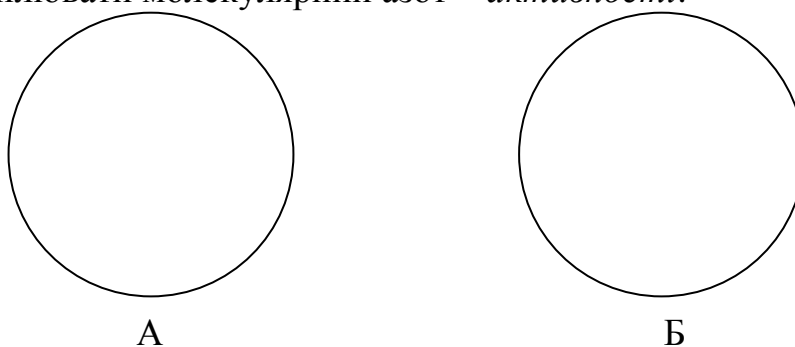


Рис. 3. Бульбочкові бактерії з роду *Rhizobium*:

А – клітини, виділені з бульбочок конюшини; *Б* – бактероїди з бульбочок конюшини

Завдання 7. Дослідити вільноживучі азотфіксатори.

Крім бульбочкових бактерій, у ґрунті є багато інших видів мікроорганізмів, які можуть засвоювати молекулярний азот атмосфери. В 1893 р. С. М. Виноградський вперше виділив і вивчив вільноживучий азотфіксатор – анаеробну спороносну бактерію веретеноподібної форми, яку було названо на честь Л. Пастера – *Clostridium pasterianum*.

Описано багато азотфіксаторів з роду *Clostridium* (*C. buturicum*, *C. acetobutylicum*, *C. pectinovorum*, *C. felsineum*, *C. beijerinckii* та ін.). Ці бактерії можуть використовувати різні джерела азоту: солі амонію і азотної кислоти, а також багато різних органічних азотовмісних сполук. Із вуглецевих сполук вони використовують моноцукри, дицукри, поліцукри, органічні кислоти тощо.

Енергійним фіксатором азоту серед цієї групи бактерій є *Clostridium pasterianum*. Він може зв'язувати до 10–12 мг азоту на 1 г збродженого цукру.

Іншим дуже поширеним вільноживучим азотфіксатором є аеробна, овальної форми, бактерія – *Azotobacter chroococcum*, відкрита у 1901 р. М. Бейєрінком. Серед представників азотобактера найґрунтовніше вивчено *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis*. На відміну від клостридій азотобактер інтенсивніше зв'язує молекулярний азот. Активні культури азотобактера зв'язують 15–20 мг азоту на 1 г використаного цукру або іншої органічної речовини. Він не засвоює клітковини.

Останніми роками вчені різних країн приділяють велику увагу вивченню процесу фіксації азоту мікроорганізмами, які містяться на корінні і в прикореневій зоні небобових рослин. Ці мікроби дістали назву *ризосферних*, а процес зв'язування ними молекулярного азоту називається

асоціативною азотфіксацією. Азотфіксуюча активність виявлена у представників багатьох родів ризосферних бактерій.

Отримання елективної культури *Clostridium pasterianum*

Хід роботи:

1. Виготовити безазотне поживне середовище С.М. Виноградського (г на 1 л дист. води):
глюкоза - 20,0
 K_2HPO_4 - 1,0
 $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5
NaCl - 0,4
2. Розлити середовище по 30-40 мл у конічні колби.
3. Додати до середовища 1/3 чайної ложки ґрунту і 1/4 чайної ложки крейди.
4. Колби інкубувати у термостаті протягом 4-5 днів при температурі 28-30 °С.
5. Виготовити мазок і забарвити його розчином Люголя.
6. Вивчити під мікроскопом з імерсійною системою.
7. Замалювати клітини *Clostridium pasterianum* у робочий альбом.

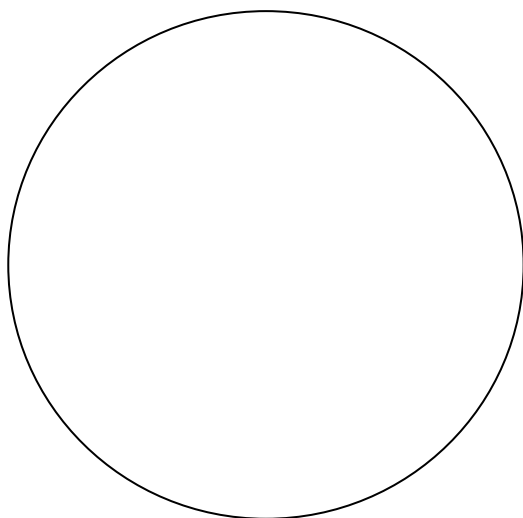


Рисунок 4. _____

Отримання елективної культури *Azotobacter chroococcum*

Хід роботи:

1. Виготовити поживне середовище Ешбі (г на 1 л дист. води):
глюкоза або сахароза - 20,0
 K_2HPO_4 - 0,2
 $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,2
NaCl - 0,2
 K_2SO_4 - 0,1
 $CaCO_3$ - 5,0
2. Стерилізоване середовище розлити у колби шаром у 1,5-2,0 см.
3. Додати грудочку ґрунту і витримати у термостаті при температурі 28-30 °С протягом 5-7 діб.

4. З бурої плівки, яка утворилася на поверхні середовища, виготовити мікропрепарат і дослідити його під мікроскопом.
3. Замалювати диплококи *Azotobacter chroococcum* в робочий альбом.

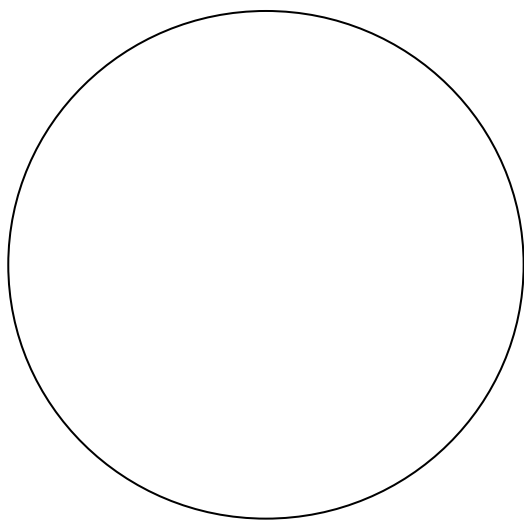


Рисунок 5. _____

Контрольні питання:

1. Які основні етапи включає в себе кругообіг азоту?
2. Процеси амоніфікації. Амоніфікуючі бактерії.
3. Процеси нітрифікації. Назвіть бактерій-нітрифікаторів.
4. Охарактеризуйте процес денітрифікації..
5. Охарактеризуйте процес фіксації атмосферного азоту.
6. Симбіотичні бактерії-азотфіксатори.
7. Вільноживучі азотфіксатори.
8. Методи застосування бактеріальних добрив.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 14

ПЕРЕТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ СПОЛУК ВУГЛЕЦЮ

Мета: Ознайомитися із особливостями перетворення мікроорганізмами сполук вуглецю.

Мікробіологічний словник: фітогенний і зоогенний типи розкладу органічних речовин, целюлозоруйнівні мікроорганізми, аеробне й анаеробне розщеплення целюлози, целюлосоми, середовище Гетчинсона.

Завдання 1. Ознайомитися із особливостями перетворення мікроорганізмами сполук вуглецю.

Вуглець є одним з найважливіших елементів живої природи. Це складова частина всіх органічних речовин. Основним його джерелом є вуглекислий газ (рис. 1)

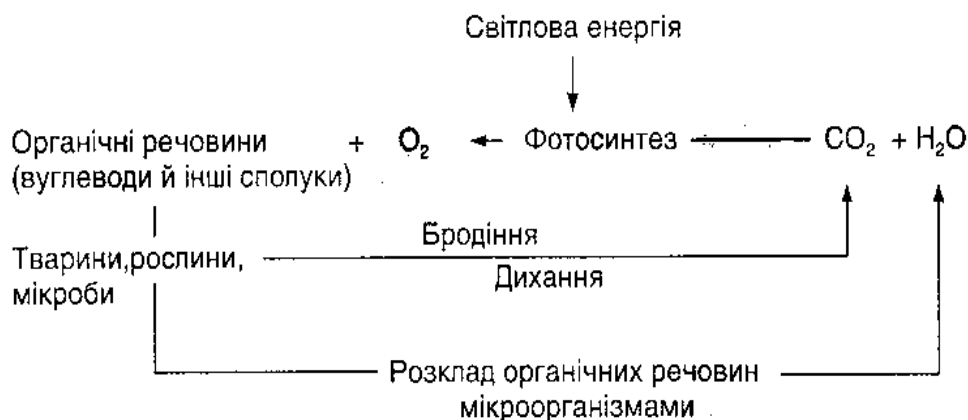


Рис. 1 Кругообіг вуглецю в природі.

Щороку рослинність Землі зв'язує понад 170 млрд т вуглецю, а також мільярди тон азоту, фосфору, сірки, калію та інших елементів. Внаслідок цього синтезується близько 450 млрд т органічних речовин (у перерахунку на глюкозу). Проте основна роль у трансформації органічних вуглецевих сполук, поверненні CO_2 в атмосферу належить мікроорганізмам. Руйнуючи рештки рослинних і тваринних організмів, мікроби їх мінералізують з утворенням кінцевих продуктів CO_2 і H_2O , які знову використовуються зеленими рослинами.

Існують два основні типи розкладу органічних речовин – фітогенний і зоогенний. Перший здійснюється за участю грибів, бактерій, актиноміцетів та інших мікроорганізмів. Зоогенний розклад здійснюють тварини: найпростіші, черви, молюски, різні комахи і навіть ссавці. Основну роль у розкладі органічних речовин відіграє фітогенний тип.

Залежно від умов середовища органічні речовини розкладаються аеробними або анаеробними мікроорганізмами. Кінцевими продуктами розкладу органічних речовин аеробними мікробами є вуглекислий газ і вода, анаеробними – продукти неповного розкладу (кислоти, спирти тощо).

Розклад клітковини: Клітковина – найбільш поширена органічна речовина в природі. До її складу входить понад 50 % усього органічного вуглецю біосфери. Синтезують клітковину переважно вищі рослини, а також окремі види оцтовокислих бактерій (*Acetobacter xylinum*). У деревині міститься понад 50 % клітковини, а у волокнах бавовнику – понад 90 %. За хімічною природою клітковина являє собою полісахарид, молекула якого складається із залишків глюкози (від 300 до 3000), з'єднаних між собою 1,4-зв'язками. Це лінійний високополімерний гомопол і сахарид.

Клітковину розкладають аеробні мікроорганізми (бактерії, актиноміцети, гриби) та анаеробні мезофільні і термофільні бактерії. Для цих

мікроорганізмів характерна висока специфічність до цього полісахариду. Розклад целюлози відбувається як в аеробних, так і анаеробних умовах, у кислому або лужному середовищі, при низькій або високій вологості та температурі.

Аеробний розклад. Цей процес здійснюють бактерії родів *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Polyangium*, *Archangium*, *Sporangium*, *Мухосoccus*, *Cellulomonas*.

Анаеробний розклад здійснюють переважно бактерії роду *Clostridium*. Вони поширені в ґрунтах, гною, мулі, стічних водах та інших середовищах

Розклад клітковини відбувається протягом кількох етапів. Першим етапом є ферментативний гідроліз цього складного полісахариду під впливом ферменту целюлази, який розщеплює (β 1,4-глікозидні зв'язки. При цьому полімерний ланцюг молекули клітковини перетворюється спочатку на дисахарид целобіозу, яка далі під дією ферменту глюкозидази (целобіази) гідролізується до глюкози:



При аеробному розкладі глюкоза перетворюється (переважно) до CO_2 і H_2O . При анаеробному – вона піддається процесу бродіння, в результаті якого утворюються чимало органічних речовин (кислоти, спирти тощо).

Розклад геміцелюлози: Серед вуглецевмісних речовин у природі друге місце за клітковиною посідає геміцелюлоза, яку ще називають ксиланом, коли мономером її є ксилоза. За хімічною природою геміцелюлози – це гетерополісахариди.

У розкладі геміцелюлоз беруть участь набагато більше видів мікроорганізмів, ніж у розкладі клітковини. Це пов'язано з неоднаковим хімічним складом цих сполук у різних рослин. Геміцелюлози рослинних решток активно розкладаються грибами і аеробними та анаеробними бактеріями. До них належать представники родів грибів (*Aspergillus*, *Fomes*, *Polyporus*, *Rhizopus* та інші), актиноміцетів (*Streptomyces*), бактерій (*Bacillus*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Vibrio* та інші).

Розклад лігніну: Лігнін є основною складовою частиною здерев'янілих тканин вищих рослин. Велика його кількість міститься у вторинних шарах клітинної стінки і в міжклітинній речовині. За хімічною природою він є тримірним полімером фенольної природи, зв'язаним з полісахаридами.

В аеробних умовах лігнін можуть розкладати багато представників класу *Basidiomycetes*. У ґрунті є також аеробні бактерії, які належать до роду *Pseudomonas* і мають здатність розкладати лігнін.

Розклад крохмалю: Рослинний крохмаль є високомолекулярним полісахаридом, що складається з великої кількості (від кількох сот до кількох тисяч) залишків глюкози. Крохмаль є найважливішим резервним полісахаридом рослин. Найбільша кількість його міститься в насінні і бульбах.

Розклад крохмалю відбувається під впливом амілолітичних ферментів, які утворюються як бактеріями, так і грибами. Активними продуцентами амілази серед бактерій є *Bacillus macerans* і *Bacillus polymyxa*, а серед цвільових грибів – *Aspergillus oryzae*.

Розклад хітину: Полісахарид хітин є головним структурним елементом твердого зовнішнього скелета комах і ракоподібних, а також клітинної стінки у багатьох грибів. Багато ґрунтових і водних мікроорганізмів мають здатність використовувати цей дуже стійкий і поширений у природі полісахарид, розкладаючи його за допомогою екзоферментів. Близько 50 видів бактерій розкладають хітин. Серед них найкраще вивчено представників родів *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Nocardia* та ін.

Окислення вуглеводнів: Добре відомо, що навіть такі хімічно стійкі органічні речовини, як парафіни, нафта і каучук можуть розкладатися різними мікробами. Вуглеводні цим мікроорганізмам слугують за джерело енергії і матеріал для синтезу структурних компонентів клітини. До активних перетворювачів вуглеводнів належать представники родів *Arthrhabacter*, *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* та інших.

Серед газоподібних вуглеводнів особливе місце належить метану. Він окислюється до метилового спирту бактеріями з родів *Methylomonas*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, що є метилотрофними мікроорганізмами.

Завдання 2. Ознайомитися із особливостями розщеплення целюлози целюлозоруйнівними мікроорганізмами.

Як відомо, на поверхні ґрунту та в його верхніх шарах міститься значна кількість рослинних залишків, а основним компонентом клітинних стінок рослин є целюлоза. Целюлоза виступає енергетичним і конструктивним матеріалом для чисельної групи мікроорганізмів – бактерій (клостридії, міксобактерії), актинобактерій, мікроскопічних грибів. Об'єднувальною ознакою є здатність до ферментативного розщеплення целюлози, яке мікроорганізми здатні виконувати як в аеробних, так і в анаеробних умовах. У присутності кисню целюлоза окислюється до CO_2 та H_2O , і цей процес протікає за участі одного організму. На відміну від аеробного окислення, в анаеробних умовах целюлоза окислюється до CO_2 та CH_4 , і до таких реакцій здатні синтрофні мікробні угруповання. Розщеплення целюлози каталізує комплекс ферментів, які можуть виділятися в оточуюче середовище (екзоферменти) або бути пов'язаними з бактеріальною клітиною і знаходитися всередині целюлосом (ендоферменти). Целюлосоми – спеціальні утворення на поверхні бактеріальної клітини та складаються з поліпептидних субодиниць (целюлозні ферменти) і вуглеводних фібрил.

Завдання 3. Ознайомитися із методикою отримання накопичувальної культури аеробних целюлозоруйнівних мікроорганізмів.

В аеробних умовах розщеплювати целюлозу здатні як еукаріотні мікроорганізми (мікроскопічні гриби родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* та ін.), так і прокаріоти. Це актинобактерії родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та бактерії – *Cytophaga* (довгі палички, злегка зігнуті, з

загостреними кінцями), *Cellvibrio* (рухомі короткі, злегка зігнені палички), *Cellfalcicula* (короткі товсті палички з загостреними кінцями) та ін.

Хід роботи:

1. У стерильні конічні колби ємністю 100-200 мл налити 50-100 мл простерилізованого рідкого середовища Гетчинсона (г/л): K_2HPO_4 – 1, $CaCl_2$ – 0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3, NaCl – 0,1; $FeCl_3$ – 0,01, $NaNO_3$ – 2,5, целюлозний порошок – 5, агар – 20, дистильована вода – 1 л.

2. У колбу внести 0,5-1 г ґрунту та на кінчику скальпеля – крейдяного порошку.

3. Із круглого листка фільтрувального паперу скласти складчастий конус і опустити на дно колби широкою стороною донизу.

4. Колбу закрити ватно-марлевою пробкою та поставити у термостат при температурі 25-26°C на 14 діб.

Завдання 4. Ознайомитися із методикою дослідження целюлозоруйнівних мікроорганізмів.

Через 14 діб уважно роздивитися колбу з накопичувальною культурою целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Найбільш інтенсивно розщеплення фільтрувального паперу відбувалося на межі папір-рідина, де достатньо поживних речовин і кисню для розвитку аеробних мікроорганізмів. В результаті діяльності целюлозоруйнівних мікроорганізмів папір розпадається на окремі волокна, і конус осідає на дно, на самому папері неозброєним оком можна спостерігати слизисті плями жовтуватого або рожевого кольору – результат розвитку мікроорганізмів.

Хід роботи:

1. За допомогою бактеріальної петлі взяти невелику кількість слизу або шматочок напіврозщепленого паперу та розмазати по предметному склу без додавання води.

2. Виготовлений таким чином мазок висушити та зафіксувати у полум'ї пальника.

3. Зафіксований препарат фарбувати барвником фуксин протягом 3-4 хвилин.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору целюлозоруйнівні мікроорганізми різної морфології. Зробити схематичні малюнки.

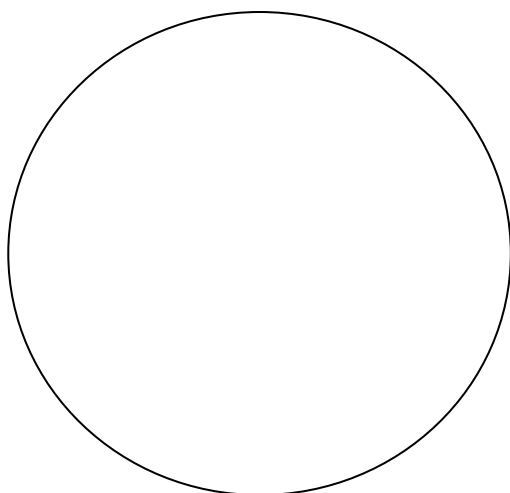


Рисунок 2. _____

Контрольні питання:

1. Які основні етапи включає в себе кругообіг вуглецю?
2. Аеробний та анаеробний розклад клітковини.
3. Які мікроорганізми забезпечують розкладання геміцелюлози, лігніну і хітину?
4. Як розкладаються в навколишньому середовищі вуглеводні?
5. Як отримати накопичувальну культуру аеробних целюлозоруйнівних мікроорганізмів?

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 15-16**ІНФЕКЦІЙНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА ЇХ ПРОФІЛАКТИКА**

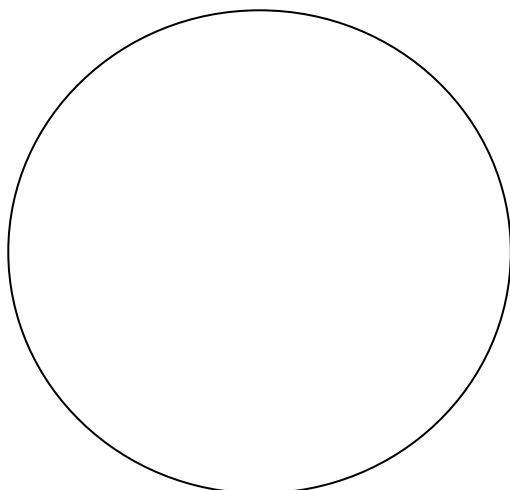
Мета: ознайомлення з захворюваннями бактеріальної природи – харчовими інфекціями та харчовими отруєннями, їх симптомами і шляхами передачі. Вивчення збудників харчових захворювань шляхом їх мікроскопічного дослідження. Ознайомлення із заходами щодо боротьби з харчовими захворюваннями.

Мікробіологічний словник: харчові інфекції, харчові отруєння, патогенні мікроорганізми, інкубаційний період, бацилоносій.

Завдання 1. Виконати практичні завдання по дослідженню патогенних мікроорганізмів.

1. Провести на постійних мікропрепаратах мікроскопію (об'єтив 90х) збудників харчових захворювань: сальмонел, паличок Коха, стафілококів.

2. Замалювати збудників, визначити захворювання, які ними викликаються. Описати прояви псування харчових продуктів через патогенних мікроорганізмів та можливі шляхи захворювання.

**Рисунок 1.**

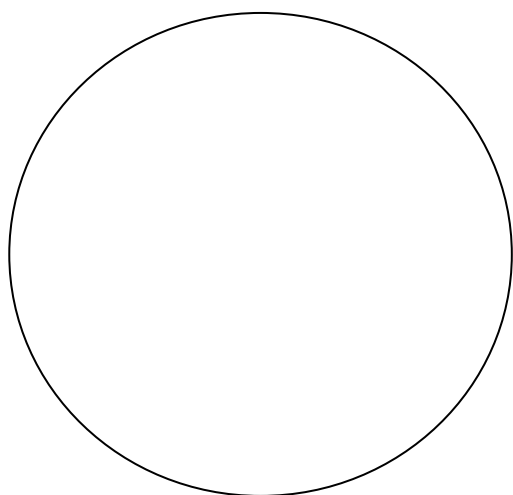


Рисунок 2. _____

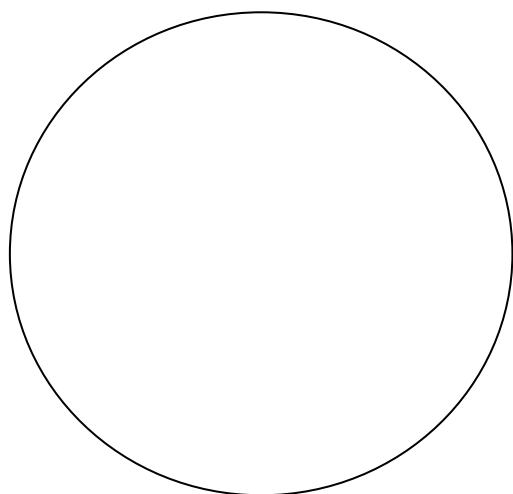


Рисунок 3. _____

Харчовими називаються захворювання, які виникають в результаті вживання недоброякісної їжі. Їх збудниками є патогенні або умовно-патогенні мікроорганізми.

У харчові продукти вони потрапляють з ґрунту, повітря, води, обладнання, з рук працівників, від бацилоносіїв і хворих тварин. За зовнішніми ознаками і походженням харчові захворювання діляться на харчові інфекції і харчові отруєння.

У харчових інфекціях їжа є джерелом передачі інфекції. Інфекційний процес настає в результаті розмноження в організмі людини мікроорганізмів, які надійшли з їжею. Ці захворювання заразні. **Найбільш поширені харчові інфекції – черевний тиф, паратифи, холера, бактеріальна дизентерія, туберкульоз, бруцельоз, сибірка.**

Завдання 2. Вивчити типи інфекційних захворювань та методи їх профілактики

Черевний тиф і паратифи – це гострі інфекційні захворювання людини, що характеризуються інтоксикацією, лихоманкою, ураженням лімфатичного апарату і утворенням виразок в тонкому кишечнику. Збудники черевного тифу і паратифів А і В належать до групи сальмонел (рід *Salmonella*). За морфологічними ознаками вони не відрізняються.

Збудники – невеликі, безспорові, аеробні рухливі палички, які фарбуються грамнегативно. Вони утворюють сильнодіючий ендотоксин. Оптимальна температура дії токсинів 37°C . Збудники в рідинах витримують нагрівання до температури 50°C протягом години. Загибель настає при нагріванні до 65°C протягом 30 хвилин. Кип'ятіння вбиває їх миттєво. Добре витримують низькі температури. У воді ставків зберігаються до 12 діб, в проточній – 4 доби, в мулі – кілька місяців, в м'ясі і салі – до 3 місяців, сирі – 36 днів, житньому хлібі – 30 днів і пшеничному – 2 дня. Середовищем для розмноження є різні напівфабрикати.

Поширення збудника відбувається через різні предмети навколишнього середовища, забруднені спороженнями хворої людини. Заражаються також при вживанні продуктів харчування або води з наявністю збудників.

Інкубаційний період захворювань в середньому становить 14 днів. Ознаки захворювань: сильний пронос, загальна слабкість, висока температура тіла. Після одужання людина тривалий час залишається бацилоносієм.

Холера – гостре карантинне кишкове захворювання. Характеризується ураженням тонкого кишечника і порушень водно-сольового обміну в результаті зневоднення організму. Збудник хвороби – холерний вібріон, рухливий, що не утворює спор, грамнегативний, факультативний анаероб. Гине при нагріванні до 80°C через 5 хвилин, а при 100°C – миттєво. Добре зберігається при низьких температурах. На харчових продуктах залишається життєздатним до 10-15 діб, в ґрунті – до 2 місяців, у воді – кілька діб. Холерний вібріон продукує екзотоксин (холероген), ендотоксин і велика кількість ферментів патогенності.

Зараження людини відбувається при споживанні сирієї води, немитих овочів, фруктів і інших продуктів харчування.

Інкубаційний період триває від кількох годин до 2-3 діб. Перебіг хвороби характеризується наявністю діареї у вигляді «рисового відвару», сильної блювоти. При запізнілому лікуванні – можлива смерть.

Бактеріальна дизентерія – гостре інфекційне захворювання, що протікає з переважним ураженням слизової оболонки товстого кишечника і загальною інтоксикацією. Хвороба характеризується загальною слабкістю, підвищенням температури тіла, проносом, нерідко з домішками і навіть згустками крові. Хвороба викликається різними видами дизентерійних бактерій з роду Шигел. За морфологічними ознаками це палички довжиною до 3 мкм, з закрученими кінцями. Вони нерухомі, грамнегативні, здатні утворювати сильний ендотоксин. Дизентерійні бактерії досить чутливі до дії низьких і високих температур, а також до впливу різних дезінфікуючих речовин. У молоці і молочних продуктах, на поверхні плодів і овочів бактерії здатні виживати до 2 тижнів.

Джерелом зараження є люди, хворі на гостру або хронічну форму дизентерії, а також бактеріоносії. Інфікування відбувається при вживанні води, молока, харчових продуктів, заражених збудниками дизентерії. Інкубаційний період хвороби триває від 2 до 6 днів.

Туберкульоз – різноманітне за своїми проявом інфекційне

захворювання, яке викликають бактерії роду *Mycobacterium*, що належать до актиноміцетів. Це тонкі прямі або ледве зігнуті аеробні палички довжиною 0,5-4 мкм і шириною 0,3 мкм. Вони нерухомі, грамнегативні, не утворюють спор і капсул. Стійкі до дії кислот, лугів, спирту, нагрівання і висушування. У воді, замороженому м'ясі зберігаються до одного року, в жирі – 2 місяці, олії – до 3 місяців. Чутливі до сонячного світла, ультрафіолету, високої температури і при 70 °С гинуть через 10 хвилин, при 100 °С – через 10 секунд.

Джерелом інфекції є хвора людина, а також домашні тварини та птиця. Збудник в організм людини найчастіше проникає повітряно-крапельним шляхом, але можливо аліментарне зараження (через ротову порожнину). Інкубаційний період хвороби може тривати від декількох тижнів до декількох років. Клінічні ознаки хвороби характеризуються дещо підвищеною температурою тіла, загальною слабкістю, кашлем (часто з мокротою).

Бруцельоз – зоонозних інфекційно-алергічне захворювання, супроводжується лихоманкою, ураженням судинної, нервової і статевих систем, опорно-рухового апарату, печінки, селезінки і часто набуває хронічної форми. Збудниками захворювання є бруцели - дрібні кокоподібні, нерухомі, грамнегативні аеробні бактерії, які не утворюють спор і об'єднані в рід *Bricella*. Розміри їх від 0,5 до 1,5 мкм в довжину і 0,4-0,6 мкм завширшки.

Для бруцел характерна висока життєздатність. У харчових продуктах (маслі, сирі, бринзі, замороженому м'ясі) вони здатні залишатися життєздатними протягом декількох місяців. При нагріванні до 60-65 °С гинуть через 25-30 хвилин, при кип'ятінні – через кілька секунд.

Люди заражаються при прийомі їжі, головним чином через молоко і молочні продукти, а також шляхом контакту з тваринами і при обробленні туш. Для людей найбільш небезпечним є збудник бруцельозу овець і кіз. Інкубаційний період триває 1-3 тижні.

Сибірська виразка – гостре інфекційне захворювання, характеризується лихоманкою, ураженням шкіри, лімфатичного апарату, інтоксикацією. Збудник – велика, нерухома, аеробна, спороутворююча грампозитивна пряма паличка довжиною від 4 до 8 мкм і шириною 1-1,5 мкм.

Вегетативна форма нестійка до високої температури і дезінфікуючих засобів. При температурі 75 °С бактерії гинуть через 1-3 хвилини. Спори витримують кип'ятіння протягом 45-60 хвилин, зберігаються в солоному м'ясі кілька місяців, в ґрунті – десятки і сотні років.

Люди заражаються сибірку при прямому контакті з хворими тваринами, через м'ясо і молоко, шкірне і хутрове сировину та вироби з них. Перебіг хвороби можливо в трьох формах: кишкової, легеневої і шкірної. Інкубаційний період триває від кількох годин до 8 днів, частіше все – 2-3 дні.

Завдання 3. Ознайомитися з типами харчових отруєнь і методами їх профілактики

Мікробні харчові отруєння виникають в результаті розмноження в харчових продуктах мікроорганізмів і накопичення токсинів при порушенні санітарно-гігієнічних і технологічних норм виготовлення, зберігання і

реалізації продукції. Харчові отруєння поділяються на харчові токсикоінфекції та харчові інтоксикації.

Харчові токсикоінфекції можливі лише за умови наявності в продуктах значної кількості живих токсигенних мікробів і їх токсинів.

Харчові інтоксикації (токсикози) виникають як наслідок вживання їжі, яка містить мікробні токсини, хоча сам збудник може бути відсутнім.

3.1 Харчові токсикоінфекції

Сальмонельоз – поширені токсикоінфекції, які викликаються різними видами бактерій роду *Salmonella*.

Збудники сальмонельозів – короткі, неспороутворюючі палички, факультативні анаероби. Ростуть при кімнатній температурі, холодостійкі, зберігаються життєздатними при температурі 20 °С. Зупиняється розвиток при рН нижче 5, концентрації кухонної солі 12-15%. Нагрівання до 75 °С протягом 10 хвилин викликає загибель. Причиною токсикоінфекції може бути м'ясо, фарш, птиця, яйця, риба, бацилоносії. Продукти, заражені сальмонелами, смакові якості не змінюють. Інкубаційний період – 6-36 годин. Термостійкий ендотоксин потрапляє в кишечник людини і викликає такі клінічні ознаки: нудоту, блювоту, болі в животі, пронос, посилене серцебиття, загальну слабкість.

Заходи щодо профілактики:

- виявлення і усунення бацилоносіїв;
- виконання вимог санітарно-ветеринарного нагляду до умов забою тварин, первинної обробки та оброблення туш;
- дотримання персоналом правил особистої гігієни;
- виконання гігієнічних вимог, що пред'являються до приміщень, обладнання та готових продуктів;
- термічна обробка продуктів при температурі 100 °С протягом 30 хвилин і зберігання готової продукції в холодильнику при 3-4 °С;
- систематичний мікробіологічний контроль за станом виробництва і продукції.

3.2 Харчові інтоксикації (токсикози)

Стафілококові харчові інтоксикації займають провідне місце серед отруєнь бактеріальної природи.

Збудники – стафілококи. Вони зустрічаються в повітрі, гнійники на шкірі, в носі і гортані людини. Серед патогенних стафілококів представляє особливу загрозу є золотистий стафілокок, який утворює в харчових продуктах ентеротоксин, «кишковий отруту», який викликає отруєння.

Збудник – безспоровий, факультативний анаероб, стійкий до висушування, 12% концентрації кухонної солі і 50% концентрації цукру, рН середовища вище 4,5. Оптимальна температура токсиноутворення – 30-37 °С. При кімнатній температурі в молоці, кашах, рибної та м'ясної кулінарії освіти токсинів може викликати масове отруєння. При цьому продукти зовнішніх ознак псування не мають. Інкубаційний період – 1-6 годин. Ознаки отруєння: нудота, блювота, біль у шлунку, пронос, загальна слабкість.

Заходи щодо профілактики:

- виявлення і усунення бацилоносіїв;
- зберігання продуктів при температурі 3-4 ° С;
- термічна обробка продуктів при 100 ° С протягом 30 хвилин із забезпеченням температури всередині продукту 80 ° С;
- дотримання санітарних норм, які виключають повторне обсіменіння готової продукції.

Ботулізм – важке харчове отруєння, характеризується ураженням центральної нервової системи. Отруєння виникає при вживанні недоброякісної їжі (консервів з овочів, м'яса, грибів, сирокочених окостів, непросоленої копченої риби, ковбас).

Збудник – рухома паличка з плектридіальним спороношенням, схожа на тенісну ракетку. Утворює найсильніший з отрут екзотоксин (нейротоксин) – **ботулін**. Збудник знаходиться в ґрунті, шлунку тварин і риб, на овочах і плодах; строгий анаероб, капсул не утворює, що не розкладає білки, викликає бродіння цукру з утворенням масляної кислоти і газів. Спори гинуть при 120 °С за 10 хвилин, але в заморожених продуктах зберігаються місяцями. Оптимальна температура токсинування 30-37 °С. Токсин стійкий до розсолу, маринадів, копильні речовин, заморожування і соляній кислоті шлункового соку. Інкубаційний період - від 12 до 24 годин і більше. Токсин пошкоджує центральну нервову і серцево-судинну системи. Температура не підвищується, симптоми з боку розлади шлунково-кишкового тракту бувають не завжди, хворий знаходиться в свідомості. Ознаки захворювання: двоїння предметів, втрата слуху і голосу. Смерть настає від паралічу серця або органів дихання.

Ознаки недоброякісних стерильних консервів: видування кришки, скупчення газів, при відкупорюванні – запах масляної кислоти. Причиною отруєння можуть бути консерви без ознак «бомбажу», якщо вони недопастеризовані, мають рН вище 4,3 і зберігаються в теплому приміщенні.

Заходи щодо профілактики:

- ретельне миття сировини;
- суворе виконання технологічних норм соління, маринування, копчення і режиму стерилізації (120 °С протягом 30 хвилин);
- суворе виконання вимог мікробіологічного контролю над технологічним процесом, зберіганням сировини та готової продукції;
- ефективний засіб лікування ботулізму –антитоксична сироватка.

ВИСНОВКИ:

**СИТУАЦІЙНІ ЗАДАЧІ НА ТЕМУ:
ПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ. ХАРЧОВІ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА
ШЛЯХИ ЇХ ЗНЕШКОДЖЕННЯ**

1. У студентському таборі виник спалах захворювання У день захворювання дві групи, де були хворі, обідали не о 14.30, як встановлено за розкладом дня, а о 17.00. Обід для цих груп після приготування зберігався на кухні та перед роздачею був короткочасно розігрітий. Вкажіть можливу причину виникнення захворювання. Як слід чинити з готовими стравами, реалізовувати які одразу після приготування не виявляється можливим?

2. У літньому таборі виник спалах захворювання _____. На обід другою стравою були курчата з гарніром. Курчата варились протягом 30 хвилин. Поясніть причину виникнення захворювання, визначить його. Вкажіть порушення технології приготування других страв.

3. Відмічене групове отруєння при вживанні жареної риби. В осіб, які вживали рибу, захворювання почалось раптово, скаргами на нудоту, блювання, болі в животі. Реалізація готової риби була проведена через 3-7 годин після приготування. Зберігалась вона при температурі 26 °С. Бактеріологічними дослідженнями був виділений _____ з сирої риби та з води, в якій замочували рибу, а також з готової риби. Ідентичні культури виділені з блювотиння та калу хворих. Яка причина захворювання? Вкажіть на порушення санітарно-гігієнічних норм зберігання та реалізації риби.

4. У дитячому колективі на протязі 3 днів захворіло 30 дітей. В усіх захворілих перебіг хвороби був за типом харчового отруєння. З фекалій та блювотиння виділені Шигели Зонне. Встановлено, що сметана, отримана напередодні, зберігалась протягом ночі на кухні при кімнатній температурі. Вранці діти їли її на сніданок. В інших дитячих закладах, де давали сметану з цієї партії, захворілих не було. При отриманні сметани з бази буфетниці допомагала їй сестра. Які порушення мають місце при зберіганні продукту? Вкажіть на ймовірне джерело інфекції. Яких заходів необхідно прийняти для попередження розповсюдження захворювання?

5. У серпні виникла епідемія гострого харчового отруєння серед дітей однієї з груп дитячого садку. В інших групах усі діти здорові. Встановлено, що за 3-4 години до появи ознак захворювання діти їли торт із заварним кремом, виготовлений матір'ю однієї дитини. Торт зберігався на кухні при кімнатній температурі. Із залишків тарту та блювотиння захворілих виділена культура _____. Вкажіть на джерело зараження та порушення умов зберігання продукту.

6. У лікарню прибув пацієнт. Діагноз – _____. Наступного дня виявлено захворювання ще в 6 осіб. Усі хворі були учасниками святкового обіду. На обід були подані різноманітні страви, в тому числі: покупні рибні

консерви, риба копчена, гриби домашнього консервування, торт, морозиво тощо. Висловіть свою думку щодо причини захворювання. Поясніть власні припущення.

ВИРІШЕННЯ ЗАДАЧ:

Контрольні питання

1. Поняття про патогенності і вірулентності мікроорганізмів.
2. Шляхи надходження інфекцій в організм.
3. Захисні властивості організму.
4. Види імунітету.
5. Класифікація харчових захворювань.
6. Особливості харчових інфекцій, їх збудники.
7. Особливості харчових інтоксикацій, їх збудники.
8. Роль збудників харчових інтоксикацій в сфері громадського харчування і в консервному виробництві. Ознаки псування продуктів. Заходи щодо профілактики.
9. Особливості харчових токсикоінфекцій.
10. Путі передачі токсикоінфекцій і заходи щодо їх профілактики.

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 17

ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ОБСІМЕНІННЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ МЕТОДОМ МАЗКА-ВІДБИТКА

Мета: ознайомитися з мікрофлорою м'яса та риби для виробництва м'ясних та рибних продуктів, а також з методами мікробіологічного контролю їх якості.

Мікробіологічний словник: мазок-відбиток, ступінь свіжості м'яса, риби вади м'яса, риби, бактеріологічний аналіз.

Хід роботи:

1. Підготувати мазки-відбитки з поверхні та глибинних шарів м'яса.
2. Розглянути препарати під мікроскопом, замалювати, визначити кількісний та якісний склад мікрофлори.
3. Визначити ступінь свіжості м'яса мікроскопічним методом.
4. Порівняти результати досліджень з нормативами і зробити висновок про якість зразків м'яса, які аналізуються.
5. Оформити результати роботи у вигляді таблиці:

Визначення свіжості м'яса бактеріоскопічним методом

Тканини здорових тварин, як правило, стерильні. На поверхню м'яса мікроорганізми потрапляють з навколишнього середовища при обробленні туші і при їх зберіганні. При порушенні режиму зберігання м'яса мікроорганізми інтенсивно розмножуються і потрапляють всередину тканини. М'ясо, отримане від хворих тварин, може містити умовно-патогенні і патогенні мікроорганізми.

Аналіз мазків-відбитків, отриманих з різних частин м'яса, дозволяє орієнтовно судити про якісний склад мікрофлори і ступень обсіменіння м'яса мікроорганізмами.

Проби м'яса для мікробіологічного дослідження відбирають згідно з вимогами ГОСТу 7269-79 «М'ясо. Методи відбору зразків і органолептичні методи визначення свіжості». З кожної туші відбирають пробу масою близько 200 г (біля розрізу 4 і 5 шийних хребців, а м'язи в області лопатки, з м'язів стегна в товстій частині). З кожної проби готують не менше трьох мазків-відбитків: з поверхневого шару, з глибини 1-2 см і з глибини 2-2,5 см і 3-3,5 см.

Завдання 1. Зробити зріз м'язів м'яса яловичини. Приготувати мазок-відбиток.

Хід роботи:

Щоб приготувати мазок-відбиток, з поверхневого шару стерильними ножицями вирізують шматочки м'яса (0,5-1,0 г) і роблять відбитки на предметному склі.

Якщо готують відбиток з глибоких шарів, то поверхня шматка м'яса

попередньо стерилізують вогнем або ватним тампоном, змоченим в спирті. Потім стерильним скальпелем роблять розріз, розсовують краю розрізу пінцетом, вирізають ножицями шматочки тканини на потрібній глибині і роблять відбитки на предметному склі.

Мазки висушують на повітрі, фіксують, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. Кожен приготований мазок проглядається як мінімум в 5 полях зору. У кожному полі звертають увагу на забарвлення бактерій і підраховують окремо коки і паличкоподібні форми, після чого визначають середньоарифметичне число в одному полі зору.

Таблиця 1

Визначення свіжості м'яса бактеріоскопічним методом

| № зразка | Місце взяття відбитку | Кількість бактерій в полі зору: коки, палички | Морфологічні характеристики виявленої мікрофлори |
|----------|-----------------------|---|--|
| | | | |

Таблиця 2

Оцінка свіжості м'яса бактеріоскопічним методом

| Характеристика відбитка | Ступінь свіжості м'яса |
|--|------------------------|
| Мікрофлора не виявляється або видно поодинокі екземпляри коків, дріжджів, паличок в поле зору препарату, мікрофлора грампозитивна; в мазках з глибоких шарів мікроорганізми майже або зовсім не виявляються. Відсутні залишки розкладання тканини м'яса. | свіже |
| В мазках поверхневого шару виявляється кілька десятків мікроорганізмів, до 30 коків і паличок в поле зору, в глибоких шарах не більше 20-30 бактерій переважно коків. Мікрофлора порівну грампозитивна та грамнегативна. Видно сліди розпаду м'язової тканини. | сумнівної свіжості |
| В поле зору мазків-відбитків з поверхневих і глибинних шарів помітно велику кількість мікроорганізмів (понад 30) переважно паличок, грамнегативні кокові форми майже відсутні, на склі чітко визначаються сліди розкладання тканини. Таке м'ясо неможна вживати. | несвіже |

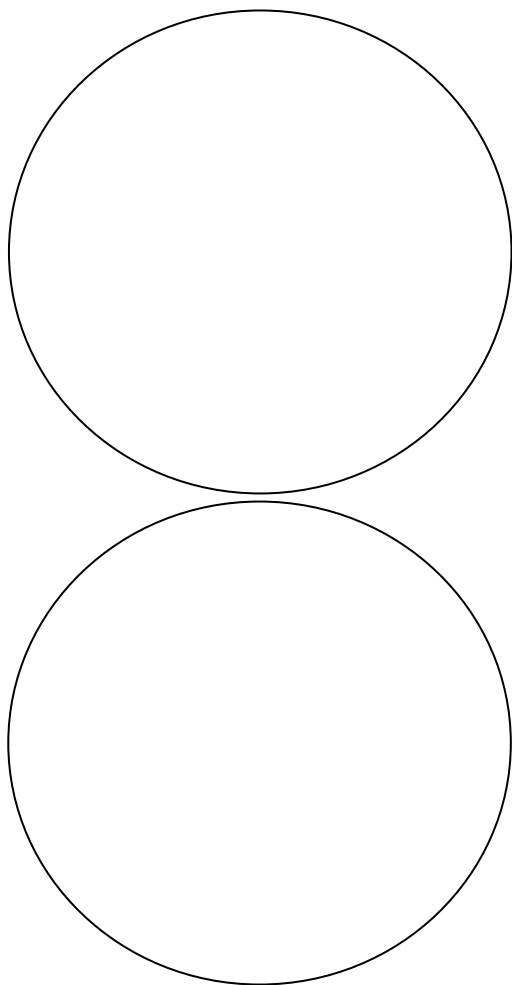


Рисунок 1. _____

Рисунок 2. _____

Вади м'яса

Гниття м'яса починається з поверхні і поступово поширюється в товщу. На початкових стадіях процесу беруть участь переважно кокові форми, а потім їх витісняють паличкоподібні бактерії. При гнильному псуванні м'ясо набуває сірого забарвлення, воно втрачає пружність, ковзає, розм'якшується. З'являється спочатку кислий, а потім неприємний гнильний запах, який посилюється з поглибленням процесу. Жир стає брудно-сірим, слизьким.

Ослизнення - найбільш поширений вид псування остигаючого і охолодженого м'яса. Воно виражається в освіті на поверхні м'яса суцільного шару слизу. Кількість бактерій при цьому досягає мільйонів і навіть мільярдів на 1 см². Найчастіше всі процеси ослизнення відбуваються при температурі від 2 до 10 °С.

Кислотне бродіння супроводжується появою неприємного кислого запаху, м'ясо набуває сірого або зеленувато-сірого кольору. Кислотне бродіння часто виникає в результаті поганого знекровлення туш, а також у разі, коли м'ясо довго не охолоджується.

Пігментація - поява забарвлених плям, пов'язаних з розвитком на поверхні м'яса пігментоутворюючих мікроорганізмів, в результаті чого на поверхні туші виникають червоні плями, а при розвитку дріжджів - біло-сірий наліт.

Пліснявіння зумовлюється зростанням на поверхні м'яса різних грибів. Розвиток цвілі починається з появи паутиноподібного нальоту білого кольору, який легко витирається. Надалі утворюються більш-менш потужні нальоти. Пліснявіння охолодженого м'яса відбувається частіше при підвищеній вологості повітря в камері холодильника.

Завдання 2. Визначити свіжість риби бактеріоскопічним методом

Хід роботи:

1. Підготувати мазки-відбитки з поверхні та глибинних шарів риби.
2. Розглянути препарати під мікроскопом, замалювати, визначити кількісний та якісний склад мікрофлори.
3. Визначити ступінь свіжості риби мікроскопічним методом.
4. Порівняти результати досліджень з нормативами і зробити висновок про якість зразків риби, які аналізуються.
5. Оформити результати роботи у вигляді таблиці:

Завдання 3. Зробити мазки-відбитки з поверхні риби і з глибинного шару м'язів.

Хід роботи:

Мета бактеріоскопічного контролю риби полягає в тому, щоб своєчасно виявити головні осередки обсіменіння і причини їх виникнення. Бактеріологічне дослідження і оцінка якості риби здійснюється наступним чином: спочатку роблять мазок-відбиток з поверхні риби, притискаючи до неї предметне скло; потім спинну частину звільняють від луски, стерилізують, стерильним скальпелем роблять розріз посередині спинки.

На глибині 1-1,5 см вирізають шматочок тканини площею 2 см² і роблять їм відбитки на склі. Предметне скло можна помістити в розріз на потрібну глибину і стиснути його стерильним пінцетом.

Відбиток з одного боку предметного скла видаляють ватою, змоченою в спирті, а з іншого - фіксують, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. Порівнюють з даними наведеної нижче таблиці та роблять висновок про свіжість зразків риби.

Вади риби

Гниття - аналогічно м'ясу.

Пліснявіння - аналогічно м'ясу.

Пігментація солоної риби характеризується утворенням червоного пігменту. Цей порок частіше виникає в пересоленій рибі. Характеризується розм'якшенням тканин і червоним забарвленням.

Омилення характеризується утворенням на поверхні брудно-білого або коричневого нальоту, який легко розмазується. Риба набуває неприємного смаку і запаху. Ця вада часто з'являється в недосоленій рибі.

Таблиця 3

Визначення свіжості риби бактеріоскопічним методом

| № зразка | Місце взяття відбитку | Кількість бактерій в полі зору: коки, палички | Морфологічні характеристики виявленої мікрофлори |
|----------|-----------------------|---|--|
| | | | |

Таблиця 4

Оцінка свіжості риби мікроскопічним методом

| Місце відбору зразка | Свіжа риба | Риба, недавно виловлена, допустима до вживання | Риба зіпсована, непридатна до вживання |
|----------------------|--|--|--|
| Поверхня | Поодинокі мікроорганізми в мазку або в полі зору | Поодинокі мікроорганізми (5-6 в полі зору) | 40 і більше клітин в полі зору |
| Глибинний шар м'язів | Мікрофлора не знайдено | Поодинокі мікроорганізми в препараті | від 10 до 20 і більше в полі зору |

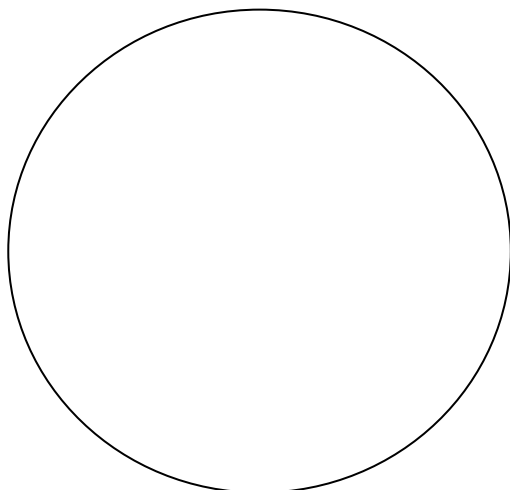


Рисунок 3. _____

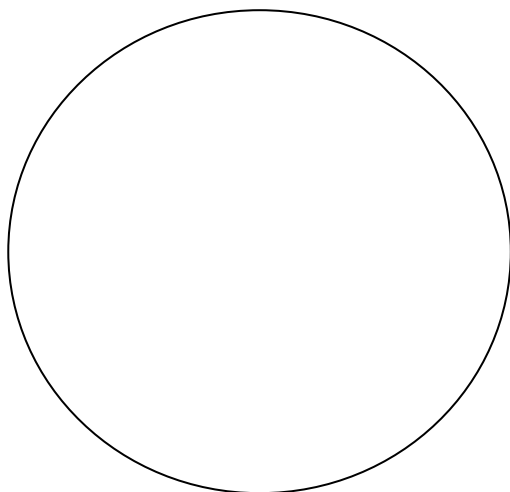


Рисунок 4. _____

Контрольні питання:

1. Шляхи обсіменіння м'ясних туш та риби мікроорганізмами.
2. Характеристика мікрофлори м'яса та риби.
3. Види псування м'яса та риби.
4. М'ясо та риба як джерело інфекційних захворювань людей і тварин.
5. За якими показниками проводиться бактеріоскопічне дослідження м'яса забійних тварин?
6. За якими показниками проводиться бактеріоскопічне дослідження свіжої риби?
7. Як оцінюють свіжість м'яса та риби бактеріоскопічним методом?

ВИСНОВКИ:

Лабораторна робота № 18

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МОЛОКА І КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

Мета: визначення якості молока методами мікробіологічного контролю, ознайомлення з мікрофлорою молока. Вивчення вад молока.

Мікробіологічний словник: мікрофлора молока, редуктазна проба, колі-титр молока, вади молока.

Завдання 1. Визначити якість молока за мікробіологічними показниками.

Молоко – сприятливе середовище для розвитку мікроорганізмів. Вони потрапляють в молоко з вимені корови, рук доярок, апаратів і посуду для доїння, вовни тварин, підстилок і тощо. До складу мікрофлори молока входять

молочнокислі бактерії, стрептококи, дріжджі, спори цвілевих грибів, гнильні бактерії, а також деякі хвороботворні мікроорганізми - черевотіфозні бактерії, золотистий стафілокок, збудник бруцельозу тощо. Серед мікроорганізмів знаходяться і кишкові палички, які потрапляють в молоко в результаті фекального забруднення.

Відбір проб і оцінку якостей молока проводять відповідно до вимог стандарту (ГОСТ-9225-84) «Молоко і молочні продукти. Методи мікробіологічного дослідження». Оцінка якості молока проводиться за трьома показниками: загальна кількість мікроорганізмів в 1 мл молока, коли-титр молока, проба на редуктазу.

Визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл молока

Аналіз загального мікробіологічного обсіменіння може проводитися з метою встановлення мікрофлори молока шляхом мікроскопіювання окремих колоній або визначенням мікробного числа.

Мікробним числом називають кількість мікроорганізмів, які знаходяться в 1 см³ (г) продукту. Розведення готують в пробірках з 9 см³ стерильної води. В першу пробірку вносять 1 см³ молока (перше розведення), потім 1 см³ суміші з першої пробірки переносять в іншу, з другої в наступну (до отримання потрібного розведення). По одній краплі з третього або четвертого розведення наносять на поверхню МПА, стерильним шпателем рівномірно розподіляють по всій площі чашки Петрі. Інкують при температурі 37 °С протягом 2 діб в термостаті, після чого визначають мікробне число, яке розраховують шляхом підрахунку колоній мікроорганізмів.

При великій кількості колоній дно чашки ділять на сектори, підраховують кількість колоній в 4 секторах, знаходять середнє арифметичне і множать на кількість секторів всієї чашки (здобувають загальну кількість колоній, які виросли в одній чашці).

Для підрахунку загальної кількості бактерій в 1 см³ молока число колоній, які виросли в чашці, множать на відповідне розведення і на 20 (в 1 см міститься 20 крапель).

Стандарт на молоко пред'являє такі вимоги за кількістю мікроорганізмів в 1 см³ продукту (пляшкове пастеризоване): молоко групи «А» - не більше 50 000 бактерій в 1 см³; групи «Б» - не більше 100 000, в бідонах і цистернах - не більше 200 000.

Визначення коли-титру молока

Коли-титром називається найменший обсяг або маса продукту, в якому виявлена одна кишкова паличка (іноді це частки грама або міліграма).

Колі-індекс- кількість кишкових паличок в одиниці маси або обсягу досліджуваного продукту.

Для визначення коли-титру молока засівають 6 пробірок на середовище Мюллера (в перші три - по 1 см, в останні три пробірки - по 0,1 см³). Інкубацію проводять в термостаті при температурі 43 °С. Через 24 години переглядають пробірки, відзначають ті, які забродили. Поява газу свідчить про забруднення молока кишковою паличкою.

Бродильним титром називається найменша кількість молока, в якому

виявлено бродіння.

Відповідно до ГОСТу **бродильний титр кишкової палички в молоці групи «А» - 3 см³, групи «Б» і бідони - 0,3 см³**. Патогенні бактерії не допускаються.

Завдання 2. Провести оцінку якості молока редуктазною пробою

Проба на редуктазу застосовується для швидкого визначення бактеріальної чистоти молока без підрахунку кількості бактерій.

Принцип методу. Бактерії, розмножуючись в молоці, виділяють в середу анаеробну дегідрази (редуктазу) - фермент, що володіє відновними властивостями. Кількість виділився ферменту може бути різним і залежить від виду бактерій і їх віку. Однак деяка паралель між кількістю бактерій в молоці і відновної здатністю ферменту відзначається. Для визначення кількості редуктази в молоці до пробі молока додається певна кількість метиленової сині, який під дією редуктази відновлюється до прозорого лейкополуки.

Хід роботи:

У пробірку наливають 0,5 см³ розчину метиленової сині і 10 см³ досліджуваного молока, підігрітого до 40 °С. Все рівномірно розмішують, ставлять у водяну баню при температурі 38-40 °С і спостерігають за зміною кольору суміші. Перші 20 хвилин слід спостерігати за пробами безперервно, а далі досить переглядати через кожні 15-20 хвилин. Закінченням аналізу є повне знебарвлення молока (до уваги не береться наявність кілець блакитного кольору зверху чи знизу). Час від початку аналізу до моменту знебарвлення визначають в годинах і хвилинах: в залежності від тривалості знебарвлення, молоко розділяється на 4 класи (див. таблицю 1).

Таблиця 1

Характеристика класів молока

| Назва показнику | Клас молока | | | |
|---|----------------------|-------------------|----------------------|---------------|
| | I | II | III | IV |
| Час знебарвлювання | більш 5 годин 30 хв. | від 5 до 2 год. | від 2 год. до 20 хв. | менше 20 хв. |
| Якість молока | добре | задовільне | погане | Дуже погане |
| Кількість мікроорганізмів в 1 см ³ | менше 500 тис. | 500 тис. - 4 млн. | 4-20 млн. | більш 20 млн. |

Завдання 3. Дослідити основні вади молока

Гіркий смак. Вада виникає в результаті поїдання тваринами гірких кормів, а також в результаті розвитку мікроорганізмів, частіше спорових паличок, рідше – мікрококи. Гіркий смак з'являється при розвитку гнільних бактерій в охолодженному молоці при тривалому зберіганні.

Прогірклий смак. Викликається, головним чином, флюоресцируючими

бактеріями, які продукують фермент ліпазу. Бактерії-збудники розкладають жири з утворенням масляних кислот, альдегідів, ефірів та інших речовин, які зраджують молоку прогірклий смак. Порок частіше виникає при зберіганні молока на холоді.

Салістий смак. Виникає як наслідок дії ферментів на молочний жир. З'являються сторонні смак і запахи (хлібний, трав'яний). Поява цієї вади пов'язано зі значним розвитком в молоці бактерій групи кишкової палички і флюоресцируючими бактерій. Даний порок частіше виникає при годуванні тварин зеленими кормами.

Молоко, яке згіркло. Вада характеризується посиленням газоутворенням. У сирому молоці збудниками є дріжджі і кишкова паличка, а в пастеризованому - маслянокислі бактерії.

Передчасне згортання молока. Причиною є зміна білків під дією ферментів, які виділяють мікроорганізми (мікрококи, стрептококи). Молоко без підвищення кислотності може згортатися аеробною споровою паличкою.

Тягуче молоко. Вада виникає як без підвищення кислотності, так і при її наростанні. Збудником в першому випадку є безспорова паличка тягучого молока. При цьому молоко стає тягучим, але без утворення згустку.

У другому випадку вада викликається молочнокислими бактеріями, які утворюють слиз при скисанні молока за наступними освітою тягучого згустку.

Червоний колір молока. Виникає як наслідок розвитку на поверхні молока бактерій, які виробляють червоний пігмент, або при попаданні крові.

Синій колір молока. Поверхня забарвлюється в синій колір, який не проникає в глибину. Збудником є безспорова аеробна паличка, яка в молоці не утворює кислоти. Порок виникає в сирому молоці при зниженій температурі зберігання і повільному зростанні кислотності.

Контрольні питання

1. Шляхи проникнення мікроорганізмів в молоко.
2. Вади молока.
3. Зміни мікрофлори молока під час зберігання.
4. Поняття про колі-титр і коли-індекс.
5. Мікробіологічні показники оцінки якості молока.
6. Поняття про мікробне число і його визначення.
7. Визначення бродильного титру.
8. Редуктазна проба, принцип методу та хід аналізу.

ВИСНОВКИ:

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПІДСУМКОВОГО ЗАНЯТТЯ

1. Який показник колі-титру молока буде гіршим за 0,1 см³ або 0,01 см³?
2. Який показник колі-індексу води буде гіршим за 3 або 0,3?
3. Скільки мікроорганізмів буде в 1 г ковбаси вареної (1 гатунку), якщо на двох паралельних чашках Петрі при розведенні 1:100 виросло 47 і 63 колоній?
4. Підрахувати загальну кількість мікроорганізмів в 1 г варено-копченої ковбаси вищого гатунку, якщо на двох паралельних чашках Петрі при розведенні 1: 100 виросло 15 і 23 колонії.
5. Яким буде коли-титр молока, якщо в середовищі Кеслера при розведенні 1:1000 виявлена (після пересіву на середовище Ендо і мікроскопіюванні) кишкова паличка?
6. Підрахувати кількість дріжджів і цвілевих грибів в 1 г моркви свіжої, якщо на двох паралельних чашках Петрі виросло при розведенні 1:100 відповідно 113 і 143 колонії. Яке живильне середовище використовували в цьому випадку?
7. Підрахувати кількість мікроорганізмів в 1 г вершкового масла 72%, якщо на паралельних чашках Петрі з МПА виросло при розведенні 1:100 відповідно 248 і 290 колоній, а при розведенні 1:1000 - 38 і 30 колоній.
8. Підрахувати кількість клітин дріжджів в 1 мл дріжджової суспензії (Сума клітин дріжджів в десяти великих квадратах склала 324, а - середнє число клітин в квадраті, $h = 0,1$ мм, $S = 0,04$ см²) $M = \frac{\alpha \cdot 1000}{h \cdot S}$ за формулою.
Відзначити метод підрахунку.
9. Для визначення загальної забрудненості сметани 20% жирності були зроблені посіви 1г середнього зразка наступних розведень 1:10, 1:100 і 1:1000. Після термостатування на чашках з першим і другим розведеннями виросло дуже багато колоній, які неможливо підрахувати. На паралельних чашках з розведеннями 1:1000 виросло 450 і 702 колонії. Як підрахувати загальну забрудненість сметани 20% жирності? Які будуть Ваші подальші дії?
10. Які чашки Петрі будуть взяті для підрахунку МАФМ в 1 г цукру-піску? При розведенні 1:10 зросла 250 колоній
- "- 1: 100 -" - 38 колоній
- "- 1: 1000 -" - 4 колонії. Розрахувати кількість мікроорганізмів в 1 г цукру-піску.
11. Для яких мікроорганізмів і з якою метою і як користуються камерами Горяєва-Тома?
12. Які чашки Петрі будуть взяті для підрахунку цвілевих грибів і дріжджів в 1 г борошна пшеничного вищого сорту? При розведенні 1:10 виросло 750 колоній
- "- 1: 100 -" - 68 колоній
- "- 1: 1000 -" - 7 колоній. Яка живильне середовище використовується в цьому випадку?

13. Підрахувати кількість МАФАМ в 1 г солі, якщо на чашках Петрі виросло колоній: при розведенні 1:10 - 386, при розведенні 1: 100 - 41, при розведенні 1: 1000 - 3.

14. За якими мікробіологічними показниками можна швидко встановити свіжість м'яса?

15. Яким методом і за допомогою якого апарату можна встановити мікробне число повітря? Що означає мікробне число повітря?

16. Яким методом стерилізують сусло-агар? Для вирощування яких мікроорганізмів застосовують це живильне середовище?

17. На якому рідкому елективному середовищі вирощують кишкову паличку?

18. На яке тверде елективне середовище пересівають проби, які забродили на середовищі Кеслера, для виявлення кишкової палички?

19. Які предмети стерилізують методом фламбування?

20. Назвати режим стерилізації посуду сухим жаром. Де її здійснюють?

21. Назвіть температуру стерилізації в автоклаві при тиску 1 і 0,5 атм.

22. Що являє собою тиндалізація і де застосовується цей метод стерилізації?

23. Відзначте способи холодної стерилізації.

ЛІТЕРАТУРА

Базова

1. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.
2. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 144 с.
3. Гудзь С.П. та ін. Основи мікробіології. – К.: УМКВО, 1991. – 236 с.
4. Гусев М.В., Минева Л.А. Микробиология. – М.: МГУ, 1992. – 448 с.

Допоміжна

1. Айзедман Б.Е., Смирнов В.В., Бондаренко А.С. Фитонциды и антибиотики высших растений. – К.: Наукова думка, 1984. – 277 с.
2. Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Просвещение, 1983. – 127 с.
3. Бойко А.Л. Экология вирусов. - К.: Вища школа, 1990. – 165 с.
4. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. – Л.: ЛГУ, 1989. – 246 с.
5. Джиллер П. Структура сообществ и экологическая ниша. – М.: Мир, 1990. – 120 с.
6. Мусієнко М.М., Серебряков В.В., Брайон О.В. Екологія. Охорона природи. – К.: Знання, 2002. – 550 с.
7. Пяткін К.Д., Криворшеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією. – К.: Вища школа, 1992. – 431 с.
8. Ситнік І.О., Климнюк С.І., Творчо М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1988. – 392 с.
9. Сытник К.М., Брайон А.В., Гордецкий А.В. Словарь-справочник по экологии. – К.: Наукова думка, 1994. – 665 с.

Інформаційні ресурси

1. Електронні підручники з курсу "Мікробіологія з основами вірусології"
2. Періодичні фахові та науково-популярні видання та наукові журнали.
3. Наукові та науково-популярні фільми:
4. "Еволюція мікроорганізмів"
5. "Генетика мікроорганізмів"
6. "Метаболізм мікроорганізмів"
7. "Мікроби і вищі організми"
8. "Мікробна екологія"
9. "Захисна система організму"
10. "Єдність живих організмів"
11. "Мікроби і хвороби"
12. Аудіолекції для студентів з вадами зору.

ДОДАТКИ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2 МІКРООРГАНІЗМІВ І СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. ФОРМИ БАКТЕРІЙ

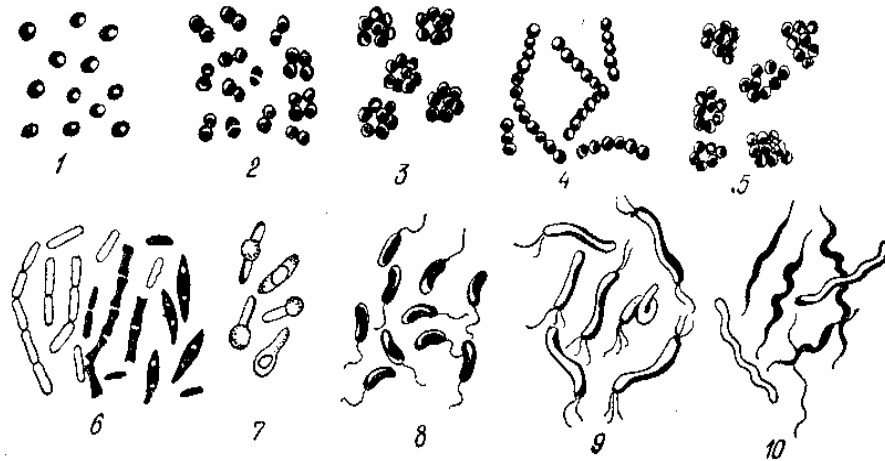


Рис. 1. Основні форми бактерій:

1 – монококи, 2 – дипло- і тетракоки, 3 – сарцини, 4 – стрептококи, 5 – стафілококи, 6,7 – паличкоподібні бактерії, 8 – вібріони, 9 – спірили, 10 – спірохети.

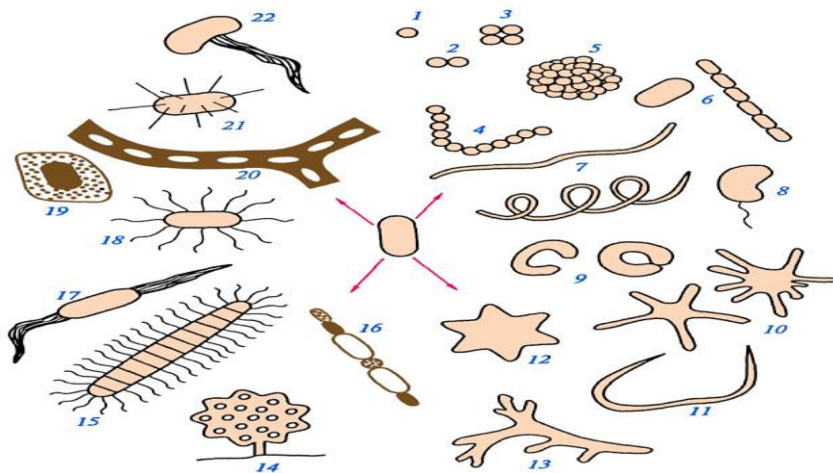


Рис. 2. Різноманітність форм прокаріот:

1 - коки; 2 - диплокок; 3 - сарцина; 4 - стрептокок; 5 - колонія сферичної форми; 6 – паличкоподібні бактерії (поодинокі клітини і ланцюжки клітин); 7 - спірили; 8 - вібріон; 9 - бактерії, які мають форму замкненого або незамкненого кільця; 10 - бактерії, які утворюють вирости (простеки); 11 - бактерія червеподібної форми; 12 - бактеріальна клітина у формі шестикутної зірки; 13 - актиноміцети; 14 - плодове тіло міксобактерії; 15 - нитчаста бактерія роду *Caryophanon* з джгутиками; 16 - нитчаста ціанобактерія, яка утворює спори (акінети) і гетероцисти; 17, 18 - бактерії з різними типами джгутиків; 19 - бактерія, яка утворює капсулу; 20 – нитчасті бактерії типу

Sphaerotilus, які оточені чохлом і інкрустовані гідратом окису заліза; 21 - бактерія, яка утворює шипи; 22 - *Gallionellasp.*

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3 МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ І СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. ФОРМИ БАКТЕРІЙ

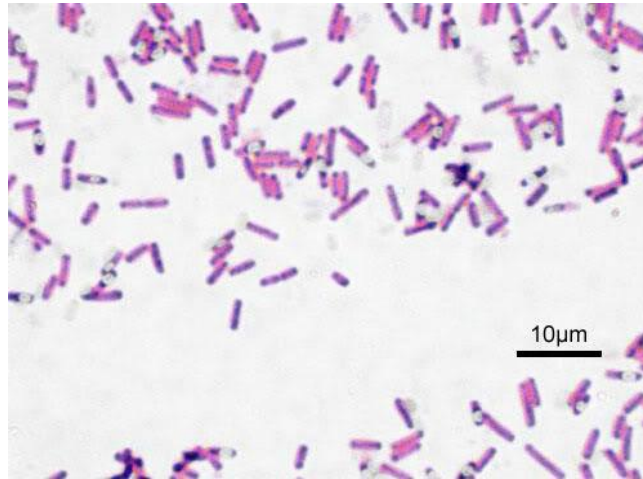


Рис. 1. Фіксований мазок *Bacillus subtilis*

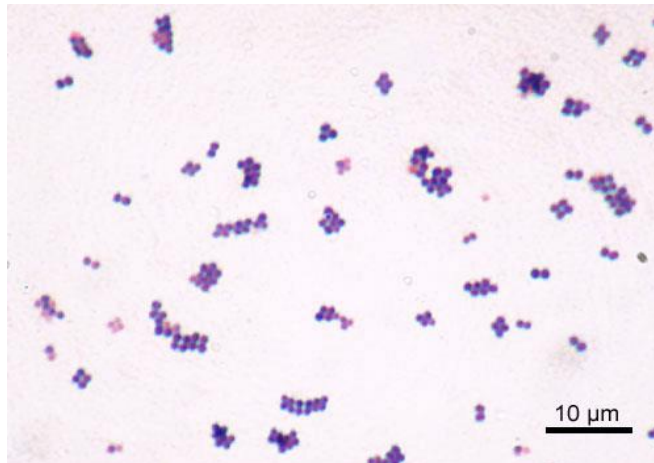


Рис. 2. Фіксований мазок *Staphylococcus aureus*

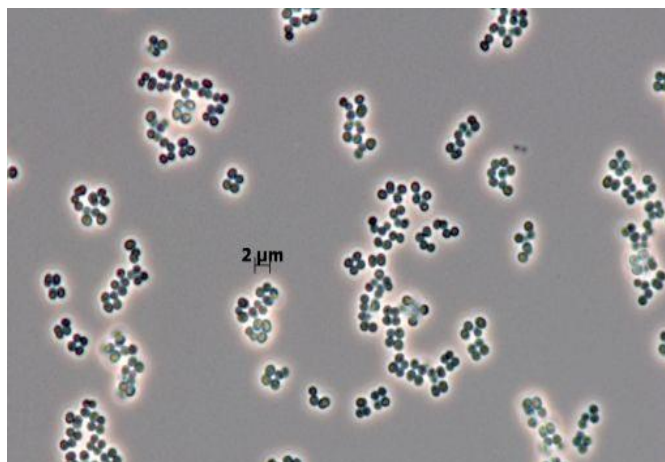


Рис. 3. Фіксований мазок *Sarcina flava*

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4
ГРАМПОЗИТИВНІ ТА ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ.
МЕТОД ФАРБУВАННЯ ЗА ГРАМОМ

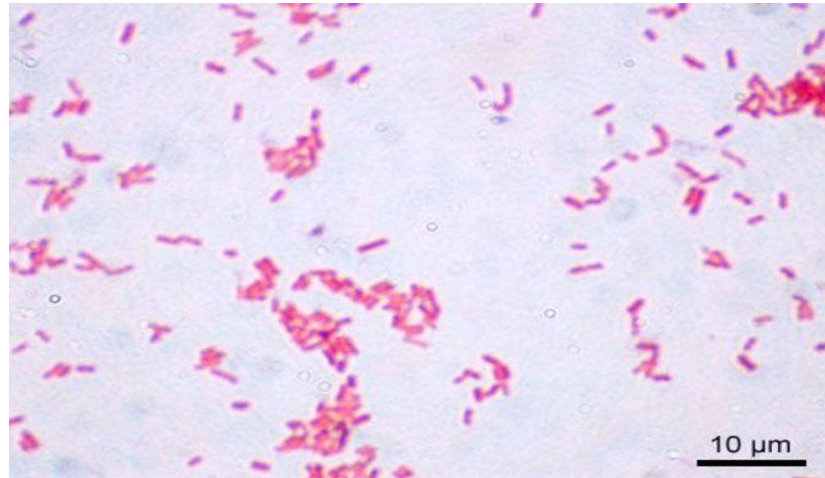


Рис. 1. Кишкова паличка (*Escherichia coli*) – грамнегативна бактерія за формою палички, при фарбуванні за Грамом має розовий колір.

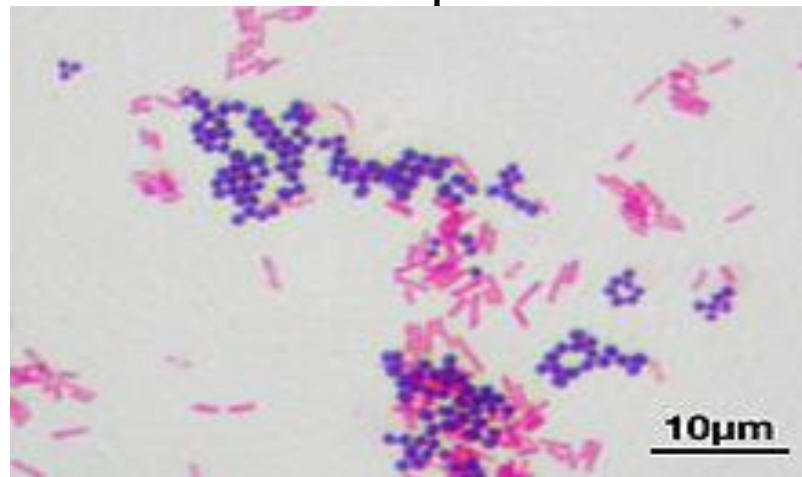


Рис. 2. Забарвлення за Грамом *Staphylococcus aureus* (грампозитивні коки) і *Escherichia coli* (грамнегативні бацили)

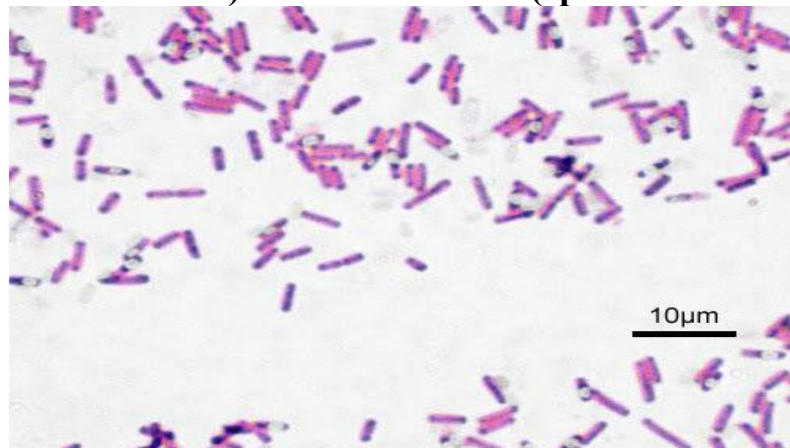


Рис. 3. *Bacillus subtilis* після забарвлення за Грамом

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10
ВИГОТОВЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.
МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Рідке натуральне загальнозживане середовище – пептонна вода

1. Для приготування пептонної води до дистильованої води необхідно додати 1% пептону і 0,5% NaCl або розчинити у дистильованій воді стандартну суміш, виготовлену промисловим способом.
2. Встановити значення рН на рівні 7,2-7,4 розчином NaOH.
3. Прокип'ятити 30 хвилин, знову перевірити рН.
4. У випадку застосування стандартного середовища, суміш прокип'ятити протягом 3 хв.
5. Розчин профільтрувати через паперовий фільтр і простерилізувати при 121 °С (при 1 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

Щільне напівсинтетичне середовище – середовище для дріжджів

1. Для приготування середовища для дріжджів в 1л дистильованої води розчинити солі.
2. Додати агар-агар.
3. Витримати протягом 15-20 хвилин до його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні.
4. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр та розлити у флакони для стерилізації.
5. Середовище простерилізувати при 112°С (при 0,5 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

Компоненти середовища (г/л):

- Сахароза – 20,0
- Пептон – 5,0
- KH_2PO_4 – 3,0
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0
- агар-агар – 20,0

Щільне натуральне середовище – картопляний агар.

1. Для приготування картопляного агару 200 г картоплі (добре помитої та очищеної) подрібнити.
2. Залити 1 л водопровідної води.
3. Кип'ятити протягом 15 хвилин.
4. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водопровідною водою до початкового рівня.
5. Додати 0,2% NaCl і 2% агар-агару.
6. Нагріти при постійному перемішуванні до повного розплавлення агару, при необхідності знову профільтрувати.
7. Встановити значення рН на рівні 7,0.
8. Середовище простерилізувати при 121°С (при 1 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

Лабораторна робота №11
ОСНОВНІ ТИПИ БРОДІННЯ. СПИРТОВЕ І МОЛОЧНОКИСЛЕ
БРОДІННЯ

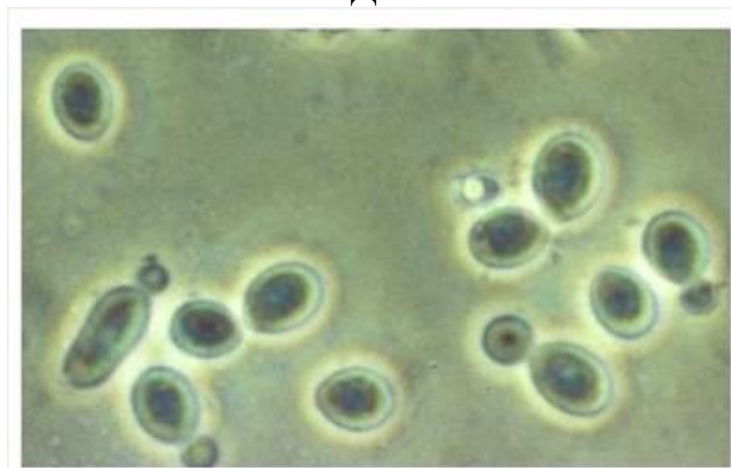


Рис.1. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* в стадії брунькування

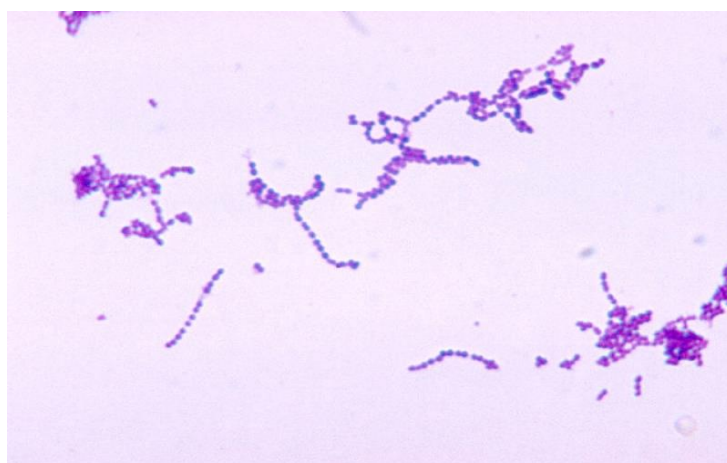


Рис. 2. *Streptococcus lactis*

Лабораторна робота №12
ОСНОВНІ ТИПИ БРОДІННЯ. МАСЛЯНОКИСЛЕ І ОЦТОВОКИСЛЕ
БРОДІННЯ



Рис. 1. *Clostridium butyricum*



Рис. 2. Збудники бродіння пектинових речовин: а – *Clostridium felsineum*; б – *Clostridium pectinovorum*.

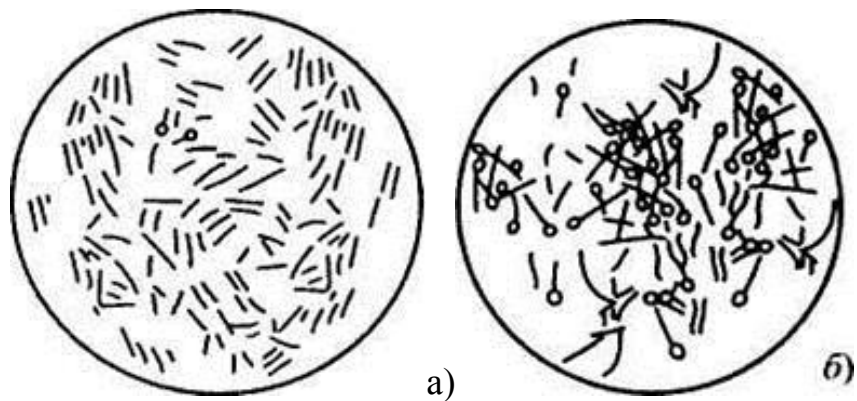


Рис. 3. Збудник бродіння клітковини *Clostridium omelianskii*: а – молоді клітини; б – клітини зі спорами.

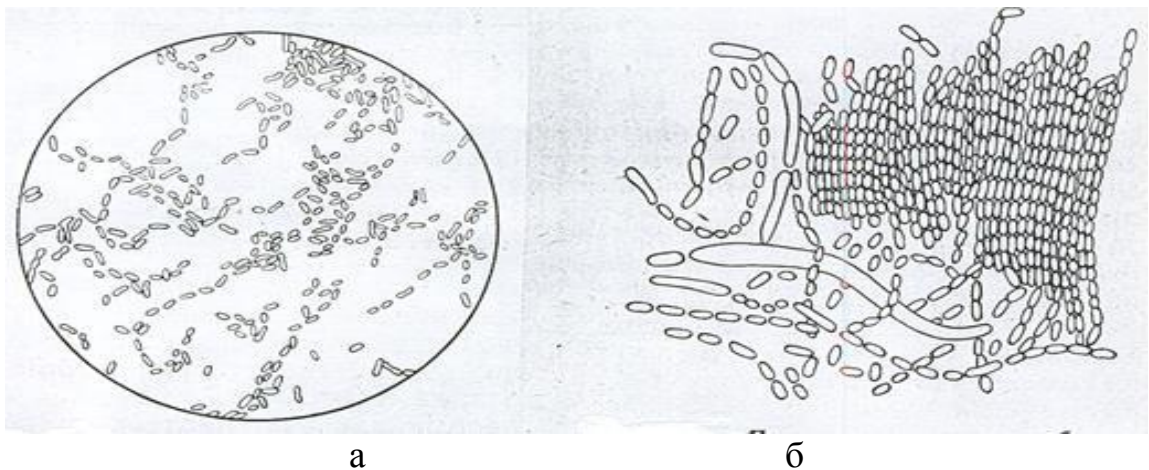


Рис. 4. Збудники оцтовокислого бродіння: а – *Acetobacter aceti*; б – *Acetobacter pasteurianum*

Лабораторна робота № 13
ПЕРЕТВОРЕННЯ АЗОТУ МІКРООРГАНІЗМАМИ

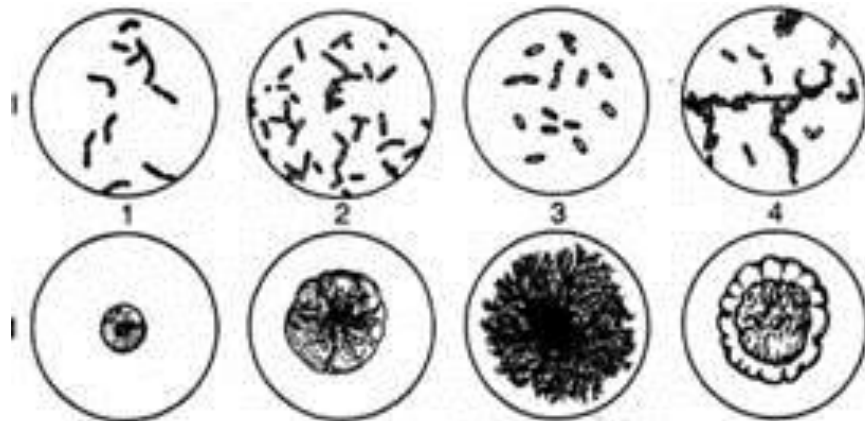


Рис. 2. Найпоширеніші спороносні бактерії-амоніфікатори та їхні колонії:

I – палички; II – колонії (1 – *B. megaterium*; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. mycoides*; 4 – *B. mesentericus*)

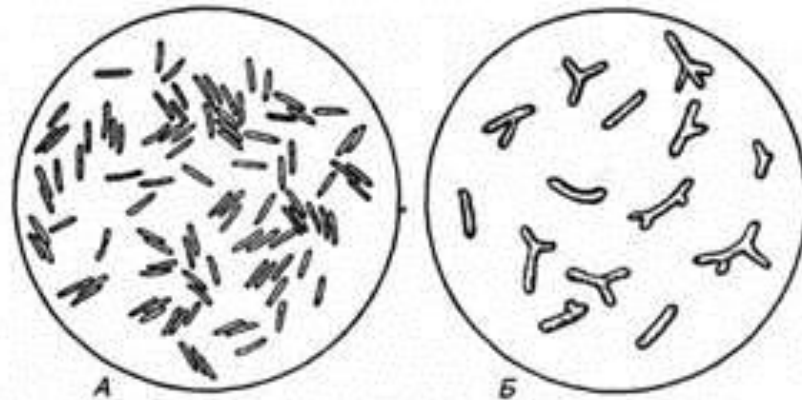


Рис. 3. Бульбочкові бактерії з роду *Rhizobium*:

A – клітини, виділені з бульбочок конюшини; Б – бактероїди з бульбочок конюшини

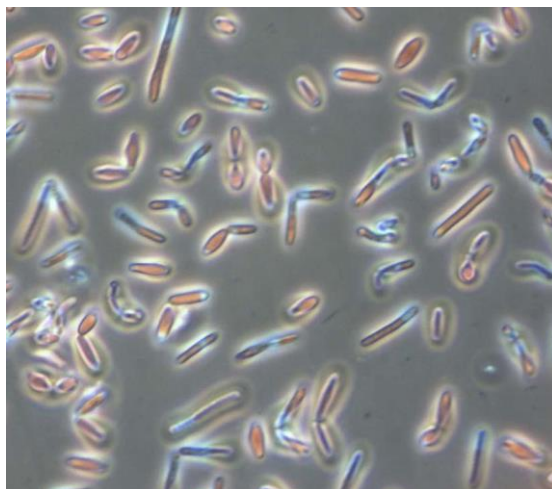


Рис. 4. *Clostridium pasterianum*



Рис. 5. *Azotobacter chroococcum*

Лабораторна робота № 14
 ПЕРЕТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ СПОЛУК ВУГЛЕЦЮ

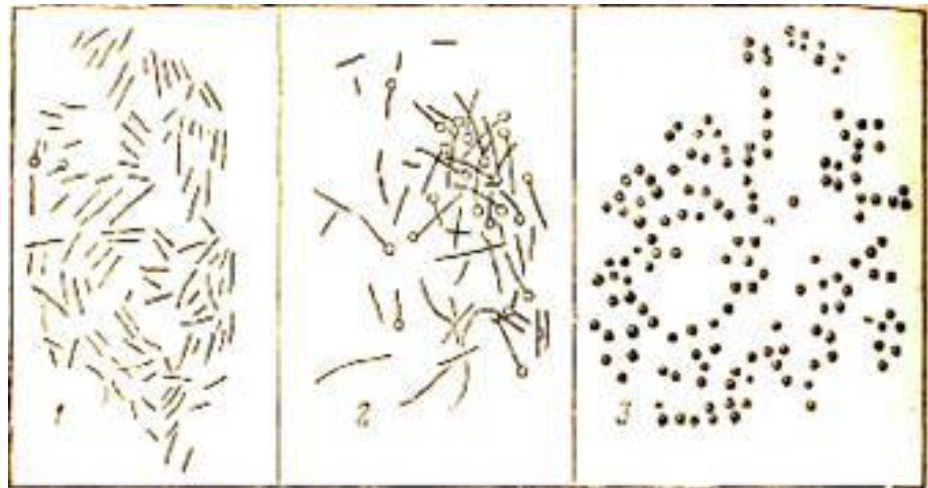


Рис. 1 *Clostridium cellulosa omelianskii*:
 1 – молоді клітини; 2 – «барабанні палички»; 3 – спори.