

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ, САНІТАРІЯ ТА ГІГІЄНА

Методичні вказівки
до лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти першого
(бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за
спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво,
переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)»

Електронний ресурс

Харків – 2025

УДК 579.6(075.8)

М 59

Рецензенти:

Євлаш В. В. – доктор технічних наук, професор, зав. кафедри хімії, біохімії, мікробіології та гігієни харчування Державного біотехнологічного університету;

Литвин О. О. – доктор фізико-математичних наук, професор, в.о. зав. кафедри харчових технологій легкої промисловості і дизайну Навчально-наукового інституту «Українська інженерно-педагогічна академія» Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

*Затверджено до розміщення в мережі Інтернет рішенням Науково-методичної ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 8 від 28 березня 2025 року)*

М 59

Мікробіологія та фізіологія, санітарія та гігієна : методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» [Електронний ресурс] / укладачі І. В. Цихановська, О. В. Александров. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2025. – (PDF 145 с.)

Методичні вказівки для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти спеціальності 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» містять рекомендації щодо виконання лабораторних робіт. Рекомендації складено відповідно до програми дисципліни «Мікробіологія та фізіологія, санітарія та гігієна», яка викладається студентам 2 курсу спеціальності 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» ХНУ імені В. Н. Каразіна. Методичні вказівки допоможуть здобувачам вищої освіти засвоїти теоретичний курс і набути практичних навичок.

УДК 579.6(075.8)

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2025

© Цихановська І. В., Александров О. В., уклад., 2025

ЗМІСТ

Лабораторна робота № 1. « Морфологія та систематика бактерій».....	4
Лабораторна робота № 2. « Морфологія та систематика мікроскопічних грибів».....	20
Лабораторна робота № 3. « Морфологія та систематика дріжджів».....	36
Лабораторна робота № 4. « Методи культування мікроорганізмів. Методика висіву мікроорганізмів. Умови вирощування мікроорганізмів».....	45
Лабораторна робота № 5. « Мікроскопія фіксованого препарату бактерій та висів суміші бактерій на МПА».....	59
Лабораторна робота № 6. « Виділення та ідентифікація чистих культур мікроорганізмів».....	63
Лабораторна робота № 7. « Важливіші біохімічні процеси , які викликаються мікроорганізмами. Елективні (накопичувальні) культури мікроорганізмів. Одержання маслянокислих бактерій. Висів ґрунту в МПБ і кип'ятіння середовища».....	78
Лабораторна робота № 8. « Молочнокислі бактерії . Визначення кислотності молока. Заквашування молока. Виділення елективної культури дріжджів з поверхні ягід винограду».....	91
Лабораторна робота № 9. « Вивчення методів стерилізації».....	96
Лабораторна робота № 10. « Мікрофлора найважливіших груп харчових продуктів».....	102
Лабораторна робота № 11. « Вплив наносуспензійної добавки на основі подвійного оксиду дво- та тривалентного феруму на мікробіологічні показники житньо-пшеничного хліба протягом зберігання».....	113
Лабораторна робота № 12. « Фізіологічне значення основних харчових компонентів . Значення білків, ліпідів, вуглеводів та мінеральних речовин в організмі».....	121
Лабораторна робота № 13. « Будова та функції травної системи ».....	133
Лабораторна робота № 14. « Дослідження впливу хлоридної кислоти на процес перетравлювання білків і дослідження перетравлювання вуглеводів амілазою слини. Дослідження емульгуючої властивості жовчі при перетравлюванні жирів та впливу комплексної дії ферментів соку підшлункової залози. Вплив харчових волокон на процеси травлення».....	137
Література.....	144

Лабораторна робота № 1 **«Морфологія та систематика бактерій»**

Мета: 1. Ознайомитися: з морфологічними особливостями будови мікроорганізмів та шляхами її вивчення; з простими та складними методами пофарбування фіксованих препаратів бактерій.

2. Ознайомитися з культуральними і морфологічними властивостями бактерій і методами їхньої ідентифікації.

План

- 1.1. Приготування препаратів мікроорганізмів
- 1.2. Прості та складні методи пофарбування фіксованих препаратів бактерій
- 1.3. Визначення розмірів мікробної клітини
- 1.4. Пофарбувати бактерії за методом Грама і вивчити препарати під мікроскопом
- 1.5. Вивчення демонстраційних препаратів бактерій
- 1.6. Ідентифікація та морфологія бактерій

1.1. Приготування препаратів мікроорганізмів

Для спостереження мікроорганізмів під мікроскопом необхідно приготувати спеціальні препарати. Існують різні методи приготування препаратів, вибір котрих залежить від об'єкту, а також мети дослідження.

Мікро органічному аналізу підлягають препарати живих (прижиттєвих) та убитих (фіксованих), пофарбованих та непофарбованих мікроорганізмів.

Препарати готують, як правило, на предметному склі товщиною не більш 1,2-1,4 мм. Поверхня скла повинна бути старанно очищена та обезжирена (наприклад, хромовою сумішшю з наступним ополіскуванням водою, обпалюванням поверхні скла у полум'ї пальника). Для приготування препаратів живих мікроорганізмів використовують додатково покривні скельця (товщиною до 0,17 мм), якими накривають препарат. Чисті скельця утримують у сухому стані або у обезжирених рідинах.

Препарати живих клітин

Живі клітини мікроорганізмів можна розглядати під мікроскопом в непофарбованих (нативних) препаратах та препаратах, пофарбованих прижиттєво.

Прижиттєве дослідження мікробів використовується в практичних лабораторіях вельми обмежено, через палу контрастність живих клітин цей метод придатний для вивчення морфології тільки великих мікробів, наприклад, мікроскопічних грибів; прижиттєвих препаратах бактерій досліджують головним чином рухливість клітин.

Існують два основних засобу приготування прижиттєвих препаратів мікроорганізмів: препарат “роздавлена крапля” та “висяча крапля”.

Препарат “висяча крапля”. Невелику краплю суспензії (зависі) мікробних клітин наносять на покривне скло та обережно накладають на нього предметне скло з заглибленням так, щоб крапля повільно розташовувалась у центрі заглиблення. По краям луночку попередньо

змащують вазеліном, препарат перевертають та мікроскопують. Метод використовують головним чином для вивчення рухливості мікроорганізмів.

Препарат “роздавлена крапля”. На предметне скло наносять краплю рідини (при роботі з бактеріями – водопровідну воду, при роботі з мікроскопічними грибами – суміш рівних об’ємів етилового спирту та гліцерину), вносять до неї небагато досліджуваних мікроорганізмів, розміщують та накривають покривним склом. Надлишок вируш енної рідини вилучають фільтрувальним папером.

Вирощувані на густому середовищі бактерії переносять у краплю рідини за допомогою бактеріологічної петлі, але мікроскопічні гриби – двома препоравальними голками. Культура, яка була вирощувана у рідкому середовищі, поміщається на предметне скло стерильною піпеткою без попереднього нанесення краплі рідини.

Мікроскопують препарат, як правило, сухою системою (об’єктиви $8^x, 20^x, 40^x$). Препарат дозволяє встановити форму клітин переважно великих мікроорганізмів, їх розміри, розташування, наявність або відсутність рухливості.

Препарат “роздавлена крапля” прижиттєве пофарбованих мікроорганізмів. До краплі мікробної суспензії на предметне скло додають краплю слабого розчину (1:1000) фарбника (метиленового синього або фуксину), перемішують, потім накривають покривним склом.

Подібним чином рекомендується диференціювати живі та мертві клітини, наприклад, при дослідженні пекарських дріжджів. Мертві клітини звичайно фарбуються швидше та яскравіше за рахунок посмертного підвищення проникливості клітинної оболонки.

Вироблені препарати живих мікроорганізмів поміщують у посудину з дезинфікуючим розчином для знешкодження.

1.2. Прості та складні методи пофарбування фіксованих препаратів бактерій

Препарати фіксованих забарвлених клітин. забарвлення по Граму

В фіксованих препаратах мікроорганізми зафіксовані, тобто вбиті і прикріплені до предметного скла, а потім забарвлені.

Для забарвлення мікроорганізмів використовують анілінові барвники (основні, кислі та нейтральні). Найбільше застосування мають основні барвники: метиленовий синій, основний фуксин, генціанвіолет та ін.; для забарвлення препаратів готують спиртові, водно-спиртові та водні розчини; в деяких випадках додають в якості протравлювача карболову кислоту, луг та ін. Рецепти широко використовуваних барвників наведені в додатку 3.

Забарвлення мікроорганізмів – це складний фізико-хімічний процес, в механізмі якого відіграють роль явища електроадсорбції, капілярності, хімічної спорідненості між барвником та об’єктом. Основні барвники складаються з забарвлюючого катіону та безбарвного аніону. Оскільки бактерії володіють поверхневим негативним зарядом і в них містяться сполуки кислої природи (нуклеїнові кислоти), основні барвники

характеризуються більшою спорідненістю до клітин, ніж кислі барвники, і тому широко використовуються в мікробіології.

Деякі барвники характеризуються вибіркою хімічною спорідненістю до окремих компонентів клітини (ядерній речовині, включенням) в використовуються для їх виявлення. Так, зерна волютіну добре забарвлюються хризоїдином, метиленовим синім, зерна гранульози і глікогену – розчином іоду, зерна жиру – Суданом III.

При світлопольній мікроскопії фіксовані забарвлені препарати мають ряд переваг перед прижиттєвими: 1) високу контрастність; 2) можливість диференційованого виявлення клітинних структур; 3) безпека роботи; 4) довго тривалість зберігання препаратів.

Метод широко використовується при якісних та кількісних мікробіологічних дослідженнях.

Приготування препарату включає етапи: приготування мазка, висушування, фіксацію та забарвлення.

Приготування мазка. На предметне скло наносять краплю водопровідної води, вносять до неї невелику кількість досліджуваного матеріалу, взятого з щільного середовища бактеріологічною петлею, та розмішують (у випадку росту бактерій на рідкому середовищі на скло наносять тільки краплю мікробної суспензії). Мікробну завесь розмазують петлею на площі 2-3 см² тонким шаром.

Висушування та фіксація. Мазок висушують на повітрі, або в струмені теплого повітря над полум'ям пальника, тримаючи скло мазком доверху. Далі охолоджений мазок фіксують в полум'ї пальника: скло з мазком обернутим доверху, проводять 3-4 рази через полум'я. При цьому мікроби гинуть, мазок прикріплюється до скла, забарвлення клітин покращується.

Можлива також фіксація хімічним шляхом (етилловим, метиловим спиртом, сумішшю рівних об'ємів спирту з ефіром та ін.).

Забарвлення препарату. Вона може бути простою і складною. При простих методах забарвлення використовують один барвник. На охолоджений фіксований мазок наносять розчин вибраного барвника. Термін забарвлення аніліновими барвниками 1-3 хв. Потім мазок промивають слабким струменем води, обережно промокають фільтруючим папером і розглядають з імерсією. Використовують метод головним чином для обзорної мікроскопії.

Складні методи забарвлення складаються в послідовному забарвленні двома або декількома барвниками. Ці методи слугують для диференціації видів мікробів за здатністю до забарвлення (тинкторіальні властивості), або для виявлення окремих клітинних структур.

Забарвлення бактерій за методом Грама є диференціальним і широко використовується для визначення видової приналежності бактерій. За цим способом одні бактерії міцно забарвлюються в синьо-фіолетовий колір (грам позитивні бактерії, Гр.+), інші знебарвлюються в процесі забарвлення і виявляються тільки при додатковому забарвленні в червоний колір (грам негативні бактерії, Гр.-).

Спроможність бактерій забарвлюватись за Грамом, очевидно, визначається різницею властивостей та хімічного складу клітинної оболонки і цитоплазматичної мембрани в грам позитивних та грамотригативних бактерій. Грампозитивні бактерії мають трьохшарову клітинну оболонку з низьким вмістом ліпідів; на поверхні цитоплазми цих бактерій розташовується комплекс з білка та рибонуклеату магнію, який при забарвленні за Грамом утворює міцну сполуку з генціанвіолетом та йодом, що не руйнується при обробці спиртом. У грамотригативних бактерій оболонка двохшарова, багата ліпідами, комплекс білка з рибонуклеатом магнію відсутній, що, видимо, пояснює знебарвлення клітин на етапі обробки спиртом.

Техніка забарвлення за Грамом (в модифікації Синева) складається з наступного:

1) на фіксований мазок кладуть сухий фільтруючий папір, просочений генціанвіолетом, наносять на папір 2-3 краплі води і забарвлюють 2 хв.;

2) знімають папір і, не промиваючи препарат водою, наносять на мазок 2-3 краплі розчину Люголя, витримують реактив 1-2 хв.;

3) заливають розчин Люголя і для знебарвлення наносять на мазок етиловий спирт 96° на 30 с.;

4) промивають препарат водою;

5) для додаткового забарвлення наливають на мазок водний розчин фуксину на 1 хв.;

6) промивають препарат водою, промокають фільтруючим папером і мікро скопують з імерсійним об'єктивом.

Бактерії, забарвлені в синій колір, - грам позитивні, в червоний – грам негативні.

Забарвлення спор бактерій

Спора – це клітина бактерій, що знаходиться в спокої, якій властива висока стійкість до фізико-хімічних впливів. Оболонка спор багатoshарова і мало проникна, тому при простому забарвленні бактерій вони залишаються незабарвленими і мають вигляд без колірних включень на тлі материнських вегетативних клітин, що забарвилися. Всі методи забарвлення спор бактерій застосовані на попередньому розм'якшенні оболонки протравою з наступною обробкою концентрованими барвниками.

Техніка забарвлення спор за методом Ожешко:

1) висушений нефіксований мазок заливають 0,5%-вим розчином соляної кислоти і підігрівають високо над полум'ям пальника до з'явлення пари (до 2 хв.);

2) препарат промивають водою, закривають фільтруючим папером і наливають на неї карболовий фуксин Ціля. Забарвлюють 5 хв при нагріванні

над полум'ям;

3) промивають препарат водою;

4) з ціллю знебарвлення занурюють препарат в склянку з 1%-вим розчином сірчаної кислоти приблизно на 2 хв (до помітного знебарвлення мазка);

5) промивають препарат водою і додають метиленовою синню Лефлера протягом 3-5 хв;

б) знову промивають водою, висушують та мікро скопують з імерсією. Бактеріальні клітини забарвлюються в синій колір, спори – в червоний.

1.3. Визначення розмірів мікробної клітини

Вимірювання величини мікроорганізмів проводять під мікроскопом, користуючись окулярною лінійкою (мікрометром). Мікрометр являє скляну круглу платівку, в центрі якої вигравірована шкала з діленнями (50 або 100). Окуляр – мікрометр розташовують в окуляр діленнями вниз, попередньо відгвинтивши очну лінзу. Лінзу згвинчують знову і окуляр вставляють в монокулярний насад мікроскопа.

Робота починається з обчислення ціни ділення окуляра-мікрометра при даному збільшенні мікроскопа. Для цієї мети слугує додаткове пристосування – об'єкт-мікрометр, який являє собою скляну платівку (іноді в металічній оправі) з нанесеною в центрі лінійкою. Лінійка має довжину 1 мм і поділена на 100 ділень, кожне з яких дорівнює 0,01 мм (10 мкм). Об'єкт-мікрометр розташовують на предметному столику і фокусують з тим об'єктивом, при якому будуть визначати розміри клітини. Обертаючи окуляр і переміщуючи об'єкт-мікрометр, суміщають нульову риску окуляра-мікрометра з будь-якою рисою об'єкта-мікрометра і потім знаходять наступне суміщення (рис.1.1).

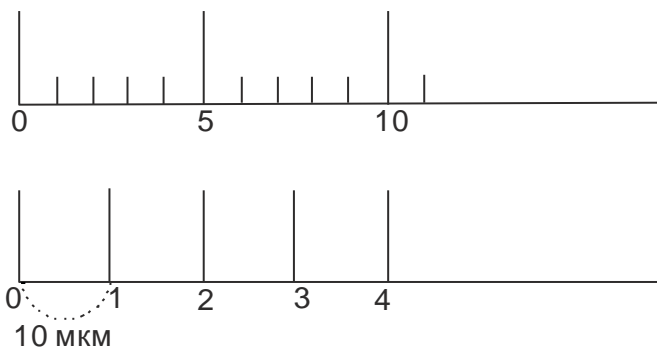


Рис. 1.1. Визначення величини ділення окулярного мікрометра

Обчислюють скільком діленням об'єкту мікрометра відповідає одне ділення окулярного мікрометра. Припустим, два ділення об'єкта мікрометра (20 мкм) відповідають 5 діленням окуляра-мікрометра; відповідно, величина (ціна) одного ділення окуляра-мікрометра дорівнює 4 мкм (20:5).

Знаючи величину ділення окуляра-мікрометра, приступають до визначення величини мікроорганізмів при тому ж збільшенні. Для цього вимірюють, якому числу ділень окуляра-мікрометра відповідають довжина і ширина клітини, і помножують одержані числа на ціну ділення окуляра. Для вірності результату необхідно вимірити не менше 20 клітин і одержати середні розміри.

План:

1. Відповісти на контрольні питання з теми.

2. Пофарбувати за методом Грама фіксований препарат бактерій. Вивчити його під мікроскопом і зарисувати.

3. Подивитися демонстраційні препарати і визначити спроможність бактерій фарбуватися за методом Грама (Гр⁺ або Гр⁻).

Методичні вказівки:

1. Для приготування препарату слід взяти в праву руку бактеріологічну петлю, в ліву пробірку із завісою бактерій. Петлю пропалити в полум'ї пальника, вийняти корок з пробірки, захвативши його мізинцем правої руки, обпалити краї пробірки в полум'ї пальника і внести петлю в пробірку. Охолодити петлю на внутрішній стінці пробірки і захопити краплю завіси. Вийнявши петлю, пробірку затулити корком і поставити в штатив; взяти в ліву руку предметне скло і перенести на нього культуру з петлі. Користуючись методичними вказівками, наведеними раніше у частинах «приготування мазка», «висушування та фіксація», «Забарвлення препарату та бактерій за Грамом», ретельно виконати всі етапи приготування мазка (висушування, фіксацію) та пофарбування по Граму.

Помилки пофарбування можливі при порушенні часу пофарбування генціанвіолетом, недостатньому або значному знебарвленні препарату спиртом, а також при надто густих та нерівномірних мазках. Продивитись препарат з імерсійним об'єктивом, відмітивши в альбомі грам позитивне (синє) забарвлення сарцин та грам негативне (червоне) – кишкові палички.

2. Продивитись демонстраційні препарати, показуючи основні форми бактерій (культури стафілококів, синьої палички, зубної спірохети), а також деякі внутрішньоклітинні включення (зерна гранульози олійнокислих бактерій, пофарбовані розчином Люголя, спори картопляної палички, пофарбовані по Ожешко).

1.4. Пофарбувати бактерії за методом Грама і вивчити препарати під мікроскопом

1. Виготовлення фіксованого пофарбованого препарату бактерій складається з трьох етапів:

а) виготовлення мазка на предметному склі (прийом демонструє викладач); б) фіксація висушеного мазка в полум'ї спиртівки; в) фарбування.

2. Етапи фарбування за методом Грама:

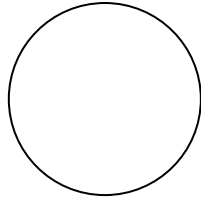
а) покласти на мазок фільтрувальний папір, що просочений генціанвіолетом, налити на нього декілька крапель води. Фарбувати 2 хвилини;

б) видалити папірець у лоток, нанести на мазок декілька крапель розчину Люголя. Витримати 1 хвилину;

в) нанести на мазок етиловий спирт на 20-30 сек. і змити спирт водою;

г) нанести на мазок фуксин. Фарбувати 1 хвилину. Змити водою, просушити мазок фільтрувальним папером.

Мікроскопію препарату провести з великим збільшенням (об'єктив х90) з використанням імерсійного масла. Зарисувати та описати в альбомі картину мікроскопи препарату. Форма протоколу:



МБІ
Збільшення
Фарбування за методом Грама
Суміш бактерій

У полі зору помічено два типа клітин:
коки, пофарбовані у синій колір, і
палички - у червоний
Висновок: коки – Гр⁺
палички – Гр⁻

1.5. Вивчення демонстраційних препаратів бактерій

Препарат №1

Коки та палички пофарбовані фуксином. Відмітити відсутність різниці у кольорі під час фарбування простим методом.

Препарат № 2

Ті ж бактерії, пофарбовані за методом Грама. Відмітити різницю у кольорі. Визначити здатність забарвлюватися за методом Грама коків та паличок.

Класифікація кокових бактерій за морфологічними ознаками

Коки мають форму кулі, діаметр якого коливається від 1 до 2,5 мкм. Під впливом різних факторів середовища коки можуть набувати овальну, сплюснену чи еліптичну форму.

За взаємним розташуванням клітин, що залежить від способу поділу, їх підрозділяють на групи.

1. Монококи або мікрококи (рід *Micrococcus*) – поодинокі коки (рис. 1.2 а).

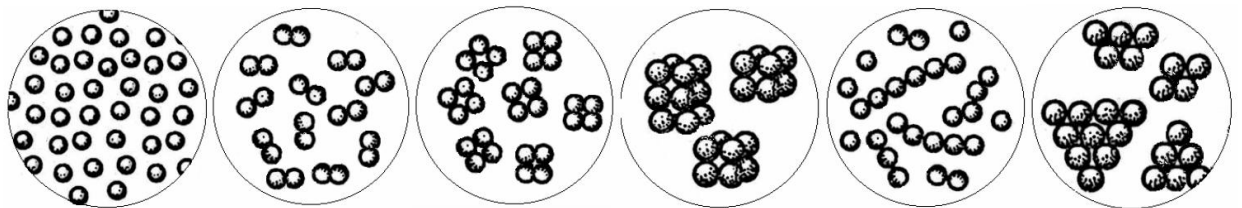


Рис. 1.2 Форми кокових бактерій: а – мікрококи, б – диплококи, в – тетракоки, г – сарцини, д – стрептококи, е – стафілококи

2. Диплококи (рід *Diplococcus*) – коки, що поділяються в одній площині й утворюють пари клітин, більшість їх – патогенні (рис. 1.2б).

3. Стрептококи (рід *Streptococcus*) – поділяються також в одній площині, але клітини не відокремлюються одна від одної і утворюють ланцюжки (рис.1.2д).

4. Тетракоки – поділяються в двох взаємно перпендикулярних площинах і утворюють групи з чотирьох клітин (рис. 1.2в).

5. Сарцини (рід *Sarcina*) – поділяються в трьох взаємно перпендикулярних площинах і утворюють скупчення (пакети) кубічної

форми (рис. 1.2з).

6. Стафілококи (рід *Staphylococcus*) – поділяються безладно в декількох площинах, утворюють скупчення, що нагадують за формою гроно винограду (рис. 1.2е).

Коки в основному нерухливі, не утворюють спор, грампозитивні.

Мікрококи або **монококи** (рис. 1.2а) є стійкими мікроорганізмами, добре розвиваються у широкому діапазоні температур (22...40°C) за найрізноманітніших умов: у молочних продуктах, у ґрунті, пилу, розсолах, морській воді і багатьох не занадто кислих харчових продуктах. Більшість є сапрофітами. Майже усі види на твердих середовищах утворюють колонії маслянистої консистенції, забарвлені у білий чи жовтий колір. Зустрічаються також різні відтінки від червоного до жовтогарячого.

Найбільш розповсюджені види: *Micrococcus agilis*, *M. flavus*, *M. luteus*, *M. roseus*, *M. freudenreichi* (рис. 1.3).

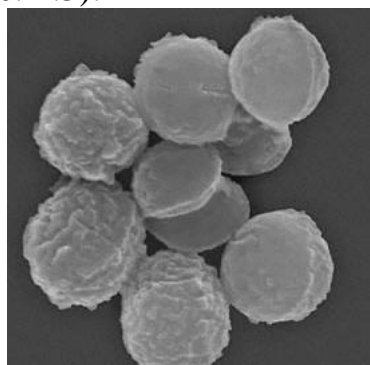


Рис. 1.3 Електронна мікроскопія *Micrococcus luteus*

Форма клітин переважно овальна ($d = 0,5...1$ мкм). Деякі види мають промислове значення, їх застосовують у сироварінні, оскільки вони розщеплюють казеїн і лактозу з утворенням ароматичних сполук.

Стрептококи (рис. 1.2д) – грам позитивні бактерії, утворюють ланцюжки різної довжини, живуть у кишечнику людини і тварин, молочних і багатьох інших харчових продуктах, потрапляють у стічні води.

Відомі групи гемолітичних, фекальних і «молочних» стрептококів. Найбільше практичне значення мають види *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. thermophilus*, *S. faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* тощо. *Streptococcus lactis* (стрептокок молочний) (рис. 1.4) викликає скисання молока і використовується в молочній промисловості для виготовлення кефіру, сиру, сметани.



Рис. 1.4 Електронна мікроскопія *Streptococcus lactis*

Виявляється в коров'ячому молоці, гної, у пилу, ґрунті, на рослинах і посуді. Швидко росте в молоці за 25°C. Форма клітин переважно овальна ($d = 0,5...1$ мкм).

Бактерії *Leuconostoc mesenteroides* (рис. 1.5) утворюють одиночні клітини, диплококи чи ланцюжки.

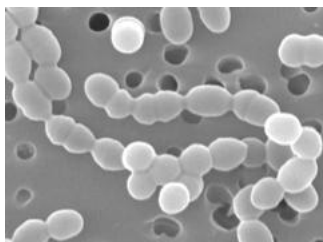


Рис. 1.5 Електронна мікроскопія *Leuconostoc mesenteroides*

На середовищі із сахарозою утворюють капсули, які можна виявити, забарвлюючи препарати розведеною тушшю. Колонії слизуваті, майже безбарвні, опуклі, великі (d до 2-4 мм). Завдають великої шкоди цукровій і спиртовій промисловості, що переробляє м'ясо. Широко розповсюджений у товарному цукрі, м'яся, капусті, силосі й інших, багатих на вуглеводи, рослинних продуктах. Здатні продукувати екзополісахариди, що знаходить своє застосування у біотехнології при одержанні кровозамінників, сефадексів тощо.

Сарцини (рис. 1.2г, 1.6) – коки, що групуються в кубоподібні пакети різної величини. Число коків у пакеті кратне восьми.

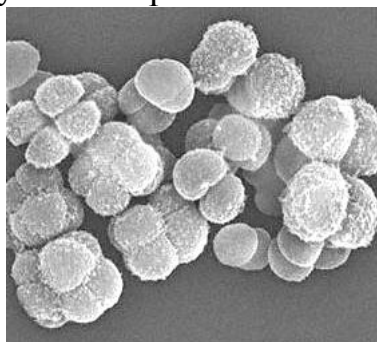


Рис. 1.6 Електронна мікроскопія *Sarcina flava*

Це сапрофіти, які розвиваються в рослинних продуктах, що бродять, головним чином у пивному суслі, пиві і засівних дріжджах. У результаті їх життєдіяльності пиво скисає, каламутніє і набуває смаку і запаху меду («сарцинова хвороба»). Сарцини широко поширені в природі: у воді, ґрунті, повітрі (на часточках пилу), на зерні, солоді (види *Sarcina lutea*, *S. flava*, *S. maxima*, *S. aurantica*).

Стафілококи (рис. 1.2 е, 1.7). Їх можна знайти на шкірі і слизових оболонках рота і носа, а також у багатьох харчових продуктах.

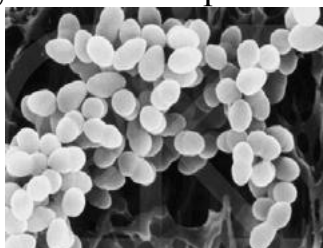


Рис. 1.7 Електронна мікроскопія *Staphylococcus aureus*

Найчастіше зустрічаються два види: *Staphylococcus aureus* утворює

золотисто - жовтий пігмент і *Staphylococcus albus* – утворює білий пігмент. Вони є збудниками маститу, фурункульозу, харчових отруєнь. Використовуються як тестові культури для визначення активності певних антибіотиків (ампіциліну, цефазоліну, канаміцину тощо).

Культуральні ознаки бактерій

До культуральних (макроморфологічних) особливостей відносять характер росту мікроорганізмів на рідких та твердих поживних середовищах.

На поверхні щільного поживного середовища мікроорганізми можуть рости у вигляді окремих колоній, суцільно за штрихом та газоном.

Колонія – це ізольоване скупчення клітин одного виду, які вирости, як правило, з однієї клітини. Залежної від того, де розвинулись клітини розрізняють: поверхневі, глибинні та донні колонії. Колонії, що розвинулись на поверхні відрізняються великою різноманітністю (рис. 1.8).

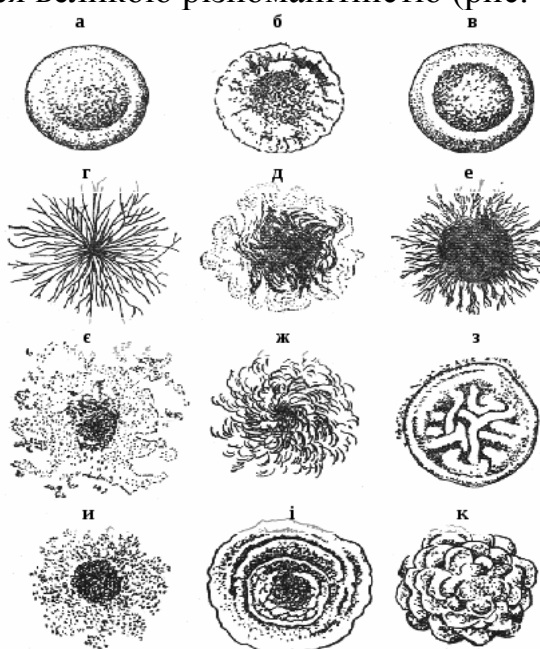


Рис. 1.8 Форма колоній: а – кругла; б – кругла з фестончастим краєм; в – кругла з валіком по краю; г, д – ризоїдальні; е – з ризоїдальним краєм; є – амебоподібна; ж – нитчаста; з – складчаста; и – неправильна; і – концентрична; к – складна.

У процесі їх опису враховують наступні ознаки:

- форму колоній – кругла, амебоподібна, неправильна, ризоїдна тощо;
- розмір (діаметр) колонії, який вимірюють у мм;
- поверхню колонії – гладенька, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, із концентричними кільцями тощо;
- профіль колонії – плоский, випуклий, кратероподібний, конусоподібний тощо;
- блискучість та прозорість – колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора;
- колір колонії – незабарвлені (колонії брудно-білого кольору відносять до незабарвлених) або пігментовані: білі, жовті, золотисті, оранжеві, бузкові, червоні, чорні. Окремо звертають увагу на виділення пігменту у середовище.
- край колонії – рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчастий та інші;

• структуру колонії – однорідна, дрібно- або великозернисті, волокнисті та інші.

Край та структуру колонії визначають за допомогою лупи; консистенцію колонії визначають під час торкання до її поверхні петлею. Колонія може легко відокремлюватися від середовища або вростати в агаризоване середовище, бути твердою, м'якою, слизуватою, тягучою, крихкою.

Глибинні колонії, навпаки, досить одноманітні. Найчастіше вони мають вигляд сплюснених чечевичок. Лише деякі можуть мати вигляд пучечків вати з нитчастими виростами у поживне середовище. Утворення глибинних колоній часто супроводжується розривом щільного середовища, якщо мікроорганізми виділяють вуглекислоту або інші гази.

Донні колонії мають, як правило, вигляд прозорих плівок, що стеляться по дну. Розміри та деякі інші особливості колоній мікроорганізмів змінюються з віком, залежать від складу середовища та температури вирощування, тому, при описанні колонії, вказують ці критерії.

Ріст у рідкому поживному середовищі більш одноманітний і супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки або осаду. При цьому відмічають ступінь помутніння (слабка, помірна або сильна), особливості плівки (тонка, щільна або рихла, гладенька або складчаста), а при утворенні осаду вказують – бідний він чи суттєвий, щільний, рихлий, слизоподібний або пластівцевий.

Морфологічні та культуральні ознаки паличкоподібних бактерій ***Класифікація паличкоподібних бактерій за морфологічними ознаками***

Паличкоподібні бактерії являють собою циліндричні клітини, довжина яких у середньому 2...6 мкм, іноді 10...12 мкм. Довжина клітин того самого виду варіює залежно від віку культури й умов вирощування: складу середовища, рН, інтенсивності аерації, температури й інших факторів. Ширина клітин є більш стійкою ознакою і коливається у межах 0,5...1 мкм.

Палички можуть бути з'єднані попарно чи в ланцюжки та поділяються на дві групи:

- 1) Аспорогенні палички (*Bacterium*) – не утворюють спор, їх називають просто бактеріями.
- 2) Спорогенні палички (*Bacillus* та *Clostridium*) – утворюють спори. Ті спорогенні палички, що живуть в аеробних умовах і утворюють спори, діаметр яких менший за поперечник клітини, називають *бацилами* (рис 1.9 а, б). Спорогенні анаеробні палички, які утворюють спори, діаметр яких більший за поперечник клітини, називають *кlostридіями* (рис. 1.9 в – е). Спора може розміщуватися у центрі клітини (рис 1.9 а, в), термінально – у кінці (рис. 1.9 б, д, е) та субтермінально – ближче до кінця клітини (рис. 1.9 г). Бактеріальні спори утворюються за несприятливих умов існування (висушуванні, дефіциті поживних речовин та ін.). Спора має підвищену стійкість, оскільки має міцну багаточарову оболонку, дипіколінат кальцію, який зумовлює термостійкість, низький вміст води та повільні процеси

метаболізму. За сприятливих умов спори проростають, проходячи три послідовні стадії: активацію, ініціацію, проростання. Всередині бактеріальної клітини утворюється лише одна спора (ендоспора). Утворення спор сприяє збереженню виду і не являється способом розмноження, на відміну від спор грибів.



Рис. 1.9 Розміщення ендоспор у бактеріальній клітині:
 центрально: а – *Bacillus megatherium*, в – *Clostridium butyricum*;
 термінально: б – *B. thuringiensis*, д – *C. polymyxa*; е – *C. tetani*;
 субтермінально: з – *Clostridium botulinum*

Аспорогенні палички.

Молочнокислі бактерії *Lactobacterium delbruckii* (рис. 1.10) – довжина 2...7 мкм, товщина 0,5...0,8 мкм. Зустрічаються поодинокі чи короткими ланцюжками.



Рис. 1.10 Електронна мікроскопія *Lactobacterium delbruckii*

Нерухомі, грамозитивні, гомоферментативні (основним і майже єдиним продуктом метаболізму яких є молочна кислота). Оптимальна температура розвитку 45...50°C. Їх застосовують як компонент хлібних заквасок, у виробництві молочної кислоти.

Широко використовуються в харчовій промисловості й інші види гомоферментативних молочнокислих бактерій: *Lactobacterium casei* (для готування сиру), *L. plantarum* (силосування і квашення), *L. bulgaricum* і *L. acidophilum* (одержання кисломолочних продуктів).

Оцтовокислі бактерії (рис. 1.11, 1.12).

Окремі види оцтовокислих бактерій (*Acetobacter schutzenbachi*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*) відрізняються один від одного розмірами клітин, рухливістю, стійкістю до спирту. Довжина паличок 1...2 мкм, діаметр – 0,4...0,8 мкм; грамнегативні, утворюють ланцюжки і плівку: суцільну або у вигляді острівців.

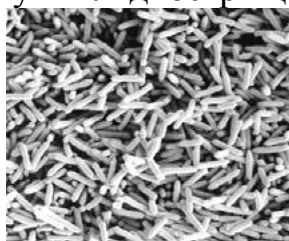


Рис. 1.11 Електронна мікроскопія *Acetobacter aceti*

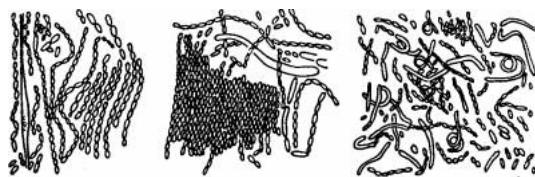


Рис. 1.12 Схематичне зображення оцтовокислих бактерій:
а – *Acetobacter aceti*; б – *Acetobacter pasteurianum*;
в – *Acetobacter xylinum*

Застосовуються для одержання харчового оцту. Можуть викликати псування вина, пива й інших харчових продуктів.

Кишкова паличка *Escherichia coli* (рис. 1.13). Розміри: діаметр 0,5 мкм, довжина – 1,0...2,0 мкм. Розташовуються поодинокі чи короткими ланцюжками. Грамнегативні, рухливі, короткі. Постійно знаходяться в кишечнику людини і тварин, звідки потрапляють у ґрунт, воду, на рослини, предмети тощо, де можуть існувати досить короткий проміжок часу.



Рис. 1.13 Електронна мікроскопія *Escherichia coli*: а – трансмісійна;
б – скануюча

Є показниками санітарного стану води, рідких і твердих харчових продуктів, устаткування, приміщень, працівників харчових підприємств. Непатогенні штами *E. coli* використовують як основу пробіотичних препаратів для нормалізації функціонування шлунково-кишкового тракту людини (наприклад, штам *Escherichia coli* Nissle 1917, відомий як *Mutaflor*). Кишкова паличка *E. coli* була одним з перших організмів, чий геном був повністю секвенований (розшифрований). Послідовність нуклеотидів у геномі штаму *E. coli* K12 була опублікована в журналі Science в 1997 році, тому саме *E. coli* найчастіше використовують для генетичних досліджень прокариотів та генних маніпуляцій. Генно-інженерні (рекомбінантні) штами *E. coli* використовуються для одержання таких цінних біотехнологічних продуктів, як інсулін, інтерферон, моноклональні антитіла, тощо.

Спорогенні палички

Бацили.

Картопляна паличка *Bacillus mesentericus*. Палички довжиною 1,5...4 мкм, розмір у поперечнику 0,5...0,8 мкм, рухливі, утворюють центральну спору. На сусло-агарі утворюють сухі, зморшкуваті, білуваті, іноді сіруваті з коричневим відтінком колонії; на м'ясопептонному агарі колонії слизуваті, сіруваті, з неприємним запахом. Строгі аероби.

Сінна паличка *Bacillus subtilis* (рис. 1.14) мало відрізняється від картопляної палички. У видів *B. subtilis* спори трохи роздуті у вигляді барила, а в *B. mesentericus* залишаються у формі палички. Аероби.

Промислові штами бактерій *B. subtilis* та *B. mesentericus* широко

використовуються у біотехнологіях одержання таких біологічно активних речовин як ферменти протеолітичного та амілолітичного комплексу, вітаміни тощо.

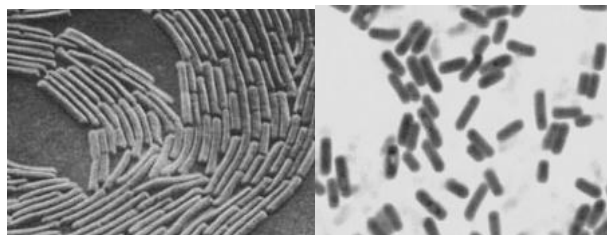


Рис. 1.14 Бактерії *Bacillus subtilis*: у електронному (а) та світловому (б) мікроскопах

Bacillus megatherium (рис. 1.15) – великі палички, довжина 4...7 мкм, ширина – 1...2 мкм. Рухливі, з центрально розташованими спорами.

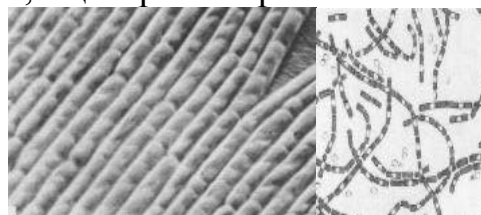


Рис. 1.15 Бактерії *Bacillus megatherium*: у електронному (а) та світловому (б) мікроскопах

На твердих поживних середовищах утворюють щільні, білі, гладкі колонії, плоскі, іноді з концентричними колами. Бактерії *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* використовуються для одержання фосфорних бактеріальних добрив.

Клостридії. Бактерії роду *Clostridium* характеризуються розміром клітин 1,5...20,00×3...2,0 мкм. Утворюють овальні або сферичні спори, які зазвичай деформують клітину. Грампозитивні.

Маслянокислі бактерії (рис. 1.16) (*Clostridium butyricum*, *C. pasterianum*, *C. saccharobutyricum*) являють собою рухливі палички величиною 8...12 мкм.



Рис. 1.16 Негативне контрастування капсульних форм бактерій: а – *Clostridium butyricum*, б – *Clostridium bifermentans*

За формою нагадують сигари, тому, що діаметр спор більше діаметра клітини. Бактерії розвиваються за відсутності кисню. Широко поширені в природі. Багато сапрофітів. Використовуються в промисловості для одержання масляної кислоти, бутилового спирту й інших цінних продуктів.

Серед клостридій є група патогенних видів, які здатні спричиняти небезпечні захворювання, наприклад *Clostridium botulinum* (від лат. *botulus* – ковбаса) – збудник ботулізму. Причиною захворювання є вживання ковбасних виробів, консервів, консервованих грибів та інших продуктів, які

інфіковані збудником ботулізму. Патологічний процес, зумовлений екзотоксином, який всмоктується крізь кишечник, надходить у кров, уражує мозок, серцево-судинну систему та м'язи. При ботулізмі з'являється сухість у роті, головний біль, блювота, параліч очних м'язів, порушення акомодатції, глухота. Летальність – 40...60%. Анаеробну інфекцію (газову гангрену) викликає спільна дія декількох видів із роду *Clostridium* в асоціації з різними аеробними мікроорганізмами (патогенними стафілококами та стрептококами).

До збудників анаеробної інфекції належать *Clostridium novyi*, *C. septicum*, *C. perfringens* та інші. *C. tetani* – збудник правцю. Джерелом зараження є тварини та людина, які виділяють клостридії з випорожненнями у ґрунт. Захворювання правцем пов'язане із травматизмом. Захворювання починається із судомних скорочень м'язів ділянок тіла куди потрапив збудник, потім відбувається тонічне скорочення жувальних м'язів, м'язів обличчя, потиличних м'язів, потім м'язів спини та кінцівок. Тіло хворого приймає вигляд дуги, хворий лежить, впираючись потилицею та тазом. Летальність – 35...70%.

Рухливість бактерій

Багато бактерій є рухливими організмами. Переміщення бактерій здійснюється різними способами: за допомогою джгутиків (монотрихи, амфітрихи, лофотрихи, перитрихи) (рис. 1.17); по твердому субстраті ковзними, плазуючими рухами; шляхом реактивного руху.

Для дослідження рухливості бактерій зручно використати мікроскопічний препарат «висяча крапля».

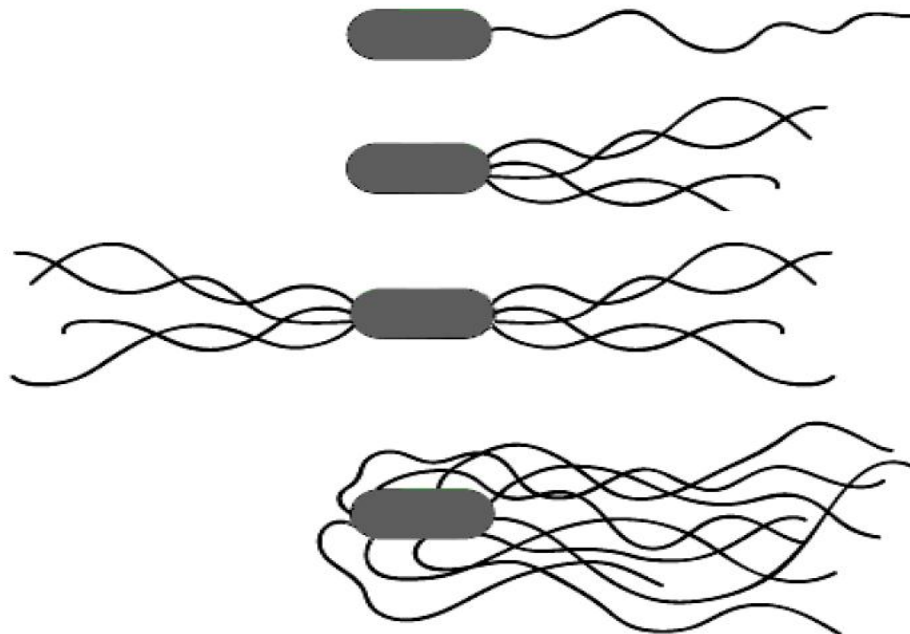


Рис. 1.17 Розміщення джгутиків у бактерій: а – монотрихи (*Vibrio*); б – лофотрихи (*Pseudomonas*); в – амфітрихи (*Spirillum*); г – перетрихи (*Proteus*, *Escherichia*)

Завдання на виконання

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» бактерій: *Micrococcus*

luteus, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*. Мікроорганізми розглянути у живому вигляді.

2. Приготувати фіксовані препарати *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* тощо (приготовлених з кисломолочних продуктів). Фіксовані мазки зафарбувати метиленовим синім (3 хв.), промити, просушити, розглянути з імерсією ($\times 90$).

3. Розглянути капсули бактерій *Leuconostoc mezenteroides* або *Azotobacter chroococcum* у показових препаратах.

Опрацювання результатів

Результати спостережень необхідно занести до протоколу лабораторної роботи 1, у якому повинно бути відображено:

1. Назва лабораторної роботи. Дата виконання. Мета роботи.
2. Теоретичні відомості: Будова бактеріальної клітини. Класифікація кокових бактерій за морфологічними ознаками. Порядок операцій приготування фіксованого мікроскопічного препарату «мазок». Визначення поняття «культуральні(макроморфологічні)» особливості мікроорганізму. Перелік ознак, які враховують у процесі опису колоній мікроорганізмів.
3. Практична частина (рисунок).
4. Висновок до роботи представити у вигляді таблиці морфологічних ознак та практичного значення розглянутих на лабораторному занятті бактерій:

Рід та вид бактерій	Форма клітин	Розміри, мкм	Характер з'єднання клітин	Забарвлення за Грамом	Наявність капсули	Рухливість	Практичне значення

Контрольні запитання

1. Наведіть класифікацію кокових бактерій за морфологічними ознаками.
2. Дайте характеристику різних морфологічних груп кокових бактерій.
3. Наведіть приклади практичного використання кокових бактерій.
4. На які групи поділяються паличкоподібні бактерії за морфологічними ознаками?
5. Наведіть особливості морфології та зазначте практичне значення бактерій: *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis-mesentericus*, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*, *Corynebacterium sp.*
6. Які типи рухливості бактерій відомі?
7. Охарактеризуйте джгутики бактерій: їх будову, розміри, розташування

Лабораторна робота № 2

«Морфологія та систематика мікроскопічних грибів»

Мета: Ознайомитися з культуральними і морфологічними властивостями міцеліальних грибів і методами їхньої ідентифікації.

План

- 2.1. Вивчення демонстраційних препаратів міцеліальних грибів
- 2.2. Ідентифікація та морфологія мікроскопічних грибів
- 2.3. Вивчення у прижиттєвому непофарбованому препараті морфологічні властивості міцеліального гриба

2.1. Вивчення демонстраційних препаратів міцеліальних грибів

Методи мікроскопічних досліджень мікроорганізмів

Мікробна клітина – складна жива система, характеризується високим ступенем впорядкованості складових її структур. Кожна структура виконує певне життєве призначення. Взаємодія структур забезпечує існування клітини, її цілісність.

Препарати живих клітин

Живі клітини мікроорганізмів можна розглядати під мікроскопом в непофарбованих (нативних) препаратах та препаратах, пофарбованих прижиттєво.

Прижиттєве дослідження мікробів використовується в практичних лабораторіях вельми обмежено, через палу контрастність живих клітин цей метод придатний для вивчення морфології тільки великих мікробів, наприклад, мікроскопічних грибів; прижиттєвих препаратах бактерій досліджують головним чином рухливість клітин.

Існують два основних засоби приготування прижиттєвих препаратів мікроорганізмів: препарат “роздавлена крапля” та “вісяча крапля”.

Препарат “вісяча крапля”. Невелику краплю суспензії (зависі) мікробних клітин наносять на покривне скло та обережно накладають на нього предметне скло з заглибленням так, щоб крапля повільно розташовувалась у центрі заглиблення. По краях луночку попередньо змащують вазеліном, препарат перевертають та мікроскопують. Метод використовують головним чином для вивчення рухливості мікроорганізмів.

Препарат “роздавлена крапля”. На предметне скло наносять краплю рідини (при роботі з бактеріями – водопровідну воду, при роботі з мікроскопічними грибами – суміш рівних об’ємів етилового спирту та гліцерину), вносять до неї небагато досліджуваних мікроорганізмів, розміщують та накривають покривним склом. Надлишок вируш енної рідини вилучають фільтрувальним папером.

Вирощувані на густому середовищі бактерії переносять у краплю рідини за допомогою бактеріологічної петлі, але мікроскопічні гриби – двома препоравальними голками. Культура, яка була вирощувана у рідкому середовищі, поміщається на предметне скло стерильною піпеткою без

попереднього нанесення краплі рідини.

Мікроскопують препарат, як правило, сухою системою (об'єктиви 8^x , 20^x , 40^x). Препарат дозволяє встановити форму клітин переважно великих мікроорганізмів, їх розміри, розташування, наявність або відсутність рухливості.

Препарат “роздавлена крапля” прижиттєве пофарбованих мікроорганізмів. До краплі мікробної суспензії на предметне скло додають краплю слабкого розчину (1:1000) фарбника (метиленового синього або фуксину), перемішують, потім накривають покривним склом.

Подібним чином рекомендується диференціювати живі та мертві клітини, наприклад, при дослідженні пекарських дріжджів. Мертві клітини звичайно фарбуються швидше та яскравіше за рахунок посмертного підвищення проникливості клітинної оболонки.

Вироблені препарати живих мікроорганізмів поміщують у посудину з дезинфікуючим розчином для знешкодження.

Для **вивчення внутрішньої будови клітин** застосовують спеціальні методи забарвлення (цитохімічні методи дослідження). Багато з цих методів переслідують діагностичні цілі. За формою клітини мікроорганізми не дуже різноманітні, і в ряді випадків, щоб встановити приналежність мікроба до того чи іншого роду й виду, необхідно провести спеціальне забарвлення тієї чи іншої структури (або речовини, накопичувальної в клітині).

Морфологічні та цитологічні особливості мікроорганізмів можна вивчати, використовуючи різні методи мікроскопії, а також застосовуючи методи диференційного забарвлення. Існує ряд прийомів, які лежать в основі більшості спеціальних методів дослідження морфології й цитології бактеріальних клітин.

Препарати готують, як правило, на предметних скельцях, товщина яких не повинна перевищувати 1,2...1,4 мм (рис. 2.1). Використання предметних скелець більшої товщини не дозволяє повністю використати числову апертуру системи мікроскопа.

При роботі з покривними скельцями, їх товщина не повинна перевищувати 0,15...0,17 мм. Більш товсті скельця погіршують якість зображення.

В мікробіологічній практиці використовують препарати «роздавлена крапля», «висяча крапля», препарат «відбиток» та препарати фіксованих забарвлених клітин.

Приготування мікроскопічного препарату «відбиток»

З агаризованого середовища, на якому вирости суцільним газоном (або окремими колоніями) мікроорганізми, вирізають невеличкий кубик і переносять його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була зверху. Потім до газону легенько прижимають покривне (або предметне) скло, яке знімають так, щоб не зрушити його у бік. Отриманий препарат поміщають відбитком униз у краплю води або барвника метиленового синього на предметне скло і розглядають.

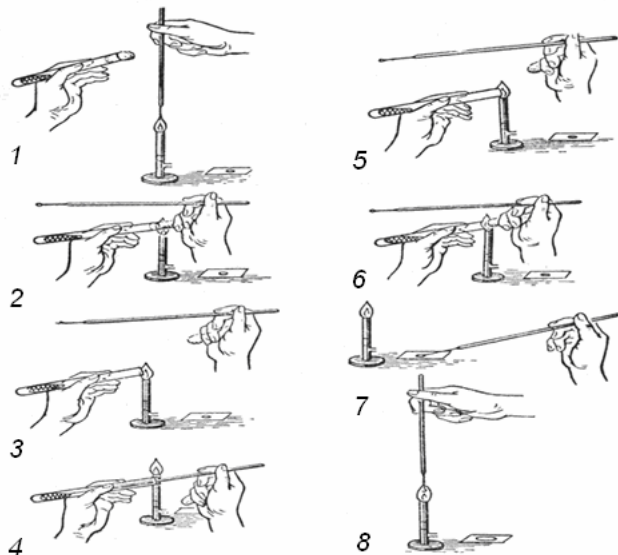


Рис. 2.1 Схема послідовності відбору проби та виготовлення мікроскопічного препарату

Приготування мікроскопічного препарату «висяча крапля»

Краплю суспензії мікроорганізмів петлею наносять на покривне скло (рис.2.2), зверху притискають спеціальне предметне скло з лункою у центрі і перевертають. Крапля повинна вільно висіти над лункою, не торкаючись її країв. Краї лунки попередньо змазують вазеліном – крапля герметизована у вологій камері, що дозволяє тривале спостереження за об'єктом.

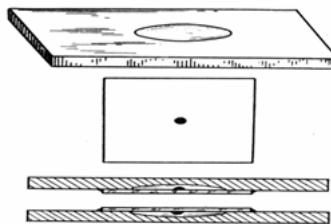


Рис. 2.2 Виготовлення препарату «висяча крапля»

Приготування фіксованих препаратів

Фіксування дає можливість перервати життєві процеси в об'єкті, зберігши незмінною його структуру. У результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще профарбовуються.

Виготовлення *фіксованих* забарвлених препаратів клітин включає ряд послідовних етапів:

1. Приготування мазка. На чисте предметне скло, знежирене милом або спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером (знежирення скелець здійснюють удалині від пальників), наносять краплю дистильованої води. Фламованою (прожареної в полум'ї пальника) бактеріологічною петлею чи голкою з пробірки з культурою, тримаючи її в лівій руці в горизонтальному положенні поблизу пальника, беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю. Отриману суспензію рівномірно розтирають петлею на площі 2...4 см². Мазок повинен бути тоненьким, рівномірним за товщиною, овальним за формою.

2. Висушування мазка. Мазок висушують за кімнатної температури на

повітрі або у теплому повітрі над запаленою спиртівкою, не допускаючи перегрівання.

3. Фіксація мазка передбачає декілька моментів:

- убити (знешкодити) клітини мікроорганізмів;
- забезпечити краще прилипання клітин до скла;
- зробити мазок більш сприйнятливими до барвників.

Найбільш розповсюдженим методом фіксації є термічна обробка.

З цією метою препарат тричі проводять через полум'я пальника, тримаючи скло мазком вгору. Мазок не треба перегрівати, оскільки при цьому відбуваються грубі зміни клітинних структур, а інколи їх морфології. Для вивчення тонкої будови клітини використовують фіксацію хімічними рідинами.

4. Фарбування. Розрізняють прості й диференційні методи забарвлення мікробних клітин (докладніше див. лаб. роботу №4). При простому фарбуванні забарвлюється вся клітина, добре видно її форма й розміри. Методи диференційного фарбування передбачають виявлення деяких клітинних структур (запасні речовини, включення, спори...). Для простого фарбування використовують якийсь один барвник (генціановий фіолетовий, метиленовий синій, фуксин). Для цього фіксований препарат кладуть на паралельні скляні рейки (місток) над кристалізатором (кюветою) і заливають препарат фарбою на 0,5...3 хв. (рис. 2.3). Після закінчення фарбування препарат промивають водою до тих пір, поки вода не стане безкольоровою. Потім препарат висушують на повітрі, наносять на мазок краплю імерсійної рідини і мікроскопіюють. Після розгляду препаратів фронтальну лінзу об'єктива необхідно протерти.

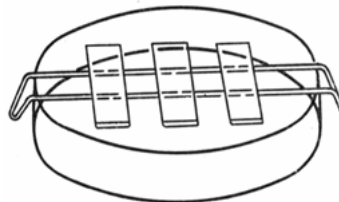


Рис. 2.3 Місток з паралельними рейками для фарбування препарату

2.2. Ідентифікація та морфологія мікроскопічних грибів

Мікроскопічні гриби відносяться до нижчих рослинних організмів. По новій системі класифікації гриби, які використовуються в промисловості, або являються поширеними збудниками порчі продуктів, відносяться до класу відділу сучасних грибів. (*Eumycota*).

Розпознавання мікроскопічних грибів, або ідентифікація заснована на вивченні морфологічних та культуральних признаков.

Поняття “ідентифікація мікроорганізмів” означає визначення положення даного виду систематиці, тобто його назва.

Для ідентифікації мікроскопічних грибів важливими признаками являються їх морфологічні та культуральні властивості.

До **морфологічних** властивостей мікроскопічних грибів відноситься будова вегетативного тіла і органів розмноження.

Гриби – крупні (довжина гифів – декілька десятків *мкм*, товщина 10-15 *мкм*) та достатньо контрастні мікроорганізми, тому в лабораторних умовах для вивчення морфологічних властивостей їх мікроскопують в прижиттєвих незабарвлених препаратах типу “роздавлена крапля” при малих (об’єктив 8^x) та середніх (об’єктив 40^x) збільшення.

Морфологічними ознаками мікроскопічних грибів являється будова їх клітин та органів розмноження.

Веgetативне тіло гриба (грибниця або міцелій) складається з розвітвлених та переплітаючих ниток, які називаються гифами.

У одноклітинних (низчих) грибів міцелій представляє собою одну розвітвлену клітину, у багатоклітинних (вищих) грибів гифи розділені перегородками (септировані).

Мікроскопічні гриби характеризуються різноманітністю способів та органів розмноження. Розмноження грибів аналогічне вегетаційному у вищих рослин, іде шляхом проростання кусочків міцелію або з допомогою оідій (кліток, виникаючих при розчленінні гифів). При розмноженні спороутворенням спори утворюються в плодоносячи тілах, які розвиваються на спеціальних гифах, які відрізняються, як правило від других особливою будовою. Будова плодоносячих тіл і спор у мікроскопічних грибів дуже різноманітна і являється основною морфологічною ознакою, що диференцує окремі види грибів.

Культуральними властивостями мікроскопічних грибів називається зовнішній вид грибниці та спосіб її росту по відношенню до середовища мешкання (поверхневий або глибокий). Наприклад, міцелій гриба може розвиватися на поверхні середовища (мукорові гриби), або усередені (гриб Фітофтора *Phytophthora infestans* в картоплі).

При культури вириванні на поживних середовищах в лабораторних умовах у грибів, як правило, відмічається радіальне розростання грибниці, утворюється округла колонія. Міцелій деяких видів грибів забарвлений за користь відкладання пігменту в кліткових оболонках: рожевий – у гриба Фузаріум (*Fusarium*), зелений – у гриба Пенициліум (*Penicillium*), чорний – у деяких аспергиллових грибів (*Aspergillus*).

Культуральні властивості грибів досліджують неозброєним оком (візуально).

Вивчання морфологічних і культуральних властивостей дозволяють установити назву роду мікроскопічних грибів. Визначення назви виду гриба вимагає подальшого дослідження процесів життєдіяльності мікроорганізмів.

Методичні вказівки:

Рекомендується ознайомитися з представниками пліснявих грибів – розповсюдженими збудниками псування харчових продуктів з класів «Зігоміцет» (*Zigomycetes*), «Аскоміцет» *Ascomycetes* та «Дейтероіцет» *Deuteromycetes*.

Нижче наведені методичні вказівки по вивченню препаратів шести видів пліснявих грибів, що дозволяє розділити студентів на підгрупи для роботи з різноманітними культурами (по 1-2 в кожній групі).

Культуральні властивості грибів слід вивчити неозброєним оком (візуально) по раніше заготованим висівам на густому живильному середовищі – сусло-агарі в чашках Петрі¹.

Необхідно звернути увагу на характер повітряного міцелію (щільний, пухкий та ін., забарвлення, висота) та змалювати його в альбомі.

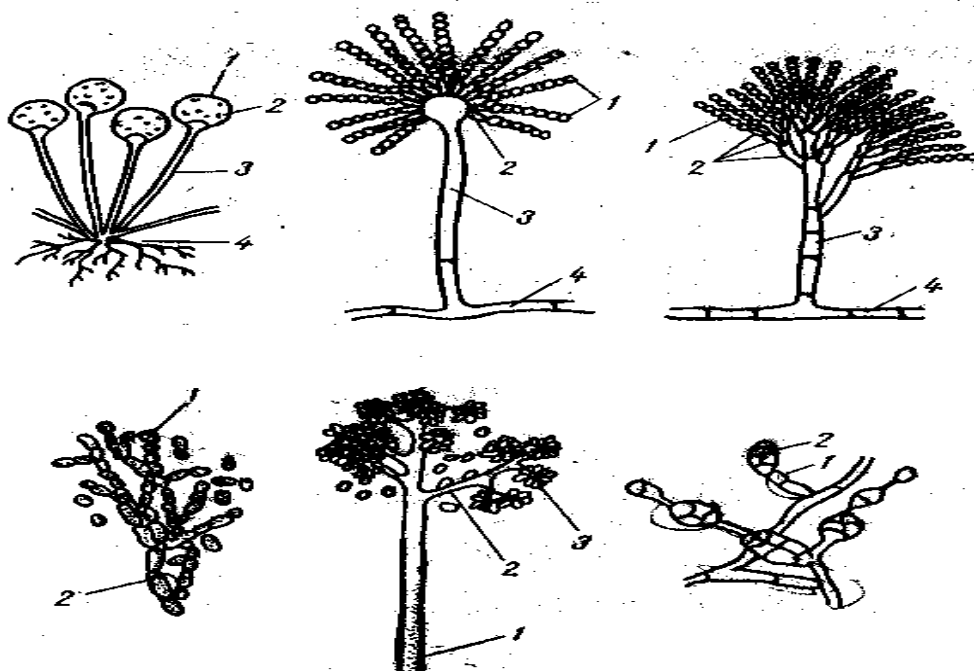
Морфологічні ознаки грибів необхідно вивчити при мікроскопії прижиттєвих не пофарбованих препаратів типу «розчавлена крапля», приготованих з культури гриба з сусла-агару. При виготовленні препарату ретельно розтягнути препарувальними голками міцелій, внесений в краплю спирту з гліцерином на предметному склі. Мікроскопію проводять з використанням сухих об'єктів (послідовно 8^x та 40^x).

Відзначити будову міцелію та органів розмноження. Оскільки більшість пліснявих грибів, вражаючи харчові продукти, розмножуються безстатевим шляхом, на занятті розглядаються тільки способи безстатевого розмноження.

Препарати грибів класу «Зигоміцети» (нижче досконалі)

Рід Rhizopus (Rhizopus) – збудники хвороби ягід, коренеплодів і рослинних продуктів.

Вивчаючи зростання гриба на живильному середовищі в чашці Петрі, звернути увагу на розстелений по субстрату міцелій, місцями забарвлений в темно-бурий колір. Для препарату відібрати з живильного середовища довгі розстелені гіфи (столони). При мікроскопії зауважити одноклітинний міцелій та органи розмноження – спорангій і спорангієносії, не розгалужені, пофарбовані в темний колір, ростуть жмутами і мають біля основи коренеподібні паростки (різоїди). Спори знаходяться всередині кулеподібного спорангія рис.2.4,а.



¹Плоскі скляні чашки з покриттям діаметром 6-11 см і висотою 1,5-2 см

Рис. 2.4. Плісняві гриби

- a – Різопус:* 1 – спорангій; 2 – спори; 3 – спорангієносець; 4 – ризоїди;
пергілус: 1 – конідії; 2 – стерігми; 3 – конідієносець; 4 – вегетативні гіфи;
в – Пеніциліум: 1 – конідії; 2 – стерігми; 3 – конідієносець; 4 – вегетативні гіфи;
г – Оїдіум: 1 – Овідії; 2 – гіф; *д – Ботрїтіс:* 1,2 – конідієносець; 3 – конідії;
е – Альтернація: 1 – конідієносець; 2 – конідії.

Препарати грибів класу «Аскоміцети» (вищі досконалі)

Рід Аспергілус (Aspergillus) – збудники пліснявиння промислових і продовольчих товарів, деякі види грибів використовуються в техніці.

На суслі-агарі зауважити густий, повітряний, місцями пофарбований в чорний колір міцелій. Для мікроскопування відібрати небагато пухкого міцелію, звернути увагу на багатоклітинний міцелій та органи розмноження – одноклітинні конідіє носії, які закінчуються віялоподібним розширенням (стеріг ми зі спорами – конідіями) (*дивись рис. 2.4, б*).

Рід Пеніциліум (Penicillium) – збудники пліснявки харчових продуктів (масла, сиру, ковбаси, фруктів), розвиваються на стінках вологих приміщень деякі види використовуються в харчовій і методичній промисловості. На суслі-агарі зауважити пухкий, забарвлений в сіро-зелений колір повітряний міцелій. Для мікроскопування відібрати міцелій з молоді частини (межа забарвленого та білого міцелію): в препараті звернути увагу на багатоклітинні гіфи та органи розмноження – конідіє носії з конідіями. На відміну від попередніх грибів пеніциллова пліснява має багатоклітинний конідіє носій, який закінчується у вигляді китиці із стерігм та конідій (*дивись рис. 2.4, в*).

Препарати грибів класу «Дейтероїцети» (вищі недосконалі)

Рід Оїдіум (Oidium) – збудники псування рослинних та тваринних продуктів, зокрема кисломолочних продуктів та квашених овочів, при зберіганні.

На поверхні агару відмітити оксамитову білу поволоку міцелію. Для мікроскопування зішкребти білу плівку, в препараті відмітити багатоклітинний міцелій та відсутність спеціальних органів розмноження; спостерігаються прямокутні клітини розмноження – оїдії, що утворюються на кінцях гіф при їх розчленуванні (*дивись рис. 2.4, г*)

Рід Ботрїтіс (Botrytis) викликає гниття плодів, овочів, ягід, кагатну гниль цукрового буряка. На поверхні агару роздвигатись сіру пухку поволоку і відібрати міцелій для препарату. При мікроскопуванні звернути увагу на одноклітинний деревоподібно-розгалужений конідієносій, що несе на кінцях гілок жмути одноклітинних овальних сіруватих конідій (*дивись рис. 2.4, д*)

Рід Альтернація (Alternaria) – збудники псування сільськогосподарських рослин в період зберігання. На живильному середовищі слід роздвигатись щільний темно забарвлений міцелій. Для мікроскопування взяти грибницю в чорних дільницях, заглиблюючись в неї голками; в препараті звернути увагу на багатоклітинний міцелій, слабо розвинуті конідіє носії і розташовані на них одиничні або ланцюжками

значні конідії. Вони мають вигляд округлих або загострено витягнутих багатоклітинних утворювань (дивись рис. 2.4,е)

Будова міцеліальних грибів

Серед грибів зустрічаються одноклітинні, нитчасті та міцеліальні форми. Більшість грибів – ценоцитні організми з вегетативною структурою, яка має назву *міцелій*. Міцелій складається з багатоядерної маси цитоплазми, що наповнює сильно розгалужену систему твердих трубочок приблизно однакової товщини (~5...15 мкм та більше) – *гіфів*. Як правило міцелій утворюється шляхом проростання і розростання одиночної репродуктивної клітини – спори.

Грибна спора проростає у вигляді довгої нитки – гіфа, що росте, багаторазово гілкується й утворює цілу систему ниток, тобто міцелій. Ріст грибів здійснюється за рахунок кінчиків гіф і може продовжуватися доти, доки вистачає поживних речовин.

Міцелій *нижчих грибів* – є несептованим (не має поперечних перетинок); міцелій *вищих грибів* є септованим (має перетинки або перетяжки). Гриби можуть розмножуватися вегетативним, безстатевим і статевим шляхом. Гриби поширені в природі повсюдно. Спори грибів виявляються в будь-яких екосистемах, техногенних потоках і продуктах. Найбільша кількість грибів зустрічається в ґрунті. Вони беруть активну участь у біогеохімічному циклі перетворень вуглецю та інших біогенних елементів у природі і належать як до зимогенної, так і до автохтонної мікрофлори. Серед великої розмаїтості грибів, що пристосувалися до життя в ґрунті, є невелика група водних грибів, а також досить велика група паразитичних грибів, що викликають захворювання людини, тварин і рослин (мікози). Гриби здатні виділяти у зовнішнє середовище ферменти й абсорбційним шляхом поглинають поживні речовини, продукти ферментативного гідролізу природних біополімерів та інших розчинних речовин. Такий тип живлення визначає положення ґрунтових грибів як найбільшу екологічну групу, що бере участь у мінералізації органічних речовин у екосистемах.

Класифікація та практичне значення міцеліальних грибів.

Серед еуміцетів (справжніх грибів) розрізняють нижчі гриби фікоміцети (чи зигоміцети) і вищі гриби, що розподілені по класах: аскоміцети, базидіоміцети і недосконалі гриби.

Зигоміцети (Клас *Zygomycetes*). Міцелій у них добре розвинутий, несептований.

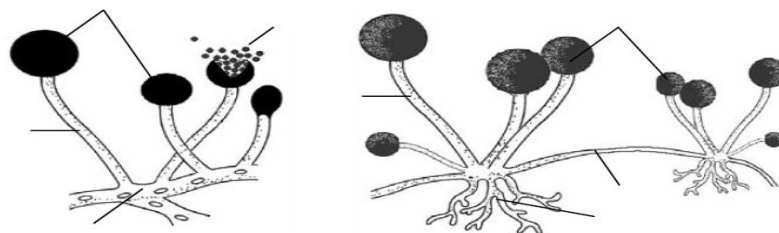


Рис. 2.5. Графічне зображення зигоміцетів: а – *Mucor*: 1 – спорангій, 2 – спорангіоспори, 3 – спорангіоносій, 4 – міцелій; б – *Rhizopus*: 1 – спорангій, 2 – спорангіоносій, 3 – столон, 4 – ризоїди.

Безстатеве розмноження відбувається за допомогою нерухомих спорангіоспор; статеве розмноження – зигоспорами. До цього класу відносять мукові гриби (родина *Mucoraceae*), які широко розповсюджені в природі. Мукові гриби (рис. 2.5. а) характеризуються різноманітністю будови органів безстатевого спороношення. Найбільше практичне значення серед мукових грибів мають представники родів *Mucor* і *Rhizopus*.

Гриби роду *Mucor* мають великі спорангії, що утворюються на поодиноких або розгалужених спорангіоносіях (рис. 2.6). Види цього роду відрізняються один від іншого за формою і забарвленням спорангіоспор, за формою хламідоспор тощо.

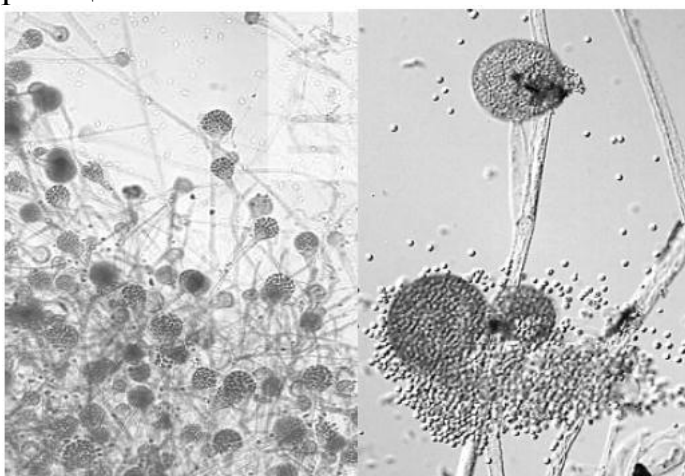


Рис. 2.6 Гриби роду *Mucor* за збільшення у 8× (а) та 40× (б) разів

Гриби роду *Mucor* мають великі спорангії, що утворюються на поодиноких або розгалужених спорангіоносіях (рис. 2.6). Види цього роду відрізняються один від іншого за формою і забарвленням спорангіоспор, за формою хламідоспор тощо.

Гриби роду *Rhizopus* (рис. 2.7) утворюють нерозгалужені, забарвлені в темно-бурий колір спорангіоносії, що ростуть пучками (кущиками).

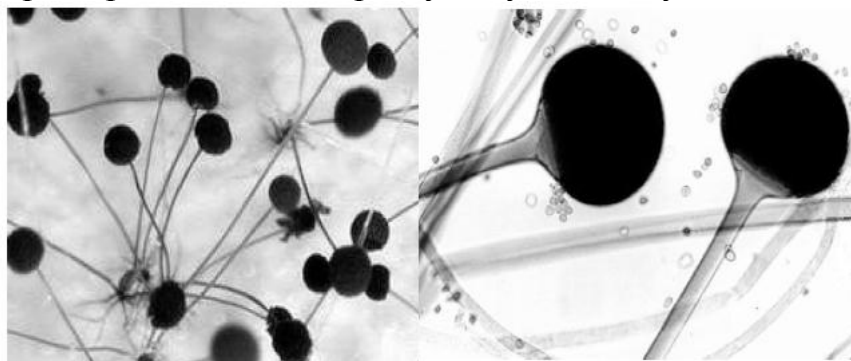


Рис. 2.7 Гриби роду *Rhizopus* за збільшення у 8× (а) та 40× (б) разів

У основи останніх є коренеподібні утворення – ризоїди (рис. 2.7 б), за допомогою яких гриб прикріплюється до субстрату. Спорангії великі з

темнозabarвленими спорами, мають вигляд чорних «голівок» на спорангієносіях. Гриби роду *Rhizopus* поширюються по субстрату дуже швидко за допомогою довгих сланких гіф (столонів), що нагадують вуса суниці.

Деякі мукорові гриби мають велике промислове значення завдяки здатності продукувати органічні кислоти, ферменти, зброджувати цукор в етиловий спирт. Так, для одержання молочної кислоти використовують гриб *Rhizopus oryzae*, ферментний препарат глюкоамілазу одержують за допомогою гриба *Rhizopus niveus*, ферменти протеїнази – за допомогою *Mucor mihei*, *M. pusillus*, *M. rouxii*, фермент ліпазу – за допомогою *Mucor rouxii* та *Rhizopus sp.*

У країнах Сходу мукорові гриби застосовують поряд із дріжджами у виробництві алкогольних напоїв і при виготовленні специфічних продуктів харчування, зброджених з бобів сої. Серед мукорових грибів існують збудники захворювань людини і тварин. Уражаючи ягоди й овочі, ці гриби викликають в них «м'яку гнилизну» – повне руйнування тканин.

Деякі з цих грибів є паразитами комах, їх використовують для знищення шкідників сільськогосподарських культур.

Аскоміцети (Клас *Ascomycetes*). Аскоміцети або сумчасті гриби – вищі гриби; міцелій у більшості добре розвинутий, септований, але до аскоміцетів належать і організми, що не мають міцелію, представлені одиночними клітинами, що брунькуються (дріжджі). У аскоміцетів розрізняють статевий і безстатевий способи розмноження. При статевому способі злиття двох ядер приводить до утворення зиготи, що перетворюється на аск (сумку), усередині нього в результаті поділу диплоїдного ядра утворюються гаплоїдні аскоспори, їх може бути від чотирьох до 1000 і більше. При безстатевому способі розмноження на кінцях плодоносних гіф – конідієносіях – утворюються екзоспори – конідії.

Сумчасті гриби широко поширені у природі. Серед них багато паразитів культурних рослин, збудників псування харчових продуктів, є патогенні для тварин і людини види. Багато з них використовуються у промисловості як продуценти біологічно активних речовин (ферментів, вітамінів, антибіотиків, алкалоїдів).

Аскоміцети здатні утворювати плодові тіла декількох типів. Залежно від типу плодових тіл серед аскоміцетів виділяють: **плектоміцети** (утворюють замкнені плодові тіла або *клеїстотеції*), **піреноміцети** (утворюють пляшкоподібні плодові тіла або *перитеції*) та **дискоміцети** (утворюють відкриті чашеподібні плодові тіла – *апотеції*).

До *плектоміцетів* (порядку евроцієвих – *Eurotiales*) належать деякі аспергиллові (рис. 2.8, б) та пеніцилові гриби (рис. 2.8 а). Пеніцилові гриби розмножуються в основному безстатевим шляхом, конідії утворюються на кінцях мутовчасторозгалужених конідієносіїв. Конідії бувають зеленого, блакитного, сіро-зеленого забарвлення або незабарвленими.

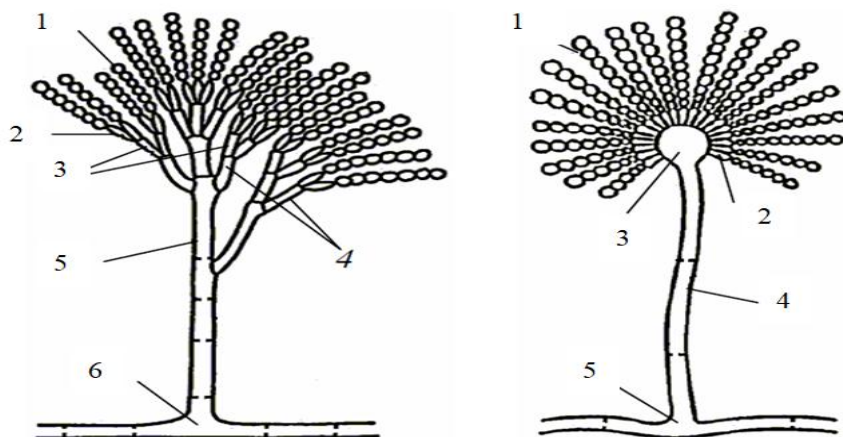


Рис. 2.8 Графічне зображення грибів роду: *a* – *Penicillium*: 1 – конідії, 2 – метули, 3 – стеригми, 4 – гілочки, 5 – конідиеносій, 6 – міцелій;

б – *Aspergillus*: 1 – конідії, 2 – стеригми, 3 – булавоподібна голівка, 4 – конідиеносій 5 – міцелій

Окремі види роду *Penicillium* (рис. 2.9) використовуються при одержанні антибіотика пеніциліну (*Penicillium chrysogenum*, *P. nigricans*, *P. brevicompactum* тощо). Вид *P. roqueforti* відіграє важливу роль у дозріванні сиру Рокфор, вид *P. camemberti* – у виробництві сиру Камамбер.

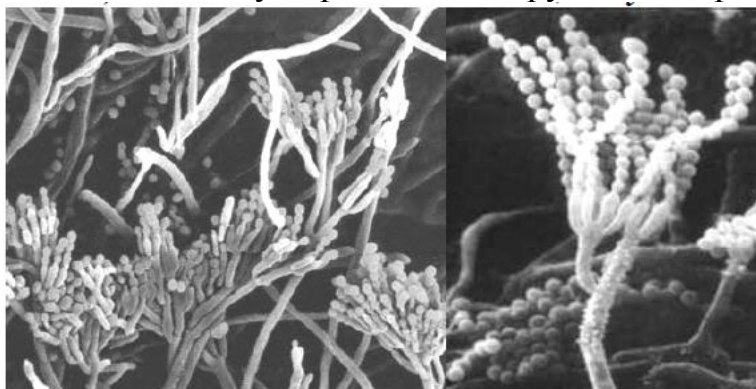


Рис. 2.9 Гриби *Penicillium chrysogenum* у світловому (*a*) та електронному (*б*) мікроскопах

Гриби роду *Aspergillus* (рис. 2.10) мають одноклітинні, кулясті, булавоподібної чи грушоподібної форми нерозгалужені конідиеносії.

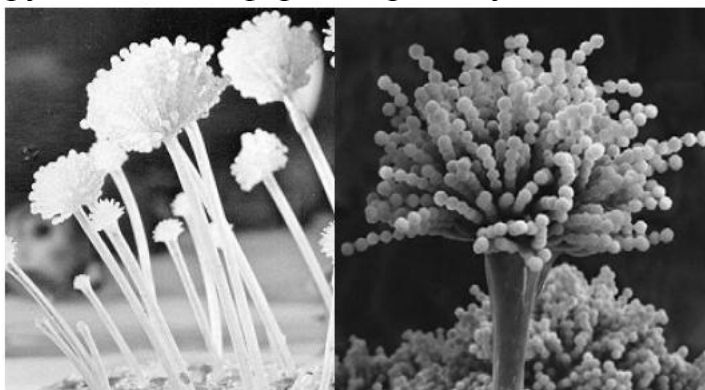


Рис. 2.10 Гриби *Aspergillus niger* у світловому (*a*) та електронному (*б*) мікроскопах

На них розташовуються паралельно одна одній короткі кеглеподібні

стеригми, від кожної з яких відшнуровуються ланцюжки конідій. Уся голівка конідиеносія нагадує дозрілу кульбабу або наконечник лейки зі струмками води, тому гриб називають лійковим. Конідії різного забарвлення (зеленуваті, жовті, коричневі, чорні), частіше округлі. Представники аспергілових грибів широко використовуються у промисловості. Вид *Aspergillus niger* застосовують у виробництві лимонної кислоти; *A. oryzae* і *A. awamori* використовують для одержання ферментних препаратів.

Деякі аспергіли викликають захворювання – аспергільози (дихальних шляхів, шкіри, слизуватої порожнини рота) людини і тварин. Існують види, що виділяють отрутні для тварин і людини речовини, – афлатоксини (похідні кумаринів), однією з біологічних дій яких є пухлиноутворення. Аспергілові і пеніцилові гриби є розповсюдженими збудниками псування (пліснявіння) харчових продуктів.

До піреноміцетів належить *Claviceps purpurea* – паразит хлібних і кормових злаків. Тверді, схожі на ріжок тіла темно-фіолетового кольору, що утворюються у суцвіттях злаків на місці звичайних зерен, являють собою склероції гриба. Склероції містять алкалоїди (похідні лізергінової кислоти) – сильнодіючі речовини, токсичні для людини і тварин. Ці алкалоїди, тим не менш, використовуються для одержання лікувальних фармацевтичних препаратів.

До піреноміцетів (порядок гіпокрейні – *Hypocreales*) належать види родів *Fusarium* (рис. 2.11). Більшість представників цих грибів є фітопатогенними.

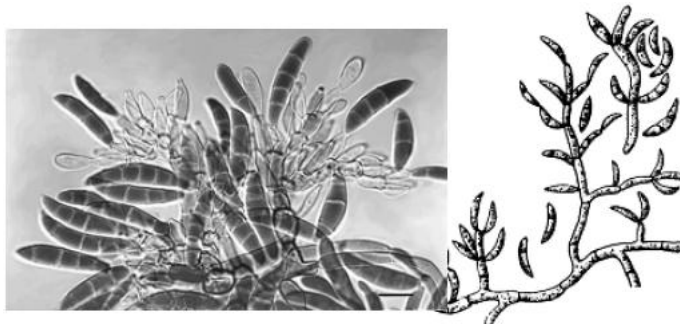


Рис. 2.11 Гриби роду *Fusarium*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Гриби роду *Fusarium* формують два типи конідій: макроконідії – серповидно-вигнуті багатоклітинні, котрі розвиваються на коротких розгалужених конідиеносіях (і мікроконідії – дрібніші еліптичні чи округлі одноклітинні (з одною-двома перегородками)). Мицелій цих грибів білий, біло-рожевий, жовтуватий.

Фузаріум (*Fusarium*) викликає захворювання різних овочів і плодів, відомі під загальною назвою фузаріозів. Існує вид, який утворює отрутні для людини речовини. У промисловості використовується вид *Fusarium moliniforme* для одержання гіберелінів – регуляторів росту рослин гормональної природи.

Представниками дискорміцетів є деякі лісові гриби (трюфелі, плоді тіла яких вживають у їжу), гриби роду *Sclerotinia* тощо. Для склеротинії

характерно утворення склероціїв на міцелії у циклі розвитку. Конідіальне спороносіння відсутнє. *Sclerotinia* – розповсюджений і небезпечний збудник білої гнилизни плодів і овочів при їх збереженні. Міцелій склеротинії пронизує уражений орган рослини, утворює на його поверхні білий пластівчастий наліт. У біотехнології гриби роду *Sclerotinia* використовуються для одержання ферменту β -глюкозидази.

Недосконалі гриби (*Anamorphic fungi*) – ті, у яких статевого (досконалого) способу розмноження немає або він не знайдений. Включає як одноклітинні (дріжджі), так і багатоклітинні мицеліальні форми.

Ботритис (*Botrytis*) має деревоподібно розгалужені конідієносії, що несуть на кінцях розгалужень зібрані у голівки одноклітинні димчастого кольору конідії (рис. 2.12).

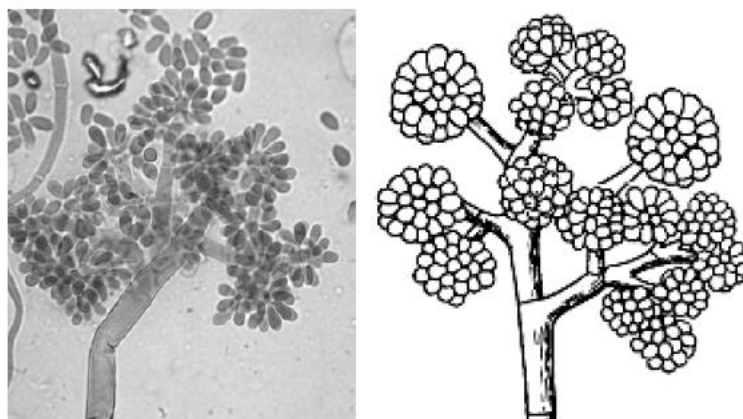


Рис. 2.12 Гриби роду *Botrytis*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Цей гриб продукує пектолітичні ферменти і тому уражає яблука, груші, багато овочів і ягід. Деякі види цього гриба знайшли своє практичне застосування. Гриби виду *Botrytis cinerea*, наприклад, використовуються для деградації β -1,3(1,6)-D – глюканів.

Альтернарія (*Alternaria*) характеризується наявністю багатоклітинних темнозбарвлених конідій булавоподібної вигнутотої форми, що розташовані ланцюжками або поодинокі на слабзорозвинених конідієносіях (рис. 2.13).

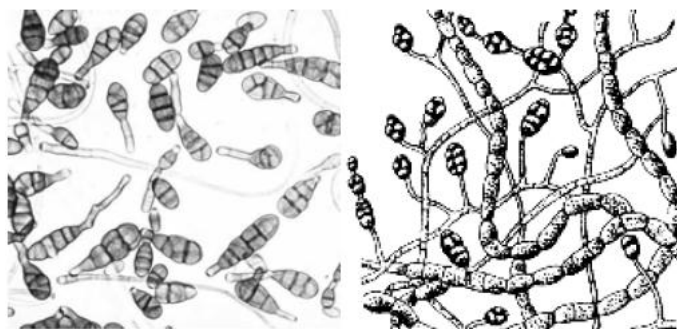


Рис. 2.13 Гриби роду *Alternaria alternaria*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Різні види *Alternaria* поширені в ґрунті і на рослинних залишках. Гриб викликає захворювання багатьох сільськогосподарських рослин, яке називається альтернаріоз. Розвиваючись на харчових продуктах, *Alternaria*

утворює на них чорні втиснені плями.

Дослідників цікавить здатність грибів виду *Alternaria alternata* до деградації пластиків. Ендоміцес (*Endomyces*) утворює розгалужений білий міцелій, гіфи якого легко розпадаються на оїдії (рис. 2.14).

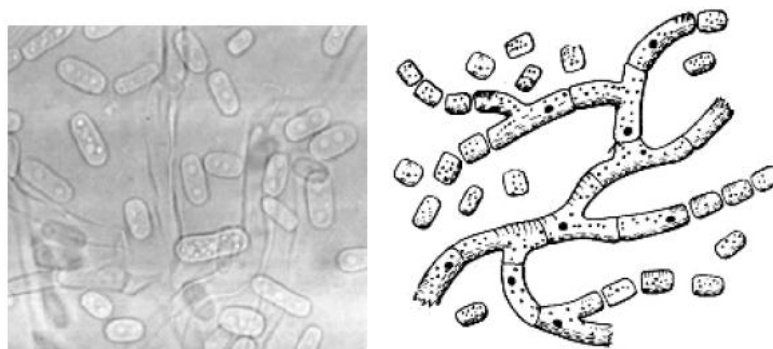


Рис. 2.14 Гриби роду *Endomyces*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Один з видів цього роду – *Endomyces lactis* (стара назва *Oidium lactis*) – молочна цвіль, часто розвивається у вигляді бархатистої плівки на поверхні квашених овочів і кисломолочних продуктів при їх збереженні. Гриб використовує молочну кислоту, яка знаходиться в цих продуктах і має консервуючу дію, що приводить до їх псування. У молочних продуктах *Endomyces* розкладає білки, жири. Ця цвіль зустрічається також на пресованих дріжджах, вершковому маслі, сирі й інших продуктах.

Фома (*Phoma*) (рис. 2.15) має короткі конідієносії у пікнідах з безбарвними одноклітинними конідіями різноманітної форми.

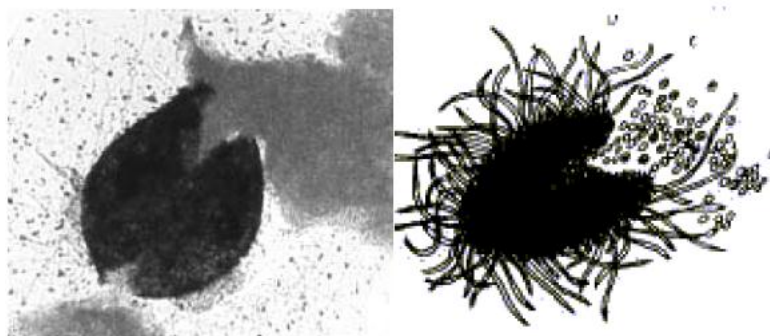


Рис. 2.15 Гриби роду *Phoma glomerata*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Серед грибів багато паразитів рослин, а також збудників псування овочів при збереженні – фомозу. Деякі види грибів роду *Phoma* мають велике значення у біотехнологічній практиці. Так, гриби виду *Phoma savai* є продуцентами цілого ряду фітотоксинів: кавоксину, кавоксиніну, кавоксону, які використовуються як регулятори росту рослин.

Кладоспоріум (*Cladosporium*) має слабкогіллясті конідієносії, що несуть на кінцях ланцюжки конідій (рис. 2.16). Конідії бувають різноманітної форми (округлої, овальної, циліндричної тощо) і розмірів, нерідко двоклітинні. Міцелій, конідієносії та конідії забарвлені в оливково-зелений колір.

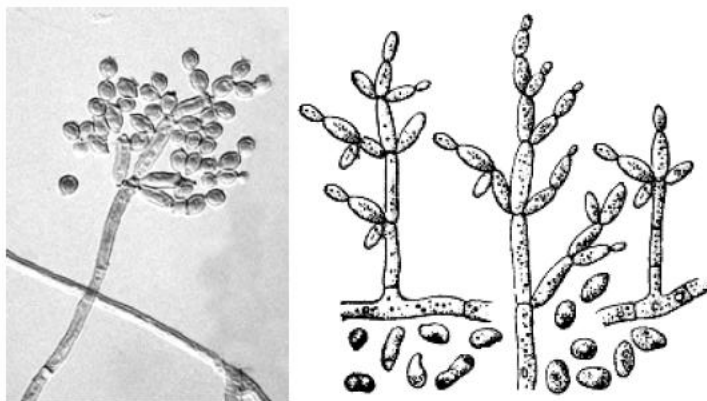


Рис. 2.16 Гриби роду *Cladosporium*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Ці гриби характерні тим, що виділяють у середовище темний пігмент. Кладоспоріум нерідко виявляється при холодильному збереженні на різних харчових продуктах у вигляді бархатистих темно-маслинових (до чорного кольору) плям.

Деякі види роду *Cladosporium* здатні продукувати ферменти целюлолітичного комплексу і тому активно використовуються для деградації целюлози.

Гриби роду *Trichothecium* (рис. 2.17) мають міцелій, що стелиться по поверхні субстрату. Конідіеносії прямі з рідкими перетинками іноді злегка роздуті на кінцях.

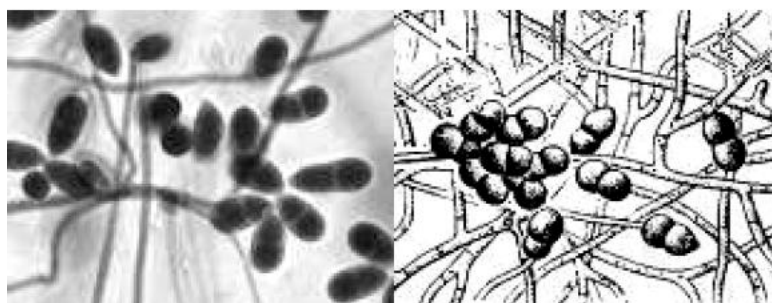


Рис. 2.17 Гриби роду *Trichothecium*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Конідії довгасті або грушеподібні, внизу звужені, з поперечною перетинкою. Гриби виду *Trichothecium roseum* продукують антибіотик трихотетин, целюлолітичні ферменти.

2.3. Вивчення у прижиттєвому непофарбованому препараті морфологічні властивості міцеліального гриба

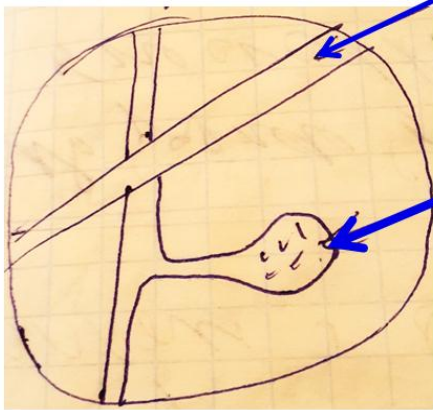
Мета: вивчити неозброєним оком і описати культуральні властивості одного з міцеліальних грибів (рід *Різопус*, *Аспергілус* і *Піциліум*), який вирощено на сусло-агарі. Відзначити вид, колір, пухнастість, висоту повітряного міцелію, форму і колір гігантської колонії.

Техніка виконання: приготувати препарат “роздавлена крапля”: нанести на предметне скло краплю суміші гліцерину зі спиртом “1:1”; розігнути у вигляді гачка бактеріологічну петлю, відібрати нею частину повітряного міцелію і помістити його в краплю на склі; двома препарувальними голками

розтягти міцелій у рідині і прикрити зверху покривним склом.

Мікроскопіювати у малому збільшенні (об'єктив x 8) коли злегка опущений конденсор. Замалювати картину мікроскопи препарату:

Форма протоколу

	<p>Гіф (або гіфа)</p> <p>Спорангій зі спорами</p>	<p>В поле зору мікроскопа видно ниткоподібні клітини (<i>гіфи</i>), що не розділені перегородками. А також органи безстатевого спороношення - <i>спорангії</i> (зі спорами всередині). Висновок: міцеліальний нижчий гриб Мукор на стадії безстатевого спороношення</p>
<p>МБІ Збільшення – 400 Забарвлення – Об'єкт - міцеліальний гриб (нативний препарат)</p>		

а) у препараті гриба роду Різопус відзначити несептовані гіфи з розгалуженнями на кінцях (ризоїдами) і наявність спорангіїв - плодових тіл безстатевого спороутворення - найбільш типових для нижчих грибів (округлий мішечок зі спорами);

б) у препараті гриба роду Аспергілус - відзначити густі гіфи і наявність конідій - плодових тіл безстатевого спороутворення, найбільш типових для вищих грибів. Конідії мають вигляд кульбаби (круглий центр із відгалуженнями зовнішніх спор по колу);

в) у препараті гриба Пініціліум відзначити густі гіфи і конідії - плодові тіла безстатевого спороутворення у вигляді щіточки.

Завдання на виконання

1. Ознайомитись з зовнішнім виглядом, кольором, щільністю, характером росту грибів на чашках Петрі.

2. Приготувати препарати в суміші гліцерину і спирту (1:1), роздивитись і замалювати міцелій, спорангій, спори та конідії (8×, 40×) *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamory*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium culmorum*, *Botritis cinerea*, *Trichothecium roseum*, *Endomyces lactis*, *Alternaria alternara*, *Phoma exigna*.

Опрацювання результатів

Результати спостережень необхідно занести до протоколу лабораторної роботи 2, у якому повинно бути відображено:

1. Назва лабораторної роботи. Дата виконання. Мета роботи.
2. Теоретичні відомості: Будова міцелію мікроміцетів. Характеристика способів розмноження грибів. Практичне значення різних видів грибів.
3. Практична частина (рисунок).

Висновок до роботи представити у вигляді таблиці морфолого-культуральних ознак та практичного значення розглянутих на лабораторному занятті:

Клас	Рід, вид	Колір колонії	Щільність міцелію	Будова міцелію	Спосіб безстатевого розмноження	Практичне значення

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте будову міцелію грибів. На які групи поділяються гриби за будовою міцелію?
2. Дайте характеристику вегетативних, безстатевих і статевих способів розмноження мікроміцетів.
3. Наведіть приклади практичного значення грибів, які належать до різних класів.
4. Охарактеризуйте культуральні ознаки міцеліальних грибів.

Лабораторна робота № 3

«Морфологія та систематика дріжджів»

Мета: Ознайомитися з культуральними і морфологічними властивостями дріжджів і методами їхньої ідентифікації.

План

- 3.1. Будова еукаріотичної клітини на прикладі дріжджової
- 3.2. Класифікація та практичне значення дріжджів
- 3.3. Вивчення морфології дріжджів

3.1. Будова еукаріотичної клітини на прикладі дріжджової

За сучасними уявленнями дріжджі є збірною систематичною групою одноклітинних мікроорганізмів, до якої відносять представників різних класів грибів. Дріжджі – одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми, тобто мають диференційоване ядро. На рис. 3.1 наведена схема будови дріжджової клітини.

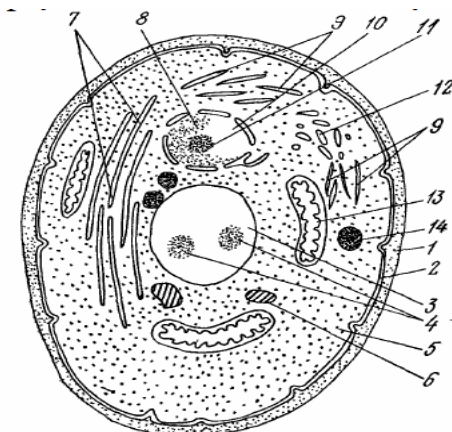


Рис. 3.1 Схема будови дріжджової клітини: 1 – клітинна стінка; 2 – цитоплазматична мембрана (ЦПМ); 3 – вакуоль, 4 – гранули поліфосфату; 5 – цитоплазма; 6 – глікоген; 7 – ендоплазматичний ретикулум; 8 – хроматин; 9 – рибосоми; 10 – ядро; 11 – ядерце; 12 – апарат Гольджі; 13 – мітохондрія; 14 – краплини жиру

Клітина оточена клітинною стінкою (1), яка є механічним бар'єром, зберігає і надає форму клітці, підтримує внутрішньоклітинний тиск. Структура клітинної стінки багат шарова, пориста, через пори клітинної стінки із зовнішнього середовища проникають низькомолекулярні речовини (вода, солі, цукор, вуглеводи тощо) і виводяться продукти метаболізму (діоксид вуглецю, амінокислоти, спирти, кислоти, тощо).

До внутрішньої поверхні клітинної стінки прилягає цитоплазматична мембрана (2). Вона виконує роль осмотичного бар'єру, через який шляхом дифузії й за допомогою численних ферментативних систем проходить активний обмін речовинами з зовнішнім середовищем. Мембрана оточує цитоплазму (5), яка представляє собою напіврідку колоїдну систему всередині клітини. У ній знаходяться всі структурні елементи і включення клітини, протікають біохімічні процеси життєзабезпечення.

Ядро дріжджової клітини (10) має округлу форму розміром 1...2 мкм. Основні хімічні сполуки ядра – ДНК та РНК. Рибосоми (9) мають розмір 15...20 нм і являють собою дрібні сферичні структури, за допомогою яких синтезується білок, їх кількість досягається в клітині $2 \cdot 10^4$ – 10^5 . Сховищем резервних речовин в клітині є мембранне утворення – вакуоль (3). Гранули поліфосфату (волютин) (4), глікоген (6), краплини жиру (14) – це резервні речовини, що виконують роль енергетичного запасу. Ендоплазматичний ретикулум (7) являє собою мембранне утворення у вигляді дрібних каналців і бульбашок, які локалізуються в певних ділянках цитоплазми. Він є носієм різних ферментних систем, що каталізують синтез білкових і ліпідних компонентів клітинних органел.

Апарат Гольджі (12) також є мембранним утворенням, що складається з орієнтованих певним чином стопок дискоїдних цистерн, оточених масою дрібних бульбашок. Білки з порожнини ендоплазматичного ретикулуму входять в апарат Гольджі, де піддаються різноманітним нековалентним модифікаціям, в результаті яких набувають кінцеві зрілі форми. Апарат Гольджі направляє їх у численні внутрішньоклітинні і позаклітинні «пункти призначення». Правильне сортування білків та їх модифікація перед вибірконим виділенням – одна з головних функцій апарату Гольджі, який також відповідає за виведення утворених у клітині сполук назовні.

Енергетичні потреби клітини забезпечують мітохондрії (13) – напівавтономні структури діаметром 0,2...2 мкм і довжиною 0,5...7 мкм.

3.2. Класифікація та практичне значення дріжджів

Спорогенні (досконалі) дріжджі належить до класу *Ascomycetes* (класу сумчастих грибів). Для аскоміцетних дріжджів властива відсутність міцелію і

плодових тіл. Клітина перетворюється на сумку (аск), усередині якої формуються аскоспори. Аски можуть розвиватися в результаті злиття двох гаплоїдних клітин-гамет. Копуляційне ядро ділиться шляхом мейозу. Навколо кожного ядра концентрується цитоплазма. Вона покрита щільною оболонкою. Кількість утворених аскоспор може досягати 12 (найчастіше їх 4...8). У диплоїдних дріжджів аски утворюються безстатевим способом, з однієї клітини. Дріжджові клітини розмножуються вегетативним способом – брунькуванням, поділом або комбінованим поділом-брунькуванням, а також безстатевим і статевим способами.

Серед дріжджів-аскоміцетів найбільше практичне значення мають три родини.

Перша родина – *Saccharomycetaceae* (сахароміцети). Форма клітин найчастіше кругла, овальна або еліпсоїдна. У дріжджовій клітині можна виявити оболонку, цитоплазму, ядро (після фарбування) і вакуолі. Застосовуючи різноманітні способи вітального (прижиттєвого) фарбування, в клітині можна розрізнити волютин (метахроматин), глікоген, краплини жиру.

Розміри клітин: довжина – 2,5...10 мкм, діаметр – 2,5...6,8 мкм. Дріжджі добре зброджують моносахариди, дисахариди.

Сахароміцети мають велике значення у промисловості. Вони здатні спричиняти бродіння цукрів, а також швидко накопичувати біомасу, яка складається, в основному, з білків, багатих на незамінні амінокислоти. Кінцевими продуктами бродіння є вуглекислий газ і спирт. Дріжджі, які здатні швидко перетворювати цукри на ці продукти бродіння належать до культурних, їх застосовують у хлібопеченні, пивоварінні, спиртовій промисловості, виноробстві, виробництві квасу тощо.

Представники роду *Saccharomyces* (рис. 3.2) розмножуються брунькуванням.

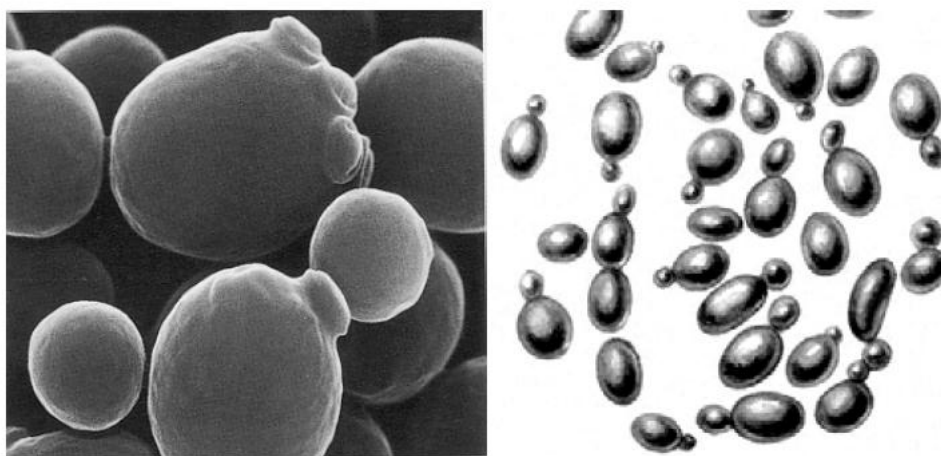


Рис. 3.2 Дріжджі роду *Saccharomyces*: а – електронна мікроскопія, б – графічне зображення

При цьому на молодій клітині утворюється пагорбок – брунька, що поступово збільшується в розмірі. Із зростанням бруньки між нею і клітиною утворюється перетяжка, яка поступово звужує канал з'єднання утвореної дочірньої клітини з материнською. За сприятливих умов цей процес звичайно

триває близько 2 годин. Часто молода клітина залишається на материнській і в свою чергу починає брунькуватися, в результаті чого виникають мікроколонії дріжджів. Сумки з 1...4 спорами виникають з окремих диплоїдних клітин безстатевим способом. Спори безбарвні, з гладкими оболонками, мають кулясту або овальну форму.

Рід *Saccharomyces* включає багато видів. Найважливіше значення для промисловості мають такі види:

Saccharomyces cerevisiae. Зброджує глюкозу, галактозу, сахарозу, на $\frac{1}{3}$ рафінозу, мальтозу, прості декстрини. Застосовується в спиртовому, хлібопекарному виробництві, є основною культурою виноробства.

S. carlsbergensis, спричиняє бродіння глюкози, галактози, сахарози, рафінози, мальтози і простих декстринів. Застосовується в пивоварінні.

S. minor (синонім *S. paradoxus*) зброджує глюкозу, галактозу, сахарозу, рафінозу на $\frac{1}{3}$, мальтозу не зброджує. Використовується в хлібопекарському виробництві у процесі приготування житнього хліба.

S. vini (синонім *S. ellipsoideus*) застосовується у виноробстві.

Друга родина *Schizosaccharomycetaceae* (шизосахароміцети) об'єднує одноклітинні паличкоподібні дріжджі, які розмножуються поділом; за несприятливих умов утворюють 4, рідше – 8 аскоспор. Під час поділу (частіше ізоморфного) спочатку ділиться ядро, потім посередині клітини починає рости клітинна стінка від периферії до центру. Із зростанням стінки цитоплазматична мембрана вистилає її зсередини. Коли нова клітинна стінка повністю розділить материнську клітину на дві нові, вона посередині розчиняється, в результаті чого нові клітини відокремлюються одна від одної.

Вид *Schizosaccharomyces pombe* (рис. 3.3) – дріжджі паличкоподібної форми довжиною 4...8 і діаметром 3...5 мкм.



Рис. 3.3 Дріжджі роду *Schizosaccharomyces*: а – електронна мікроскопія, б – графічне зображення

Зброджують не лише сахарозу, глюкозу, мальтозу, рафінозу на $\frac{1}{3}$, а й декстрини. У кінці циклу розвитку в статевій сумці утворюються 4 еліптичні спори з гладкими оболонками. Шизосахароміцети поширені в тропічних країнах, де їх застосовують для зброджування оцукрених крохмалистих

субстратів, зокрема для виготовлення пива «помбе». Широко використовуються на спиртових заводах Аргентини та Мексики. Інші види шизосахароміцетів зустрічаються в країнах помірнього клімату в плодово-ягідних соках, які самі забродили.

Третя родина – *Saccharomycodaceae* (сахаромікоди) має спільні ознаки: лимоноподібна або черевичкоподібна форма клітин; характерний спосіб вегетативного розмноження – комбінований (поділ брунькуванням). На материнській клітині утворюється брунькоподібний виріст з широкою основою, який потім відокремлюється поперечною перегородкою. Утворення дочірніх клітин починається за типом брунькування, а закінчується за типом поділу. З настанням несприятливих умов дріжджові клітини перетворюються на сумки з аскоспорами.

Вид *Saccharomyces ludwigii* (рис. 3.4) – великі лимоноподібні дріжджі, добре зброджують глюкозу, сахарозу, рафінозу на $\frac{1}{3}$.

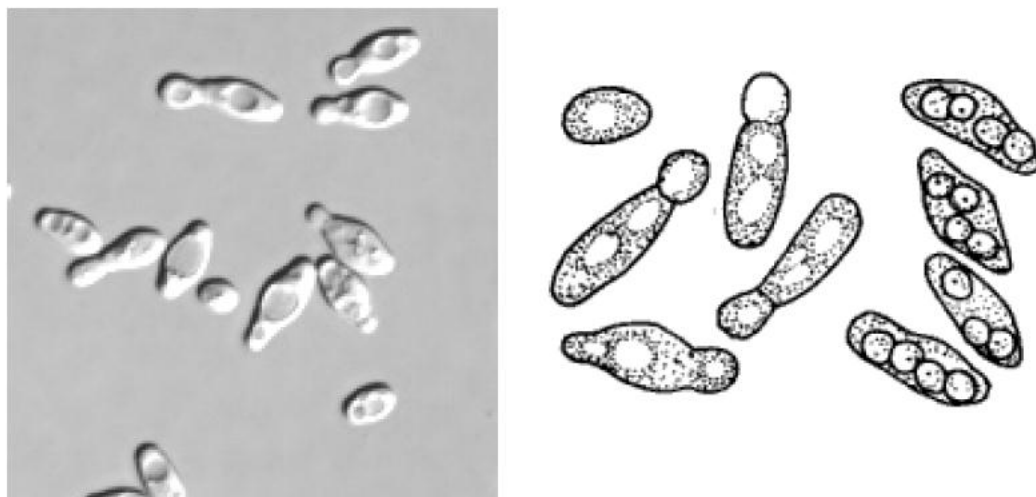


Рис. 3.4 Дріжджі роду *Saccharomyces*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Розвиваються у виноградних і плодово-ягідних соках, які самі забродили, в слизотечі дерев, у чайному грибку. Є шкідником харчових виробництв.

Недосконалі дріжджі. Для виробництва кормових дріжджів застосовуються деякі представники недосконалих дріжджів. Таку назву вони отримали тому, що розмножуються вегетативним (брунькуванням, рідше поділом) і безстатевим способом. Статевий спосіб розмноження у недосконалих дріжджів відсутній (не знайдений, або не підібрані відповідні умови). Для одержання кормових дріжджів на відходах харчових виробництв, гідролізатах деревини, соняшникового й рисового лушпиння, соломи, стеблин бавовнику, качанів кукурудзи та інших целюлозовмісних матеріалів, на парафінах, етанолі застосовуються деякі види родів *Candida*, *Trichosporon*, *Rodotorula*, *Torulopsis*.

Серед недосконалих дріжджів виявлені види, які спричиняють порушення технології та псування готових продуктів у харчових виробництвах – це представники родів *Candida*, *Brettanomyces*, *Trigonopsis* та ін.

Рід *Candida*. Форма клітини куляста, овальна, циліндрична, видовжена.

Розмножуються багатостороннім брунькуванням, а також безстатевим способом – бластоспорами. Утворюють псевдоміцелій, а іноді справжній міцелій.

Candida albicans (застарілий синонім *C.mycoderma*) (рис. 3.5) – форма клітин циліндрична, довгаста, рідше овальна, довжина – 4...8 мкм, діаметр – 2...4 мкм, на поверхні рідких субстратів утворюють плівки: молоді – білі, гладкі, старі – зморшкуваті, брудно-сірі. Асимілюють глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу.

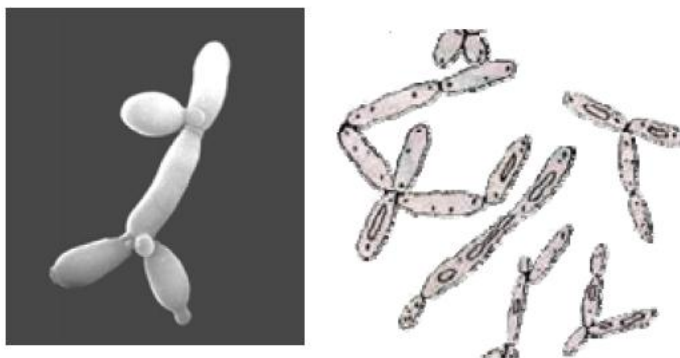


Рис. 3.5 Дріжджі виду *Candida albicans*: а – електронна мікроскопія, б – графічне зображення

Окиснюють етиловий спирт у CO_2 і воду шляхом дихання. Шкідник спиртового виробництва, пивоваріння, виноробства, виробництва квасу, безалкогольних напоїв. На спеціалізованих дріжджових заводах у дріжджеростильних апаратах розмножуються з набагато більшою швидкістю, ніж дріжджі – сахароміцети і здатні витіснити культурні дріжджі. Подібними шкідниками є *Candida crusei*, *Candida guilliermondi* і *Candida pulcherima*.

Candida utilis (рис. 3.6). Форма клітин овальна, клітини поодинокі, іноді з'єднані по дві-три, рідше утворюють гілочки або невеликі ланцюжки.

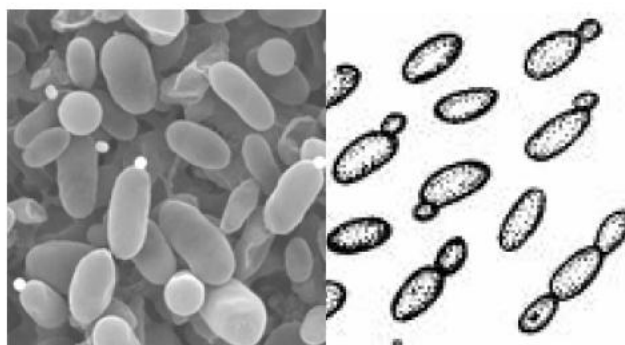


Рис. 3.6 Дріжджі виду *Candida utilis*: а – електронна мікроскопія, б – графічне зображення

Брунькування як полярне, так і бічне: псевдоміцелій та справжній міцелій не виражені. Застосовується для одержання кормових дріжджів на після спиртовій барді.

Candida scotti (рис. 3.7). Форма клітин округла до 4 мкм у діаметрі або

овальна, клітини зібрані у характерні “кущики”, утворюють псевдоміцелій.

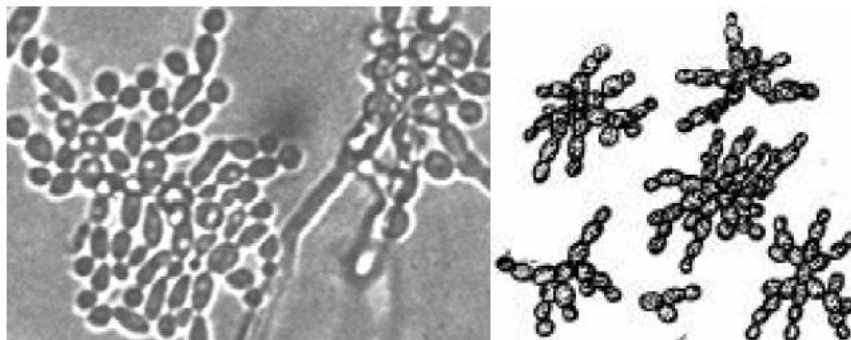


Рис. 3.7 Дріжджі виду *Candida scotti*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Застосовується для одержання кормових дріжджів на рослинних гідролізатах. Інші види *Candida* використовуються для отримання білково-вітамінних концентратів (БВК) на гідролізатах, комунальних відходах, парафінах, метанолі.

Рід *Trichosporon* (рис. 3.8). Клітини тонкі, видовжені, з тупими кінцями, а також овальні, поодинокі або з’єднані в ланцюжки.

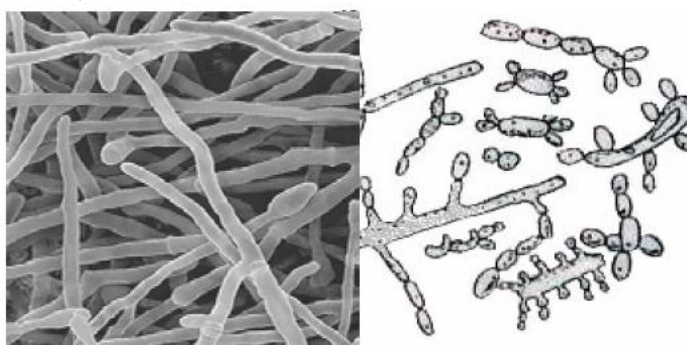


Рис. 3.8 Дріжджі виду *Trichosporon cutaneum*: а – електронна мікроскопія, б – графічне зображення

Часто зустрічаються міцелієподібні клітини різної довжини з поперечними перетинками. У багатьох клітин виявлені рогоподібні вирости. У клітинах добре помітні жирові включення. Діаметр клітин – 2...5 мкм, довжина – 10...15 мкм і більше. Псевдоміцелій та справжній міцелій розвинуті добре.

Вид *Trichosporon cutaneum* використовується для одержання кормових дріжджів на відходах спиртових заводів.

Рід *Rhodotorula* (рис. 3.9). Форма клітин овальна, кругла або трохи видовжена, паличкоподібна, довжина – 3...4 мкм, діаметр – 2...3 мкм, розмножуються брунькуванням.

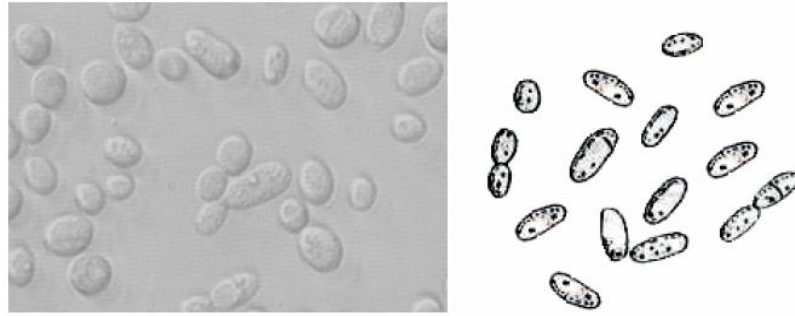


Рис. 3.9 Дріжджі роду *Rhodotorula*: а – світлова мікроскопія, б – графічне зображення

Псевдоміцелію та справжнього міцелію не утворюють. Синтезує каротиноїди, внаслідок чого колонії забарвлюються.

3.3. Вивчення морфології дріжджів

Морфологія дріжджів

Дріжджі являються одноклітинними крупними (до 10-15 мкм) грибовими організмами з класу Аскоміцет (*Ascomycetes*), існуючими у фазі росту переважно у вигляді окремих клітин. Вони не утворюють міцелій. Вивчення морфології дріжджів проводять при мікроскопії прижиттєвих, як незабарвлених, так і забарвлених препаратів при середніх та великих збільшеннях мікроскопу. При мікроскопічному вивченні дріжджів необхідно звернути увагу на наступні особливості морфології.

Форма клітин дріжджів частіше округла, овально-яйцеподібна, або еліпсоподібна, іноді циліндрична. В клітині, як правило, виявляються: оболонка, цитоплазма, ядро, включення поживних та енергетичних речовин: крапельки жиру, глікоген, волютин. В старіючих клітинах з'являються вакуолі – порожнини, наповнені водним розчином органічних та мінеральних речовин.

Важливою морфологічною ознакою дріжджів являються способи розмноження. В брунькуючих клітинах присутні одна або декілька дочірніх клітин, які часто не відділяються від материнської. Окрім брунькування, деякі види дріжджів можуть розмножуватися за допомогою спор.

Спороутворюючі або справжні дріжджі відносять до порядку Endomycetales, родини Endomycetaceae.

До їх числа відноситься більшість культурних дріжджів, які використовуються в промисловості. Деякі з дріжджів являються збудниками порчі харчових продуктів, їх називають дикими дріжджами.

Слід пом'ятати, що спори не завжди виявляються при мікроскопії Дріжджових клітин; у культурних дріжджів здатність до спороутворення придушена.

Дріжджі, які не здатні до спороутворення, об'єднані у порядок Cryptococates. Їх називають ложними дріжджами, або дріжджеподібними організмами. Деякі з них використовуються в техніці, другі являються збудниками порчі продуктів.

Вивчення морфології дріжджів

Студенти групами (ряд навчальних столів) виконують індивідуальні

завдання з приготування різних препаратів, потім обмінюються отриманою інформацією (ознайомлення з різними препаратами) і заносять до протоколу заняття рисунок і описання картини мікроскопії трьох варіантів препаратів дріжджів.

1. Приготувати препарат із нативних забарвлених дріжджів (1-ий ряд навчальних місць)

Мета — визначення віку клітин за морфологічними ознаками.

Приготувати із суспензії дріжджів препарат “роздавлена крапля”. З цією метою нанести на предметне скло краплю суспензії дріжджів, прикрити покривним склом, злегка притиснути його до предметного скла, щоб крапля не розтікалась по склу, і помістити препарат на предметний столик мікроскопа. Мікроскопія - у середньому збільшенні (об'єктив х40).

Аналіз препарату: помітити характер оболонки, її товщину, наявність світлих плям вакуолей, наявність включень і клітин, що брунькують, за морфологічними ознаками.

Зарисувати мікроскопічну картину мікроскопії препарату й описати результат.

2. Приготувати препарат пофарбованих дріжджів
(2-ий ряд навчальних столів)

Мета — диференціація живих і мертвих клітин.

Нанести на предметне скло краплю суспензії дріжджів і змішати з краплею метиленового синього (1:1000) або фуксину. Накрити покривним склом. Мікроскопія — у середньому збільшенні (х40).

Аналіз препарату: Відзначити інтенсивність забарвлення більшості клітин. Визначити, які клітини — живі чи мертві містяться переважно у препараті. Зарисувати картину мікроскопії препарату й описати результат.

3. Приготувати препарат, оброблений розчином Люголя

Мета — визначити наявність у клітині включень глікогену.

Методика приготування — аналогічна попередній роботі. Замість фарбування використовувати розчин Люголя.

Аналіз препарату: відзначити наявність у клітині зерен глікогену і зробити висновок про вік клітин дріжджів.

Завдання на виконання

1. Приготувати препарати «роздавлена» крапля і роздивитись під мікроскопом чисті культури аскоміцетних дріжджів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, вивчити їх форму, розміри, способи розмноження.

2. Приготувати препарати аспорогенних дріжджів *Candida scotti*, *Candida tropicalis*, *Candida valida*, *Candida utilis*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon cutaneum*.

Визначити в кожній культурі спосіб вегетативного (або безстатевого) розмноження, наявність або відсутність псевдоміцелію.

Опрацювання результатів

Результати спостережень необхідно занести до протоколу лабораторної роботи 3, у якому повинно бути відображено:

1. Назва лабораторної роботи. Дата виконання. Мета роботи.
2. Теоретичні відомості: Будова дріжджової клітини. Морфологічні ознаки дріжджів: форма клітин, їх розміри, способи вегетативного розмноження.

Практичне значення різних видів дріжджів.

3. Практична частина (рисунок).

Висновок до роботи представити у вигляді таблиці морфологічних ознак та практичного значення розглянутих на лабораторному занятті дріжджів:

Родина	Рід і вид	Форма клітин	Розмір клітин	Спосіб вегетативного розмноження	Утворення спор	Практичне значення

Контрольні запитання:

1. Наведіть характеристику будови дріжджової клітини. Зазначте особливості будови, хімічний склад та виконувані функції органел клітини: оболонки, ядра, вакуолі, рибосом, мітохондрій, включень.

2. Охарактеризуйте морфологічні ознаки дріжджів: форму клітин, їх розміри, способи вегетативного розмноження на прикладі сахароміцетів *Saccharomyces cerevisiae*, шизосахароміцетів *Shizosaccharomyces pombe* та сахаромікодів *Saccharomyces ludwigii*.

3. Охарактеризуйте морфологічні ознаки аспорогенних дріжджів на прикладі представників родів *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.

4. Яке практичне значення мають дріжджі?

Лабораторна робота № 4

“Методи культивування мікроорганізмів. Методика висіву мікроорганізмів. Умови вирощування мікроорганізмів”

Мета: 1. Ознайомлення з методами культивування мікроорганізмів; методикою висіву мікроорганізмів; умовами вирощування мікроорганізмів

План:

- 4.1. Методи культивування мікроорганізмів
- 4.2. Методики висіву мікроорганізмів
- 4.3. Умови вирощування мікроорганізмів

4.1. Методи культивування мікроорганізмів

Вирощування (культивування) мікроорганізмів широко використовується в лабораторних і виробничих умовах для виділення, накопичення та зберігання мікроорганізмів.

Цей метод використовується при якісному аналізі мікрофлори

різноманітних об'єктів для вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів та їх ідентифікації, при кількісному аналізі – для підрахування життєздатних особин, в виробничих умовах – для накопичення корисних людині мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності та ін.

Живильні середовища

Для культивування мікроорганізмів використовують спеціальні живильні середовища, які повинні містити необхідні живильні речовини і є оптимальним середовищем мікроорганізмів за фізико – хімічними умовами.

Обов'язковими хімічними елементами будь – яких живильних середовищ є так звані органогени (C, H_2, O_2, N), P, S, K, Mg, Fe, Ca (попелові елементи), які додають до середовищ у вигляді засвоєваних сполук. До складу середовищ входять також мікроелементи (Co, Ni, Zn та ін.), а для деяких мікроорганізмів і вітаміни. В живному середовищі повинна бути достатня кількість води (не менше 60%), яка виступає розчинником живильних речовин і додатковим джерелом (кисню) Оксигену, Гідрогену, а також деяких мінеральних елементів.

Необхідно підкреслити, що універсальних середовищ, придатних в рівній мірі для всіх мікроорганізмів, не існує. В залежності від особливостей обмінних процесів (процесів синтезу, способів одержання енергії) окремі види мікроорганізмів потребують відмінного складу живильних речовин. Ці відмінності стосуються головним чином джерел Карбону та Нітрогену. Так, в середовища для автотрофів не потрібно включати органічні речовини: Нітроген та інші необхідні елементи вони отримують з мінеральних солей, а Карбон з CO_2 . Більшість гетеротрофів в якості джерела Карбону засвоюють моно- та дісахари, багатоатомні спирти, органічні кислоти; потреба в карбоновмісних речовинах в них надзвичайно різноманітна: від амонійних солей (для одних видів) до повного набору амінокислот (для більш вимогливих видів).

При складанні живильних середовищ враховують умови, необхідні для здійснення обміну між клітиною і середовищем. Живильне середовище повинно мати кислотність (pH), оптимальну для вирощування даного виду мікроорганізму. Більшість бактерій тяжіє до нейтрального (pH біля 7,0) або слабо лужного середовища мікроскопічні гриби – до слабокислого. В живильному середовищі має бути певна концентрація розчинних речовин, тобто, певний осмотичний тиск. В дуже розведених або концентрованих середовищах розмноження мікроорганізмів уповільнюється і може навіть припинитись. Не менше важливим є підтримання в середовищі окисно-відновлюваних умов, відповідаючи енергетичному обміну мікроорганізму. Це досягається умовами аерації, або введенням в середовище речовин, володіючих різноманітними окислювальними властивостями.

Середовища для того ж самого мікроорганізму можуть відрізнятися в залежності від завдань дослідження.

За складом живильні середовища розподіляються на дві групи: **природні та штучні.**

Природними (або натуральними) називають середовища, які

складаються з натуральних харчових продуктів (молока, яєць, овочів, фруктів, м'яса). Більшість з них використовують у вигляді екстрактів або настоянок. **Штучні середовища** – готують за спеціальними рецептами з харчових продуктів, в які після відповідної обробки вводять додаткові речовини (пептон, цукри, кухонну сіль та ін.). До штучних середовищ відносять синтетичні середовища, які являються водними розчинами хімічно-чистих речовин в точно вказаних концентраціях.

За **фізичним станом (консистенцією)** живильні середовища можуть бути **щільними, напіврідкими та рідкими**. До **рідких** живильних середовищ відносять м'ясо – пептонний (МПБ), цукровий, жовчний бульйони, молоко, пептонну воду, сусло та ін.. Для ущільнення середовищ використовують агар – агар, желатину. Агар – агар – речовина рослинного походження, з морських водоростей, він індіферентний мікробіологічно, тобто не засвоюється більшістю мікробів; розплавляється при температурі 90-100°C, застигає при 36-40°C; утворюючи щільний гель. Прикладом **напіврідкого** середовища є м'ясо – пептонний агар (МПБ). **Щільні агаризовані** середовища годують, додаючи до рідких від 0,15 - 0,5 до 1,5 -3% агар – агару в залежності від мети дослідження. Желатина – білкова речовина тваринного походження. Застигає желатиновий гель при 20°C, розріджуються – при 22-27°C. Використання його як ущільнювача середовищ обмежено. Оскільки температура розплавлення желатинового гелю нижче температури вирощування більшості мікроорганізмів (35-37°C). Окрім того, він розріджується мікроорганізмами, спроможними розщеплювати білок. Живильні середовища, ущільнені желатиною (10-15%), використовують головним чином для вивчення протеолітичної здібності мікробів (спроможність до розчеплення білка). **Щільним середовищами** є, наприклад, м'ясо – пептонний желатин, виготовлений на основі МПБ,

В теперішній час вітчизняною промисловістю організоване виробництво деяких видів сухих живильних середовищ (сухий живильний агар, середовища для бактерій кишкової групи – Ендо, Плоскі рева та ін.). Це гігроскопічні порошки, які містять в висушеному вигляді всі необхідні компоненти живильних середовищ; перед роботою їх розчиняють у воді в концентрації від 1,5 до 6% і розливають у відповідні ємності для висіву мікроорганізмів. Перевага сухих середовищ складається з простоти та зручності приготування, незмінності складу, зручності транспортування, що набагато полегшує роботу мікробіологічних лабораторій.

За **призначенням** розрізняють **стандартні, елективні та диференційно-діагностичні** середовища. **Стандартні** середовища (загальноживані) придатні для розвитку багатьох видів мікроорганізмів. До складу відносяться МПБ, МПА, сусло – агар та ін.

Елективні (вибірні) середовища забезпечують переважне накопичення одного виду або групи мікроорганізмів та менш придатні або зовсім непридатні для розвитку інших. Ці середовища були запропоновані С.М. Виноградським та О.М. Бейеринковим і використовуються в мікробіологічній практиці для виділення мікробів з місць природного

перебування, для одержання накопичу вальних культур певного виду з матеріалу, що містить різноманітну мікрофлору.

Диференційно-діагностичні середовища слугують для диференціації одних видів мікроорганізмів від інших на підставі різниці в обмінних процесах. В склад цих середовищ зазвичай введені речовини, які дозволяють виявити ферментативну активність досліджуваних культур. Диференційно-діагностичними середовищами користуються в основному для ідентифікації невідомих видів мікроорганізмів.

Рецепти та способи виготовлення живильних середовищ, які частіше використовуються в мікробіологічній практиці, наведені в додатковій літературі.

Для зберігання живильних середовищ та вирощування мікроорганізмів зазвичай використовують скляний посуд різноманітних ємностей. Новий посуд кип'ятять в 10%-вому розчині соляної кислоти протягом 15 хв, споліскують холодною водою та висушують. Висушений посуд закривають ватними корками та стерилізують.

Після розливання в ємності живильні середовища також піддають стерилізації, використовуючи різні методи в залежності від складу середовища. Зберігають середовища в сухому, прохолодному, захищеному від світла та пилу приміщенні в шухлядах, шафах або на стелажах.

Принципи складання поживних середовищ для культивування мікроорганізмів

Для свого росту й розвитку мікроорганізми потребують необхідних поживних субстратів. У природних умовах усі необхідні поживні речовини вони отримують із довкілля (грунтового розчину, води). В лабораторних умовах харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються за рахунок поживних середовищ, які повинні містити *макроелементи* (С, О, N, H, P, S, Mg, Ca, Fe), *мікроелементи* (Zn, Mn, B, Cu, Mo та ін.) за необхідності – *фактори росту* (деякі амінокислоти, вітаміни, жирні кислоти, нуклеотиди). Різні групи мікроорганізмів відрізняються між собою за потребою в хімічних елементах та можливостях їх використання.

Залежно від того, яке джерело енергії можуть використовувати прокаріоти, їх поділяють на: *фототрофи* (джерело енергії – світло) і *хемотрофи* (джерело енергії – окисно-відновні реакції). Організми, для яких джерелом (донором) електронів в енергетичному процесі є неорганічні речовини, запропоновано називати *літотрофами*, а ті, у яких донорами електронів виступають органічні речовини – *органотрофами*. Тоді, залежно від джерела енергії й природи донора електронів, можливі **чотири типи** енергетичного метаболізму: хемолітотрофія, хемоорганотрофія, фотолітотрофія, фотоорганотрофія.

У конструктивному метаболізмі головна роль належить карбону, оскільки всі сполуки, з яких побудовані живі організми – це карбонові сполуки. Залежно від джерела карбону, для конструктивного метаболізму, всі прокаріоти поділяють на **дві групи** – автотрофи та гетеротрофи.

Автотрофи (від гр. autos – сам, trophe – харчування) – перетворюють

неорганічний карбон, карбонову кислоту ($H_2O + CO_2$) (яка не має енергетичної цінності) на багаті енергією речовини власного тіла.

Гетеротрофи (від гр. heteros – інший) потребують готові органічні сполуки, які використовують як джерело енергії й вуглецю. Тобто живляться за рахунок органічних субстратів, синтезованих іншими організмами.

Поняття гетеротрофія, досить широке й об'єднує організми, які різко відрізняються за потребами у поживних речовинах. Різниця між гетеротрофними прокаріотами з високою потребою у готових органічних сполуках і тими, потреби яких мінімальні, полягає у ступені розвинутої біосинтетичних властивостей.

Так, до паразитів відносять мікроорганізми, які здатні жити лише за рахунок живих організмів. Паразитарний спосіб життя зумовлений відсутністю деяких метаболічних шляхів у цих прокаріот, що призвело до їх повної залежності від продуктів метаболізму хазяїна.

Сапрофіти (від гр. sapos – гнилий, phyton – рослина) – потребують готові органічні сполуки, якими можуть бути гниючі рештки рослинного та тваринного походження.

Деякі прокаріоти потребують одну якусь сполуку (або кілька) із групи вітамінів, амінокислот або азотистих основ, які вони з тих чи інших причин не можуть синтезувати самі. Такі сполуки називають факторами росту, а мікроорганізми, що їх потребують – **ауксотрофами**, на відміну від **прототрофів**, які синтезують всі органічні сполуки з основного джерела карбону.

Нітроген – є одним із чотирьох основних елементів, із яких побудовані клітини. З розрахунку на сухі речовини, його вміст становить ~ 10%. У природі нітроген зустрічається в окисленій чи відновленій формах та у молекулярному вигляді – N_2 . Переважна більшість прокаріотів засвоює нітроген у відновленій формі (солі амоніаку, сечовина, органічні сполуки – амінокислоти та продукти неповного гідролізу). Багатьма прокаріотами може також використовуватись окислений нітроген.

Дослідження потреб прокаріотів у поживних елементах показало, що всі вони потребують металів, які можуть використовуватись у вигляді катіонів неорганічних солей. Деякі з них (ферум, калій, кальцій, магній) необхідні у досить великих кількостях, інші (цинк, манган, натрій, молібден, купрум, ванадій, нікель, кобальт) – у незначних. Роль металів зумовлена тим, що вони входять до складу основних клітинних метаболітів.

Таким чином, поживне середовище повинно містити всі необхідні компоненти для нормального розвитку мікроорганізмів, з урахуванням його фізіологічних особливостей. При цьому слід пам'ятати, що повністю універсального поживного середовища не існує.

В лабораторних умовах мікроорганізми вирощують на поживних середовищах, які повинні відповідати певним вимогам:

- бути поживними, тобто вони повинні задовольняти всі необхідні харчові потреби мікроорганізмів;
- містити необхідну кількість води;

- мати певні значення рН та Eh;
- бути ізотонічними;
- бути стерильними;
- бути прозорими (за можливістю).

Класифікація поживних середовищ за консистенцією. За консистенцією середовища поділяють на рідкі, щільні та напіврідкі. Для виготовлення рідких поживних середовищ поживні субстрати розчиняють у воді (наприклад, МПБ, пептонна вода, середовище Гісса).

Класифікація поживних середовищ за призначенням. За призначенням поживні середовища поділяють на:

- універсальні (загальноживані) середовища, на яких ростуть і розвиваються представники різних груп мікроорганізмів (наприклад, МПА, МПБ, пептонна вода). Вони використовуються для культивування мікроорганізмів та накопичення біомаси;
- середовища спеціального призначення, серед яких виділяють:
 - елективні середовища, які забезпечують розвиток певних груп мікроорганізмів (наприклад, середовища, які не містять зв'язаних форм нітрогену– для виділення азотфіксуючих бактерій);
 - селективні середовища призначені для селекції мікроорганізмів за певною ознакою (наприклад, стійкість до антибіотика);
 - диференційно-діагностичні (індикаторні) поживні середовища – дають можливість швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших або виявити деякі їх особливості. Наприклад, середовище Ендо, яке дозволяє виявити наявність клітин *Escherichia coli* у природних субстратах, оскільки лише *E. coli* на цьому середовищі утворює колонії рожевого або червоного кольору з металевим блиском (рис.4.1).



Рис. 4.1 Колонії *Escherichia coli* на середовищі Ендо

Способи ущільнення поживних середовищ. Щільні середовища готують на основі рідких, шляхом внесення ущільнювача. Як ущільнювач часто використовують агар-агар або інколи желатин (табл. 4.1). У виключних випадках, коли мікроорганізми не можуть рости за присутності органічних речовин (облігатні літотрофи), як ущільнювач для поживних середовищ використовують силікагель. Напіврідкі середовища отримують при внесенні половинної концентрації ущільнювача.

Таблиця 4.1.

Характеристики речовин, які використовуються для ущільнення поживних середовищ

Показник	Ущільнювач	
	Агар-агар	Желятин
Матеріал для одержання (походження)	морські водорості	шкіра, кістки, хрящі
Основні компоненти	полісахариди	білки
Температура плавлення	не менше 80°C	10% розчину 32°C
Температура ущільнення	30...40°C	22...25°C
Дія протеаз	не діють	діють
Конденсаційна вода	виділяється	не виділяється
Робоча концентрація	1,0...3,3%	10...20%

Агар-агар – складний гетерополісахарид, до складу якого входить агароза й агаропектин. Агар-агар отримують із деяких морських водоростей і випускають у вигляді пластинок або порошку. У воді він утворює гель, який плавиться за 100°C і ущільнюється за температури ~40°C. Для ущільнення вносять у середовище 1,5...2,0% агар-агару.

Методи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів в лабораторних умовах

Культивування (від лат. *cultus* – вирощування) – це вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах. Мікроорганізми, що розвинулись на поживному середовищі називають *культурами*. Для успішного вирощування мікроорганізмів необхідно забезпечити оптимальні умови культивування, які залежать від їх фізіологічних особливостей.

До таких умов відносять: склад поживного середовища, аерацію, температуру та інші специфічні фактори.

Інтервали температур, за яких можуть рости мікроорганізми суттєво відрізняються. За відношенням до температури мікроорганізми поділяють на:

- *мезофіли* – ростуть в діапазоні температур 20...40°C. Для водних та ґрунтових мікроорганізмів температурний оптимум 20...30°C. Для бактерій шкіри та слизових оболонок кишечника – 35...38°C;
- *термофіли* – ростуть за температур вище 45°C;
- *психрофіли* – ростуть за температури нижче 20°C. Оптимум 5...10°C. У лабораторних умовах температурний оптимум для мікроорганізмів забезпечується їх культивуванням у термостатах (рис. 4.2).



Рис.4.2 Сучасні лабораторні термостати

Температура у термостаті автоматично регулюється за допомогою

спеціального обладнання – терморегулятора, який підтримує її на постійному рівні. Термостат – це металевий ящик із подвійними стінками, між якими знаходиться повітря або вода. В отворі верхньої стінки знаходиться термометр, який показує температуру в середині термостата, і терморегулятор. Роль терморегулятора полягає в тому, що при перевищенні встановленого рівня температури, обігрів автоматично виключається або зменшується. Обігрів термостата забезпечується електричними тенами.

За відношенням мікроорганізмів до кисню їх розподіляють на:

- *аероби* – життєдіяльність яких відбувається за рахунок окиснення речовин киснем повітря;
- *анаероби* – отримують кисень при анаеробному розщепленні складних органічних сполук. Атмосферний кисень при цьому смертельний;
- *мікроаерофіли (факультативні аероби та анаероби)* – потребують умов із зниженим рівнем кисню.

Способи культивування аеробних мікроорганізмів в лабораторних умовах

Культивування на поверхні рідкого та щільного поживного середовища. В цьому випадку мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з повітря. При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу контакту середовища з повітрям. Для цього середовище наливають тонким шаром у посуд із широким дном – чашки Петрі, матраці, скошені поверхні у пробірках, колби (рис. 4.3).

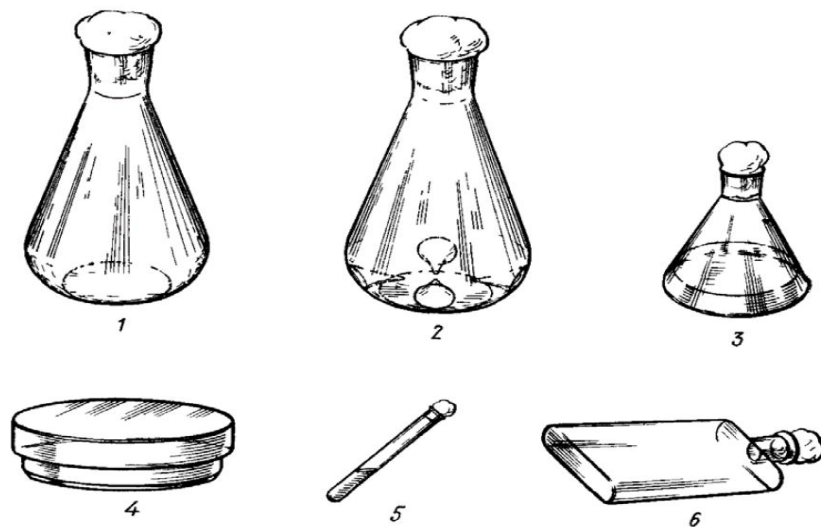


Рис. 4.3 Посуд для культивування мікроорганізмів: 1 – качалочна колба; 2 – качалочна колба з відбійниками; 3 – конічна колба; 4 – чашка Петрі; 5 – пробірка; 6 – матрац.

Глибинне культивування у рідкому середовищі. Під час глибинного культивування мікроорганізми використовують кисень, розчинений у воді. Розчинність кисню у воді є невеликою, тому, щоб забезпечити ріст аеробів у товщі рідкого середовища, його необхідно штучно аерувати. Найпростіший спосіб аерації це струшування колб або пробірок на спеціальних качалках (шуттель-апаратах) (рис. 4.4).



Рис. 4.4 Качалки (шуттель-апарати) для культивування мікроорганізмів

При цьому відбувається збільшення поверхні контакту поживного середовища з киснем повітря. У промисловості для вирощування мікроорганізмів у ферментерах, досить часто разом із механічним перемішуванням використовують ще й продування через середовище стерильного повітря.

Способи культивування анаеробних мікроорганізмів в лабораторних умовах.

Вирощування у високому шарі середовища. Рідке середовище наливають до країв пробірок чи колб. Перед використанням середовище прогрівають на водяній бані 30...40 хвилин, і швидко охолоджують, щоб не встиг розчинитись кисень. Посівний матеріал вносять на дно пробірки. Пробірки закривають гумовими або скляними пробками. Якщо ріст мікроорганізмів не супроводжується виділенням газів, поверхню середовища заливають стерильним вазеліном або парафіном.

Культивування у в'язкому середовищі. Дифузія кисню у рідину зменшується зі збільшенням її в'язкості. Готують середовище з додаванням 0,5% агар-агару (ущільнювача).

Вирощування у шарі щільного середовища. Посівний матеріал вносять у розплавлене та охолоджене до 45...50°C агаризоване середовище. У пробірках поверхню заливають стерильною вазеліновою олією.

Вирощування в анаеростатах. З анаеростатів (рис. 4.5) відкачують повітря, а потім заповнюють сумішшю азоту (80...90%) та вуглекислого газу (10...20%), за рахунок якої створюється надлишковий тиск, який перешкоджає проникненню кисню з повітря.



Рис. 4.5 Анаеростати

Щодо відношення мікроорганізмів до світла, то більшості

мікроорганізмів воно не потрібно, за винятком фототрофних бактерій.

Методи посіву мікроорганізмів на щільні та рідкі поживні середовища

В лабораторних умовах мікроорганізми вирощують у рідких або на щільних поживних середовищах. Посіви проводять так, щоб у середовище не потрапили з повітря сторонні мікроорганізми. З цією метою посіви проводять поблизу газового пальника або спиртівки, в полум'ї яких стерилізують петлю, кінці піпеток, обпалюють краї короків та пробірок при їх відкриванні та закриванні.

Пробірки з посівами тримають у лівій руці між великим і вказівним пальцями. Ватні корки із пробірок виймають затиснувши їх між безіменним пальцем і мізинцем правої руки. Краї відкритих пробірок і корки тримають поблизу полум'я пальника (рис. 4.6).

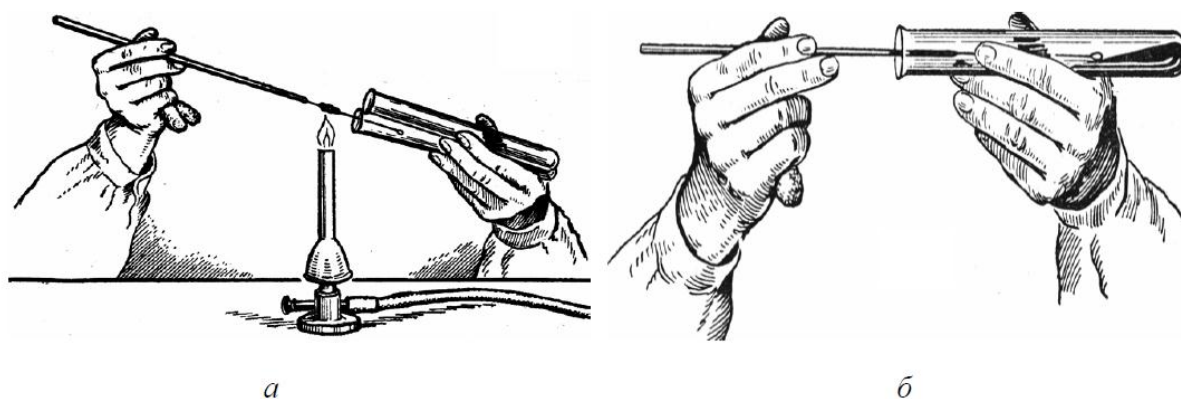


Рис. 4.6 Посів мікроорганізмів в рідке (а) і на скошене агаризоване (б) середовище

Посів у *рідке середовище* проводять петлею, пастерівською або градуйованою піпеткою. Суспензію закачують безпосередньо у середовище, матеріал розтирають петлею на стінці пробірки біля поверхні середовища, а потім пробірку струшують, змиваючи посівний матеріал у середовище. Після посіву петлю обов'язково фламбують у полум'ї пальника, а піпетки занурюють у дезінфікуючий розчин.

Перед посівом на *щільне поживне середовище* його необхідно розплавити на водяній бані, охолодити до 50...60°C і розлити у стерильні пробірки (стовпчиком або у вигляді скошеної поверхні) та чашки Петрі. Потім середовище охолоджують (ущільнюють) і підсушують. Посіви роблять бактеріальною петлею, голкою або шпателем.

У першому випадку матеріал набирають стерильною петлею і зигзагоподібно наносять на поверхню скошеного агаризованого середовища (рис. 4.7).

В *середовище, яке розлите стовпчиком*, досліджуваний матеріал засівають уколом бактеріальної голки.

При посіві шпателем на *поверхню середовища* в чашку Петрі наносять краплю мікробної суспензії, а потім рівномірно розтирають її по всій поверхні.

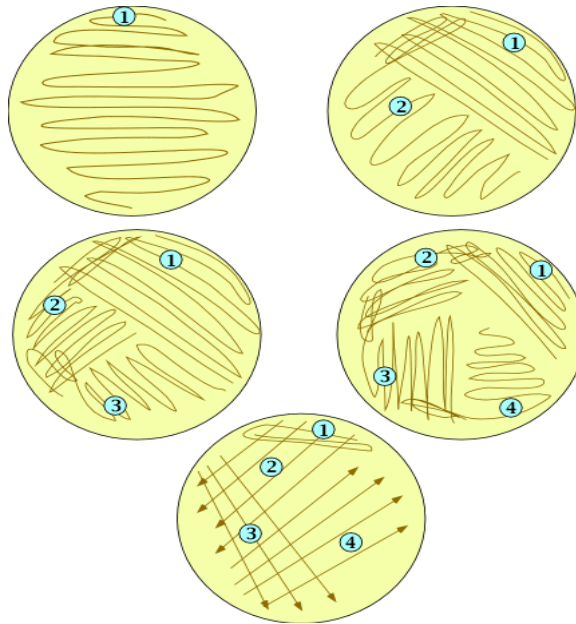


Рис. 4.7 Посів мікроорганізмів на чашку Петрі петлею (метод поверхневих штрихів).

4.2. Методики висіву мікроорганізмів

В залежності від завдань дослідження, виду живильного середовища та способу його розливання в лабораторному посуді використовуються різноманітні методи висіву досліджуваного матеріалу. При висіві культури необхідно дотримувати стерильність, тобто запобігати можливості забруднення досліджуваного матеріалу та живильних середовищ сторонніми мікроорганізмами.

Висів культури на живильні середовища в пробірках

Техніка висіву за етапом вказана на рис.4.6, 4.8, 4.9

а) пробірки з культурою та стерильним живильним середовищем кладуть на два пальці лівої руки з нахилом до працюючого; пробірки підтримують великим пальцем так, щоб всі маніпуляції здійснювались під контролем ока; в праву руку, як писне перо, беруть бактеріологічну петлю і прожарюють їх в полум'ї пальника;

б) не випускаючи петлі, виймають правою рукою корки одночасно з обох пробірок, затиснувши їх між мізинцем та долонею;

в) простерилізовану петлю вводять в пробірку з культурою і відбирають матеріал;

г) проводять висів культури: при висіві на скошений агар петлю обережно вводять в пробірку, не доходячи до межі конденсаційної води, та зигзагоподібними рухами розподіляють матеріал на поверхні агару знизу доверху; висів в агаровий стовпчик проводять шляхом проколювання середовища до дна пробірки; при висіві на рідкі середовища матеріал, взятий петлею, наносять на стінку пробірки біля верхнього рівня середовища і, злегка струшуючи пробірку змивають його середовищем;

д) після пересіву культури кінці пробірок проносять крізь полум'я пальника для стерилізації (фламбують), обпалюють ватні корки, швидко затуляють пробірки та пропалюють петлю.

Висів суспензії мікроорганізмів можна проводити також за допомогою піпетки. З цією метою піпетку фламбують, опускають в ємність з культурою (пробірка, колба), набирають певну кількість матеріалу, затискають отвір піпетки вказівним пальцем тієї ж руки і переносять завесь до живильного середовища, видуваючи її з піпетки. Піпетку опускають в склянку з дезінфікуючим розчином.

Висів на *щільні середовища* в чашках Петрі здійснюють різними методами в залежності від необхідності зростити мікроорганізми в товщі середовища або на його поверхні:

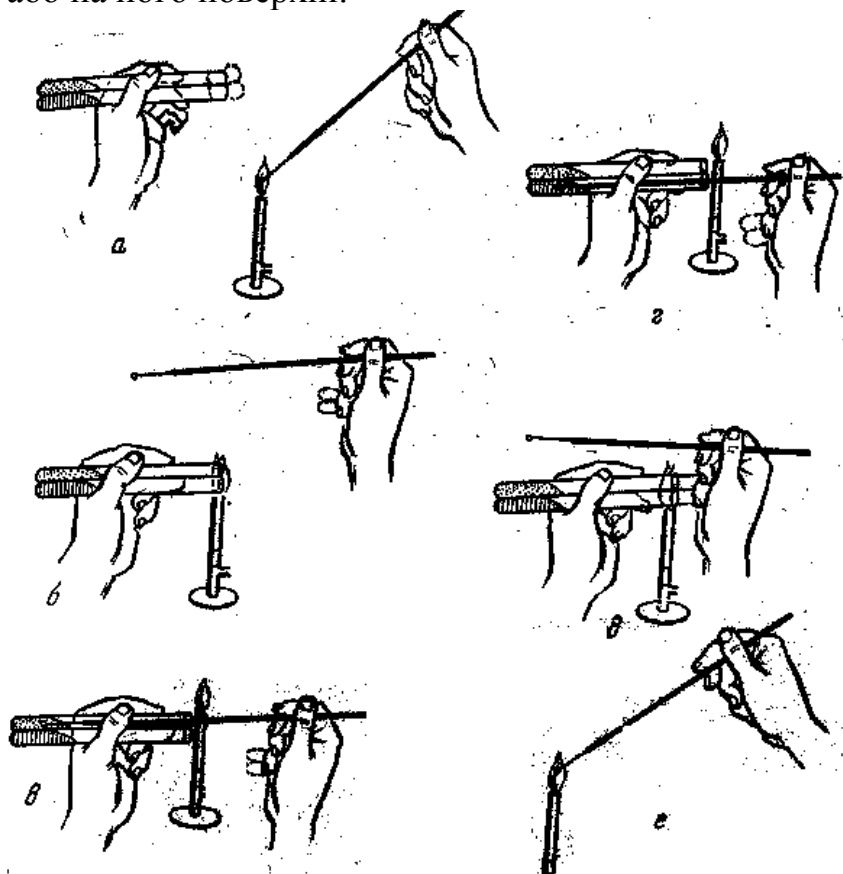


Рис. 4.8. Пересів культури мікроорганізмів у пробірки з середовищем:
a, e – стерилізація петлі; *б* – стерилізація країв пробірки;
в, г – здобуття та висів матеріалу; *д* – закриття пробірок пробками.

а) для *глибинного висіву* (в товщі середовища) використовують зазвичай відміряні кількості щільного середовища, заготовлені в пробірках по 10-15 мл. Культуру вносять в пробірки з розплавленим та охолодженим до 40-45°C агаром, а потім заливають суміш в чашку Петрі. Можливий і інший спосіб глибинного висіву: завесь мікроорганізмів вносять безпосередньо в стерильну чашку Петрі на дно, злегка відкривши кришку, а потім заливають її розплавленим та охолодженим агаром. Середовище з культурою ретельно перемішують, обертаючи чашку, не піднімаючи її з поверхні столу, і залишають чашку на столі до застигання агару;

б) для *поверхневого росту* досліджуваний матеріал наносять на поверхню все застиглому середовища (рис. 4.7 та 4.9).

Розподілення матеріалу по платівці агару можна виконати за

допомогою шпателя або бактеріальної петлі. При висіві шпателем (скляною паличкою, зігнутою у вигляді трикутника) чашка з застиглим середовищем знаходиться на поверхні столу.

Лівою рукою злегка відкривають кришку, а правою вносять на поверхню агару певну кількість (петлю, краплю або певний об'єм) культури. Рухаючи шпатель по колу, розділяють культуру по всій поверхні середовища. При використанні для висіву бактеріологічної петлі здійснюють висів штриховим способом (рис. 4.7 та 4.9).

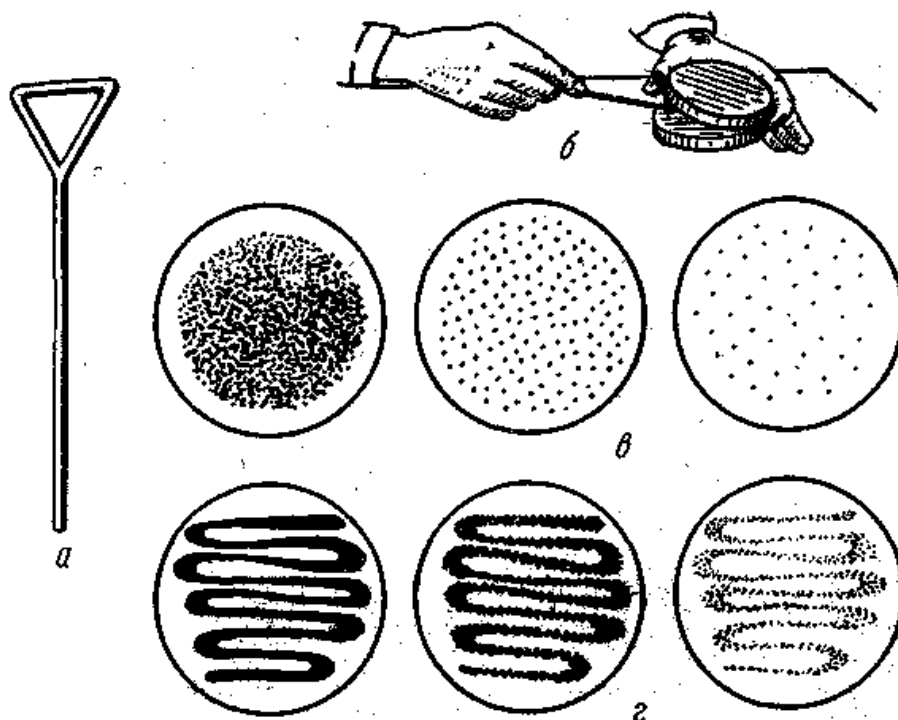


Рисунок 4.9. Висів мікроорганізмів на поверхню щільного середовища
 а – шпатель Дригальського; б – положення чашки та руки при висіві;
 в – ріст мікроорганізмів після висіву шпателем;
 г – ріст мікроорганізмів після висіву петлею

4.3. Умови вирощування мікроорганізмів

Температура. Для оптимального розвитку мікроорганізмів необхідна певна температура, притаманна видовим потребам культури.

Більшість мікроорганізмів активно розмножується при температурі 25-37°C (бактерії – при 36-37°C, плісняві гриби – при 25-30°C). Холодолюбні (психрофільні) мікроорганізми розвиваються в межах від 0 до 20°C.

Для теплолюбних (термофільних) мікроорганізмів оптимальною температурою росту є 45-65°C.

Відхилення температури від оптимальної затримує розвиток мікроорганізмів.

Тому їх вирощують в спеціальних термостатах – шафах з термоізоляцією, в яких підтримується постійна температура, відрегульована у відповідності з потребами культур. (рис.4.2.).

Світло. Більшість мікроорганізмів не потребують світла, а прямі

сонячні промені пригнічують їх розвиток. В зв'язку з цим мікроорганізми вирощують в неосвітлених термостатах.

Аерація. Мікроорганізми характеризуються неоднаковими потребами у вільному кисні, що визначає різницю в умовах їх культивування.

Мікроорганізми аероби та факультативні анаероби вирощують при доступі кисню в звичайних умовах повітряного середовища.

Культивування анаеробів проводиться при відсутності кисню, що створюється різними способами.

Найбільш простий спосіб – механічний захист мікроорганізмів від повітря шляхом вирощування їх в високому шарі рідкого середовища (в пробірці до 10-15 мм), поверхня середовища при цьому заливається тонким шаром стерильної вазелінової олії або парафіну. Для видалення з середовища розчиненого Оксигену її кип'ятять 20-30 хв. В водяній бані безпосередньо перед висівом. Зменшення дифузії кисню в рідкі середовища з повітря досягається ущільненням середовища агар-агаром (0,2-0,3%). При використанні щільних середовищ здійснюється глибинний висів в чашках Петрі, звичайних пробірках або трубках Буррі (скляні трубки довжиною 20-25 см, діаметром 1-1,5 см).

Суворі анаеробні мікроорганізми вирощують шляхом видалення кисню з навколишнього середовища. В цьому випадку ємності з висівами вміщують в посудину, що герметично зачиняється (скляний вакуумний ексікатор), або приладдя (мікроанаеростат), звідки повітря видаляють насосом. З герметичних посудин кисень можна видалити також хімічним способом, вмістивши до них хімічні речовини – відновлювачі (наприклад, лужний розчин пірогалолу, металічне залізо та ін.).

Термін культивування. У відповідності з закономірностями росту більшість культур бактерій вирощують протягом 24-48 годин. Плісняві гриби та дріжджі культивують протягом тижня.

Завдання на виконання

1. Ознайомитися з роботою автоклаву, термостату, анаеростату користуючись їх описом у лабораторному практикумі та поясненнями викладача.

2. Загорнути чашки Петрі, піпетки й пробірки з колбами в папір для проведення їх стерилізації в автоклаві. Виготовити ватні корки для пробірок.

3. Провести стерильний посів дріжджів на рідке та щільне середовище.

4. Почати виділення чистої культури дріжджів із суміші дріжджів за методом Коха.

5. Почати виділення чистої культури мікроорганізмів за методом Дригальського із виробничих субстратів.

Опрацювання результатів

За результатами роботи необхідно скласти протокол лабораторної роботи 4, у якому повинно бути відображено:

1. Назва лабораторної роботи. Дата виконання. Мета роботи.

2. Теоретичні відомості: Принципи складання поживних середовищ для

культивування мікроорганізмів, вимоги до лабораторних поживних середовищ. Класифікація поживних середовищ за походженням (складом), за консистенцією, за призначенням. Способи ущільнення поживних середовищ. Методи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів в лабораторних умовах.

3. Практична частина – записати у лабораторному зошиті послідовність операцій, необхідних для здійснення посівів, назви посіяних культур мікроорганізмів та номер суміші для виділення чистої культури.

У висновку до роботи необхідно класифікувати використані на лабораторному занятті поживні середовища за походженням, призначенням та фізичним станом, а також відзначити застосовані способи посівів та методи культивування.

Контрольні запитання

1. Які умови необхідно забезпечити для нормального вирощування мікроорганізмів?

2. На які групи поділяються мікроорганізми залежно від відношення до температури?

3. На які групи поділяють мікроорганізми в залежності від джерела карбону?

4. Назвіть макро- та мікроелементи, які повинно містити поживне середовище.

5. Що являє собою агар-агар та які його фізичні характеристики? Чому желатин має обмежене використання для ущільнення поживних середовищ?

6. Яким вимогам повинні відповідати поживні середовища?

7. Як класифікують поживні середовища залежно від походження, призначення та консистенції?

8. Як забезпечити вирощування аеробних та анаеробних форм мікроорганізмів?

9. Яка техніка посіву на рідкі та щільні поживні середовища?

Лабораторна робота № 5

«Мікроскопія фіксованого препарату бактерій та посів суміші бактерій на МПА»

Мета: Ознайомитися з методикою посіву суміші бактерій на щільне живильне середовище (МПА) методом «посіву, що виснажується»

План

5.1. Приготування фіксованого препарату із суміші бактерій

5.2. Пофарбування фуксином препарату із суміші бактерій

5.3. Проведення мікроскопії препарату з використанням імерсійного об'єктива

5.4. Посів суміші бактерій на щільне живильне середовище (МПА) методом «посіву, що виснажується»

5.1. Приготування фіксованого препарату із суміші бактерій

Фіксування дає можливість перервати життєві процеси в об'єкті, зберігши незмінною його структуру. У результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще профарбовуються.

Виготовлення *фіксованих* забарвлених препаратів клітин включає ряд послідовних етапів:

1. Приготування мазка. На чисте предметне скло, знежирене милом або спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером (знежирення скелець здійснюють вдалині (на відстані) від пальників), наносять краплю дистильованої води. Фламованою (прожареної в полум'ї пальника) бактеріологічною петлею чи голкою з пробірки з культурою, тримаючи її в лівій руці в горизонтальному положенні поблизу пальника, беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю. Отриману суспензію рівномірно розтирають петлею на площі 2...4 см². Мазок повинен бути тоненьким, рівномірним за товщиною, овальним за формою.

2. Висушування мазка. Мазок висушують за кімнатної температури на повітрі або у теплом повітрі над запаленою спиртівкою, не допускаючи перегрівання.

3. Фіксація мазка передбачає декілька моментів:

- убити (знешкодити) клітини мікроорганізмів;
- забезпечити краще прилипання клітин до скла;
- зробити мазок більш сприйнятливими до барвників.

Найбільш розповсюдженим методом фіксації є термічна обробка.

З цією метою препарат тричі проводять через полум'я пальника, тримаючи скло мазком вгору. Мазок не треба перегрівати, оскільки при цьому відбуваються грубі зміни клітинних структур, а інколи їх морфології. Для вивчення тонкої будови клітини використовують фіксацію хімічними рідинами.

4. Фарбування. Розрізняють прості й диференційні методи забарвлення мікробних клітин. При простому фарбуванні забарвлюється вся клітина, добре видно її форму й розміри. Методи диференційного фарбування передбачають виявлення деяких клітинних структур (запасні речовини, включення, спори...). Для простого фарбування використовують якийсь один барвник (генціановий фіолетовий, метиленовий синій, фуксин). Для цього фіксований препарат кладуть на паралельні скляні рейки (місток) над кристалізатором (кюветою) і заливають препарат фарбою на 0,5...3 хв. (рис. 5.1). Після закінчення фарбування препарат промивають водою до тих пір, поки вода не стане безкольоровою. Потім препарат висушують на повітрі, наносять на мазок краплю імерсійної рідини і мікроскопіюють. Після розгляду препаратів фронтальну лінзу об'єктива необхідно протерти.

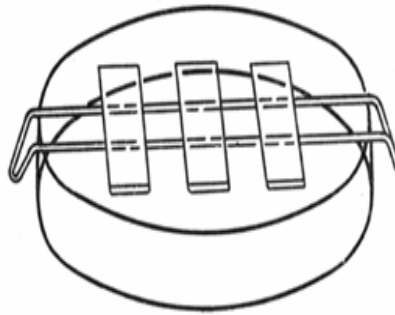


Рис. 5.1 Місток з паралельними рейками для фарбування препарату

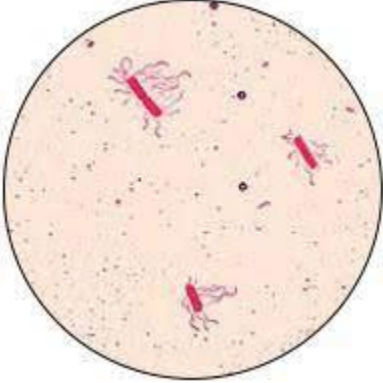
У *нашому випадку*: суміш невідомих бактерій знаходиться в пробірці, що поставлена в штатив. Наші дії: приготувати мазок із суміші бактерій, висушити на повітрі, зафіксувати в полум'ї спиртівки.

5.2. Фарбування фуксином препарату із суміші бактерій

Пофарбувати препарат (зафіксований мазок) простим способом – фуксином.

5.3. Мікроскопія препарату з використанням імерсійного об'єктива

Вивчити під мікроскопом (з використанням імерсійного об'єктива) морфологію бактерій, відзначити склад суміші бактерій (форми клітин). Зарисувати й описати мікроскопічну картину за формою:



У препараті виявлено клітини 2 типів бактерій за формою: кулеподібні і паличкоподібні.
Висновок: суміш коків і паличкоподібних бактерій

МБІ
Збільшення 1000
Фарбування фуксином
Суміш бактерій

5.4. Висів суміші бактерій на щільне живильне середовище (МПА) методом «посіву, що виснажується»

Метод штрихових посівів сьогодні використовується в мікробіологічних лабораторіях найчастіше. Матеріал, що містить мікроорганізми, набирають бактеріологічною петлею й наносять на поверхню поживного середовища біля краю чашки. Знімають надлишок матеріалу й проводять його посів паралельними штрихами від краю до краю чашки (рис. 5.2).

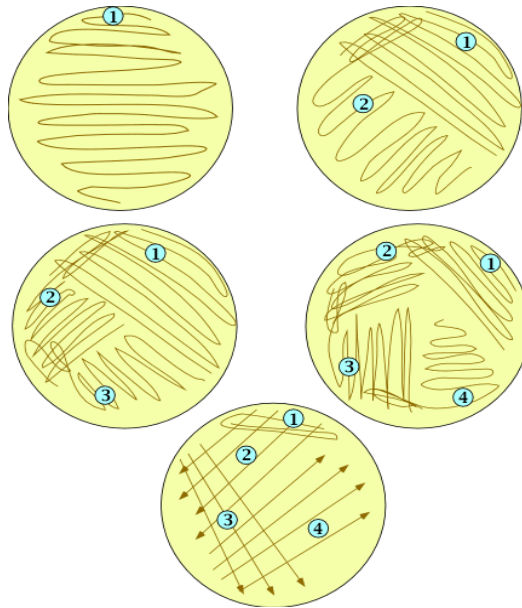


Рис. 5.2 Посів мікроорганізмів на чашку Петрі петлею (метод поверхневих штрихів)

Через добу інкубації посівів за оптимальної температури на поверхні чашки виростають ізольовані колонії мікроорганізмів (рис. 5.3).



Рис. 5.3 Ізольовані колонії мікроорганізмів, одержані методом штрихових посівів

Після посіву чашки поміщають у термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворилася на кришці чашки Петрі, не перешкодила одержати ізольовані колонії. Чашки витримують у термостаті протягом 1...7 діб залежно від швидкості росту мікроорганізмів. Вирослі ізольовані колонії відсівають петлею на поверхню скошеного щільного середовища в пробірці або в рідке середовище.

Методика посіву суміші бактерій на МПА

Взяти для роботи чашку Петрі з застиглим МПА. Надписати з боку дна. Вказавши № групи і № робочого місця (наприклад, Т-43, №7).

Стерильно! Бактеріологічною петлею відібрати стерильно над вогнем, пропаленою петлею культуру (суспензію) з пробірки і зробити її посів штрихом на поверхні МПА у наступному порядку: для посіву суміші бактерій на МПА беруть попередньо приготовлені три чашки Петрі з МПА. На денці чашок вказують їх номер (1, 2 та 3), а також номери робочих місць студентів та групу, після чого ставлять чашки на стіл покритими кришками зверху. Дотримуючись правил стерильності, відбирають стерильною піпеткою 2 мл досліджуваної суспензії бактерій і наносять її на поверхню агару в першій чашці. Далі здійснюють поверхневий посів культури за допомогою шпателя Дригальського (послідовно з першої чашки до другої і з другої – в третю).

Після закінчення посіву шпатель занурюють в дезінфікувальний розчин; чашки перевертають догори дном, щоб конденсаційна вода, що накопичується при застиганні середовища, не стікала з покритишки та не розмивала ріст культури. Посіви вміщують до термостата для культивування при 37°C на 24-48 годин.

Увага! Не можна спущувати середовище петлею. Петля з культурою повинна ковзати по поверхні. Потрібно, не відриваючи від агару петлю, провести нею по поверхні середовища від бортика чашки до протилежного бортика, заштриховуючи усю поверхню середовища.

Зроблений посів має назву **поверхневого посіву, що виснажується**. Чашки закрити кришкою, перевернути догори дном і поставити в термостат за температури 37°C на 24-48 годин. Записати в альбом умови посіву.

Завдання на виконання

1. Приготувати фіксований пофарбований фуксином препарат із суміші бактерій. Провести мікроскопію препарату з використанням імерсійного об'єктива. Зробити посів суміші бактерій на щільне живильне середовище (МПА) методом «посіву, що виснажується».

Опрацювання результатів

За результатами роботи необхідно скласти протокол лабораторної роботи 5, у якому повинно бути відображено:

1. Назва лабораторної роботи. Дата виконання. Мета роботи.
2. Теоретичні відомості: метод поверхневого посіву – «штрихових посівів».

Практична частина – записати у лабораторному зошиті результати досліду з вивчення під мікроскопом морфологію бактерій (форми клітин).

Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняття методу поверхневого посіву – «штрихових посівів».
2. Наведіть методику поверхневого посіву, що виснажується.
3. Наведіть декілька основних моментів фіксації мазка мікробів.
4. Вкажіть умови висушування мазка мікроорганізмів.
5. Назвіть чотири послідовних етапи виготовлення фіксованих забарвлених препаратів мікробних клітин

Лабораторна робота № 6

«Виділення та ідентифікація чистих культур мікроорганізмів»

Мета: Ознайомитися з методами виділення та ідентифікація чистих культур мікроорганізмів

План

- 6.1. Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів
- 6.2. Виділення чистої культури з однієї клітини
- 6.3. Вивчення чистих культур мікроорганізмів з метою ідентифікації
- 6.4. Виділення чистих культур та їх вивчення, що виконують в декілька

етапів, які відповідають дням дослідження

6.1. Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів

Методи якісного аналізу мікрофлори

При мікробіологічному дослідженні різноманітних об'єктів широко використовуються методи якісного аналізу, які дозволяють орієнтуватися у видовому складі мікрофлори. Ці методи засновані на вивченні біологічних особливостей мікроорганізмів.

Знання якісного складу мікрофлори харчових продуктів дозволяє робити висновки про їх доброякісність, стійкість при зберіганні, а в продуктах, одержаних з використанням мікробіологічних процесів, - про відповідність мікрофлори продукту завданому складу заквасок. Методи якісного аналізу використовуються також при санітарно-мікробіологічних дослідженнях для виявлення в харчових продуктах та об'єктах зовнішнього середовища патогенних мікроорганізмів – збудників захворювань та ін.

При дослідженні якісного складу мікрофлори основними методами культивування є:

- 1) виділення чистих культур (тобто культур одного виду) мікроорганізмів з наступною ідентифікацією);
- 2) одержання елективних, або накопичувальних культур (тобто культур переважно одного виду) мікроорганізмів.

Використовуються також прискорені орієнтовні методи якісного аналізу, які дозволяють виявити окремі характерні видові ознаки мікроорганізмів і за ними орієнтовно робити висновки про склад мікрофлори об'єкта дослідження (наприклад, за формою та забарвленням бактеріальних клітин при мікроскопуванні мазків).

Накопичувальною називають таку культуру, у якій переважають представники однієї фізіологічної групи або навіть одного виду мікроорганізмів. Сутність методу накопичувальних культур (введений у мікробіологічну практику М. Бейерінком та С.М. Виноградським) полягає в створенні елективних, тобто вибіркових умов, які забезпечують переважний розвиток бажаних мікроорганізмів або групи мікроорганізмів зі змішаної популяції.

Про одержання накопичувальної культури судять за появою характерних ознак розвитку цільових мікроорганізмів – помутніння середовища, іноді супроводжуване пігментацією, поява плівки, осаду, виділення газів. Крім візуального спостереження накопичувальну культуру мікроскопіюють і виявляють присутність бажаних форм. Іноді необхідно визначити продукти метаболізму, утворення яких властиво цільовим мікроорганізмам. Наприклад, про розвиток нітрифікуючих бактерій свідчить поява в середовищі нітрит- і нітрат-іонів і зменшення або навіть повне зникнення іона амонію. Після того як отримана накопичувальна, приступають до виділення чистої культури.

Чиста культура – потомство однієї клітини, тобто вона може бути

отримана з окремої колонії або однієї клітини.

Виділення чистих культур мікроорганізмів

Мікроорганізми, виділені в вигляді чистих культур, необхідні для багатьох мікробіологічних робіт.

В природних умовах різні об'єкти містять, як правило, змішану мікрофлору. Оскільки вивчення фізіології клітин та їх ідентифікація можливі тільки про роботі з ізольованими видами, якісний аналіз мікрофлори об'єкта звичайно починається з виділення мікроорганізмів у вигляді чистих культур.

Так, наприклад, діагностичні дослідження з метою виявлення збудника псування харчових продуктів або інфекційного захворювання потребують, як правило, виділення підозрілих мікроорганізмів у вигляді чистих культур з продукту, матеріалу від хворого або інших об'єктів навколишнього середовища.

В деяких технологічних процесах (виготовлення кисломолочних продуктів, антибіотиків, заквашування овочів та ін.) використання мікроорганізмів з відомими властивостями без домішок сторонніх видів дозволяє поліпшити якість продукції та економічні показники виробництва.

Методи виділення чистих культур мікроорганізмів засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів та наступному вирощуванні нащадків цієї клітини на живильних середовищах ізольовано від інших видів.

Відомі методи видобування однієї клітини із зависі мікроорганізмів за допомогою спеціальних приладів (мікроманіпулятор, мікроселектор Перфільєва) під контролем мікроскопу. Однак найбільше розповсюдженим способом виділення чистих культур є висів суміші мікробів на щільне середовище з метою одержання окремих колоній культур, які вважають результатом розвитку однієї клітини. Для висіву частіше використовуються агаризовані середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом та носить назву *метода платівчатих (або чашкових) культур Коха*.

Виділення чистої культури з окремої колонії.

Метод послідовних розведень, запропонований Л. Пастером, був одним з найперших, який застосовувався для механічного роз'єднання мікроорганізмів. Він полягає в проведенні послідовних серійних розведень матеріалу, що містить мікроорганізми, у стерильному рідкому поживному середовищі. Метод використовується для виділення чистих культур мікроорганізмів, як аеробних, так і анаеробних. Готують розведення матеріалу в 10-100 разів та більше (в залежності від передбачуваного обсіювання мікроорганізмами) та проводять висів розведень, користуючись поверхневим або глибинним методом (рис. 6.1).

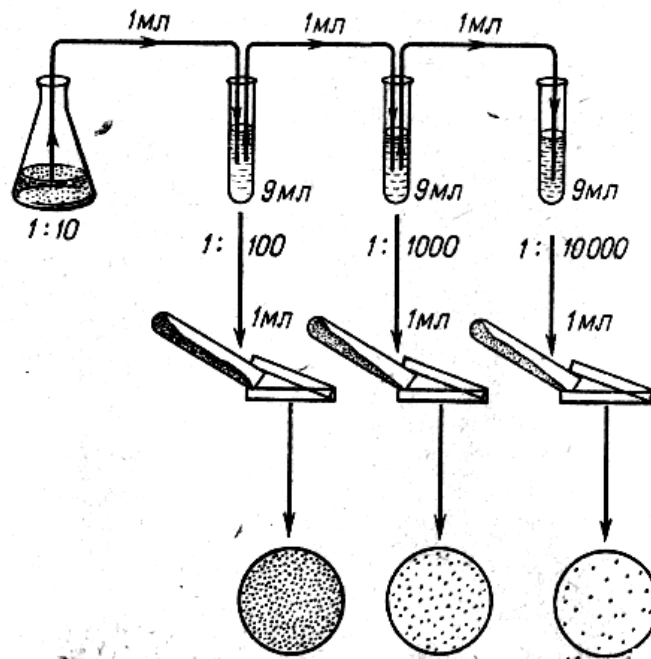


Рис.6.1. Схема розведення і посіву досліджуваного матеріалу при мікробній кількості чашковим методом

Цей прийом досить кропіткий і недосконалий у роботі, оскільки не дозволяє контролювати кількість мікробних клітин, які попадають у пробірки при розведеннях.

Цього недоліку не має *метод Коха (метод пластинчастих розведень)*. Р. Кох використав щільні поживні середовища на основі желатину або агар-агару. Матеріал з асоціаціями різних видів бактерій розводився в декількох пробірках з розплавленим і дещо охолодженим желатином, вміст яких пізніше виливався на стерильні скляні пластини. Після застигання середовища воно культивувалося за оптимальної температури. У його товщі утворювалися ізольовані колонії мікроорганізмів, які легко можуть бути перенесені на свіже поживне середовище за допомогою бактеріологічної петлі для одержання чистої культури бактерій. Основним завданням методу є розведення концентрації мікроорганізмів в досліджуваному матеріалі з таким розрахунком, щоб при висіві його на живильному середовищі вирости ізольовані колонії. Існують два основних метода розведення досліджуваного матеріалу: 1) на поверхні щільного живильного середовища “методом виснажуючого висіву”; 2) попереднє розведення матеріалу в фізіологічному розчині або водопровідній воді в пробірках та висів готового розведення на щільне живильне середовище. Виділення чистих культур суворих анаеробів за методом Коха потребує умов вирощування без доступу кисню.

Однак цей метод не можна застосувати для виділення мікроорганізмів, які не ростуть або погано ростуть на щільних середовищах. До числа таких мікроорганізмів належать деякі бактерії, багато водоростей і найпростіші.

Метод Дригальського є удосконалішим методом, що широко розповсюджений у повсякденній мікробіологічній практиці. Спочатку на поверхню середовища в чашці Петрі піпеткою або петлею наносять досліджуваний матеріал. За допомогою металевого або скляного шпателя

його ретельно втирають у середовище. Чашку під час посіву тримають привідкритою й обережно обертають, щоб рівномірно розподілити матеріал. Не стерилізуючи шпателя, проводять ним в іншій чашці Петрі, за потреби – у третій. Тільки після цього шпатель занурюють у дезінфікуючий розчин. На поверхні середовища в першій чашці спостерігаємо, як правило, суцільний ріст бактерій, у другій – густий ріст, а в третій – ріст у вигляді ізольованих колоній (рис. 6.2).

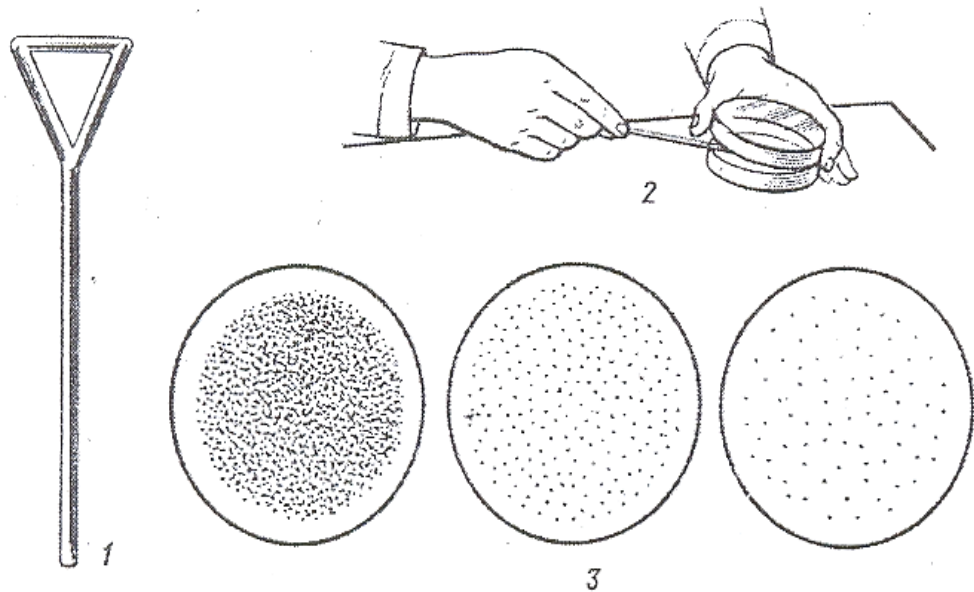


Рис. 6.2 Розсів культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища шпателем: 1 – шпатель Дригальського; 2 – розсів; 3 – ріст мікроорганізмів після розсіву

Метод штрихових посівів сьогодні використовується в мікробіологічних лабораторіях найчастіше. Матеріал, що містить мікроорганізми, набирають бактеріологічною петлею й наносять на поверхню поживного середовища біля краю чашки. Знімають надлишок матеріалу й проводять його посів паралельними штрихами від краю до краю чашки (рис. 6.3).

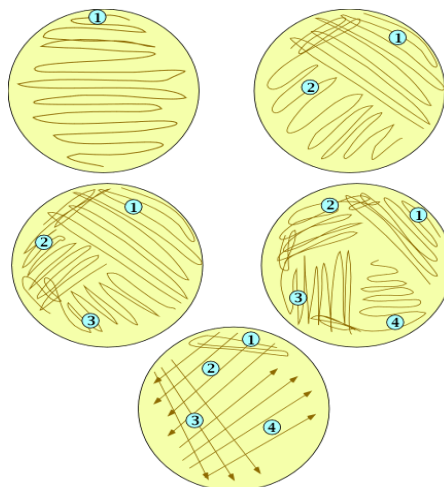


Рис. 6.3 Посів мікроорганізмів на чашку Петрі петлею (метод поверхневих штрихів)

Через добу інкубації посівів за оптимальної температури на поверхні

чашки виростають ізольовані колонії мікроорганізмів (рис. 6.4).



Рис. 6.4 Ізольовані колонії мікроорганізмів, одержані методом штрихових посівів

Після посіву чашки поміщають у термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворилася на кришці чашки Петрі, не перешкодила одержати ізольовані колонії. Чашки витримують у термостаті протягом 1...7 діб залежно від швидкості росту мікроорганізмів. Вирослі ізольовані колонії відсівають петлею на поверхню скошеного щільного середовища в пробірки або в рідке середовище.

Метод виснажувального висіву на поверхні щільного середовища використовується для виділення чистих культур аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів. З цією метою для висіву беруть ряд чашок Петрі зі щільним середовищем; в першу чашку наносять досліджуваний матеріал і розподіляють його по поверхні шпателем Дригальського або бактеріологічною петлею. Потім не стерилізуючи шпатель (або петлю), проводять висів послідовно на поверхню середовища в інших чашках. Кількість матеріалу, що вноситься в середовище, при цьому послідовно зменшується (виснажуючий висів) (рис. 6.5)



Рис. 6.5 Метод виснажувального висіву на поверхні щільного середовища

Якщо розведення досліджуваного матеріалу виконане правильно, на поверхні середовища, або в його товщі (в залежності від методу висіву) утворюються ізольовані колонії мікроорганізмів, видимі неозброєним оком.

Кожна колонія складається з клітин одного виду, однак для виділення чистої культури необхідно пересіяти колонію на окреме середовище, тобто ізолювати її від мікроорганізмів інших видів.

Завершальним етапом виділення чистої культури мікроорганізмів невідомого виду є **перевірка її чистоти** на ізолюваному середовищі візуально (продавлення висіву неозброєним оком) та мікроскопуванням мазка.

6.2. Виділення чистої культури з однієї клітини. Чисту культуру з однієї клітини можна виділити краплинним методом, за допомогою мікроманіпулятора або мікроселектора.

Краплинний метод Лінднера використовують під час роботи з

великими мікроорганізмами: дріжджами, міцеліальними грибами, водоростями. Порядок роботи наступний. Накопичувальну культуру розводять у стерильному середовищі з таким розрахунком, щоб у невеликій краплі були одиночні клітини мікроорганізмів. Потім на поверхню стерильного покривного скла стерильним сталевим пером наносять ряд крапель приготовленого розведення. Готують препарат «висяча крапля». Нанесені на покривне скло краплі переглядають під мікроскопом і відзначають ті, у яких виявлена тільки одна клітина. Після цього препарат поміщають у термостат у вологу камеру, якою зазвичай служить чашка Петрі зі зволженим фільтрувальним папером на дні. Через 12...24 год відзначені краплі знову мікроскопіюють. Ті краплі, в яких спостерігається утворення мікроколоній, обережно знімають із покривного скла шматочками стерильного фільтрувального паперу й переносять у пробірки зі стерильним середовищем.

Виділення окремих клітин за допомогою мікроманіпулятора. Мікроманіпулятор – прилад, що дозволяє за допомогою спеціальної мікропіпетки або мікропетлі вилучати одну клітину з суспензії. Цю операцію контролюють під мікроскопом. Мікроманіпулятор має два операційних штативи, між якими розташований звичайний мікроскоп (рис. 6.6).

На предметному столику мікроскопа встановлена волога камера, у яку поміщають препарат «висяча крапля». У тримачах операційних штативів закріплені мікропіпетки (мікропетлі), переміщення яких у поле зору мікроскопу здійснюється з мікронною точністю завдяки системі гвинтів і важелів. Мікропіпетки вводять у вологу камеру таким чином, щоб їхні кінці виявилися у висячій краплі. Дослідник, дивлячись у мікроскоп, вилучає окремі клітини мікропіпетками і переносить їх у пробірки з стерильним рідким середовищем.

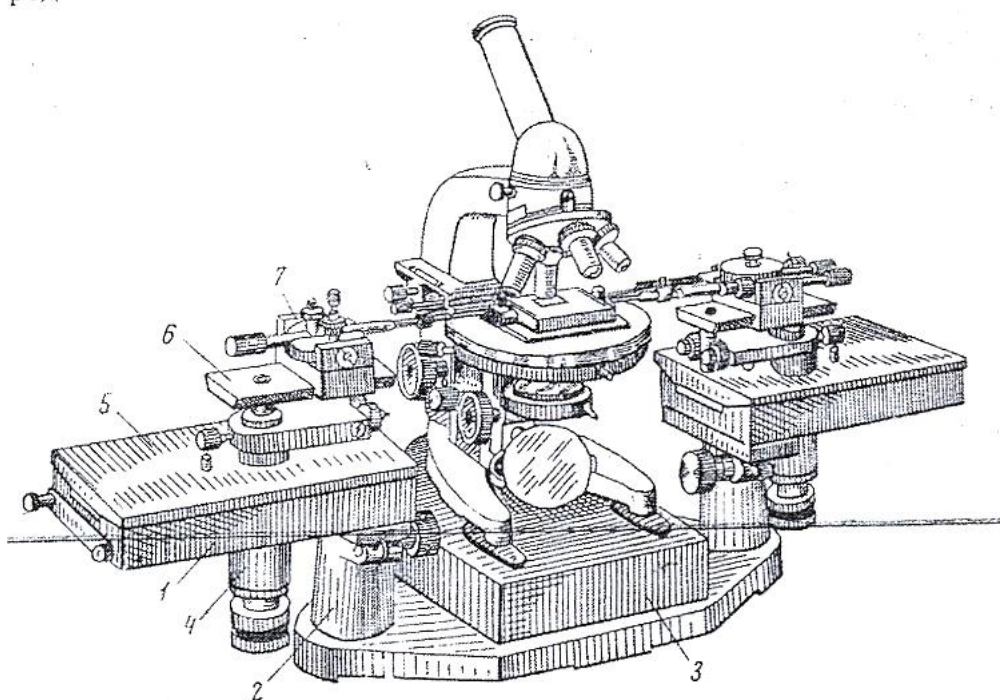


Рис. 6.6 Мікроманіпулятор з ковзними площинами конструкції Рейнерта: 1 – нижня пластина штатива, 2 – стовпчик, 3 – загальна підставка для мікроскопа й мікроманіпулятора, 4, 5 – ковзна пластина з рукояткою, 6 – штатив мікроманіпулятора для кріплення мікроінструментів (7)

Виділення окремих клітин за допомогою мікроселектора Перфільєва.

Найбільш істотною частиною мікроселектора Перфільєва є скляний мікрокапіляр, що має строгий прямокутний перетин. Завдяки цьому канал капіляра добре проглядається навіть із імерсійним об'єктивом. Стерильний капіляр заповнюють досліджуваною суспензією клітин в агаризованому поживному середовищі і за великого збільшення мікроскопа знаходять ділянку з однією клітиною. Спеціальним інструментом цю ділянку капіляра стерильно вибивають у приймач, з якого потім переносять у стерильне середовище. Мікроселектор Перфільєва можна використовувати для виділення як великих, так і дрібних мікроорганізмів.

6.3. Вивчення чистих культур мікроорганізмів з метою ідентифікації

Видова назва чистих культур більшості мікроорганізмів встановлюють шляхом вивчення **морфологічних, культуральних та фізіологічних властивостей**. Для ідентифікації пліснявих грибів достатньо вивчити морфологічні та культуральні властивості. За сукупністю вивчених ознак визначають таксономічне положення (положення в систематиці) мікроорганізмів, користуючись спеціальними визначниками.

Морфологічні властивості досліджують при мікроскопуванні прижиттєвих або фіксованих профарбованих препаратів. Морфологічна характеристика мікроорганізму повинна включати форму клітин, їх сполучення та розміри, рухливість, здатність до утворення спор, наявність включень. При описуванні морфології слід вказувати вік культури, склад середовища, умови культивування.

Культуральні властивості мікроорганізмів встановлюють за особливостями росту на живильних середовищах. *На рідких живильних середовищах* відмічають характер розподілення культури в рідині (рівномірне, викликаючи скаламучення середовища, біля дна або поверхневе), що обумовлене відношенням мікроорганізмів до кисню повітря.

Каламутність середовища може бути пластівчастою, однорідною; плівка – тонкою, щільною та пухкою, гладенька, зморшкувата або складчаста; осад малим або рясним (кількість), щільним, пухким, слизуватим (консистенція).

На щільних живильних середовищах досліджують характер колоній. Оскільки колонія утворюється в результаті розмноження однієї клітини, її будова залежить від особливостей розподілу клітин даного виду мікроорганізмів.

Розрізняють поверхневі та глибинні колонії в залежності від їх положення в середовищі. Найбільш типові видові ознаки виражені в

поверхневих колоній. При цьому форму, профіль, блиск і колір відмічають візуально, краї та структуру – при малому збільшенні мікроскопа, консистенцію. (м'яка, слизувата, тягуча або крихка) визначають дотиком до її поверхні петлею, розміри – звичайною лінійкою або окулярним мікроскопом при малому збільшенні мікроскопу (колонії точкові – менше 1 мм в діаметрі, дрібні – 1-2, великі – більше 4 мм).

Фізіологічні властивості мікроорганізмів обумовлені ферментативною активністю і відображають особливості обміну речовин клітини. Це важлива диференційна ознака, яка використовується при ідентифікації бактеріальних видів, а також дріжджових та деяких інших мікроорганізмів. В мікробіологічній практиці розповсюдженим методом вивчення фізіологічних властивостей мікроорганізмів є вирощування їх на диференціально-діагностичних середовищах, дозволяючи визначити біохімічну активність мікроорганізмів у відношенні речовин, введених в середовище. Найбільше суттєвими фізіологічними властивостями є наступні.

Відношення до кисню (тип дихання) визначається за характером росту в стовпчику агару (МПА) при висіві проколом. Після інкубації в термостаті протягом 48 годин при температурі 30-38°C можливі три типи росту в залежності від типу дихання: ріст капелюшком на поверхні (аеробні мікроорганізми), ріст біля дна пробірки (анаеробні мікроорганізми), ріст, рівномірний за всією довжиною проколу (факультативно анаеробні мікроорганізми).

Протеолітичні властивості (можливість перетравлювати білкові речовини) визначають за виділенням з живильного середовища газів-продуктів розщеплення білку; для цієї мети культуру вирощують на рідкому середовищі (МПБ або м'ясній воді), закріпивши в пробірці смужку фільтрувального папірця, просоченого реактивом, який виявляє наявність газу. Папірець закріплюють між корком та стінкою пробірки так, щоб вона не торкалась середовища. Виділення амоніаку виявляють за допомогою лакмусового папірця, посиніння якого свідчить про лужність середовища під впливом NH_3 ; виділення сірководню – за допомогою фільтрувального паперу, просоченого оцтовокислим плюмбумом (папір чорніє через утворення сірчанистого плюмбуму) виділення індолу – за допомогою папірця, просоченого шавлевою кислотою (почервоніння в результаті утворення сполуки з індолом).

Про протеолітичні властивості мікробів судять також за спроможністю розріджувати желатину. При висіві проколом в стовпчик желатини через 2 години культивування відзначають наявність та характер розріджування (пошарове, лійкоподібне, пухирчасте).

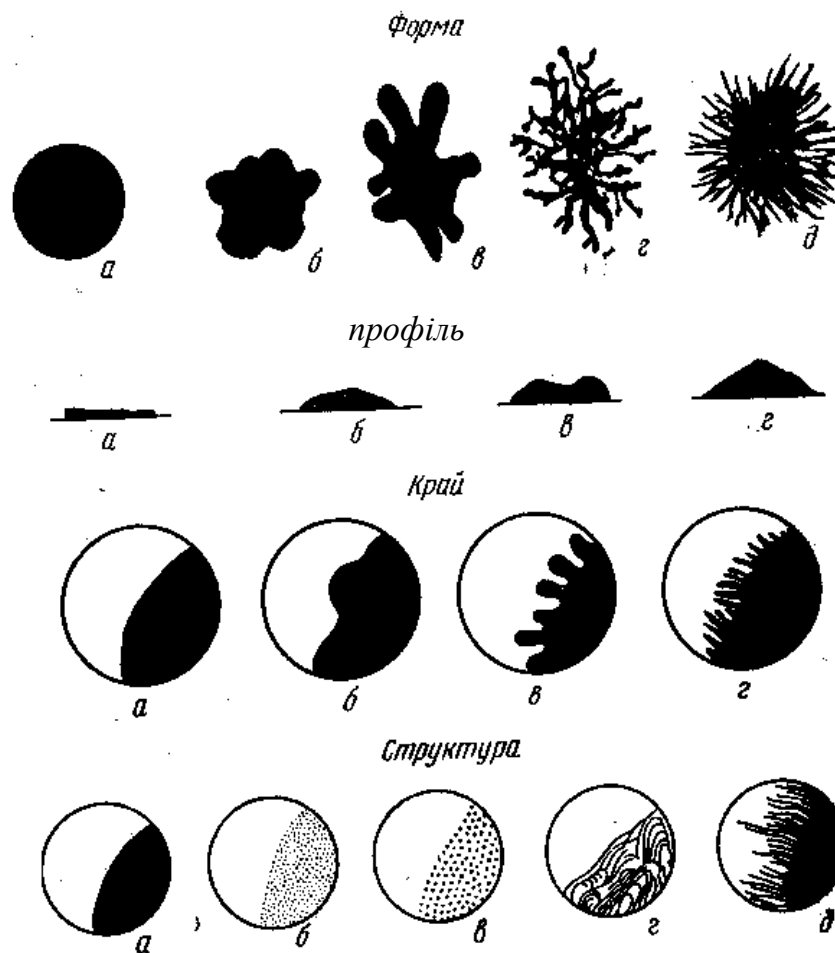


Рис. 6.7. Характеристика колоній: **форма:** а – округла; б – неправильна; в – амeboподібна; г – різoidна; д – міцеліальна. **профіль:** а – плоский; б – випуклий; в – кратероподібний; г – конусоподібний. **край:** а – рівний; б – хвилястий; в – лопатний; г – бархотястий. **структура:** а – однорідна; б – мілко зерниста; в – велико зерниста; г – струмчаста; д – хвиляста.

Цукролітичні властивості визначають на середовищах (МПА, 1%-вій пептонній воді та ін.). Розщеплення вуглеводів під впливом мікробів супроводжується зміненням кольору індикатора через підкислення середовища, а на рідких середовищах у ряді випадків і газоутворенням, яке вловлюють за допомогою “поплавця” (маленької, скляної, запаяної (злютованої) з одного кінця трубочки, вміщеної на дно пробірки з середовищем злютованим кінцем доверху; газ, що утворюється, витискує середовище і виявляється в поплавці у вигляді бульбашки).

Характер згортання лакмусового молока є важливою біохімічною ознакою. При висіві на лакмусове молоко відрізняють змінення рН та характер згустку. В залежності від того, на яку складову частину молока діють ферменти мікроорганізму, який вивчають, розрізняють наступні зміни в організмі: а) кислотне згортання (дія ферменти на лактозу) супроводжується утворенням щільного згустку та підвищенням кислотності; колір молока змінюється від бузкового до червоного; б) пентонізація (для протеолітичних ферментів на білки молока) супроводжується утворенням коло мутної жовтуватої рідни, середовище

стає лужним (виділення аміаку), молоко синіє.

Здібність рости на картоплі виявляють при висіві мікроорганізмів на скошену стерильну скибку картоплі. При цьому відрізняють додаткову культуральну відзнаку, а також амілолітичну здібність культури (розчеплення крохмалю) за пробою іодом.

Посиніння середовища після нанесення краплі розчину Люголя в зоні росту мікроорганізмів вказує на наявність в них ферменту амілози.

Слід звернути увагу, що перелік досліджуваних ознак, як і методи культивування, диференціюються в залежності від припустимого виду мікроорганізмів.

6.4. Виділення чистих культур та їх вивчення, що виконують в декілька етапів, які відповідають дням дослідження

Етапи роботи:

I. етап (1-й день) – висів досліджуваного матеріалу на *МПА* в чашках Петрі методом виснажувального висіву.

II. етап (2-й день) – вивчення росту мікроорганізмів на *МПА* (культуральні властивості). Перевисів ізольованої колонії на скошений *МПА* в пробірці.

III. Етап (3-й день) – перевірка чистоти культури за її морфологією та культуральними властивостями. Висів на диференційно-діагностичні середовища.

IV. Етап (4-й день) – вивчення фізіологічних властивостей; ідентифікація штамма за визначником.

Самостійна робота

1. Ознайомлення з колекцією живильних середовищ.
2. Висів суспензії мікроорганізмів на поверхні м'ясопектоного агару в чашці Петрі.
3. Оформлення протоколу дослідження.

Техніка виконання:

Ознайомлення з колекцією живильних середовищ

В процесі роботи знайомляться з простими живильними середовищами (*МПБ* в пробірках, *МПА* в пробірках скошений, стовпчиком, сушлом пивним, дріжджовим автолізатом), апаратами для стерилізації (автоклавом, сушильною шафою, фільтром Зейтца).

Висів суміші бактерій на МПА

Для висіву суміші мікроорганізмів на *МПА* беруть попередньо приготовленні три чашки Петрі з *МПА*. На денці чашок вказують їх номер (1,2 та 3), а також номери робочих місць студентів та групу, після чого ставлять чашки на стіл покритими зверху. Дотримуючись правил стерильності, відбирають стерильною піпеткою 2 мл досліджуваної суспензії бактерій і наносять її на поверхню агару в першій чашці. Далі здійснюють поверхневий висів культури за допомогою шпателя Дригальського (попередньо з першої чашки до другої і з другої – в третю). Після закінчення висіву шпатель занурюють в дезінфікувальний розчин; чашки перевертають догори дном, щоб конденсаційна вода, що накопичується при застиганні середовища, не стікала з покритишки та не розмивала ріст культури. Висіви вміщують до термостата для культивування при

37°C на 24-48 годин.

В протоколі дослідження необхідно записати класифікацію живильних середовищ за складом, консистенцією та призначенням, методи стерилізації живильних середовищ, умов виснажую чого висіву зависі мікроорганізмів.

Вивчення культуральних властивостей бактерій

Робота виконується за програмою II етапу виділення та вивчення чистої культури бактерій. З цією метою використовують висіви на МПА в чашках Петрі, виконані студентами на попередньому занятті. Продивляються колонії, які виростили на МПА, неозброєним оком, не відкриваючи чашок, а потім за допомогою лупи (5-10^x) в прохідному світлі зі сторони дна чашки. Для подальшого дослідження відбирають чашку з ростом бактерій у вигляді ізольованих колоній. Описують зовнішні ознаки поверхневих колоній: виявляють число типів колоній, при цьому колонію, що відрізняється хоча б однією ознакою, необхідно розглядати як самостійний тип. За числом типів колоній можна орієнтовно зробити висновки про різноманітність видового складу мікрофлори досліджуваного об'єкту. Для подальшої роботи відбирають колонію переважаючого типу бактерій.

Висів культури з колонії на скошений МПА

Дотримуючись умов стерильності, відбирають бактеріологічною петлею частку колонії і роблять висів її штрихом на поверхні скошеного агару. На пробірці надписують номер групи та робочого місця студента. При оформленні протоколу дослідження записують етап виділення чистої культури, його зміст. Властивості колоній описують за наступною формою:

№ п/п	Величини	Форма	Колір	Блиск	Край	Консистенція	Переважаючий тип

Ідентифікація чистої культури бактерій

Фізіологічні властивості бактерій

Мета: продовження дослідження по виділенню та вивченню чистої культури бактерій; ознайомлення з фізіологічними властивостями чистої культури та її ідентифікацією.

Вивчають чистоту невідомої культури, яка виростила ізольовано на скошеному МПА: зовнішній вид висіву, його однорідність, а також морфологію клітин в мікроскопічних препаратах. Якщо культура складається з бактерій, однорідних за культуральними та морфологічними властивостями, виконують висів даного виду бактерій на диференційно-діагностичні середовища для вивчення фізіологічних властивостей.

Подальше дослідження виконується з метою ідентифікації, тобто визначення назви бактерій. При цьому ріст культури на диференційно-діагностичних середовищах дозволяє вивчити фізіологічні властивості.

Студенти знайомляться з особливостями росту бактерій на диференційних середовищах за демонстраційними висівами. За результатами дослідження морфологічних, культуральних та фізіологічних властивостей чистої культури ідентифікують невідомий вид бактерій, користуючись

альбомами-визначниками.

Вивчення чистоти культури бактерій невідомого виду, ізольованої на скошеному МПА в пробірках.

Культуральні властивості: їх досліджують неозброєним оком – продивляють ріст культури на скошеному агарі. Однорідний шар бактерій на поверхні середовища свідчить про її чистоту, тобто про вміст на середовищі бактерій одного виду.

Морфологічні властивості: форму клітини бактерій та тинкторіальні властивості вивчають у мазку, профарбованому за Грамом. З цією метою відбирають бактеріологічною петлею частину культури та профарбовують фіксований мазок за Грамом. При мікроскопуванні відрізняють тинкторіальні властивості бактерій (Гр.+ або Гр.-). Однорідна культура в десяти розглянутих полях зору свідчать про чистоту виділених бактерій.

Рухливість культури: готують препарат типу “висяча крапля” з культури, яка виросла на скошеному агарі, і розглядають під мікроскопом при збільшенні об’єктиву x40. Відрізняють наявність або відсутність рухливості. Рухливі клітини інтенсивно пересуваються в полі зору мікроскопу в різних напрямках; нерухомі клітини можуть переміщуватись під впливом броунівського руху (пасивне переміщення в вигляді безладних коливань в невеликих межах).

Ознайомлення з ростом бактерій на диференційно-діагностичних середовищах (демонстраційні висіви)

При цьому відрізняють наступні властивості зрослої на середовищі культури: в стовпчику желатину – наявність або відсутність в бактерій протеолітичного ферменту желатинази та характер розрідження; на середовищі Гісса – наявність або відсутність цукролітичної активності: про розщеплення вуглеводів свідчить поява газу в поплавці та почервоніння середовища; при відсутності відповідних ферментів ріст мікробів виражається в рівномірності скаламучення середовища; змінені кольору при цьому не спостерігається. Переглядаючи висів в стовпчику агару, відзначають відношення культури до кисню: ріст по проколу (факультативні анаероби) або на поверхні (аеробів).

Ознайомлення з визначниками бактерій (рекомендується “Короткий визначник бактерій Берги” К.: Світ, 1980).

До протоколу досліджень необхідно занести результати виконаних досліджень та заповнити зведену таблицю властивостей бактерій за формою:

Морфологічні властивості			Культуральні властивості					
Форма, розміщення, спори	Пофарбованість за Грамом	Рухливість	величина	форма	Рухливість	колір	край	консистенція

Фізіологічні властивості				
Тип дихання (ріст за проколом в МПА)	Протеолітичні властивості (наявність желатинази)	Цукролітичні властивості по відношенню до		
		глюкози	лактози	сахарози

Таким чином, схема виділення та ідентифікації чистої культури бактерій наступна:

Виділення чистої культури бактерій невідомого виду

1-й день. Посів суміші бактерій на МЛА методом поверхневого штрихового посіву, що виснажується.

2-й день. 1. Вивчення культуральних властивостей культури, що виросла (опис колоній).

2. Вивчення морфологічних властивості бактерій із колонії, відібраної для дослідження; мікроскопія мазка, пофарбованого за методом Грама.

3. Пересівання бактерій із колонії на скошений МПА (власне виділення чистої культури).

3-й день. 4. Вивчення чистої, виділеної культури (візуальне дослідження росту культури на скошеному агарі, мікроскопія мазка бактерій із скошеного агару).

Увага! Рівномірна, однакова за зовнішнім виглядом бактеріальна культура на МПА, а також бактерії однієї форми й одного типу фарбування за методом Грама свідчать про чистоту культури.

Увага! На 3-й день дослідження отримують чисту культуру невідомого виду.

Увага! Подальше дослідження проводиться з метою ідентифікації культури, тобто визначення її назви. Для цього треба вивчити фізіологічні властивості бактерій на диференційно-діагностичних середовищах.

5. Посів культури на диференційно-діагностичні середовища.

Ідентифікація чистої культури

4-й день. 1. Вивчити фізіологічні властивості бактерій за характером росту на диференційно-діагностичних середовищах.

2. Ідентифікувати види за альбомами-визначниками.

Виділення із суміші бактерій чистої культури невідомого виду (другий день дослідження)

1. Ознайомитися візуально з посівом на МПА в чашках Петрі. Відібрати для роботи одну з ізольованих колоній.

2. Вивчити культуральні властивості бактерій — описати властивості

колоній: колір, розмір, форму, консистенцію (суха, волога), край (за допомогою окуляра).

3. Вивчити морфологічні властивості культури. Приготувати мазок бактерій із досліджуваної колонії, пофарбувати за методом Грама, вивчити під мікроскопом і замалювати картину мікроскопії.

4. Закінчити виділення чистої культури: пересіяти матеріал із колоній на скошений агар у пробірці

Ідентифікація бактерій

Ознайомитися з фізіологічними властивостями бактерій у демонстраційних посівах на диференційно-діагностичних середовищах:

- цукролітичні властивості на середовищі Ендо;
- тип дихання у стовпчику МПА;
- протеолітичні властивості - у бульйоні із "свинцевим" папірцем.

Записати результати за формою:

Описання колонії	Морфологія клітин	Фізіологічні властивості
Форма, колір, розмір, край.	Форма, забарвлення за методом Грама.	Розщеплення лактози. Тип дихання. Протеолітичні властивості.

Контрольні запитання:

1. Що означають поняття - культивування мікроорганізмів, культура, колонія, штам?
2. Яким вимогам повинні задовольняти живильні середовища?
3. Як класифікують живильні середовища за складом, щільністю, призначенням?
4. Які умови потрібні для успішного культивування мікроорганізмів?
5. Які способи використовуються для стерилізації живильних середовищ?
6. Які культури називаються чистими? З якою метою виділяють чисті культури бактерій у лабораторних умовах?
7. Який метод висіву використовують для виділення культури одного виду із суміші бактерій? Що являє собою колонія бактерій?
8. З яких етапів (днів дослідження) складається виділення чистої культури бактерій невідомого виду?
9. Які властивості бактерій необхідно вивчити для визначення назви чистої культури бактерій невідомого виду?
10. На яких диференційно - діагностичних середовищах вивчають цукролітичні властивості, протеолітичні властивості, тип дихання.

Лабораторна робота № 7

«Важливіші біохімічні процеси, які викликаються мікроорганізмами. Елективні (накопичувальні) культури мікроорганізмів. Одержання маслянокислих бактерій. Висів ґрунту в МПБ і кип'ятіння середовища»

Мета: 1. Ознайомитися зі важливішими біохімічними процесами, які викликаються мікроорганізмами; з елективними (накопичувальними) культурами мікроорганізмів

План

7.1. Важливіші біохімічні процеси, які викликаються мікроорганізмами.

7.2. Елективні (накопичувальні) культури мікроорганізмів (бактерій)

7.1. Важливіші біохімічні процеси, які викликаються мікроорганізмами

В даному розділі розглядаються питання біохімічної діяльності мікроорганізмів. Мікроби володіють високою біохімічною активністю, завдяки чому вони здійснюють кругообіг речовин в природі, більшість продуктів їх життєдіяльності корисні для людини і широко використовуються в народному господарстві (наприклад, спирти – етиловий, бутиловий; органічні кислоти – молочна, масляна, ацетон, вітаміни, ферменти, антибіотики та ін.). Поряд з цим біохімічна діяльність мікроорганізмів, що розвиваються на різноманітних субстратах, може викладати різні процеси псування, наприклад гнилісні процеси під впливом мікробів, здатних до розщеплення білка, процеси бродіння під впливом мікробів, розщеплюючи вуглеводи, процеси розщеплення жиру під впливом мікроорганізмів з лі політичною активністю.

На заняттях по даній темі студенти знайомляться з мікроорганізмами – частішими збудниками псування харчових продуктів: збудниками гнилісних (протей, сінна паличка, галофіти) та бродильних (маслянокислі, молочнокислі бактерії) процесів.

Ці мікроорганізми вивчаються на заняттях у вигляді елективних (накопичувальних) культур, що дозволяє одночасно знайомити студентів з важливим способом якісного аналізу мікрофлори – одержанням елективних (накопичувальних) культур.

Вивчення впливу абіотичних та біотичних факторів середовища на живі клітини

Компоненти природного середовища, які впливають на стан і властивості організму, популяції, природного угруповання мають назву екологічних факторів. За своєю природою вони можуть бути *абіотичними*, *біотичними* та *антропогенними*.

Абіотичні – усі компоненти неживої природи, серед яких найважливішими є температура, вологість, світло та інші компоненти клімату, а також водного, повітряного та ґрунтового середовища.

Біотичні – взаємодія між особинами в популяціях, між популяціями в

природних угрупованнях, що існують поруч на якійсь ділянці і впливають один на одного безпосередньо, через продукти метаболізму або більш швидко використання поживних речовин.

Вплив абіотичних факторів середовища на живі клітини

Температура. Під час вивчення впливу температури на ріст мікроорганізмів виділяють температурний діапазон, обмежений мінімальною і максимальною температурами, за яких ріст припиняється, а також ділянку оптимальних температур з максимальною швидкістю росту. На підставі цих показників мікроорганізми ділять на **три основні** групи: *мезофіли*, *психрофіли* і *термофіли*.

До *психрофілів* (від грецьк. ψυχρός — холод, φίλεω — люблю) відносять холодолюбні мікроорганізми, зокрема деякі ґрунтові і морські бактерії, а також хвороботворні для риб і водних рослин мікроорганізми. Температура росту психрофілів лежить в межах від -10°C до $+20^{\circ}\text{C}$ і вище. У свою чергу психрофіли поділяються на *облігатні* і *факультативні*.

Багато з психрофілів добре розмножуються за температур, сприятливих для мезофілів, однак можуть рости, хоча і повільно, при 0°C й нижче, тому їх називають *факультативними психрофілами*. Інші мікроорганізми пристосувалися до існування за досить низьких температур (близько 0°C і нижче), а за температури 25°C і вище вони гинуть. Подібні мікроорганізми належать до *облігатних психрофілів*.

Для *мезофілів* (mesos – середній; φίλεω — люблю) – оптимальна температура становить $30\text{...}45^{\circ}\text{C}$. До цієї групи належить більшість мікроорганізмів, у тому числі патогенних для людини і тварин. Типовим мезофілом є кишкова паличка *E. coli*: нижній рівень температури росту є $+10^{\circ}\text{C}$, а верхній – $+49^{\circ}\text{C}$, оптимальною є температура $+37^{\circ}\text{C}$.

Термофіли (від др.-грецьк. θερμη – тепло и φίλεω – люблю) – теплолюбні мікроорганізми, розвиваються за температур вище $+55^{\circ}\text{C}$, температурний мінімум для них $+30^{\circ}\text{C}$. Термофільні мікроорганізми, у свою чергу, теж поділяються на *облігатні*, *факультативні* та *екстремально термофільні*.

Факультативні термофіли мають максимальну температуру росту від 50 до 65°C , але здатні також до розмноження за кімнатної температури (20°C). Особливістю цієї групи мікроорганізмів є здатність рости за температури в межах від 20 до 40°C .

Для *екстремальних термофілів* характерна оптимальна температура росту $80\text{...}105^{\circ}\text{C}$, але рости вони можуть в межах від 60°C до 110°C . До екстремальних термофілів належать організми з групи архебактерій що не мають аналогів серед мезофілів, наприклад представники родів *Thermoproteus*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium* та ін.

Мікроорганізми по-різному ставляться до граничних температур. Якщо низькі температури мікробні клітини переносять, після розморожування зберігаючи здатність до росту, то під впливом високих температур вони досить швидко гинуть. Високі температури (60°C і вище) викликають коагуляцію білків та інактивацію ферментів.

Як правило, за 60...70°C гинуть вегетативні клітини. Нагрівання до 100...120°C використовують у мікробіології для повного знищення як вегетативних форм мікроорганізмів, так і їх спор. Це найбільш зручний і надійний спосіб стерилізації.

Осмотичний тиск. Важливе значення для життя мікроорганізмів має осмотичний тиск, величина якого визначається концентрацією розчинених речовин у середовищі. Якщо вона мала, розчин називають *гіпотонічним*. Розчин з високою концентрацією солей, тобто з великим осмотичним тиском, називають *гіпертонічним*.

Цитоплазматична мембрана клітини регулює проникнення в клітину і вихід із неї води і розчинених речовин, зберігаючи при цьому осмотичну рівновагу. Надходження води з довкілля у клітину можливе лише в тому випадку, коли осмотичний тиск в клітині буде більшим, ніж тиск зовнішнього розчину. В умовах високого осмотичного тиску в середовищі клітина втрачає здатність поглинати з нього воду, що згубно діє на неї. Нормальний осмотичний тиск у клітині визначається в межах від 3 до 7 атм.

У розчинах з осмотичним тиском, більш високим, ніж усередині мікробних клітин, останні гинуть. Це зумовлюється тим, що вода виходить із клітин назовні, клітини зневоднюються і їх протопласт стискається. Це явище має назву *плазмоліз* (рис. 7.1).

У середовищі з дуже низьким осмотичним тиском відбувається протилежне явище – *плазмолиз*, коли вода надходить усередину клітини, викликаючи розрив клітинної оболонки. Високий осмотичний тиск середовища не перешкоджає росту лише деяких мікроорганізмів, що називаються *осмофільними* (від грецьк. *osmos* – тиск, *phileo* – люблю).

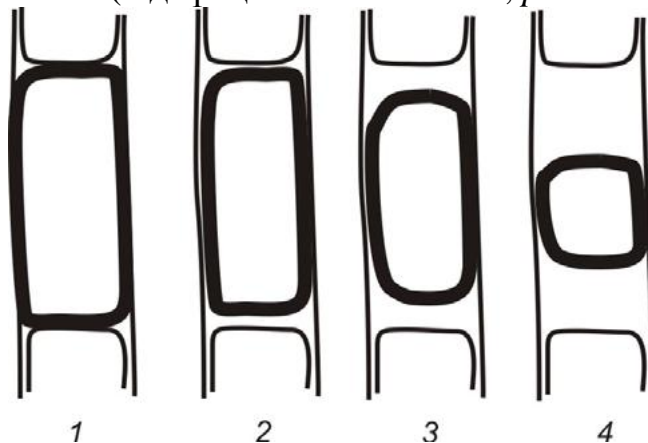


Рис. 7.1 Схема плазмолізу: 1 – клітина з шаром протоплазми біля стінки й центральною вакуолею; 2 – початок плазмолізу, розміри клітини трохи зменшуються; 3 – вакуоля помітно скорочується, протоплазма відходить від клітинної оболонки в її кутах; 4 – протопласт набуває сферичного об'єму.

До них належать багато пліснявих грибів родів *Aspergillus* і *Penicillium*, а також деякі види дріжджів, здатних розвиватися за високої концентрації цукру, але не витримують високої концентрації солей. Мікроорганізми, які витримують високий осмотичний тиск, але краще розвиваються за нормального тиску, називаються *осмотолерантними*.

Вологість середовища. Активна життєдіяльність мікроорганізмів можлива лише в умовах достатнього зволоження. Надходження поживних речовин у клітину та виділення продуктів обміну в зовнішнє середовище можливі тільки за достатнього вмісту води. В умовах її дефіциту мікроорганізми не розмножуються. Найменша кількість води, за якої ще можливий розвиток мікроорганізмів, становить 20...30 % загальної маси організму.

Найстійкіші до зневоднювання – актиноміцети і гриби. Вони можуть розвиватися навіть тоді, коли вміст вологи в субстраті дорівнює 10...15 %. Їх здатність витримувати дефіцит вологи має велике значення для підтримання безперервності кругообігу речовин у природі.

Кислотність середовища (рН). Ступінь кислотності або лужності середовища суттєво впливає на життя мікроорганізмів. Фізіологічно діючою основою в кислих і лужних субстратах є концентрація гідроксильних і водневих іонів (ОН⁻ і Н⁺).

Залежно від відношення до кислотності середовища мікроорганізми можуть бути розділені на декілька груп. Оптимальне значення рН для росту переважної більшості, які називають *нейтрофілами* – діапазон рН, близький до нейтрального, а ріст можливий, як правило, від рН 4 до рН 9. Типовими нейтрофілами є різні штами *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*.

У деяких видів мікроорганізмів оптимальне значення рН може бути в кислому (рН 4 і нижче) або лужному (рН від 9 і вище) діапазоні. Такі прокариоти називають *ацидофільними* або *алкалофільними (базофільними)*, відповідно. Серед цих груп виділяють *облігатні форми*, що втратили здатність рости в нейтральному діапазоні рН, і *факультативні*, такі, що зберегли цю здатність. Типовими представниками *облігатних ацидофілів* є бактерії роду *Thiobacillus*. До *облігатних алкалофілів* можна віднести деяких представників роду *Bacillus*. У всіх відомих *ацидофілів* значення внутріклітинного рН підтримується близько 6,5, у *нейтрофілів* – 7,5, у *алкалофілів* – не вище 9,5.

Вплив біотичних факторів середовища на живі клітини.

У довкіллі мікроорганізми існують як складні асоціації. У процесі еволюції кожна група мікроорганізмів виробила різні механізми адаптації не лише до умов неживого середовища, але й до всіх її мешканців. Це призвело до заселення мікробами найрізноманітніших екологічних ніш. Взаємовідносини між учасниками асоціацій дуже складні й динамічні у зв'язку з постійними змінами екологічних умов та фізіологічною мінливістю самих мікроорганізмів. Умовно всі взаємовідносини між мікроорганізмами для зручності поділили на *дві категорії* – *сприятливі* (взаємодопомоги) та *несприятливі* (антагоністичні). В кожній категорії виділяють певні групи.

Сприятливі біотичні взаємовідносини. Характеризуються взаємною для різних організмів вигодою від спільного існування.

Симбіоз – форма співіснування мікроорганізмів, коли обидва симбіонти отримують користь від цього співіснування і не можуть існувати один без одного. Наприклад, співіснування гриба аскоміцета з одним із видів

водоростей або ціанобактерій. В результаті цієї асоціації утворюється новий організм – лишайник.

Мутуалізм або кооперація – співіснування, коли обидва організми отримують користь, але їх зв'язок менш тісний і вони можуть існувати один без одного. Наприклад, бульбочкові бактерії та бобові рослини (рис. 7.2), отримують користь один від одного, але можуть рости окремо.

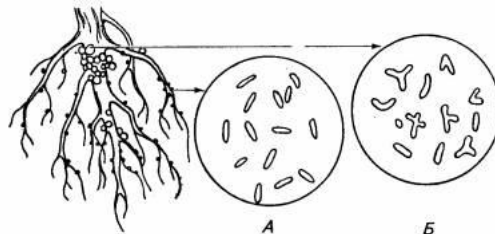


Рис. 7.2 Бульбочкові бактерії: А – палички; Б - бактеріоди

Синтрофія – явище сумісного росту двох або більше видів мікроорганізмів на середовищі, яке є незасвоєваним для кожного виду окремо. Наприклад, симбіоз в асоціації молочнокислих бактерій здійснюється завдяки тому, що кожен з співіснуючих видів синтезує та виділяє у середовище речовини необхідні іншому виду.

Сателітизм – різновид синтрофії, коли стимуляція має односторонній вплив. Наприклад, навколо колонії мікроорганізмів, які продукують вітамін В₁₂, розмножуються мікроорганізми, які не можуть продукувати цей вітамін, але потребують його для свого розвитку.

Метабіоз – ланцюгові взаємовідносини, коли один вид мікроорганізмів забезпечує умови для розвитку іншого виду. Наприклад, клітковину розщеплюють гриби, актиноміцети і деякі бактерії, в результаті чого утворюється дисахарид целобіоза, який розщеплюють інші мікроорганізми до глюкози, а глюкоза – це універсальне джерело енергії для багатьох мікроорганізмів.

Синергізм – така форма співіснування, коли у асоціантів підсилюються фізіологічні функції і виникають нові властивості. Наприклад, оцтовокислі бактерії та дріжджі («чайний гриб»), дріжджі і молочнокислі бактерії («кефірний грибок»). Оцтовокислі бактерії перетворюють сахарозу на глюкозу та фруктозу, які окислюються до глюконової та кетаглюконової кислот. Ці кислоти використовують дріжджі. Дріжджі синтезують вітаміни, які потрібні оцтовокислим бактеріям.

Несприятливі (антагоністичні) біотичні взаємовідносини.

Проявляються у пригнічувальному впливі одного або декількох членів мікробної спільноти один на одного. Пасивний або конкурентний антагонізм зумовлений використанням різними мікроорганізмами однакових поживних речовин. В цьому змаганні перевага за швидкоростучими формами мікроорганізмів.

Активний антагонізм зумовлений виділенням специфічних речовин. Такими речовинами можуть бути неспецифічні продукти обміну (органічні кислоти, спирти, аміак, феноли, перекис водню та інші). Залежно від ефекту

дії розрізняють антагонізм *мікробоцидний*, *мікробостатичний* та *лізуючий(антибіоз)*.

За направленістю антагонізм може бути *однобічним* та *двобічним*. Антагонізм може бути між мікроорганізмами – представниками різних родів та видів. Також може бути антагонізм між різними штамами одного виду. Наприклад, один із штамів кишкової палички синтезує коліцини, які пригнічують інші штами цього виду. Нерідко спостерігається явище самопригнічення – *ізоантагонізм*. Це явище особливо проявляється у актиноміцетів. Літичний фактор актиноміцетів включає складний комплекс, що складається з ряду ферментів – протеїназ, пептидаз, амілаз, лізоциму та антибіотику(ів).

Найбільш різко виражені антагоністичні взаємовідносини проявляються у формі паразитизму або хижацтва. І хижаки й паразити задовольняють свої харчові потреби за рахунок жертви. Різниця між ними у тому, що хижаки вбивають свою жертву миттєво, а паразити повільно. Паразит повністю або частково перекладає регуляцію своїх взаємовідносин з навколишнім середовищем на організм хазяїна. Паразитизм може бути постійним або тимчасовим; зовнішнім (екто-) та внутрішнім (ендо-). Наприклад, бактеріофаги втратили здатність до сапрофітного розвитку, їх вирощують лише на культурі тканини, а мікроміцети-хижаки здатні житися за рахунок клітини мікроміцета-жертви.

Практичне використання впливу абіотичних та біотичних факторів на живі клітини

Пригнічення життєвих процесів у живих клітинах за умови впливу певних абіотичних факторів широко використовується на практиці. Наприклад, більшість методів збереження і консервування харчової сировини та продуктів засноване саме на цьому. Пригнічуючий вплив низьких температур лежить в основі таких методів консервування, як охолодження або заморожування, високих температур – термічної стерилізації або пастеризації, створення високого осмотичного тиску у середовищі – сушіння, в'ялення, засолювання, тощо.

Молочнокислі бактерії і дріжджові гриби зберігають життєздатність після висушування протягом кількох років. Ця властивість мікробів широко використовується, наприклад, для отримання сухих заквасок, які застосовуються для виготовлення різних кисломолочних продуктів тощо, а також для зберігання музейних мікробів. Для цього культури піддаються заморожуванню в умовах вакууму (ліофілізації).

Явище мікробного антагонізму знайшло широке використання у медичній та ветеринарній практиці, а також сільському господарстві. З успіхом використовуються як живі мікроорганізми так і очищені антибіотичні речовини, що ними синтезуються. Препарати, основою яких є живі культури-антагоністи, отримали назву – *пробіотики*. Вони з успіхом використовуються для лікування гострих кишкових інфекцій (шигеліозів, сальмонельозів, кандидозів тощо), дисбактеріозів, вагінозів та інших. Причому, слід відмітити, що використання живих форм мікроорганізмів

практично не має побічних ефектів (алергій, порушень нормального складу мікробіоценозу макроорганізму, втрати лікувальних властивостей).

У сільському господарстві живі культури мікроорганізмів використовують для покращення приросту біомаси тварин, для профілактики інфекційних захворювань, для кращого зберігання кормів, для боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами.

Антибіотиками називають речовини, які мають антимікробні властивості. Ці речовини в основному продукуються мікробами-антагоністами, але можуть бути рослинного чи тваринного походження. В наш час відомо більш як 6000 назв антибіотиків. Але широке застосування мають близько 150.

Безсумнівно, антибіотики є найефективнішим засобом для лікування складних інфекційних захворювань, але безконтрольне та не завжди обґрунтоване їх використання призводить до негативних наслідків, а саме: появі антибіотикостійких штамів (необхідності постійного пошуку нових більш ефективних антибіотиків); складним порушенням у нормальному складі мікробіоценозу макроорганізму, необхідності доліковування негативних наслідків антибіотикотерапії.

Тому в наш час пошук нових високоефективних антибіотиків є досить актуальним. Цей пошук ведеться у двох напрямках. По-перше, шляхом хімічної модифікації вже існуючих антибіотиків. По-друге, пошуком у природі нових мікробів-антагоністів.

Класифікація біохімічних процесів, що викликаються мікроорганізмами

Здатність мікробів активно перетворювати різні сполуки в процесах дихання і харчування широко використовуються людиною для отримання цінних харчових продуктів. Завдяки цьому мікроорганізми можуть також бути винуватцями їх псування. На особливу увагу заслуговують процеси перетворення речовин під час дихальних процесів (в основному анаеробних) – типові бродіння.

Бродіння – анаеробний окисно-відновний процес, що викликають як живі клітини мікроорганізмів, так і ферменти, які вони виділяють.

У 1857 р. біологічна природа бродіння, яку викликають живі клітини мікроорганізмів, була доведена Луї Пастером. Пізніше (1897 р.)

На перших стадіях бродіння або окиснення вуглеводів з'являється піровиноградна кислота (піруват), яка залежно від умов, а також особливостей мікроорганізму перетворюється в різні сполуки. Шляхів її одержання багато. В анаеробних умовах піровиноградна кислота перетворюється в спирт, молочну, масляну кислоту та інші продукти. В аеробних умовах вона окиснюється до оцтової, лимонної або іншої органічної кислоти, а при повному окисненні з'являються CO₂ і води. Таким чином, процес бродіння проходить у дві фази: 1) в початковій або загальній фазі, яка здійснюється в анаеробних умовах, глюкоза розщеплюється до піровиноградної кислоти; 2) кінцева фаза залежить від умов культивування та особливостей мікроорганізму; при цьому утворюються різні продукти.

Перетворення органічних речовин супроводжується виділенням енергії, яка акумулюється в процесі фотосинтезу, що частково у вигляді тепла використовується мікробною клітиною або виділяється в навколишнє середовище. Між бродінням і диханням багато спільного, але при диханні окиснення речовин іде до кінця - до утворення CO₂ і води, у той час як продукти бродіння вміщують ще багато енергії.

Процеси бродіння, їх види

Залежно від переважного накопичення при бродінні тих чи інших продуктів розрізняють спиртове, молочнокисле, пропіоновокисле, маслянокисле, оцтовокисле, лимоннокисле бродіння та ін.

Процеси бродіння проходять з використанням в основному вуглеводів (крохмалю, цукрів), але деколи вихідною сировиною можуть бути спирти, органічні кислоти і навіть білки.

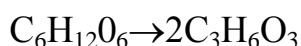
Анаеробні процеси бродіння

Спиртове бродіння. Являє собою ряд послідовних окисно-відновних та інших біохімічних процесів, в результаті яких утворюються етиловий спирт (основний продукт), вуглекислий газ, інші речовини.



Основний збудник спиртового бродіння - дріжджі. Вони ростуть в кислому середовищі при рН 4,0-4,5. У промисловості використовують культурні дріжджі. Застосування культурних дріжджів прискорює процеси бродіння, вино може бути одержано кращої якості та смаку, з меншою кількістю побічних продуктів.

Молочнокисле бродіння: гомоферментативне і гетероферментативне. Збудники типового молочнокислого бродіння (гомоферментативного бродіння) розщеплюють гексозу з утворенням двох молекул молочної кислоти:



$$\Delta G = - 197 \text{ кДж/моль.}$$

Збудниками нетипового молочнокислого бродіння (гетероферментативного бродіння) є молочнокислі стрептококи. Під дією яких, крім молочної кислоти, також утворюються леткі кислоти, ароматичні речовини, CO₂. Деякі з них мають здатність зброджувати лимонну кислоту.

Пропіоновокисле бродіння. Завдяки наявності специфічних ферментів пропіоновокислі бактерії, на відміну від попередніх, можуть розкласти, крім цукрів, піровиноградну кислоту, гліцерин, молочну кислоту.

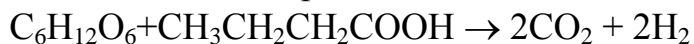


молочна пропіонова оцтова діоксид вода
кислота кислота кислота карбону

Кінцевими продуктами пропіоновокислого бродіння є пропіонова та оцтова кислота, а також діоксид карбону і вода.

Маслянокисле бродіння – складний біохімічний процес перетворення вуглеводів - спиртів або різних кислот у масляну кислоту. У результаті маслянокислого бродіння утворюється масляна кислота, діоксид карбону,

водень і виділяється енергія:



цукор масляна кислота

$$\Delta G = - 63 \text{ кДж/моль.}$$

Збудники маслянокислого бродіння є фіксаторами атмосферного азоту.

Типовими є клостридії.

Роль біохімічних процесів у перетворенні речовин у природі, зміна якостей харчових продуктів під час зберігання та використання

Різноманітні біохімічні процеси (окиснення та бродіння) широко використовують у різних галузях промисловості: виробництві спиртних напоїв, хлібопекарській справі, а також палива для двигунів внутрішнього згорання.

Етиловий спирт C_2H_5OH одержують з різноманітної сировини, яку поділяють на три основні групи:

а) ті, що містять цукор (цукровий буряк, кормова патока, або меляса, тростинний цукор, фруктовий сік).

б) ті, що містять крохмаль (картопля, земляна груша, кукурудза, овес та ін.).

в) ті, що містять целюлозу (деревина, сульфатні луги).

Основний збудник *спиртового бродіння* – дріжджі. За структурою накопичення дріжджової маси їх поділяють на пилоподібні та пластівчасті. Пилоподібні використовують для виробництва спирту, пластівчасті – у виробництві вина та пива, а також спиртних напоїв.

У хлібопекарському виробництві дріжджі використовують для розпушування тіста. З кожного кілограма збродженого цукру утворюється 255 л діоксиду карбону (CO_2). При випіканні об'єм газу збільшується, в результаті чого тісто розпушується та хліб стає пористим.

На сьогодні етиловий спирт - етанол - використовують як перспективне паливо. Мікробіологічне виробництво біоетанолу налагоджено в Японії, Німеччині, Франції, Швеції та інших країнах. Біо-етанол має ряд переваг над бензином: не забруднює навколишнє середовище, має велике октанове число, високий енергетичний ефект. Етанол не тільки паливо, згодом він прийде на зміну нафтохімічним продуктам.

7.2. Елективні (накопичувальні) культури мікроорганізмів – це культури в яких переважає один з деяких видів, або фізіологічно споріднена група. За переважаючими мікроорганізмами отримує назву вся культура. Для отримання таких культур необхідно створити елективні умови вирощування (аерацію, температуру), які забезпечать переважний розвиток необхідного для дослідника мікроорганізму.

Для виділення **елективних культур** користуються елективними живильними середовищами, які називаються також **накопичувальними**. Елективне середовище найбільше відповідає за складом та властивостями (*pH*, місткість солі) вимогам мікроорганізму, який виділяється.

Одночасно намагаються створити для конкуруючих видів несприятливі або зовсім нестерпні умови.

У результаті потрібний вид, навіть якщо в досліджуваному матеріалі були одиничні клітини його, через певний час вирощування стає переважаючим в наслідок більш високого темпу розмноження.

Метод одержання елективних культур розроблений вченим С.Н. Виноградським та засвоєний на знанні природних умов їх мешкання та фізіологічних особливостей. Для успішного виділення елективних культур необхідно знати, по-перше, який матеріал може бути джерелом їх виділення, по-друге, які вимоги цих мікробів до середовища мешкання та умов розмноження.

Цим методом користуються для якісного аналізу мікрофлори різноманітних об'єктів при виділенні чистих культур мікробів, які містяться в досліджуваному субстраті в малих кількостях: наприклад при діагностичних аналізах – з харчових продуктів, питної води, об'єктів зовнішнього середовища, підозрюваних на містимість хворобливих мікробів. Аналітична робота полегшується, якщо досліджувальний матеріал посередньо засівають на елективні середовища і після накопичення мікробів приступають до виділення чистих культур.

У виробничих процесах широко використовують накопичувальні культури, наприклад в хлібопекарстві – елективні культури дріжджів.

Лабораторна робота по одержанню та вивченню елективних культур найбільш розповсюджених збудників псування харчових продуктів, а також деяких видів, що використовуються в харчовій промисловості, виконується студентами на двох заняттях: на першому здійснюється висів матеріалу, що містить задану культуру, на другому аналізується результат. Кожний студент виділяє та аналізує одну з описаних нижче елективних культур.

Гнилісні бактерії

Гниттям називають складний біохімічний процес розкладання білкових речовин мікроорганізмами. Видовий склад гнилісних бактерій надзвичайно різноманітний: серед них є спороутворюючі та не утворюючі спор, аеробні та анаеробні види, рухливі та не порушні, розщеплюючи білки до повної мінералізації та утворюючі продукти неповного розпаду білка.

Метою лабораторних занять є виділення елективних культур двох видів гнилісних бактерій: *протея* та *сінної палички*.

Протей (*Proteus Vulgaris*) широко розповсюджений в природі. Він часто зустрічається в недоброякісному м'ясі, яйцях та інших білкових продуктах, накопичення його в харчових продуктах може стати причиною отруєння людини. Наявність протея в продуктах свідчить про їх санітарну небезпечність. Протей являє собою дрібну, грам негативну, не утворюючу спор, паличку; за типом дихання він відноситься до факультативних анаеробів, оптимальне для розвитку значення pH 6,7-7,0, оптимальна температура розвитку 25-37°C. Особливістю протея є активна рухливість, яка використовується для одержання елективної культури. Якщо матеріал, забруднений протеем, внести в конденсаційну воду скошеного агару, протей швидко розростається вверх по агару, "випереджуючи" супутню флору, і через добу інкубації на поверхні агару виявляється характерна тонка

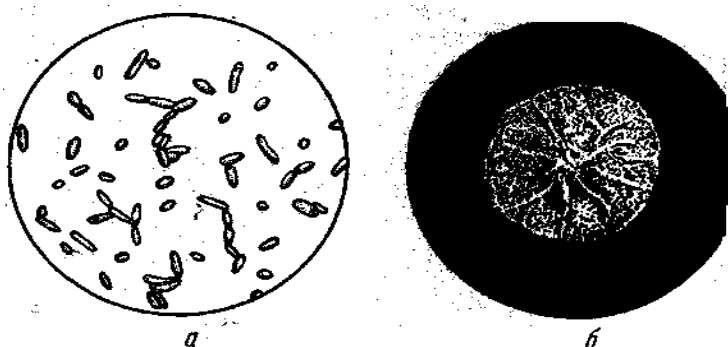
хвилеподібна голубувато-сіра поволока.

Сінна паличка (*Bac.subtilis*) також є розповсюдженим збудником гниття. Природне місце її мешкання – сіно. Сінна паличка, розмножуючись в продуктах, багатих на білки, викликає їх гниття. Вона спроможна розщеплювати також вуглеводи, тому викликає псування рослинних продуктів та хлібобулочних виробів. Сінна паличка може розвиватися на дуже бідних живильних середовищах. Це аеробна, велика, спороутворююча рухлива паличка, часто об'єднана в ланцюжки; забарвлюється за Грамом позитивно. Оптимальна температура її росту 20-30°C, однак і при температурі 25-45°C вона розвивається достатньо енергійно. Характерними ознаками сінної палички є рухливість клітин, містячи спори, та висока термостійкість спор (витримують кип'ятіння до 3 ч). В сіні містяться окрім сінної палички і інші види бактерій, однак ні одна з культур не володіє такою термостійкістю. Про наступні її особливості: аеробне дихання, спроможність росту на бідних середовищах, термовитривалість спор. При мікроскопуванні відзначається наявність грам позитивних, розташованих ланцюжком паличок. Місцями в паличках виникають спори у вигляді розташованих центрально непофарбованих порожнин.

Одержання елективної культури сінної палички

Пучку подрібненого сіна вміщують в конічну колбу, заливають 50 мл водопровідної води, закривають колбу ватним корком та кип'ятять протягом 10 хв. Охолоджену колбу розташовують в термостаті при температурі 30°C на 48-72 ч. В таких умовах не розвиваються анаероби, мікроорганізми, які потребують багатого живильного середовища, а також не термостійкі мікроорганізми. *Культуральні властивості.* При огляді висіву в колбочці видна крихка зморшкувата плівка.

Ознаками накопичення сінної палички: утворення крихкої плівки на поверхні середовища, наявність в плівці коротких паличок з центральною розташованою спорою, рухливість клітин. *Культуральні властивості* – при огляді висіву в колбочці видна крихка зморшкувата плівка.



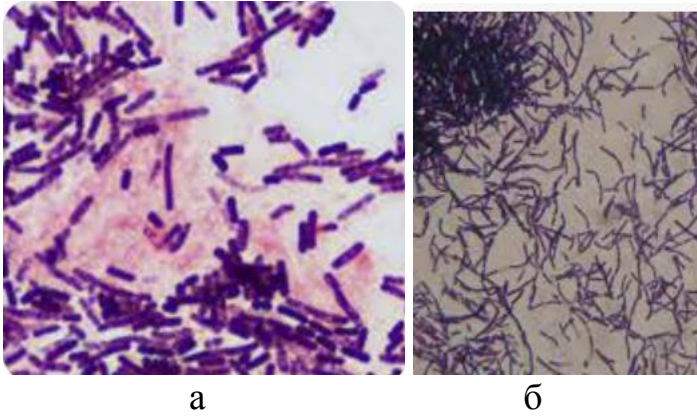


Рис. 7.3. Сінна паличка
a – вид під мікроскопом (Gp^+); *б* - колонія

Виділення елективної культури ПРОТЕЯ: шматочок м'яса, що підгнило, опустити в пробірку зі скошеним МПА. Для цього шматочок м'яса бактеріологічною петлею просунути у середину пробірки по склу, не торкаючись середовища. Пробірка повинна завжди знаходитись у вертикальному положенні. Після посіву поставити пробірку у термостат та витримати за температурою $30^{\circ}C$ 24 год. **Ознаками накопичення протей** є ніжна голубувата поволока на поверхні скошеного агару, форма – коротка грам негативна паличка, рухливість культури. **Культуральні властивості** – при огляді висіву в верхній частині скошеного агару визначають ніжну голубувату поволоку. **ВИСНОВОК:** ріст культури у вигляді плівки, що повзе вгору, тобто рухливість; морфологія: (Gp^-) короткі тонкі палички свідчать про накопичення культури протей (рис. 7.4)

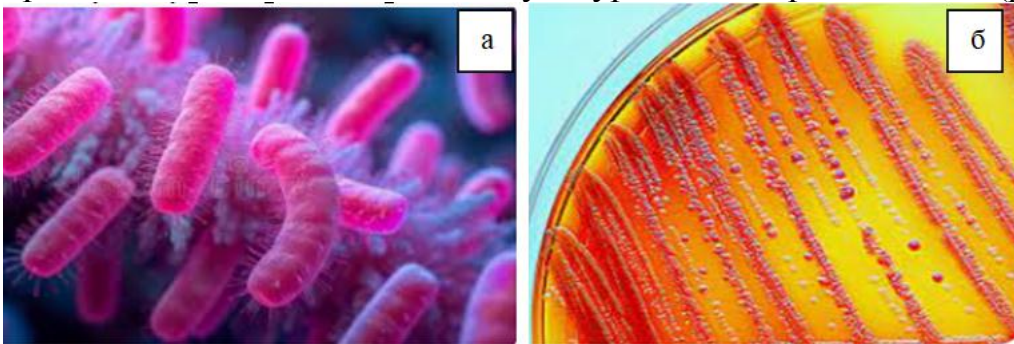


Рис. 7.4. Протей: *a* – вид під мікроскопом (Gp^-); *б* - колонія

Маслянокислі бактерії викликають процес маслянокислого бродіння з утворенням масляної кислоти, вуглекислоти і водню. Природним середовищем їх мешкання є ґрунт. Маслянокислі бактерії – це суворі анаероби, значні, рухливі, спороутворюючі, грам позитивні палички.

Спори їх розташовані біля кінця палички (рис. 7.5, а). Особливістю морфології окрім наявності спор є наявність в клітинах внутрішньоклітинних включень гранульози. Оптимальна температура розвитку бактерій $35-40^{\circ}C$. Вони витримують підкислення середовища до рН 4,9.

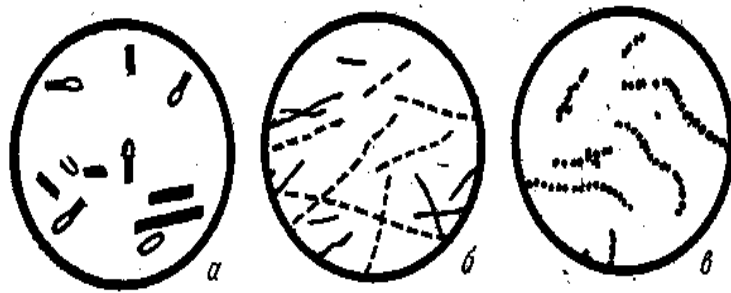


Рис.7.5. Ацидофільні бактерії: а – маслянокислі палички; б – молочнокислі бактерії; в – молочнокислі стрептококи

Елективна культура маслянокислих бактерій та її виділення. У колбу з молоком опустити щіпку ґрунту, прокип'ятити 5 хв на електричній плитці. Відзначити зовнішній вигляд живильного середовища, відмітивши згусток, що утворився у результаті скисання молока, і велику кількість бульбашок газу, що розривають згусток. Тобто, *культуральні властивості* маслянокислих бактерій свідчать про активне газоутворення (H_2).

Хімічний аналіз: наявність в середовищі масляної кислоти встановлюють за кислим запахом середовища та хімічною реакцією з 5% розчином $FeCl_3$. З колби відбирають піпеткою 5 мл культуральної рідини, переносять її в пробірку та додають 2 мл $FeCl_3$. При нагріванні рідина приймає брунатне забарвлення внаслідок утворення маслянокислого феруму.

Отже, *ознаками накопичення маслянокислих бактерій* є знебарвлення МПБ, типова морфологія великих спорових бактерій, а також наявність масляної кислоти в середовищі накопичення. *Культуральні властивості.* При огляді висіву в колбі Вюрца відзначають скаламучення середовища та наявність осаду біля дна колби, а також колір МПБ. Знебарвлення індигокарміну свідчить про накопичення H_2 та, як наслідок, про маслянокисле бродіння (рис. 7.6)

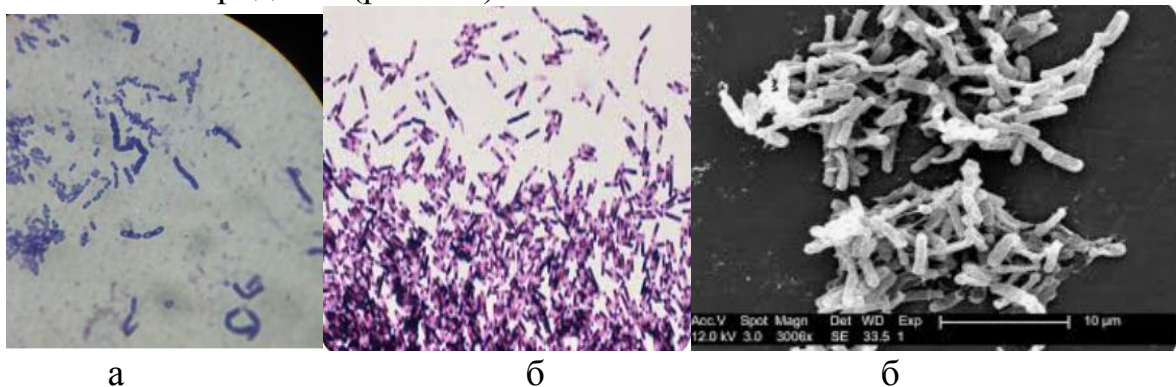


Рис. 7.6. Маслянокислі бактерії: а – вид під мікроскопом (Gr^+); б - колонія

ВИСНОВОК: культуральні властивості, що свідчать про активне газоутворення маслянокислих бактерій, витривалість культури до кип'ятіння, *морфологія* у вигляді грубої грампозитивної палички, накопичення масляної кислоти в середовищі свідчать про виділення елективної культури маслянокислих бактерій.

Висів ґрунту в МПБ і кип'ятіння середовища

Колбу Вюрца (колба з відповідною трубкою) заповнюють на 1/3 об'єму МПБ додають 1-2 г глюкози для процесу бродіння, пучку крейди для нейтралізації масляної кислоти, що утворюється, із декілька крапель індикатора – розчину фарби індигокарміну до стійкого темно-синього забарвлення бульйону. При утворенні масляної кислоти в процесі росту маслянокислих бактерій виділяється водень, який знебарвлює індигокармін. Відповідно, відновлення первинного кольору середовища свідчить про перебіг маслянокислого бродіння.

Одержання маслянокислих бактерій. Бульйон в колбі нагрівають до кипіння, вносять в середовище дрібку ґрунту і тільки після цього щільно закривають колбу змащеним вазеліном гумовим корком.

Створення умов анаеробіозу

Колбу приєднують до помпи за допомогою товстостінної трубки, натягнутої на бічний відросток колби і перемкнutoї затискачем. Поступово відкриваючи затискач, відкачують з колби повітря до появи великої – пухирчастої швидко спадаючої піни. Колбу від'єднують від помпи і вміщують в термостат при температурі 37-42°С на 3-4 доби.

Визначити накопичення масляної кислоти в середовищі: у пробірку відібрати 5 мл рідини з колби з культурою, додати 2 мл 5% розчину FeCl₃ і прокип'ятити у полум'ї спиртівки. Поява коричневого забарвлення свідчить про утворення маслянокислого феруму, тобто про наявність у середовищі масляної кислоти.

Контрольні запитання

1. Які культури називають елективними? З якою метою їх виділяють у лабораторних умовах?
2. Які середовища називають елективними?
3. Що треба знати про мікроорганізми, щоб одержати їх у вигляді елективної культури?
4. Які фізіологічні особливості покладено в основу виділення елективних культур протея, сінної палички, маслянокислих бактерій

Лабораторна робота № 8

«Молочнокислі бактерії. Визначення кислотності молока. Заквашування молока. Виділення елективної культури дріжджів з поверхні ягід винограду»

Мета: Ознайомитися з методами виділення елективних (накопичувальних) культур молочнокислих бактерій, галофілів, дріжджів та методикою визначення кислотності молока; процесом заквашування молока.

План

- 8.1. Методи виділення елективних (накопичувальних) культур молочнокислих бактерій, галофілів, дріжджів.
- 8.2. Методика визначення кислотності молока
- 8.3. Заквашування молока

8.1. Методи виділення елективних (накопичувальних) культур молочнокислих бактерій, галофілів, дріжджів.

Молочнокислі бактерії

Молочнокислі бактерії викликають анаеробне перетворення вуглеводів з утворенням молочної кислоти. Здібністю до молочнокислого бродіння володіють різні види бактерій, які об'єднуються під загальною назвою «молочнокислі». До них відносяться кулеподібні та паличкоподібні форми (рис. 7.5, б, в).

Всі представники цієї групи бактерій нерухомі, не утворюють спор, є факультативними анаеробами, дуже вимогливими до складу живильних середовищ і гарно розвиваються тільки в присутності складних органічних сполук Нітрогену. Вони є вираженими ацидофілами, однак стійкість до кислоти різна у окремих видів. Найбільш стійкі паличкоподібні форми, які можуть розвиватися при рН 4-3,8. Оптимальна температура розвитку окремих видів різновидна – 25-45°C

Елективним середовищем для виділення молочнокислих бактерій є молоко. Принцип отримання елективних культур молочнокислих бактерій заснований на тому, що вони спроможні в процесі розвитку в молоці виробляти молочну кислоту та продовжувати розмножуватися при кислому значенні рН, в той час, як ріст більшості супутніх бактерій (наприклад, гнилісних) в цих умовах пригнічується.

Виділення елективної культури молочнокислих бактерій. Заквасити пастеризоване молоко шматочком чорного хліба або 2-3 маленькими шматочками будь-якого кисломолочного продукту. Поставити у термостат та витримати за температурою 30°C 24 год.

Аналіз елективної культури молочнокислих бактерій. Вивчити зміни, що відбулися у середовищі: утворився рівномірний згусток.

Культуральні властивості

Описують характер згустку закиненого молока: консистенцію (щільна, пухкість і т.д.), наявність сироватки, бульбашок газу.

Морфологія бактерій

Мазок із сироватки (без додавання води) фіксують сумішшю Нікіфорова, профарбовують за Грамом та досліджують під мікроскопом. Проглядаючи його, встановлюють різноманітність форм клітин (паличкоподібні, коки), тинкторіальні властивості.

Увага! Для приготування профарбованого препарату використовують тільки сироватку, не дозволяється попадання в мазок молочного згустку, утруднюючого мікроскопію.

Приготувати мазок: на предметне скло нанести краплю згустка, розтерти тонкий мазок, знежирити ефіром (занурити висушений на повітрі мазок у склянку з ефіром) і пофарбувати метиленовим синім.

Увага! Під час мікроскопії відзначити кулеподібні (а) і паличкоподібні (б) бактерії, які не утворюють спор.

Ознаками накопичення молочнокислих бактерій є утворення

молочного згустку та сироватки, підвищення кислотності за зрівнянням зі свіжим молоком, а також типова для молочнокислих бактерій морфологія.

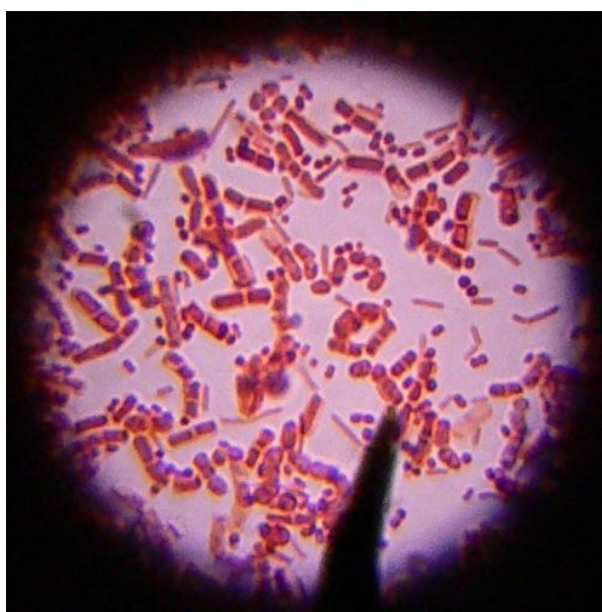
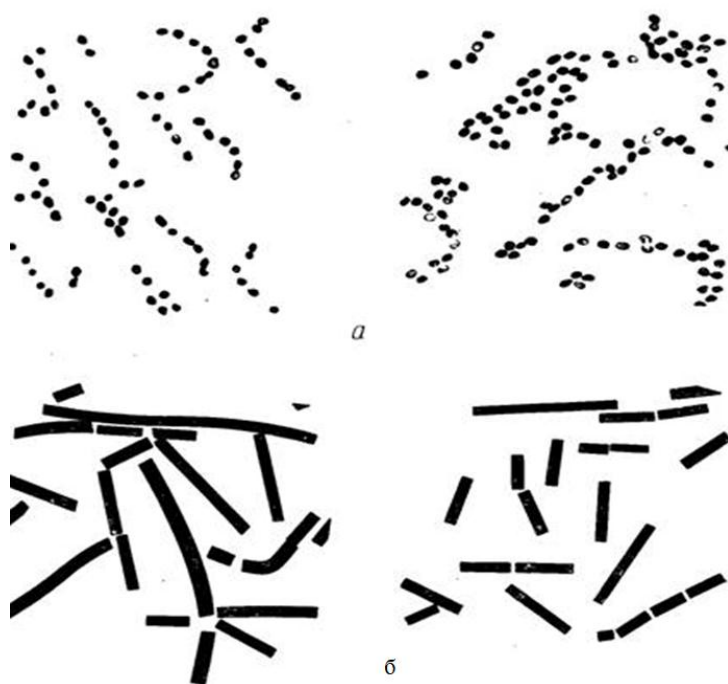


Рис. 8.1. Молочнокислі бактерії: вид під мікроскопом (Gr^-) та колонія під мікроскопом

Увага! До молочнокислих бактерій відносять види з різною морфологією, що здатні до молочнокислого бродіння.

Індивідуальне завдання: визначити кислотність молока за Тернером. Із колби з культурою відібрати 5 см^3 молока в чисту колбу, додати 10 см^3 дистильованої води і 3 краплі 1% спиртового розчину фенолфталеїна. З бюретки додати поступово до молока по краплях 0,1н розчин їдкого лугу до появи слаборожевого забарвлення. Розрахувати кислотність молока, перемноживши кількість см^3 лугу, витраченого на титрування, на 20.

Наприклад: на титрування 5 см^3 молока пішло 7 см^3 лугу. Кислотність у

градусах Тернера дорівнює $7 \times 20 = 140^\circ$.

Висновок: утворення сгустку молочних білків свідчать про накопичення культури молочнокислих бактерій: паличкоподібні бактерії і кулеподібні бактерії (G^-), розташовані ланцюжком.

Дріжджі

Дріжджі широко розповсюджені в природі. Джерелами виділення різноманітних рас дріжджів можуть бути ягоди, родзинки, квас, хліб, відстій пива. Оптимальна температура росту культури – $25-30^\circ C$, оптимальне значення pH – 4-6. Принцип одержання накопичувальної культури дріжджів заснований на їх здібності росту на цукромістких середовищах зі слабо кислою реакцією. Характерною ознакою багатьох рас дріжджів є спиртове бродіння, яке супроводжується накопиченням в середовищу CO_2 .

Виділення елективної культури дріжджів з поверхні ягід винограду

1-й день дослідження:

1. В бродильну пробірку (з поплавцем) внести пінцетом родзинку, закрити ватним корком та вмістити в термостат при температурі $30^\circ C$.

2-й день дослідження.

1. Виявити накопичення дріжджів:

а) за культуральними властивостями, відрізнивши наявність осаду мікроорганізмів;

б) за накопиченням CO_2 у поплавці (бульбашки газу при струшуванні пробірки (утворюється піна);

в) за морфологічними властивостями переважаючих клітин при мікроскопуванні пофарбованого фуксином препарату з осаду.

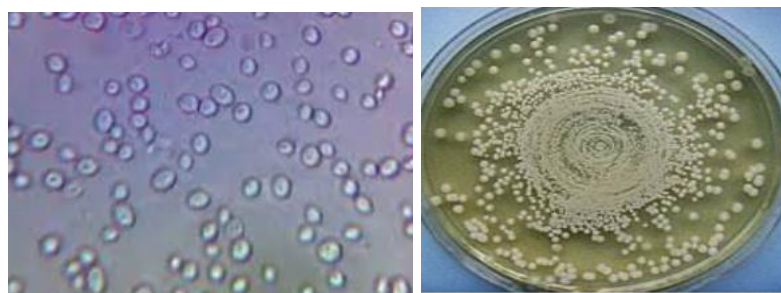


Рис. 8.2. Дріжджі: а – вид під мікроскопом; б - колонія

Галофіли. Галофільними називаються мікроорганізми, спроможні розвиватися на субстратах з підвищеним вмістом солі. В природі існують галофіли – до 32% солі $NaCl$ та їх різновид – галофіти: екстремальні галофіти 15-32% $NaCl$ та помірні галофіти 5-20% $NaCl$). Галофільні мікроорганізми мешкають у воді солоних водойм; вони розмножуються на поверхні солі, в солоних харчових продуктах і можуть викликати їх псування. До галофілів (та галофітів) відносяться різні види бактерій - аероби та анаероби, спороутворюючі та не утворюючі спор, рухливі та нерухомі, коки та палички. В основу одержання елективних культур покладена їх солестійкість.

Висів оселедця в МПБ

В три пробірки з МПБ, містячи *NaCl* в різній концентрації (0,5; 2,0 та 10,0%-вій), вносять пінцетом по шматочку оселедця. Пробірки закривають ватним корком та ставлять в термостат при температурі 30-35°C.

Аналіз елективної культури галофілів.

Відзначити помутніння сольового МПБ, що свідчить про ріст культури у розчині з підвищеним вмістом кухонної солі.

Приготувати мазок, пофарбувати за методом Грама. Під час мікроскопії відзначити кулеподібну або паличкоподібну форму клітин, їх колір.

Ознака накопичення галофітів – скаламутнення середовища, які містять підвищені концентрації кухонної солі.

Культуральні властивості

Відзначають наявність і ступінь каламутності середовища в трьох пробірках в залежності від концентрації солі в середовищі.

Морфологічні властивості

а) *Профарбованість за Грамом.* Готують препарат із середовища, яке скаламутніло. Під мікроскопом відзначають наявність кокової та паличкоподібної мікрофлори, забарвлення.

б) *Рухливість.* Готують препарат «зависла крапля» із скаламутнілого середовища та мікроскопують при 8^x, а потім 40^x.

Отже, аналіз полягає у наступному:

1. Відзначають наявність та ступінь скаламучення середовища в трьох пробірках.

2. Визначають рухливість

3. Досліджують морфологію: приготувати фіксований препарат та профарбувати за Грамом. При мікроскопуванні відзначити форму клітини, наявність або відсутність спор та колір переважаючого виду бактерій.

4. Відзначають, однорідна або різна культура в залежності від концентрації солі в середовищі.

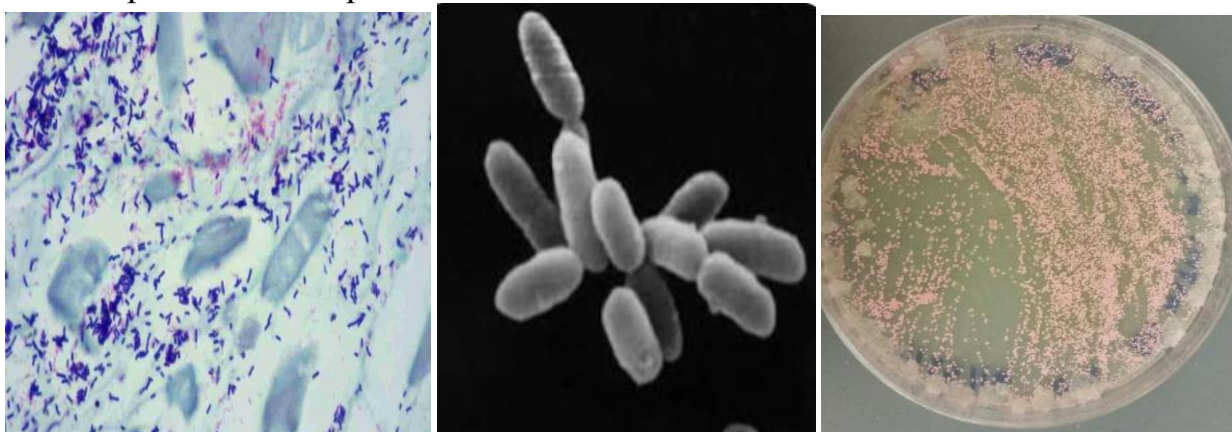


Рис. 8.3. Галофіли: а – вид під мікроскопом; б - колонія

Висновок: ріст культури в присутності 10% розчину кухонної солі свідчить про накопичення галофілів, Гр+ палички

8.2. Методика визначення кислотності молока

Для роботи беруть три колби с пастеризованим молоком. В першій колбі визначають титровану кислотність молока. Кислотність в градусах Тернера ($^{\circ}T$) виражається кількістю мілілітрів 0,1 н розчину лугу ($NaOH$ або KOH), витрачених на нейтралізацію 100 мл молока.

Для аналізу відбирають в чисту колбочку 5 мл молока, додають 10 мл дистильованої води та 3 краплі 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну. Поступово (по краплі) додають до суміші 0,1 н розчину лугу (при скаламучуванні) до появи стійкого слабо-рожевого забарвлення.

Розраховують кислотність молока, помножуючи кількість мл лугу, використаного на титрування, на 20.

$$^{\circ}T = \frac{100 \text{ мл лугу}}{5 \text{ мл молока}}$$

Кислотність свіжого молока не повинна перевищувати $22^{\circ}T$

8.3. Заквашування молока

В дві колбочки з пастеризованим молоком вносять по 2-3 петлі однієї з заквасок – кисляку або ацидофіліну. Термостатують висіви при $37^{\circ}C$ протягом 24 год.

Контрольні запитання

1. Що є ознакою накопичування галофілів, молочнокислих бактерій та дріжджів?

2.. У яких межах змінюється кислотність молока (за Тернером) при його окисненні? Як її визначають?

3. Які фізіологічні особливості покладено в основу виділення елективних культур:

- молочнокислих бактерій;
- галофілів.

Лабораторна робота № 9 “Вивчення методів стерилізації”

Мета: Ознайомитися з методами стерилізації.

План

9.1. Стерилізація поживних середовищ

9.2 Фізичні методи стерилізації

9.3. Хімічні методи стерилізації

9.1 Стерилізація поживних середовищ

Стерилізація (від лат. *sterilis* – безплідний) – це знищення всіх видів мікроорганізмів (вегетативних клітин та форм спокою (спор, цист...) у середовищах або на предметах, що піддаються стерилізації. Для стерилізації використовують різні методи, які можна поділити на дві основні групи –

фізичні та хімічні.

Фізичні методи стерилізації передбачають застосування:

1. Дії високих температур:

• фламбування (прожарювання) у полум'ї газового пальника чи спиртівки;

• кип'ятіння;

• сухим жаром у сухожарових шафах;

• автоклавування.

2. Стерилізації фільтруванням.

3. Опромінення ультрафіолетовими променями.

Хімічні методи стерилізації передбачають використання бактерицидних газів та розчинів деяких хімічних речовин (спирт, сулема...).

9.2 Фізичні методи стерилізації.

Дія високих температур:

Фламбуванням (прожарюванням) у полум'ї газового пальника (спиртівки) стерилізують, безпосередньо перед використанням, бактеріологічні петлі, мікробіологічні голки та дрібні металеві предмети. При цьому необхідно пам'ятати, що найвища температура спостерігається у верхній та периферійних частинах полум'я пальника (рис. 9.1).

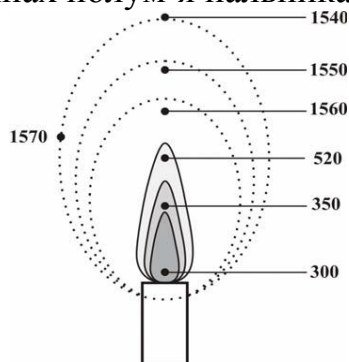


Рис. 9.1 Значення температури (у °С) в різних ділянках полум'я пальника

Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві та скляні інструменти.

Початком стерилізації вважають момент закипання води у стерилізаторі. Стерилізацію *сухим жаром* проводять у спеціальних сухожарових шафах (рис. 9.2).



Рис. 9.2 Зовнішній вигляд сучасної сухожарової шафи

Таким чином стерилізують, в основному, лабораторний посуд, який складають у спеціальні бікси або загортають у папір. При встановленні на сухожарових шафах температури, слід пам'ятати, що папір та ватно-марлеві корки обуглюються при температурі понад 180°C.

Стерилізація *автоклавуванням* – це найнадійніший та найпоширеніший спосіб стерилізації. Її проводять за допомогою спеціальних пристроїв – автоклавів (рис. 9.3).

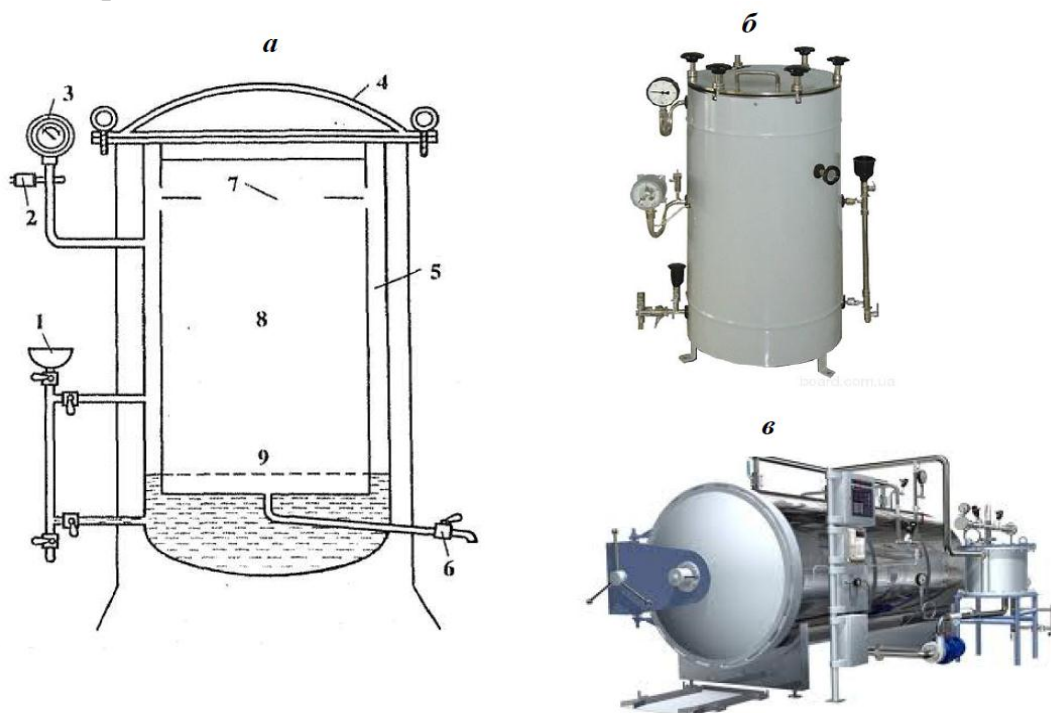


Рис. 9.3 Схема будови (а) та сучасний вигляд вертикального лабораторного(б) і горизонтального промислового (в) автоклаву: 1 – лійка, через яку автоклав заправляють водою; 2 – запобіжний клапан; 3 – манометр; 4 – кришка; 5 – водопарова камера; 6 – кран для випуску повітря; 7– отвір, через який пара надходить у стерилізаційну камеру; 8 – стерилізаційна камера; 9 – підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються.

В автоклавах стерилізують посуд, поживні середовища та проводять знешкодження відпрацьованого мікробного матеріалу. Автоклави можуть бути різноманітні за формою, розмірами, робочим тиском, конструкцією, але всі вони виконують одну і ту ж функцію – стерилізацію, і принцип їх роботи – практично однаковий. У верхній двостінний металевий резервуар, який герметично закривається, складають матеріал, який підлягає стерилізації. Нижній резервуар представляє собою котел, який заповнюється водою. Необхідний рівень води відмічено на спеціальній водомірній трубці автоклава (рівнемірі).

Верхній та нижній резервуари з'єднані між собою трубою, по якій піднімається пара під час закипання води у котлі. Пара збирається у верхньому резервуарі і, оскільки він герметично закритий, в ньому створюється надлишок тиску. Для того щоб надлишковий тиск не

перевищував дозволеної межі, верхній резервуар оснащено спеціальним паровивідним клапаном.

Автоклав обов'язково має два манометри, на одному – встановлюється необхідний для стерилізації тиск, інший – показує поточний тиск у стерилізаційній камері. Як тільки стрілка манометра доходить встановленої позначки, автоматично відкривається паровипускний клапан і надлишок пари виходить із стерилізаційної камери.

В мікробіологічній практиці стерилізація в автоклаві здійснюється при температурі в межах від 112°C до 134°C, тобто від 0,5 до 2,0 атм. Температура нижче 112°C не є надійною, а вище 134°C – не є необхідною. Показнику манометра, у фізичних атмосферах, відповідає певна температура (табл. 9.1).

Таблиця 9.1

Температура насиченої пари за різного тиску

Тиск:		Температура, °C
нормальний, атм	надлишковий, атм	
1,0	–	110
1,0	0,5	112
1,0	0,75	116
1,0	1,0	121
1,0	1,5	126
1,0	2,0	134
1,0	2,5	138

При підвищенні тиску пари відповідно підвищується й температура в автоклаві: 0,5 атм (50,65 кПа) – 110...112°C, 1 атм (101,3 кПа) – 120...121°C, 1,5 атм (151,95 кПа) – 124...126°C, 2 атм (202,6 кПа) – 132...133°C.

Температура й тривалість автоклавування визначаються матеріалом, який піддається стерилізації. Поживні середовища, які містять молоко, желатин, пивне сушло, дріжджовий автолізат, вітаміни, цукри стерилізують за 0,5 атм протягом 15...30 хв.

Загальноживані поживні середовища стерилізують за 1,0 атм. Але є субстрати, які характеризуються особливою термостабільністю (наприклад, ґрунт), Такі субстрати стерилізують за 2,0 атм протягом 1...2 год два дні поспіль.

Для середовищ, складові яких руйнуються за температури вище 100°C, проводять *поетапну* (дробну) стерилізацію, яку можна здійснювати в автоклаві з відкритим паровипускним клапаном (*стерилізація текучою парою*). Принцип такої стерилізації полягає в тому, що середовище (чи його компоненти) прогривається без надлишкового тиску (при 100°C) декілька разів, а в періоди між прогріваннями дають можливість прорости життєздатним спорам. Обробку текучою парою проводять 3...4 рази протягом 20...40 хв.

Різновидом дробної стерилізації є *тиндалізація*. Використовується для середовищ, компоненти яких денатуруються за 60°C. Матеріал, який стерилізується, прогрівають на водяних банях та апаратах Коха 5...6 разів, із перервою для переходу спорових форм мікроорганізмів у вегетативні.

Одноразовий прогрів матеріалу за температури нижче 100°C, направлений на знищення лише вегетативних клітин мікроорганізмів, називають *пастеризацією*. Вона, як правило, не забезпечує стерильності. В результаті пастеризації гине до 90...95% мікрофлори. Ті ж клітини, які залишилися – ослаблені і розмножуються повільніше. Пастеризація широко використовується у харчовій промисловості для обробки продуктів, які швидко втрачають (змінюють) свої смакові і харчові властивості за умови розвитку в них мікроорганізмів: молоко, ягідні та фруктові соки, вина, пиво та ін. Пастеризацію проводять за 60...75°C протягом 15...30 хв або за 80°C – 10...15 хв (у деяких випадках матеріал нагрівають до 90°C) із наступним швидким охолодженням до температури нижче 10°C.

Стерилізація фільтруванням використовується для обробки поживних середовищ та розчинів, компоненти яких розкладаються під дією температури. Метод полягає у пропусканні (фільтрації) розчинів через дрібнопористі фільтри (табл. 9.2). Мікробні клітини затримуються на фільтрах механічно, оскільки вони більші, ніж діаметр пор фільтру. Залежно від матеріалу, з якого виготовлено фільтр, розрізняють мембранні (колоїдні), азбестові, фарфорові, скляні фільтри. Фільтрування проводять за допомогою спеціальних приладів (фільтри Зейтца, свіча Шамберлана) (рис. 9.4).

Механізм роботи цих приладів принципово подібний. Верхній отвір стерильної колби покривається мікропористим фільтром, через який пропускається рідина, яку треба простерилізувати. Але пори фільтра настільки малі, що ця рідина не здатна проходити крізь них самостійно, для цього необхідно створити різницю тисків ззовні колби та в середині. За допомогою спеціального насоса у колбі створюється вакуум і простерилізована, таким чином, рідина збирається у колбі.

Таблиця 9.2

Характеристика мембранних фільтрів «Сінпор»

Позначення (№) фільтра	Діаметр пор, мкм	Варіації діаметра пор, ±мкм
1	4,0	1,0
2	2,5	0,5
3	1,5	0,4
4	0,85	0,15
5	0,60	0,10
6	0,40	0,06
7	0,30	0,04
8	0,23	0,03
9	0,17	0,03
10	0,12	0,02

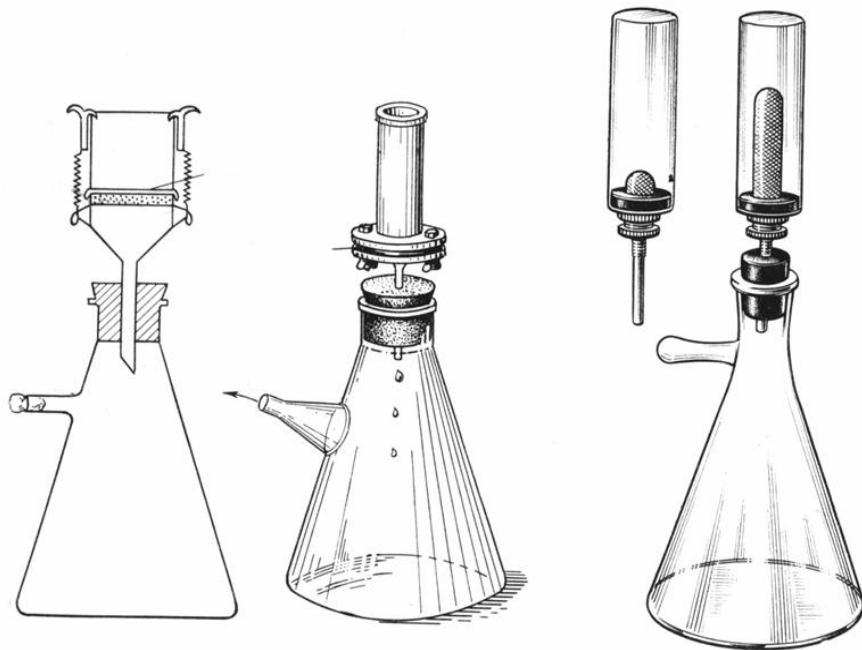


Рис. 9.4 Фільтри Зейтца із скляним (а) і металевим (б) тримачем та керамічний фільтр (в), з'єднані з колбою Бунзена: 1 – фільтри; 2 – вихід до вакуумного насоса

Опромінення ультрафіолетовими променями використовується, як правило, для обробки повітря в кімнатах, які потребують особливої чистоти.

9.3. Хімічні методи стерилізації. Хімічна стерилізація (дезінфекція) – це знищення мікроорганізмів та їх спор за допомогою хімічних речовин (антисептиків). Найчастіше дезінфекцію проводять для знищення патогенних форм мікроорганізмів у навколишньому середовищі.

Як дезінфікуючі агенти використовують:

1. Галогени (хлор, йод) та їх похідні. Хлор та йод активні проти вегетативних та спорових форм мікроорганізмів.

2. Сполуки важких металів (ртуть, срібло, мідь). Оскільки сполуки ртуті високотоксичні, а срібла – коштовні, їх використовують дуже рідко. Крім того, ці сполуки здійснюють переважно бактеріостатичну, а не бактеріцидну дію.

3. Фенольні сполуки. Фенол здійснює дезінфікуючий вплив як на вегетативні клітини, так і на спори, тоді як його сполуки неефективні проти спор.

4. Спирти (етиловий та ізопропіловий). Їх дезінфікуючі властивості зростають прямо пропорційно концентрації, від 50% до 70%. При більш високих концентраціях їх бактеріцидна дія різко знижується. Спирти не справляють летального впливу на спори бактерій і мають повільний дезінфікуючий ефект (декілька хвилин).

5. Мікробіцидні гази. Формальдегід – максимальний стерилізаційний ефект досягається при вологості повітря 70% і температурі 22°C. За нижчої температури він втрачає свій дезінфікуючий ефект. Оксидом етилену обробляють термолабільні середовища та пластмасовий посуд. Оксид

етилену летка сполука і виділяється з обробленого матеріалу при температурі 37⁰С.

6. Консерванти додають до середовищ та матеріалів, які підлягають тривалому зберіганню. Окремо можна виділити *біологічну стерилізацію*, яку здатні здійснювати антибіотичні речовини та фітонциди.

Контрольні запитання

1. Що таке стерилізація?
2. Які методи використовують для стерилізації скляного посуду?
3. Які методи використовують для стерилізації поживних середовищ?
4. Які дезінфікуючі агенти використовують для стерилізації?
5. Надайте характеристику процесу *стерилізація фільтруванням*.

Лабораторна робота № 10

“Мікрофлора найважливіших груп харчових продуктів”

Мета: вивчити вплив на бактерії різних чинників зовнішнього середовища, які використовуються для подовження терміну зберігання харчових продуктів.

План:

- 10.1. Вивчити вплив на мікроорганізми дії підвищеного осмотичного тиску середовища:
- 10.2. Вивчити вплив на мікроорганізми дії температури;
- 10.3. Вивчити вплив на мікроорганізми дії рН середовища;
- 10.4. Вивчити вплив на мікроорганізми дії антибіотиків і фітонцидів
- 10.5. Аналіз антимікробної дії чинників зовнішнього середовища зберігання

10.1. Вивчення антимікробної дії підвищеного осмотичного тиску середовища.

При високій концентрації розчинених у середовищі речовин й, отже, високому осмотичному тиску у більшості мікроорганізмів настає плазмоліз клітини — протоплазма виділяє воду й ущільнюється; при цьому загальмовуються процеси обміну речовин і клітина переходить у стан анабіозу. Явище плазмолізу покладене в основу консервування деяких харчових продуктів повареною сіллю й цукром. Варто пам'ятати, що деякі види мікроорганізмів здатні легко переносити високі концентрації розчинів і навіть мають потребу в них. Такі мікроорганізми зветься осмофілами. Деякі з них є збудниками псування харчових продуктів, консервованих сіллю й цукром, а також збудниками харчових захворювань мікробної природи.

Самостійна робота

1. Вивчення явища плазмолізу в клітинах дріжджів у концентрованому

розчині $NaCl$.

2. Визначення впливу концентрації кухарської солі на розмноження бактерій.

3. Визначення впливу концентрації глюкози на розвиток міцеліального гриба.

4. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Робота 1. Плазмоліз у дріжджових клітинах

Пекарські дріжджі розводять у дистильованій воді до незначної каламутності суспензії. Краплю суспензії вміщують на предметне скло й вносять у неї кілька кристаликів кухарської солі. Через кілька хвилин проводять мікроскопію при збільшенні в 1000 разів (об'єктивом 100^x). У плазмолізованих клітинах протоплазма відокремлюється від оболонки й зморщується. Мікроскопічну картину варто замалювати в альбомі.

Робота 2. Вплив концентрації кухарської солі на бактерії

У три пробірки із МПБ, що містить $NaCl$ різної концентрації (0, 5; 10,0 й 20,0%) роблять посів бактерій. Пробірки вміщують у термостат при температурі 37°C.

Робота 3. Вплив концентрації глюкози на міцеліальні гриби

Роблять посів міцеліального гриба в пивне сусло з 20, 40 й 60% концентрацією глюкози й без неї (контрольний посів). Посіви вміщують у термостат при температурі 25-35°C.

Увага! Підвищення осмотичного тиску в середовищі викликає зморщування протоплазми (плазмоліз), у результаті якого мікроорганізми переходять у стан анабіозу. Явище плазмолізу покладено в основу консервування харчових продуктів сіллю та цукром.

Вивчити вплив підвищеного осмотичного тиску на дріжджові клітини. Краплю суспензії пекарських дріжджів помістити на предметне скло і внести в неї скальпелем декілька кристалів кухонної солі. Через кілька хвилин переглянути під мікроскопом з об'єктивом х40. Відзначити в клітинах зморщування протоплазми і відділення її від оболонки. Замалювати картину мікроскопії.

10.2. Вивчити вплив на мікроорганізми дії температури

Увага! Про антимікробну дію того або іншого чинника свідчить зниження активності росту бактерій або повна відсутність росту.

Температура середовища, несприятлива для росту мікроорганізмів— один з факторів, які широко використовуються на практиці для придушення життєдіяльності мікроорганізмів. Найбільша температура, при якій можливе розвиток мікробів, називається максимальної. Більшість мікроорганізмів погано переносять перевищення максимальної температури розвитку. Уже при 56–60°C можлива теплова коагуляція білка, при якій клітина гине. Термостійкість мікробів різна залежно від видових особливостей і форми життєдіяльності: вегетативні клітини гинуть швидше, спорові зберігаються довше. Так, безспорові бактерії, вегетативні клітини споривих бактерій, міцеліальні гриби й дріжджі гинуть при температурі 60–70°C упродовж 15–

30 хв, а при 80-100°C – протягом декількох секунд або 1-3 хв. Спори мікроскопічних грибів гинуть при 65–80°C, спори багатьох бактерій значно більше стійкі: вони гинуть при нагріванні до 80-100°C упродовж декількох годин, а при автоклавуванні при температурі 120°C – упродовж 20 хв. Термостійкість мікроорганізмів, крім особливостей виду, залежить від віку клітин, хімічного складу середовища, кислотності й інших факторів.

Самостійна робота

1. Вплив високих температур на безспорові бактерії.
 2. Вплив високих температур на спорові бактерії.
 3. Вплив високих температур на міцеліальні гриби.
1. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Робота 1. Безспорові бактерії

Водяний нагрівач нагрівають до температури 80°C. Чашку Петрі із застиглим м'ясопептонним агаром розкреслюють із боку дна на три сектори, які позначають за часом прогрівання культури у хв (0–10–30). Роблять посів заготовленої заздалегідь зависі безспорових бактерій (у фізіологічному розчині – розчин NaCl 0,85 %-вий) бактеріологічною петлею на сектор 0 (без прогріву). Посів проводиться методом штриха на поверхні агару. Пробірку з культурою поміщають у водяний нагрівач й прогрівають 10 хв, після чого роблять посів культури на сектор 10 хв. Знову поміщають пробірку у водяний нагрівач, прогрівають додатково 20 хв і висівають культуру на сектор агару 30 хв (загальний час прогріву культури). Чашки поміщають у термостат для вирощування при температурі 37°C.

Робота 2. Споріві бактерії

Термостійкість цих бактерій визначають аналогічно визначенню термостійкості безспорових бактерій.

Робота 3. Міцеліальні гриби

Раніше заготовлені чашки Петрі із застиглим суслон-агаром надписують із боку дна – 5, 25, 40 (позначення відповідають температурі вирощування гриба) і перевертають чашки кришкою догори. Беруть заздалегідь заготовлену пробірку з водною зависсю спори міцеліального гриба й наносять бактеріологічною петлею краплю суспензії на поверхню суслон-агару в центрі платівки. Засіяні чашки поміщають догори дном для вирощування культури при відповідних температурах (5, 25 й 40°C).

Увага! Висока температура викликає коагуляцію білка клітини і, отже, загибель мікробів і широко використовується для стерилізації різних матеріалів.

Чашки петрі з застиглим МПА розкреслити з боку дна на 3 сектори і позначити їх за часом нагрівання культури: 0, 10, 30 хв.

Суміш бактерій посіяти петлею на сектор 0 (контроль). Метод посіву - штриховий поверхневий.

Потім пробірку з культурою помістити у водяний нагрівач за температури 80°C і прогріти 10 хв. Зробити висів прогрітої культури на сектор, позначений "10" (час прогріву).

Знову помістити пробірку з культурою у водяний нагрівач, прогріти додатково 20 хв. і зробити висів культури на сектор "30" (загальний час прогріву).

Надписати на чашці з боку дна № групи і № робочого місця і помістити в термостат за температури 37°C.

10.3. Вивчити вплив на мікроорганізми дії рН середовища

Увага! Більшість мікробів ростуть та розмножуються у нейтральному або слаболужному середовищі. Підкислення середовища пригнічує ріст і розмноження гнилісних мікробів. Явище анабіозу в кислому середовищі покладено в основу консервування харчових продуктів шляхом маринування і квашення.

Для міцеліальних грибів і дріжджів сприятливим є слабокисле середовище, для бактерій - нейтральне. Значні відхилення концентрації гідрогенних і гідроксильних іонів від видових потреб до реакції середовища впливають на розвиток мікробів. Змінюючи кислотність середовища, можна придушувати або стимулювати ріст і розвиток мікробів, змінювати спрямованість біохімічних процесів, що має велике практичне значення. Так, кисле середовище впливає на гнилісні бактерії, тому деякі види харчових продуктів зберігають у маринованому й квашеному виді.

Самостійна робота

1. Посів культури дріжджів на солодове сусло з різним значенням *pH*.
2. Посів культури бактерій на МПБ із різними значеннями *pH*.
3. Оформленн протоколу дослідження.

Методичні вказівки

Посів дріжджів

Готують ряд із чотирьох пробірок з однаковим обсягом стерильного солодового сусла із *pH* 3, 5, 7, 9. У кожную пробірку вносять піпеткою однакову кількість суспензії дріжджів. Пробірки ставлять у термостат для вирощування при 30°C.

Посів бактерій.

Готують ряд пробірок, що містять стерильний МПБ зі значеннями *pH* 3, 5, 7, 9. У кожную пробірку, суворо дотримуючи правила стерильності, вносять бактеріологічною петлею суспензію гнилісних бактерій (сінної й картопляної паличок, протей та ін.). Пробірки поміщають у термостат для вирощування при 37°C.

У штативі на робочому місці ряд позначених пробірок, що містять стерильний МПА з різними значеннями *pH*: 3,0; 7,0; 9,0. У кожную пробірку стерильно внести бактеріологічною петлею суміш гнильних бактерій (протей) і поставити пробірки в термостат за температури 37°C.

10.4. Вивчити вплив на мікроорганізми дії антибіотиків і фітонцидів

Хімічні речовини, що згубно діють на мікроорганізми, називаються антисептиками. Дія антисептиків на мікроорганізми залежить від хімічної структури речовини, його концентрації, тривалості контакту із клітиною (експозиції), а також від чутливості мікроорганізмів до даної речовини. У

значній мірі активність антисептиків визначається й складом середовища, у якому перебувають мікроорганізми.

Більшість антисептиків відносять до групи загально-протоплазматичних отрут, тобто отрут, що діють не тільки на мікроби, але й на будь-яку тваринну й рослинну клітину. Тому їхнє застосування для консервування харчових продуктів украй обмежено, а речовини, які дозволяється використовувати в якості консервантів, використовуються в малих дозах (від тисячних до десятих часток відсотка) і тільки для деяких видів продуктів.

Багато антисептиків використовують для дезінфекції (зnezаражування) туалетів, складських приміщень, холодильних камер, питної води, устаткування, інвентарю, дезінфекції рук та ін. Як дезінфікуючу речовину широко застосовують 0,5-5%-ві розчини фенолу, 0,1 - 10%-ві розчини хлорного вапна (хлорки).

Самостійна робота

1. Посів культури міцеліальних грибів на середовище, що містить сорбінову кислоту різної концентрації.
2. Посів спорових бактерій після обробки фенолом.
3. Посів безспорових бактерій після обробки фенолом.
4. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки

Вплив сорбінової кислоти на міцеліальні гриби (або дріжджі)

Бактеріологічною петлею роблять посів спор міцеліальних грибів (або дріжджів) у стерильне солодове сусло із сорбіновою кислотою 0,01; 0,1 й 0,5% концентрацією й без неї. Пробірки поміщають у термостат при температурі 25°C.

Вплив фенолу на безспорові бактерії

У стерильну чашку Петрі наливають 0,5% розчин фенолу. Стерильним пінцетом беруть три заготовлених заздалегідь бактеріальних тести² з кишковою паличкою й поміщають їх у розчин фенолу. Через 5 хв виймають пінцетом один з тестів, двічі (по 5 хв) промивають його в чашці Петрі зі стерильною водою й занурюють у пробірку із МПБ. Через 15 хв, а потім через 30 хв проробляють те ж з іншими тестами. Пробірки поміщають у термостат при температурі 37°C для вирощування протягом тижня, оскільки фенол може гнітити життєдіяльність бактерій.

Вплив фенолу на спорові бактерії

Робота виконується на двох заняттях за планом попередньої роботи, але з бактеріальним тестом, що містить спорові бактерії (сінну паличку й ін.).

Антибіотики й фітонциди

Багато мікроорганізмів у процесі життєдіяльності виробляють біологічно активні речовини, які згубні для мікробів-антагоністів. Ці речовини одержали назву антибіотиків. Від інших антимікробних речовин

² Бактеріальний тест являє собою шматочок бавовняної тканини, який просочили 2-мільярдною зависсю бактерій і висушили у термостаті

вони відрізняються вибірковістю дії, тобто придушують життєдіяльність і знищують певні антагоністичні види мікроорганізмів.

Антибіотики різні за хімічною природою й антимікробною дією. Одні з них лише гнітять розвиток мікроорганізмів, інші вбивають їх. Відомі також антибіотичні речовини, вироблювані вищими рослинами (фітонциди) і тваринними організмами.

Самостійна робота

1. Посів бактеріальної культури на МПА в чашки Петрі з дисками, просоченими антибіотиками.

2. Посів культури міцеліальних грибів на сусло-агар із суспензією цибулі.

3. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Антибактеріальна дія антибіотиків

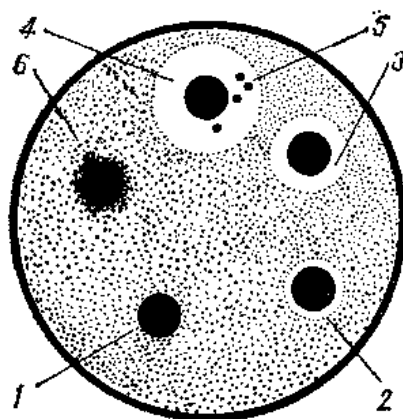


Рис. 10.1. Визначення антимікробної дії антибіотиків

(метод дисків): 1 — культура стійка до антибіотика, що втримується в даному диску; 2, 3, 4 — культура чутлива до антибіотиків; 5 — колонії стійких особин даного штаму; 6 — колонія антибіотико-залежних клітин

Чашку Петрі із застиглим МПА перевертають догори дном і пишуть на ньому номер групи й робочого місця. Потім кладуть чашку на стіл кришкою догори. Дотримуючи правила стерильності, наносять піпеткою на поверхню платівки агару краплю зависі бактерій (мікрококи, сардини або інші види сапрофітів) і ретельно розтирають її по всій поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя. Обпаленим пінцетом наносять на поверхню агару диски, просочені антибіотиком (пеніциліном, стретоміцином, левоміцетином, біоміцином або ін.). Диски розташовують по колу чашки так, як вказано на рис. 10.1.

Чашки перевертають нагору дном і поміщають у термостат при температурі 37°C.

Антимікробна дія фітонцидів

У порцелянову чашку натирають на тертці цибулину, попередньо облиту кип'ятком. Для досвіду необхідні дві чашки Петрі із застиглим суслом-агаром. Чашки надписують із боку дна, кладуть на стіл кришками

нагору й піпеткою наносять у центр платівки агару по 0,2 мл суспензії спор міцеліального гриба.

Завись розтирають за допомогою шпателя рівномірно по всій поверхні агару. Одна чашка є контрольною. У другу чашку поміщають у центр платівки обпаленим скальпелем кашку цибулі (близько 1 г). Обидві чашки ставлять у термостат при 25°C.

Увага! Антибіотики пригнічують розмноження мікроорганізмів, а деякі з антибіотиків викликають їх загибель, що дозволяє використовувати їх як лікарські препарати та препарати, що консервують.

Чашки Петрі з застиглим МПА надписати з боку дна (№ групи і № робочого місця). Покласти чашку на стіл доверху кришкою; узяти зі штатива пробірку із зависсю бактерій, відібрати стерильною піпеткою трохи зависі і нанести на поверхню МПА краплю. Потім стерильним шпателем круговими рухами розтерти культуру по поверхні агара.

а) **Антибіотики** - стерильним пінцетом нанести на поверхню агара диски з різними антибіотиками, притиснути їх щільно до середовища, приблизно на однаковій відстані один від одного.

б) **Фітонциди** часнику. Нарізати дрібно часник. У порцеляновій ступці розтерти шматочки часнику. Обпаленим скальпелем помістити кашку часнику в центрі живильного середовища з посівом бактерій.

Закрити чашки і, не перекидаючи (кришкою доверху), поставити її до термостату, витримати за 37°C протягом 24 годин.

10.5. Аналіз антимікробної дії чинників зовнішнього середовища

Мета: Врахувати результати посівів бактерій після впливу температури, за різними значеннями рН середовища, у присутності антибіотиків і фітонцидів часнику.

Аналіз антимікробної дії чинників зовнішнього середовища

Висновок про антимікробну дію різних чинників зовнішнього середовища залежно від рівня затримки росту мікроорганізмів.

Температура

Ознакою антибактеріальної дії високої температури в даному досвіді є зниження інтенсивності або відсутність росту бактерій на щільному середовищі МПА залежно від тривалості теплової обробки культури. Про дію температури на мікроскопічний гриб роблять висновки за величиною колонії й ступенем спороношення.

Самостійна робота

1. Вивчення результатів впливу високої температури на безспорові й спорові бактерії.

2. Вивчення результатів впливу високої температури на розвиток міцеліального гриба.

3. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Визначення термоустойчивості безспорових і спорових бактерій

Для визначення термостійкості безспорових і спорових бактерій переглядають сектори чашки, виявляють відсутність або наявність росту;

визначають інтенсивність росту орієнтовним візуальним методом по щільності й по площі поверхні.

Вивчити ріст бактерій на МПА в чашці Петрі: порівняти інтенсивність росту бактерій в секторах відповідно до тривалості нагрівання культури за температури 80°C.

Врахувати ріст, позначити інтенсивність росту хрестами:

«+ +» – рясний ріст,

« + » – незначний ріст,

« - » – відсутність росту.

Записати в таблицю результати:

Назва бактерій	Інтенсивність росту після нагрівання (80°C)		
	0	10 хв.	30 хв.
Кишкова паличка	++	+	–

Визначення впливу температури на розвиток гриба

Вплив температури на розвиток гриба досліджується за наступними показниками: величина діаметра колоній (виміряється смужкою міліметрового паперу з боку дна чашки) і наявність спороношення (величина пофарбованої зони колонії). Результати досліду записуються за формою:

Температура вирощування гриба, °C	Показники інтенсивності розвитку гриба, мм	
	діаметр колонії, мм	зона спороношення, мм
5	5	3
25	8	5
40	2	–

pH середовища

Ознакою впливу кислотності середовища на розмноження бактерій і дріжджів є зниження інтенсивності росту культури на рідкому середовищі.

Самостійна робота

1. Вивчення результату впливу кислотності середовища на культуру дріжджів і гнильних бактерій.

2. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Ріст культури дріжджів і гнильних бактерій

Переглядають пробірки з посівами й струшують вміст для рівномірного розподілу вирослої культури. Інтенсивність росту оцінюють по ступеню каламутності середовища й позначають умовно (кількістю хрестів). Для контролю досвіду готують фіксованим, пофарбованим фуксином препарати із вмісту пробірок, у яких відзначений ріст культури; мікроскопують і замальовують.

Вивчити ріст бактерій у пробірках із МПБ за різними значеннями pH. Відзначити інтенсивність росту гнильних бактерій за pH середовища - 3,0 -

7,0 -9,0. Позначити інтенсивність росту хрестами:
 “ ++ “ – густий ріст; “ + “ – незначний ріст; “ - “ – відсутність росту.
 Записати в таблицю результати:

Інтенсивність росту за <i>pH</i> середовища		
3.0	7.0	9.0
++	+	-

Антисептики. Антибіотики і фітонциди

Антисептики

Ознакою антимікробної дії антисептиків є вповільнення інтенсивності росту мікробів при підвищенні концентрації антисептика.

Про інтенсивність росту мікробів у даному дослідженні роблять по ступеню скаламутнення середовища в порівнянні зі стерильним середовищем. Ступінь каламутності середовища виражають кількістю хрестів.

Самостійна робота

1. Вивчення результату вирощування міцеліального гриба в присутності сорбінової кислоти.

2. Визначення антимікробної дії фенолу.

3. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Антибактеріальна дія сорбінової кислоти

Вплив сорбінової кислоти на міцеліальний гриб визначають по інтенсивності росту культури. Показником інтенсивності росту служить ступінь скаламутнення середовища після збовтування грибниці. Досліджують також інтенсивність фарбування грибниці, що є показником споруутворювання.

Для контролю чистоти культури готують препарат «розчавлена крапля» із вмісту пробірки з максимальним ростом (скаламутненням). Мікроскопують препарат при середніх збільшеннях мікроскопа.

Антимікробна дія фенолу

Переглядають неозброєним оком пробірки з посівом культури, відзначають ступінь скаламутнення живильного середовища в залежності від концентрації фенолу.

Для контролю культури готують фіксовані препарати з вирослих бактерій й офарблюють їх фуксином, мікроскопують із імерсією і замальовують в альбомі за такою формою:

Вид культури	Ріст на стерильно	Ріст бактерій після дії фенолу (0,5%-вий) при експозиції, хв	Ріст на стерильно	Ріст гриба при дії сорбінової кислоти концентрацією, %
--------------	-------------------	--	-------------------	--

		5	15	30		0	0,01	0,1	0,5
Бактерії кисломолочні	++	+	-	-	++	++	+	-	-

Антибіотики й фітонциди

Ознакою антибактеріальної активності антибіотиків і фітонцидів є утворення зони росту культури на МПА навколо диска, просоченого антибіотиками, а також навколо ямки зі здрібненою цибулею: при накладенні дисків на агар антибіотик розчиняється вологою середовища й дифундує в навколишнє середовище; те ж відбувається з фітонцидами цибулі. Залежно від активності антибіотиків і фітонцидів площа затримки росту мікробів різна.

Самостійна робота

1. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків по величині зони затримки росту на МПА з дисками.

2. Визначення чутливості міцеліального гриба до фітонцидів цибулі по величині зони затримки росту навколо ямки з кашкою цибулі.

Методичні вказівки:

Активність антибіотиків

Розглядають чашку з посівом бактерій, вимірюють за допомогою лінійки або міліметрового паперу зону затримки росту навколо кожного диска. Зона діаметром до 15 мм свідчить про малу чутливість мікроба до даного антибіотика, діаметром понад 25 мм - високої чутливості. Відсутність зони затримки росту вказує на стійкість мікроба до даного антибіотика.

Вивчити ріст бактерій на поверхні МПА у чашках Петрі у присутності антибіотиків (фітонцидів). Заміряти зону затримки (у мм) і зробити висновок про чутливість стафілокока до антибіотика. З діаметрами зони до 15 мм мікроб має малу чутливість до даного антибіотика; більше 25 мм – високу чутливість.

Відсутність зони затримки вказує на стійкість до дії даного антибіотика.

Позначення антибіотика за кольором диска і номером:

- 1) рожевий – еритроміцин
- 2) білий – левоміцетин
- 3) синій – ристоміцин
- 4) зелений – пеніцилін
- 5) жовтий – тетрациклін

Результати записати у таблицю:

Назва культури	Результат	Назва антибіотика				
		1	2	3	4	5

Стафілокок	Зона затримки росту	15	25	-	25	25
	Чутливість	мала	висока	відсутня	висока	висока

Активність фітонцидів цибулі

Розглядають чашки з посівом міцеліального гриба. Оцінюють фітонцидні властивості цибулі по наявності й величині затримки росту гриба в чашці із цибульною кашкою; вимірюють діаметр цієї зони за допомогою лінійки або міліметрового папірця. Відзначають зону відсутності спороношення (фарбування грибниці) і її величину. Результати досліду записують за формою:

Досліджувана ознака	У чашці із цибулею	У контрольній чашці	Висновок
Зона затримки росту	25	відсутня	зменшується
Зона відсутності спороношення	15	відсутня	зменшується

Осмотичний тиск

Ознака несприятливого впливу на життєдіяльність мікробів підвищеного осмотичного тиску середовища - зниження інтенсивності росту бактерій, що виражається в зменшенні скаламутнення середовища, а в грибів - у зменшенні грибниці й спороношення.

Самостійна робота

1. Вивчення результату вирощування бактерій на середовищах з різними концентраціями кухарської солі.
2. Вивчення результату впливу концентрації глюкози на ріст міцеліального гриба.
3. Оформлення протоколу дослідження.

Методичні вказівки:

Ріст бактерій

Для визначення впливу концентрації *NaCl* на розвиток бактерій, по інтенсивності скаламутнення середовища ретельно перемішують вміст пробірок обережним струшуванням й обертанням пробірки між долонями. Після цього відзначають ступінь каламутності (кількістю хрестів). Для дослідження однорідності культури із вмісту всіх пробірок з скаламутненням середовища готують фіксовані препарати, офарблюють фуксином, мікроскопують імерсійним об'єктивом і замальовують в альбом.

Ріст гриба

Інтенсивність росту цвілевого гриба встановлюють по розвитку грибниці й спороутворенню (фарбуванню грибниці) і виражають її кількістю хрестів. Для контролю культури готують із грибниці препарат

типу «розчавлена крапля», мікроскопують із об'єктивом 40^x і замальовують в альбом.

Результати робіт записують за такою формою:

Назва культури	Оцінка росту (хрестиками) при концентрації, %						
	NaCl			глюкози			
	0,5	10	20	-	20	40	60
гриб Мукор	+	–	–	++	+	–	–

Контрольні запитання

1. Які Вам відомі методи використання високих і низьких температур для продовження термінів зберігання харчових продуктів?
2. Які методи зберігання харчових продуктів ґрунтується на змінненні рН середовища?
3. Чому антибіотики не використовуються широко для подовження термінів зберігання харчових продуктів?
4. Які побічні явища виникають в організмі людини під час довготривалого вживання антибіотиків?

Лабораторна робота № 11

“Вплив наносупензійної добавки на основі подвійного оксиду дво- та тривалентного феруму на мікробіологічні показники житньо-пшеничного хліба протягом зберігання”

Мета: Ознайомитися з методикою визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів – МАФАНМ (дріжджів і пліснявих грибів) у зразках житньо-пшеничного хліба, збагаченого супензійною нанодобавкою на основі подвійного оксиду дво- та тривалентного феруму.

План

- 11.1 Відбір і підготовка проб
- 11.2 Підготовка до випробування
- 11.3. Проведення випробування

Метод заснований на висіві продукту або гомогенату продукту і (або) їх розведень в поживні середовища, визначенні приналежності виділених мікроорганізмів до пліснявих грибів і дріжджів за характерним зростанням на поживних середовищах і за морфологією клітин.

Метод призначений для: встановлення відповідності мікробіологічних показників якості харчового продукту вимогам нормативно-технічної документації [ДСТУ 4583:2006].

11.1. Вибір і підготовка проб

Маса (об'єм) наважки, призначеної для приготування гомогенату продукту або вихідного розведення – не менше $(10,0 \pm 0,1)$ г (см^3).

З проби харчового продукту, в якому нормується кількість дріжджів і (або) пліснявих грибів, або з вихідного розведення харчового продукту готують ряд розведень відповідно до допустимої кількості дріжджів і (або) пліснявих грибів, зазначеної в нормативно-технічній документації на конкретний вид харчового продукту.

11.2. Підготовка до випробування

Приготування розчинів антибіотиків.

Розчини антибіотиків готують безпосередньо перед використанням. Антибіотики в таблетках використовують для приготування розчинів при відсутності антибіотиків для ін'єкцій. При приготуванні розчинів антибіотиків з таблеток не допускається проводити зважування, так як в таблетках може міститися різна кількість наповнювача. В цьому випадку приготування розчинів засновано на використанні цілих таблеток з точно відомим вмістом антибіотиків.

Розчин масовою концентрацією левоміцетину сукцинату розчинного 50 і 100 г/дм³: у флакон з $0,5$ або $1,0$ г левоміцетину (для ін'єкцій) вносять 10 см³ стерильної дистильованої води, вміст флакона розчиняють. Розчин додають до готової основи середовища.

Приготування агарового середовища для визначення дріжджів і пліснявих грибів. 60 г сухого агарового середовища для визначення дріжджів і пліснявих грибів, що складається з $18,0$ г сухої освітленої молочної сироватки, $18,0$ г лактози і $24,0$ г мікробіологічного агару, вносять в 1 дм³ дистильованої води, нагрівають до повного розчинення, при наявності осаду фільтрують. В отриманому середовищі перевіряють активну кислотність і, при необхідності, коригують її розчином гідроксиду натрію масовою часткою від 20% до 30% або розчином молочної кислоти об'ємною часткою 20% до значення активної кислотності $4,6-4,7$ од. рН; розливають в пробірки або колби і стерилізують 15 хв при температурі 121°C .

Середовище агаризоване з левоміцетином: до 1 дм³ основи додають 2 см³ розчину левоміцетину сукцинату розчинного (для ін'єкцій) масовою концентрацією 50 г/дм³ або 1 см³ розчину масовою концентрацією 100 г/дм³. При використанні розчину левоміцетину масової концентрації 5 г/дм³ до 980 см³ основи додають 20 см³ розчину.

11.3. Проведення випробування

З підготовленої проби продукту і (або) його розведення відбирають наважку об'ємом $(1 \pm 0,1)$ г (або см³).

Розведення, які засіваються для визначення вмісту дріжджів і пліснявих грибів для хлібобулочної продукції (табл. 11.1).

Таблиця 11.1

Розведення, які засіваються для визначення вмісту дріжджів і пліснявих грибів для хлібобулочної продукції

Найменування продукту	Кількість дріжджів (Д) і пліснявих грибів (П), КУО/см ³ (г), не більше	Розведення, які засівають
Хліб та хлібобулочні вироби з терміном придатності більше 72 год	Д – 100; П – 1	1

Посіви продукту або відповідних його розведень проводять на чашки Петрі, проводять два паралельних визначення. На дно стерильної чашки Петрі піпеткою вносять 1 г (см³) продукту або його розведення і стерильно заливають 15-20 см³ живильного середовища Сабуро, або агарним середовищем для визначення дріжджів і пліснявих грибів. Чашки Петрі з посівами ставлять для застигання на горизонтальну поверхню. Потім чашки Петрі перевертають кришками донизу і ставлять в термостат зі температурою (24±1)°С на 5 діб або при температурі (30±1)°С на 3-5 діб. Посіви інкубують при температурі (24±1)°С протягом 5 діб, посіви на чашках Петрі термостатують дном догори.

Через 3 доби термостатування проводять попередній облік типових колоній або появи характерних ознак зростання на рідких поживних середовищах.

Якщо в посівах на щільних середовищах присутні мукові гриби, що дуже швидко ростуть, то зняття попередніх результатів необхідно проводити дуже обережно, не допускаючи того, щоб спори цих грибів обсіпалися і дали зростання вторинних колоній. Через 5 діб проводять остаточний облік результатів термостатування посівів. Колонії дріжджів і пліснявих грибів поділяють візуально. Зростання дріжджів на щільних середовищах супроводжується утворенням великих, опуклих, блискучих, сірувато-білих колоній з гладкою поверхнею і рівним краєм. Розвиток дріжджів в рідкому середовищі супроводжується появою каламуті, запаху бродіння і газу. Розвиток пліснявих грибів на поживних середовищах супроводжується появою міцелію різного забарвлення.

Для кількісного підрахунку відбирають чашки, на яких виросло від 15 до 150 колоній дріжджів і (або) від 5 до 50 колоній пліснявих грибів.

При необхідності для поділу колоній дріжджів і пліснявих грибів проводять мікроскопічні дослідження. Для цього з окремих колоній або з посівів на рідке середовище готують препарати методом «роздавленої (розчавленої) краплі». На предметне скло наносять краплю дистильованої води. Потім в цю краплю прожареною голкою вноситься частина колонії або бактеріальною петлею наносять краплю культуральної рідини. Отримана суспензія покривається покривним склом. Результати мікроскопування оцінюють користуючись характеристикою дріжджів і пліснявих грибів. Ознаки дріжджів і пліснявих грибів наведено в таблиці 11.2.

Таблиця 11.2

Ознаки дріжджів і пліснявих грибів

Група мікроорганізмів	Характеристика
Дріжджі	Одноклітинні мікроорганізми, клітини круглої, овальної або довгастої форми, довжиною від 2,5 до 30 мкм і шириною від 2,5 до 10 мкм.
Плісняві гриби	Складаються з ниток-гіфів, без перегородок або септованого на клітини. Гіфи утворюють бічні вирости і розгалуження, від вегетативних гіфів піднімаються гіфи, що несуть плодові тіла.

Визначення кількості клітин методом посіву на агаризовані середовища в чашки Петрі (чашковий метод).

Вважають, що кожна жива клітина при висіві на агаризоване середовище утворює колонію. Виконання аналізу має такі етапи.

Приготування розведень. Розведення робити у дистильованій воді або стерильному 0,5% водному розчині NaCl. У процесі одного досліду користуватися постійним коефіцієнтом розведення, найчастіше – десятковим. Для цього дистильовану воду розлити стерильною піпеткою по 9 см³ у стерильні сухі пробірки, потім перенести стерильною піпеткою 1 см³ (або бактеріальною петлею 1 г) досліджуваного матеріалу в пробірку з 9 см³ дистильованої води. Якщо досліджуваний зразок уже розбавили в 10 разів (10 г наважки внесли в колбочку з 90 см³ дистильованої води), одержують розведення 1:102. Суспензію одержаного розведення ретельно перемішати за допомогою стерильної піпетки, вбираючи в піпетку і випускаючи з неї отриману завись. Цю процедуру повторити 3–5 разів, що дає можливість перемішувати суспензію і зменшити адсорбцію клітин на її стінках. Потім цією самою піпеткою 1 см³ одержаного розведення перенести у другу пробірку (це розведення 1:103), з другої – в третю (1:104) і т.д.

Посів на агаризовані середовища в чашки Петрі. В стерильні чашки Петрі налити по 10–15 см³ розплавленого у киплячій водяній бані агаризованого середовища, залишити на горизонтальній поверхні доти, поки агар не застигне.

Посів робити з певних розведень залежно від передбаченої кількості мікроорганізмів у досліджуваному зразку. Стерильною піпеткою нанести певний об'єм (0,05; 0,1 або 0,2 см³) відповідного розведення на поверхню агарової пластинки чашки Петрі і розтерти по поверхні середовища стерильним шпателем (див. рис.11.1).

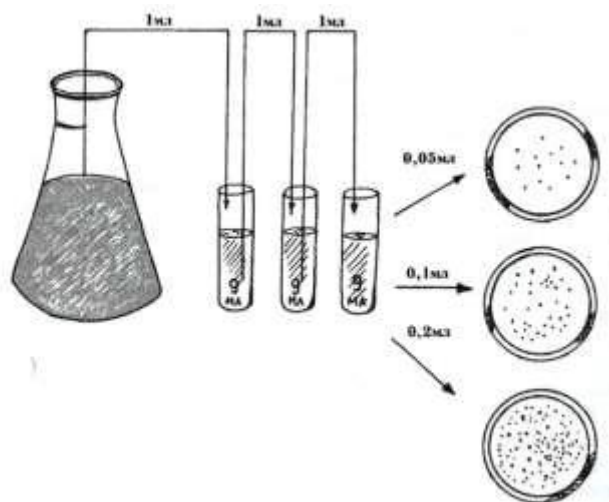


Рис. 11.1 Схема приготування розведень мікроорганізмів і посіву

З кожного розведення так само зробити чотири-шість паралельних висівів. Для паралельних посівів з одного розведення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем (бактеріальною петлею). Для посівів з різних розведень використовувати нову стерильну піпетку і новий шпатель.

Чашки із засіяними середовищами перевернути догори дном і помістити у термостат, відрегульований на температуру, сприятливу для розвитку тих мікроорганізмів, які виділяють у досліді.

Колонії, що вирости, підрахувати через певний час після посіву, який залежить від швидкості росту мікроорганізмів на середовищі, використаному в досліді. Описати колонії, мікроскопувати їх і визначити основні групи мікроорганізмів, що інфікують середовище. Підрахувати кількість колоній, які вирости при посіві з певного розведення на одній або кількох чашках Петрі.

Результати паралельних посівів підсумувати і визначити середнє число колоній, які вирости при посіві даного розбавлення.

Методи кількісної оцінки клітин мікроорганізмів

Підрахунок клітин у лічильних камерах.

У камерах Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера та інших можна підрахувати великі мікробні клітини дріжджів, спори грибів, великі бактерії, одноклітинні водорості. Лічильна камера (рис. 11.2) – це товсте предметне скло, поділене чотирма прорізами на три поперечно розташовані площадки. Центральна площадка маленьким поздовжнім прорізом поділяється на дві (чотири) рівні частини. На кожній половинці вигравійована сітка. Бічні площадки розташовані на 0,1 мм вище, ніж центральна (глибина камери), і слугують для протирання покривного скла.

Сітка камери Горяєва поділена на 225 великих квадратів (15 рядків по 15 квадратів у рядку). Площа великого квадрата дорівнює $1/25 \text{ мм}^2$ і поділена на 16 малих квадратів. Сторона малого квадрата – $1/20 \text{ мм}$, площа – $1/400 \text{ мм}^2$, об'єм при глибині $1/10 \text{ мм}$ – $1/4000 \text{ мм}^3$. Частина великих квадратів розграфлена вертикально, горизонтально або не розграфлена.

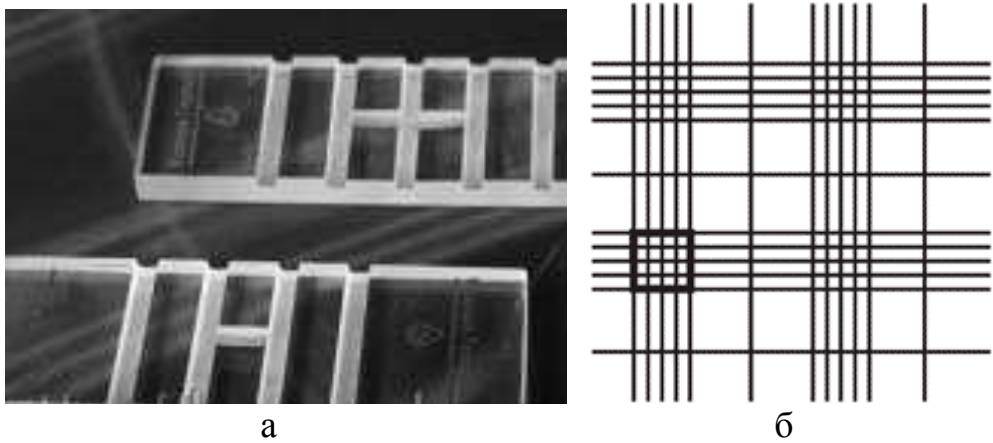


Рис. 11.2 Лічильна камера Горяєва: а – загальний вигляд, б – збільшений фрагмент сітки (виділено один великий квадрат)

Дріжджові клітини у рідких субстратах підраховують після попереднього розбавлення водою. У мірну колбу ємністю 100 см³ вносять 2, 4 або 10 см³ дріжджової суспензії залежно від передбаченої концентрації клітин. Для забарвлення мертвих дріжджових клітин додають 20–30 см³ метиленового синього (1:5000) або 1 – 5 см³ концентрації 1:40.

Камеру та спеціальне шліфоване покривне скло добре промити і висушити. На поверхню сітки нанести по невеликій краплині підготовленого розбавлення і накрити покривним скло. Рідина під покривним скло має розтікатися рівномірно по всій сітці, без пухирців.

Для того щоб об'єм рідини точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притерти до бічних площадок камери допоки не з'являться так звані кільця Ньютонів. Можна спочатку притерти покривне скло, потім за допомогою піпетки заповнити камеру суспензією мікроорганізмів. Клітини підраховувати через 3–5 хв після заповнення камери, щоб клітини осіли і були видимі в одній площині. Рухливі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку слід знищити нагріванням або додати 0,5 см³ 40 % розчину формаліну.

Камеру поставити на предметний столик мікроскопа і розглядати спочатку з об'єктивом $\times 8$, потім $\times 40$. Клітини підраховувати в п'яти (можна в десяти) великих квадратах по діагоналі або по кутках сітки і в центрі. Врахувати всі клітини, які містяться всередині великого квадрата і на суміжних лініях, якщо вони більш як наполовину лежать усередині квадрата. Клітини, які перетинаються суміжною лінією навпіл, слід рахувати на двох з чотирьох сторін квадрата; клітини, розміщені за межами квадрата, не враховувати. Кількість клітин у 1 см³ обчислюють за формулою (11.1):

$$x = (a \times 4000 \times v / c) / 1000, \quad (11.1)$$

де a – сума клітин, підрахована в п'яти (або в десяти) великих квадратах сітки; v – розбавлення вихідного субстрату; c – кількість малих квадратів, у яких проводився підрахунок.

Обробка результатів.

Результати оцінюють по кожній пробі окремо.

Якщо при випробуванні продукту на поживних середовищах виявлено зростання дріжджів і пліснявих грибів і їх присутність підтверджено мікроскопіюванням, то роблять висновок про присутність цих мікроорганізмів в продукті (див. рис. 11.3 та рис. 11.4).

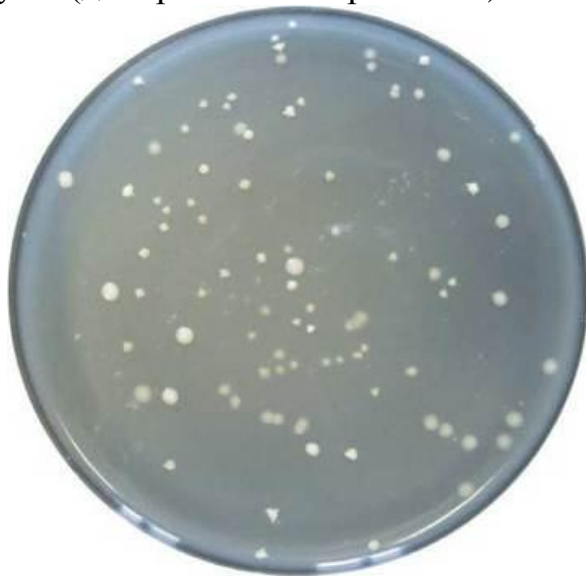


Рис. 11.3 Зростання дріжджів на агарному середовищі для визначення дріжджів і пліснявих грибів

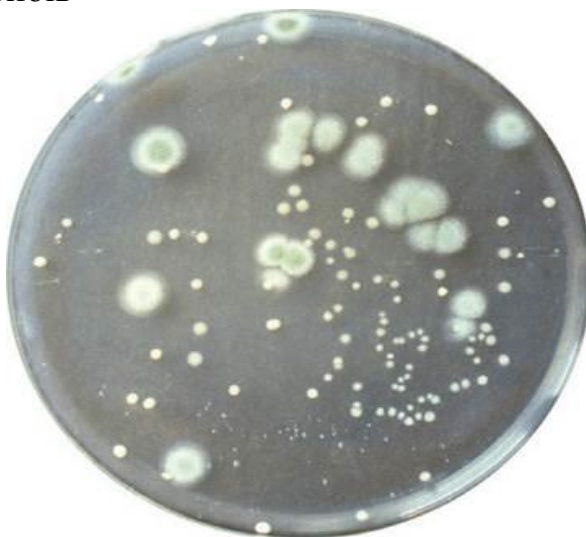


Рис. 11.4 Зростання пліснявих грибів на агарному середовищі для визначення дріжджів і пліснявих грибів

Підрахунок дріжджів і пліснявих грибів

Кожну чашку поміщають догори дном і проводять, використовуючи лупу, підрахунок кількості колоній, що вирости, рахуючи окремо колонії дріжджів і пліснявих грибів. Кожну нараховану колонію відзначають на дні чашки.

При посіві продукту або його розведення на агарове середовище для визначення дріжджів і пліснявих грибів без антибіотиків на чашці можуть вирости дрібні пилоподібні колонії бактерій або дрібні точкові колонії спорових аеробних бактерій. Вкрай дрібні колонії бактерій, незалежно від їх

видової приналежності, візуально відрізняються від великих або середнього розміру колоній дріжджів і пліснявих грибів.

На щільних поживних середовищах дріжджі утворюють поверхневі, великі, опуклі, блискучі, сірувато-білі або пофарбовані (відтінки жовтого і червоного кольору) колонії сметаноподібної консистенції з гладкою поверхнею і рівним краєм або глибинні, середнього розміру колонії у вигляді зірочок і човників.

При підрахунку дріжджів і пліснявих грибів для підтвердження отриманих результатів проводять мікроскопування обраних колоній відповідно до ДСТУ ISO 4833:2006. Клітини дріжджів мають яйцеподібну, округлу або довгасту форму, розмірами (1,5–10,0) мкм та (2,5–30) мкм.

В мікропрепаратах плісняві гриби видно у вигляді гіфів розміром від 5,0 до 50,0 мкм, або гіфів, несучих плодові тіла; спори круглої, овальної або довгастої форми. Підрахунку підлягають чашки з кількістю колоній, що вирости дріжджів від 5 до 150 і пліснявих грибів від 5 до 50.

Розрахунок кількості дріжджів і пліснявих грибів

Кількість дріжджів і пліснявих грибів N , КУО/г(см³) продукту, обчислюють за формулою (11.2):

$$N = \frac{c}{V \cdot d'} \quad (11.2)$$

де: c – кількість колоній, підрахованих на чашці, КУО; V – об'єм посівного матеріалу, см³; d – обране розведення (коефіцієнт розведення).

За остаточний результат аналізу приймають середнє арифметичне результатів визначень відповідно до ДСТУ ISO 4833:2006 або середньозважене значення результатів визначень відповідно до ДСТУ ISO 7218, отримане за всіма чашкам. При розрахунку середньозваженого значення слід виконувати посів в дворазової повторності.

Чашки, на яких виявлено менше п'яти колоній дріжджів і пліснявих грибів, беруть до уваги для підтвердження наявності зростання даних груп мікроорганізмів в продукті або відповідному його розведенні. Результат виражають у записи: менше 5×10^d КУО/г(см³), де d – число десятикратних розведень.

Контрольні питання:

1. Вкажіть мікробіологічні показники, які контролюють для хліба із житнього та суміші житнього і пшеничного борошна (з терміном придатності до споживання понад три доби) та їх величину (КУО в 1 г), в кінці устанавленого терміну придатності до споживання (відповідно ДСТУ 4583:2006).

2. Вкажіть методику підрахунку дріжджів і пліснявих грибів

3. Вкажіть методи кількісної оцінки клітин мікроорганізмів

4. Охарактеризуйте методику посіву на агаризовані середовища в чашки Петрі

Лабораторна робота № 12

«Фізіологічне значення основних харчових компонентів (білків, ліпідів, вуглеводів та мінеральних речовин) в організмі»

Мета: вивчити: особливості складу білків м'яса і печінки та встановити вміст холестерину в білку і жовтку яєць; хімічний склад нуклеопротейдів шляхом кислотного гідролізу дріжджів. Дослідити основні харчові джерела легкозасвоюваного кальцію, заліза, а також глюкози і фруктози

План роботи

- 12.1. Виявлення пуринових основ в білкових гідролізатах якісною реакцією з азотнокислим сріблом.
- 12.2. Встановлення вмісту холестерину в білку і жовтку яєць
- 12.3. Гідроліз нуклеопротейдів дріжджів та вивчення хімічного складу продуктів гідролізу.
- 12.4. Визначення легкозасвоюваного заліза та кальцію.
- 12.5. Визначення вуглеводів (глюкози, фруктози) у біологічних розчинах та екстрактах харчових продуктів

12.1. Виявлення пуринових основ в білкових гідролізатах якісною реакцією з азотнокислим сріблом.

Фізіологічне значення білків

Білки займають провідне місце серед органічних елементів, на їх частку припадає понад 50% сухої маси клітини. Вони виконують найважливіші біологічні функції. Білки організму знаходяться в динамічному стані: через безперервного процесу їх руйнування і утворення відбувається оновлення білків. Білки в організмі не депонуються, тобто не відкладаються в запас, подібно жирам, тому важливо їх щоденне надходження з їжею. Для вивчення потреби організму в білках вимірюється їх баланс, тобто кількість надходження і виділення з організму азоту білків.

У здорової дорослої людини при повноцінному раціоні існує азотиста рівновага, тобто кількість азоту, що надійшов з їжею, дорівнює кількості азоту, виділеного з організму. У разі, коли надходження азоту перевищує його виділення, говорять про позитивний азотному баланс, тобто синтез білка переважає над його розпадом. Стійкий позитивний азотний баланс спостерігається при збільшенні маси тіла. В цих умовах відбувається затримка азоту в організмі. Коли кількість виведеного з організму азоту перевищує кількість присутнього - негативний азотний баланс. Він відзначається при білковому голодуванні.

Харчові продукти з вмістом білка нерівноцінні, тому що білки володіють різним амінокислотним складом, тому їх можливість використання організмом неоднакова. У зв'язку з цим введено поняття біологічної цінності білків, яка обумовлена наявністю в них незамінних амінокислот, їх співвідношенням між собою і замінними, а також ступенем перетравлювання ферментами травного тракту. Перетравлюваність білків тваринного походження вище, ніж рослинних. Різна і ступінь їх утилізації в організмі. В

середньому змішані білки їжі утилізуються на 92%; тваринні білки - на 97%, рослинні - лише на 83-85%. Ця відмінність обумовлена відсутністю в тваринних білках лімітуючих амінокислот.

При виборі джерел білків в харчовому раціоні необхідно враховувати наявність в них нуклеопротейнів, які в травному тракті розкладаються з вивільненням пуринових основ. Кінцевим продуктом обміну пуринових основ в тканинах є сечова кислота. Внаслідок поганої розчинності вона затримується в організмі, особливо при обмеженому фізичному навантаженні, що сприяє розвитку хвороби – подагри.

Устаткування, посуд і реактиви: штатив із пробірками; піпетки на 2 мл (3 шт.); азотнокисле срібло, 1% -й розчин.

Приготування гідролізатів з м'яса і печінки. Зважують по 20 г м'яса і печінки, нарізають на шматочки, поміщають в колби об'ємом 100 мл і доливають туди по 30 мл 10% сульфатної кислоти. Колби закривають пробкою, куди вставлені довгі скляні трубки (зворотні холодильники). Суміші кип'ятять 45 хв, не допускаючи бурхливого кип'ятіння і почорніння продуктів. Після охолодження рідини зливають і нейтралізують їх концентрованим амоніаком за лакмусовим або індикаторним папірцем, потім фільтрують, пропускаючи кілька разів через фільтри, до отримання прозорих фільтратів.

Техніка виконання роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл гідролізату м'яса, в інші дві - стільки ж гідролізату печінки. В одну пробу гідролізату м'яса і одну пробу гідролізату печінки доливають по 0,5 мл розчину азотнокислого срібла (нітрату аргентуму). Через 5-10 хв визначають, чи з'явилася муть в цих пробірках, для чого порівнюють ступінь прозорості з гідролізатами, в які азотнокисле срібло не додавали

12.2. Встановлення вмісту холестерину в білку і жовтку яєць

Фізіологічна роль ліпідів в організмі

Ліпіди широко представлені в природі. Вони входять до складу тканин тварин і рослин. В організмі людини міститься в нормі 10-20% жиру, але при деяких порушеннях жирового обміну, його кількість може зрости до 50%.

Харчові жири є ефірами гліцерину і вищих жирних кислот.

Біологічна роль харчових жирів обумовлена вмістом в них есенціальних факторів харчування - поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) і жиророзчинних вітамінів.

Ненасичені жирні кислоти у великій кількості зустрічаються в складі рослинних масел і продуктів моря. У багатьох рослинних маслах (оліях) їх вміст доходить до 90% (соняшникова, кукурудзяна, лляна, оливкова). У продуктах моря присутні вищі ПНЖК з 5-ю і 6-ю подвійними зв'язками: ейкозапентаєнова і докозагексаєнова.

Біологічна роль ПНЖК значна: вони беруть участь в якості структурних елементів клітинних мембран, входять до складу нервових волокон, беруть участь в обміні вітамінів групи В, підвищують імунний статус організму і ін.

Виражену біологічну дію надає група жироподібних речовин: фосфоліпіди, гліколіпіди, стерини та ін. Вони входять до складу клітинних

мембран, ядерного речовини і цитоплазми.

Фосфоліпіди відносяться до ліпотропних факторів, ними багаті нерафіновані олії. Виключно важливе фізіологічне значення мають стерини, зокрема, холестерин. Ця речовина входить до складу клітинних мембран, є джерелом утворення жовчних кислот, гормонів, вітаміну Д. Разом з тим воно має негативну особливість, тому що холестерину відводиться провідна роль у розвитку атеросклерозу. Дана небезпека збільшується при порушенні обміну або нестачі в раціоні білків, фосфатидів, ПНЖК, а також при надмірному надходженні холестерину з їжею.

У яєчному білку практично немає жирів і холестерину.

Принцип виявлення холестерину заснований на кольоровій якісній реакції, яку дає холестерин з концентрованою сульфатною кислотою.

Устаткування, посуд і реактиви: штатив із пробірками; порцелянові ступки (2 шт.); воронки з фільтрами сухі (2 шт.); піпетка на 1 мл (1 шт.); циліндр мірний на 25 мл (1 шт.); сульфат натрію кристалічний безводний або гіпс; хлороформ; сульфатна кислота концентрована.

Техніка виконання роботи. Пробу жовтка (близько 2 г) розтирають в ступці з 5-10 г сірчаноокислого натрію або гіпсу (для зневоднення). У суміш додають приблизно 15 мл хлороформу, добре перемішують і фільтрують через сухий складчастий фільтр в суху пробірку. Аналогічної обробці піддають білок яйця. До 1-2 мл кожного фільтрату обережно по стінці доливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Поява на межі рідин червоного кільця (в пробі з яєчним жовтком) свідчить про наявність холестерину.

12.3. Гідроліз нуклеопротейдів дріжджів та вивчення хімічного складу продуктів гідролізу.

Для вивчення хімічного складу нуклеопротейдів проводять кислотний гідроліз дріжджів, оскільки вони дуже багаті нуклеопротейдами. Специфічними реакціями для кожної речовини відкривають продукти гідролізу - поліпептиди, пуринові основи, вуглевод і ортофосфатну кислоту.

Реактиви, обладнання та досліджуваний матеріал: 1. Сульфатна кислота, 10% розчин. 2. Їдкий натр, 10% розчин. 3. Сульфат купруму, 1% розчин. 4. Амоніак концентрований. 5. Ляпіс, 2% розчин (амоніачний розчин). 6. Молібденовий реактив. 7. Сульфатна кислота концентрована. 8. Тімом, 1% розчин спиртовий. 9. α -нафтол, 0,2% спиртовий розчин. 10. Лакмус. 11. дифеніламіновий реактив, 1% розчин 12. Круглодонна колба з повітряним холодильником. 13. Воронка з фільтром. 14. Мірний циліндр місткістю 50 мл. 15. Дріжджі пекарські.

Примітка: дріжджі містять, крім нуклеїнових кислот, також пентози, гексози, фосфатну кислоту і білки, тому тільки після попередньої ізоляції нуклеїнових кислот з тканин або дріжджів та подальшого гідролізу можливе проведення якісних реакцій на відкриття їх складових частин (фосфатної кислоти, рибози і т.д.). Однак, з огляду на складність даних робіт через обмеження часу на заняттях, автор вважає за можливе проведення цієї роботи на пекарських дріжджах без попереднього виділення нуклеїнових кислот.

Порядок виконання роботи: поміщають 2,5 г пекарських дріжджів в

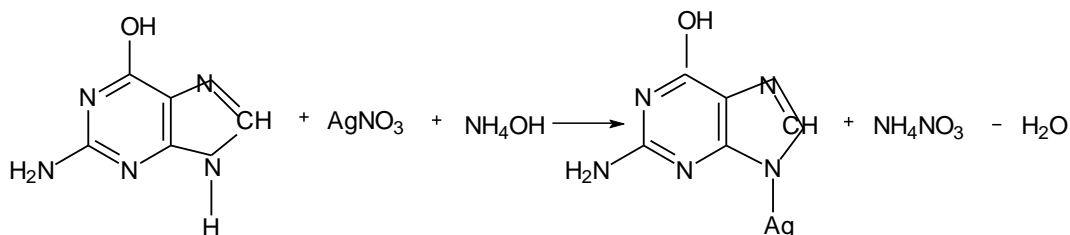
круглодонну колбу місткістю 100 мл з повітряним холодильником для гідролізу, додають 20 мл 10% розчину сульфатної кислоти і колбу закривають пробкою з довгою скляною трубкою. Гідроліз дріжджів проводять при нагріванні протягом години з моменту закипання рідини. Після охолодження гідролізат фільтрують і з фільтратом проробляють якісні реакції на складові частини нуклеопротеїдів.

1. Біуретова реакція на пептиди

До 5 крапель гідролізату доливають 10 крапель 10% розчину їдкого натру до чітко лужної реакції (за лакмусом, опущеним в пробірку), потім 2 краплі 1% розчину сульфату купруму; з'являється рожеве або рожево-фіолетове забарвлення.

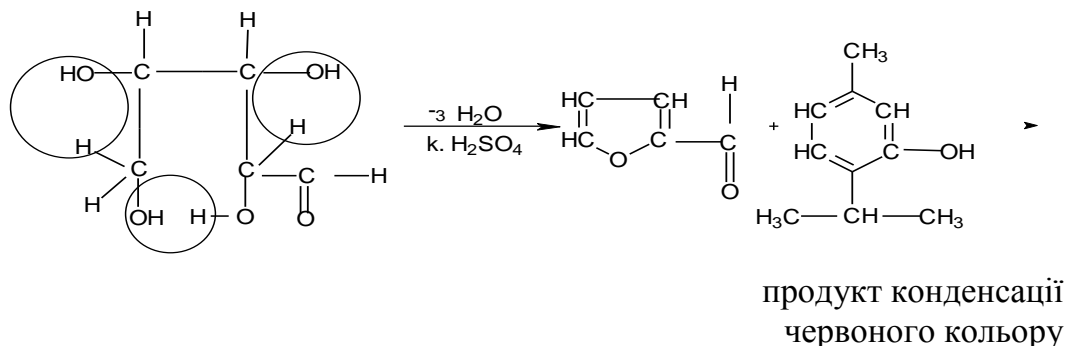
2. Срібна проба на пуринові основи

До 10 крапель гідролізату додають по краплях міцний розчин амоніаку - приблизно 10 крапель до лужної реакції (за лакмусом, опущеним у пробірку), потім додають 10 крапель 2% амоніачного розчину нітрату аргентуму. При стоянні через 3-5 хв утворюється світло-коричневий осад срібних солей пуринових основ (вміст пробірки перемішувати при стоянні не треба). Реакція протікає по наступному рівнянню:



3. Якісна реакція на пентозу (Моліша)

До 10 крапель гідролізату дріжджів додають 3 краплі 1% спиртового розчину тімолу, перемішують і по стінці пробірки обережно доливають 20-30 крапель концентрованої сульфатної кислоти. При струшуванні на дні пробірки утворюється продукт конденсації фурфуролу з тимолом червоного кольору. При взаємодії концентрованої сульфатної кислоти з гексозами або пентозами відбувається дегідратація їх: з пентоз утворюється фурфурол, а з гексоз - оксиметилфурфурол, які дають з тимолом продукт конденсації червоного кольору:



4. Якісна реакція на вуглеводи

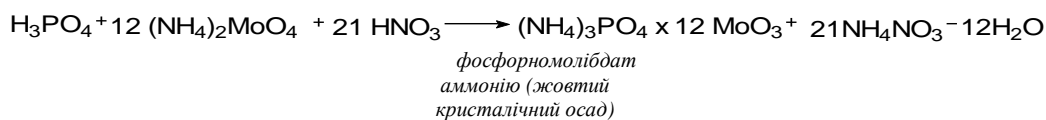
До 5 крапель гідролізату дріжджів доливають 3 краплі 0,2% спиртового розчину α -нафтола і 20 крапель концентрованої сульфатної кислоти; з'являється рожево-фіолетове забарвлення.

5. Реакція на дезоксирибозу і рибозу

Дифеніламін з дезоксирибозою дає синє забарвлення, а з розчином рибози - зелене. До 5 крапель гідролізату дріжджів додають 20 крапель 1% розчину дифеніламіна і кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв; при цьому утворюється синьо-зелене забарвлення.

6. Молібденова проба на ортофосфатну кислоту

Молібденова проба на ортофосфатну кислоту:



До 10 крапель гідролізату доливають 20 крапель молібденового реактиву і кип'ятять. При цьому рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір (не осад). Пробірку відразу охолоджують в струмені холодної води. На дні пробірці з'являється кристалічний лимонно-жовтий осад фосфорномолібдату амонію. Отримані дані необхідно оформити у вигляді таблиці 6.1.

Таблиця 12.1. – Результати дослідів

№ п/п	Назва простетичної групи	Хімічна структура простетичної групи	Результат реакції
1			
2			
3			
4			
5			

12.4. Визначення легкозасвоюваного заліза та кальцію.

Фізіологічна роль мінеральних речовин в організмі

Роль мінеральних речовин різноманітна. Вони містяться в протоплазмі і біологічних рідинах, є необхідною умовою для нормальної життєдіяльності клітин і тканин.

До **макроелементів** належать кальцій, магній, калій, натрій, фосфор. Серед **мікроелементів** найважливішими є есенціальні (незамінні) нутрієнти (фактори харчування): залізо, мідь, цинк, селен, хром, молібден, йод, кобальт, марганець.

Макроелементи беруть участь в основних обмінних процесах: водно-сольовому, кислотно-лужний. *Мікроелементи* входять до складу складних органічних сполук, наприклад, гемоглобіну, гормонів, ферментів, вітамінів.

До найбільш **дефіцитним мінеральних речовин**, в раціоні сучасної людини, відносяться **кальцій і залізо**.

Залежно від переважання катіонів або аніонів в харчових продуктах проявляються їх лужні або кислотні властивості. Молоко, овочі, фрукти, ягоди надають раціонів лужну спрямованість, а м'ясо, риба, яйця, крупи - кислотну.

Основним структурним компонентом кісток скелета є кальцій (Ca). У великій кількості кальцію потребують діти, на увазі інтенсивного росту кісток. Кальцій крім пластичних функцій виконує певну роль в ініціації м'язового скорочення, є необхідним компонентом системи згортання крові, підвищує рефлекторну збудливість спинного мозку. Засвоюваність кальцію організмом залежить не тільки від змісту його в продукті, а й співвідношення з іншими компонентами їжі: жирами, магнієм, фосфором, білками.

Недостатнє споживання кальцію з їжею або порушення всмоктування його в організмі призводить до демінералізації кісток - у дорослих (остеопороз), у дітей розвивається рахіт.

Другим, як уже зазначалося вище, дефіцитним елементом харчових раціонів є залізо. Даний мікроелемент необхідний для забезпечення дихання, кровотворення, входить до складу цитоплазми, клітинних ядер і ряду ферментів.

Засвоєнню заліза перешкоджає шавлева кислота і фітин. При нестачі заліза розвивається анемія, порушуються газообмін, клітинне дихання.

Принцип визначення кальцію заснований на його осадженні шавлевокислим амонієм в слабощелочному середовищі.

Принцип визначення заліза заснований на виявленні окисного заліза (Fe^{3+}) по реакції з роданистим амонієм або калієм, і закисного заліза (Fe^{2+}) - по реакції з ферриціанідом калію (жовтої кров'яної сіллю).

Устаткування, посуд і реактиви: штатив із пробірками; піпетки на 1 мл (4 шт.), на 2 мл (4 шт.), на 5 мл (1 шт.); колби на 25 мл (2 шт.); крапельниця для амоніаку (1 шт.); аміак 10% розчин; оцтова кислота, 10% розчин; амоній шавлевокислий, насичений розчин; роданистий калій або амоній, 50% розчин; залізосиньородистий калій (червона кров'яна сіль), 1 н. розчин; хлорид кальцію, 20% розчин; хлорид заліза (III), 0,1% розчин; хлоридна кислота, 10% розчин і концентрована.

Техніка виконання роботи. Для визначення кальцію до 1 мл мінералізату сиру і яловичини додають по 4-5 крапель амоніаку. Якщо випадає осад, його розчиняють, додаючи по краплях приблизно 0,5 мл оцтової кислоти. До прозорих розчинів доливають по краплях 1 мл розчину шавлевокислого амонію. Порівнюють ступінь помутніння мінералізату сиру і м'яса.

Техніка виконання роботи:

1. Визначення наявності окисного заліза (III): до 1 мл кожного мінералізату додають 1 мл хлоридної кислоти, потім 1 мл розчину роданистого калію (KSCN) або амонію; порівнюють інтенсивність червоного забарвлення витяжки з золи сиру і м'яса.

2. Визначення наявності закисного заліза (II): до 1 мл кожного мінералізату додають по 0,5 мл розчину железосиньородистого калію - гексаціаноферату (III) калію - $K_3[Fe(CN)_6]$ (червона кров'яна сіль); порівнюють інтенсивність зміни забарвлення в витяжках з золи сиру і м'яса.

Приготування витяжки з золи сиру і м'яса: У фарфоровій ступці подрібнюють м'ясо, відбирають наважку 12,5 г, поміщають в тигель і

висушують спочатку на водяній бані до повного видалення вологи, а потім в сушильній шафі до постійної маси.

Такому ж висушуванню піддають 12,5 г сиру. Тиглі з пробами поміщають в муфельну піч, близько дверцят, до закінчення виділення бурих парів. У міру озоління проби просувають в глиб муфеля, де температура досягає 500⁰С. Якщо зола довго залишається чорної, то проби витягують і після охолодження до них додають декілька крапель розчину пероксиду водню, ретельно перемішують і знову спалюють до постійної маси. До золи додають 10 мл 10% хлоридної кислоти, нагрівають на водяній бані 5 хв і фільтрують в колбу об'ємом 25 мл, фільтр промивають підкисленою водою (3 мл концентрованої хлоридної кислоти на 1 літр води), якій доводять об'єм витяжки до мітки.

Мінералізація можна замінити.

1. Для визначення кальцію готують 20% розчин хлориду кальцію в хлоридній кислоті (10 мл 10% хлоридної кислоти доводять до 50 мл підкисленою водою: на 40 мл води 0.06 мл концентрованої HCl). В 1 мл такого розчину міститься 0,8 мг кальцію, що відповідає його кількості в 1 мл мінералізату з сиру (після розведення, зазначеного вище).

Для визначення кількості кальцію, що відповідає його вмісту в мінералізаті м'яса, 20% розчин хлориду кальцію розбавляють тим же розчином хлоридної кислоти в 15 разів; проводять дослідження в 1 мл цього розчину.

2. Для визначення заліза готують 0,1% водний розчин хлориду заліза (III), 1 мл цього розчину розбавляють в 25 разів хлоридною кислотою (як зазначено для розчину хлориду кальцію). Кількість заліза в ньому відповідає вмісту цього елемента в мінералізаті з м'яса. Після розведення цього розчину в 7 разів виходить концентрація заліза, приблизно відповідна його вмісту в мінералізаті сиру.

12.5. Визначення вуглеводів (глюкози, фруктози) у біологічних розчинах та екстрактах харчових продуктів

Фізіологічна роль вуглеводів

Вуглеводів в харчуванні належить виключно важлива роль. Для людини вони є основним джерелом енергії, легко утилізуються і необхідні для життєдіяльності всіх клітин тканин і органів, особливо мозку, серця, м'язів. При окисненні 1 г вуглеводів в організмі утворюється 4 ккал. Джерелами вуглеводів в харчуванні є рослини, в них вуглеводи складають 80-90% сухої маси.

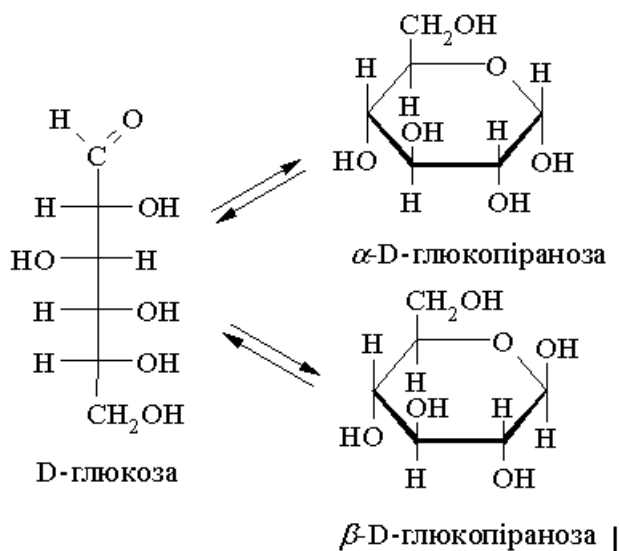
Кров містить глюкозу, яка є джерелом енергії після переходу цього вуглеводу в тканини. У сечі здорової людини глюкози не повинно бути або містяться в дуже маленьких кількостях, так як вона підлягає зворотному всмоктуванню в міру проходження первинної сечі через звивисті каналці нефрона. Норма цукру-глюкози в сечі здорової людини приблизно не більше 0,2-0,3 г/л. Однак, при виконанні аналізу сечі цей цукор не виявляється. Наявність цукру в сечі (глюкозурія) відбувається внаслідок її великої

кількості в крові або через погану роботу ниркових нефронів. Болючим станом є наявність в крові цукру більше ніж 9,9 ммоль\л. Це вже вказує на наявність глюкозурії. Якщо при цьому цукор в крові в межах фізіологічної норми, то глюкозурію викликає порушена робота нирок. Так при деяких захворюваннях нирок глюкоза з'являється і у вторинній сечі.

Можуть бути й інші причини переходу глюкози в сечу з крові (цукровий діабет, вживання за один прийом їжі великої кількості цукру або меду, емоційне збудження, стресовий стан, малорухливий спосіб життя).

Далі представляємо дослід щодо визначення глюкози в біологічному розчині людини в гарному настрої і в стресовому стані.

Глюкоза (виноградний цукор) зустрічається в ациклічній і циклічній формах:



Дослід 1. Визначити наявність глюкози в біологічному розчині (крові і сечі).

Наявність глюкози в сечі визначають за допомогою реакції Троммера, яка базується на відновленні карбонільної групи вуглеводу купрум (II) в лужному середовищі.

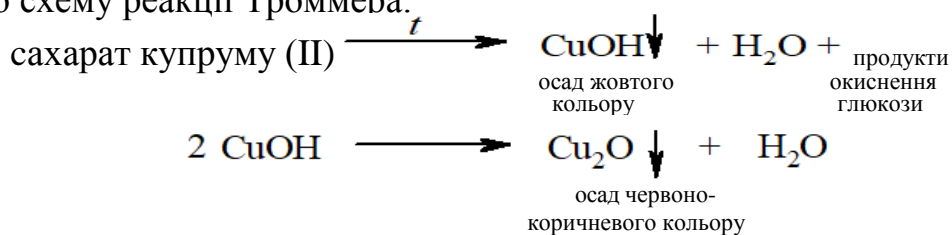
Досліджуваний матеріал: фізіологічний розчин - безбілковий фільтрат плазми крові; сеча здорової людини; сеча хворого із захворюванням нирок (або знаходиться під впливом цукрово підвищуючих чинників).

Устаткування і посуд: штатив із пробірками; крапельниці - 2 шт.; спиртівка або інше джерело тепла (полум'я).

Реактиви: натрій гідроксид, 10% розчин; купрум сульфат, 1% розчин; HNO₃ концентрована.

Хід роботи: У пробірку наливають 1-2 мл фізіологічного розчину - безбілкового фільтрату плазми крові, додають рівний об'єм NaOH і 0,5 мл розчину купрум сульфату. Пробірку тримають похило і обережно нагрівають у полум'ї пальника верхню частину розчину. Спостерігають перехід синього забарвлення розчину в зелене, а потім його знебарвлення. Одночасно з'являється жовтий осад гідроксиду купруму (I), що перетворюється в червоно-коричневий осад оксиду купруму (I).

Поява червоного-коричневого осаду свідчить про наявність редуруючого (відновлювального) вуглеводу (глюкози) в плазмі крові. Нижче наводимо схему реакції Троммера:



Аналогічно фільтрату досліджують 1-2 мл сечі здорової людини, а також сечу (з якої були попередньо видалені білки), зібраної у хворого зі захворюванням нирок (або у людини, що знаходилася під дією цукор підвищуючих чинників).

Білки з сечі видаляють наступним чином: в пробірку поміщають 1-2 мл досліджуваної сечі, додають стільки ж HNO_3 концентрованої, кип'ятять 2 хв до утворення жовтого осаду, розчин над осадом охолоджують, потім декантують в іншу пробірку і використовують для подальшого аналізу (див. вище - фільтрат плазми крові). Можна в пробірку з очищеної від білків сечею додати рівний об'єм розчину NaOH і 0,5 мл розчину купрум сульфату. Суміш кип'ятять. Поява червоно-оранжевого забарвлення свідчить про наявність редууючого (відновлювального) вуглеводу (глюкози) в сечі.

Висновок: червоно-коричневий осад оксиду купруму (I) з'являється тільки в фізіологічному розчині, що містить цукор-глюкозу (хворої людини).

Для людини краще в їжу вживати продукти, що містять не глюкозу, а фруктозу. Глюкоза і фруктоза - це структурні ізомери, що мають різні функціональні групи, а звідси і різні фізико-хімічні та фізіологічні властивості. На рис. 12.1 та 12.2 наведено структурні формули фруктози та глюкози відповідно.

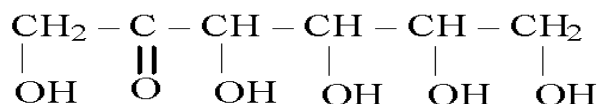


Рис. 12.1. Структурна формула фруктози (це кетоза)

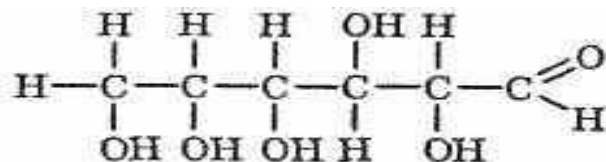


Рис. 12.2. Структурна формула глюкози (це альдоза)

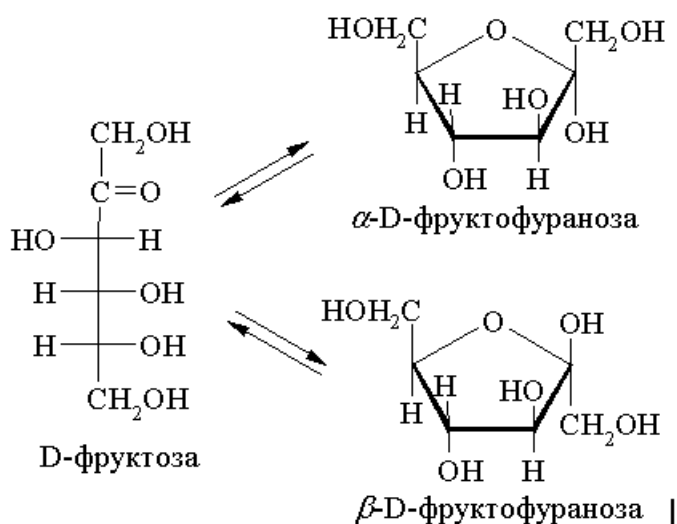
Важливе значення має фруктоза для людей з недостатнім ступенем засвоюваності глюкози (наприклад, хворих на цукровий діабет), тому що її обмін в організмі відбувається за участю ферментів, активність яких не залежить від наявності інсуліну. Перевага застосування джерел фруктози в порівнянні з глюкозою пов'язано також з більшим ступенем солодощі в порівнянні з глюкозою (фруктоза в 2,5 рази солодша за глюкозу і в 1,7 рази

солодке сахарози). Глюкоза міститься у винограді, черешні, вишні, малині, ягодах, а також в бджолиному меду (до 35%). В організмі людини вона утворюється в результаті гідролізу крохмалю, глікогену, сахарози, мальтози і лактози.

У вільному вигляді фруктоза зустрічається в плодах, бджолиному меду (45%); є складовою частиною дисахариду сахарози і полісахариду інуліну. У кавунах, динях, яблуці, груші, чорній смородині зміст фруктоза переважає над глюкозою.

Висока солодкість фруктози дозволяє використовувати менші її кількості для додання смаку продуктів і напоїв, що має особливо важливе значення для харчових раціонів обмеженою калорійності (особливо при малорухливому способі життя).

Фруктоза (левулоза, плодовий цукор) зустрічається в ациклічній і циклічних формах:



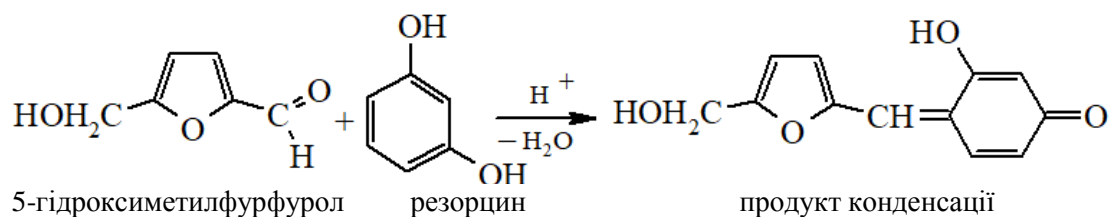
Наступний досвід присвячений виявленню глюкози і фруктози в екстрактах харчових продуктів.

Дослід 2. Виявлення глюкози і фруктози в екстрактах харчових продуктів (реакція Т. Селіванова)

У дві окремі пробірки поміщають по 2 мл свіжоприготованого реактиву Селіванова (0,01 г резорцину в суміші 10 мл води і 10 мл концентрованої хлоридної кислоти). В одну з пробірок вносять 0,5 мл екстракту винограду (розчин соку винограду в дистильованій воді 1: 1), багатого на глюкозу, в іншу - 0,5 мл екстракту яблука (розчин соку яблука в дистильованій воді 1: 1), багатого на фруктозу. Пробірки занурюють на 2 хв в киплячу водяну баню.

У пробірці з фруктозою, на відміну від глюкози, спостерігають швидке поява червоного забарвлення розчину. При подальшому нагріванні пробірок в полум'я пальника до кипіння забарвлений розчин мутніє і виділяється осад.

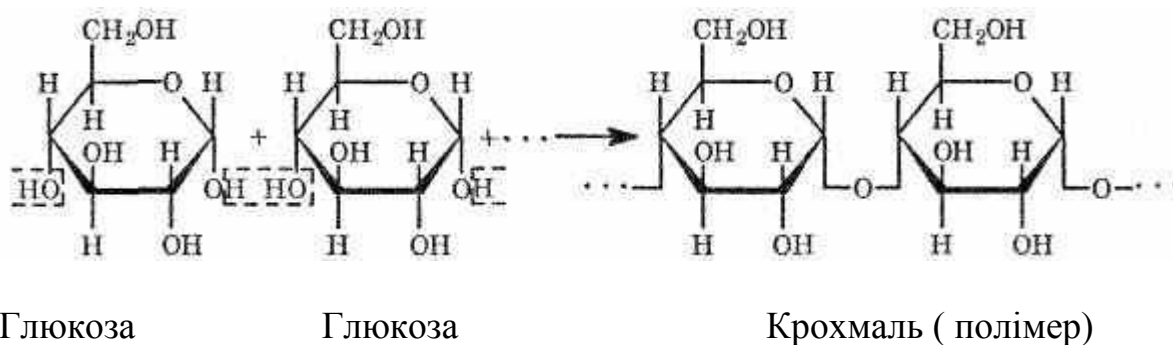
В ході реакції при нагріванні гексоз (глюкози) з хлоридної кислотою утворюється 5-гідроксиметилфурфурол, який конденсується з резорцином з утворенням забарвленого продукту складу $C_{12}H_{10}O_4$.



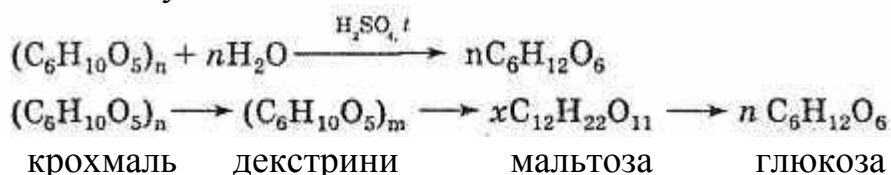
Кетози (фруктоза) в умовах дослідів перетворюються в 5-гідроксиметилфурфурол в 15-20 разів швидше, ніж альдози (глюкоза), що й обумовлює швидкість появи забарвлення і її інтенсивність в розчинах фруктози. Альдогексози (глюкоза) в цих умовах лише при тривалому кип'ятінні набувають слабо-рожеве забарвлення.

Реакція Селіванова дозволяє виявити в суміші сахарів кетогексози (фруктоза) як у вільному, так і в зв'язаному стані (дисахариди).

Макромолекули крохмалю складаються з багатьох молекул циклічної D-глюкози. Процес утворення крохмалю можна висловити так (реакція поліконденсації):



Гідроліз крохмалю (полісахариду) в шлунково-кишковому тракті (ШКТ) проходить за участю ферментів - амілаз (амілази сліни, амілази мікроорганізмів, амілази панкреатичного і кишкових соків). При цьому спочатку утворюється розчинний крохмаль, потім менш складні речовини - декстрини. Кінцевим продуктом гідролізу є глюкоза. Можна навести сумарне рівняння реакції наступним чином:



У природі виділені наступні ферменти: α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілаза, що розрізняються за своїми властивостями, поширенню і способу дії на крохмаль. Крім амілази в гідролізі бере участь мальтаза (α -глюкозидаза), що міститься в сліні, панкреатичному і кишковому соку. Найбільш активними є амілаза і мальтаза панкреатичного соку. Продукти глибокого гідролізу крохмалю (глюкоза і мальтоза) мають вільні гликозидні гідроксили, тому легко окиснюються і дають позитивну реакцію Троммера і з Фелінгової рідиною. Проміжні продукти гідролізу декстрини виявляються за

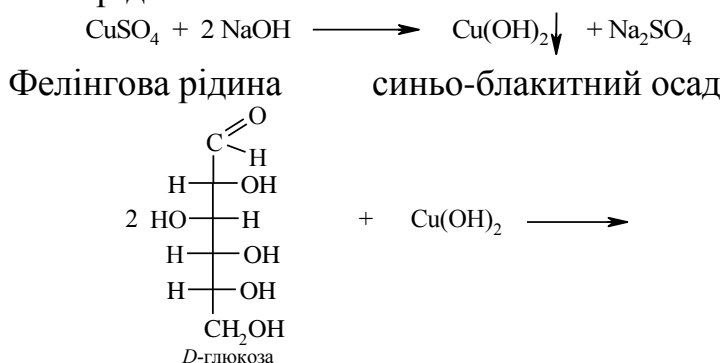
характерним фарбуванням з йодом. Крохмаль і ближчі до крохмалю амілодекстрини дають синє забарвлення з йодом, еритродекстрини - червоно-буре і мальтодекстрини фарбування не дають.

Дослід 3. Дослідження розщеплення крохмалю під дією амілази слини.

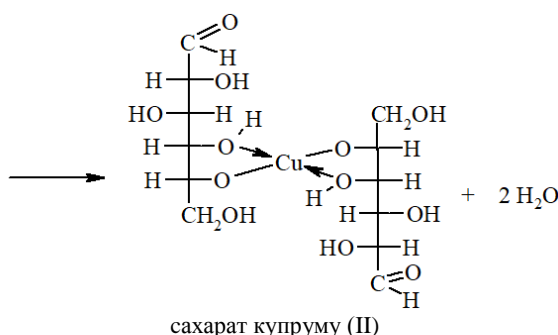
У дві пробірки наливають по 3-5 мл крохмалю (1% розчин, що містить 0,3% NaCl). В першу пробірку (контрольну) додають 2-3 мл дистильованої води, в другу пробірку (дослідну) - 2-3 мл розведеної слини і ставлять їх в термостат при 37-40°C на 30-40 хв. Час від часу періодично беруть скляною паличкою з кожної пробірки краплю рідини, наносять на предметне скло і додають краплю йоду. Проби крапель, взяті з дослідної пробірки, спочатку з йодом дають синє забарвлення, потім червоно-буре і до кінця часу інкубації перестають давати фарбування з йодом. Краплі, взяті з контрольної пробірки, весь час дають з йодом синє забарвлення. Після закінчення часу інкубації з вмістом обох пробірок проробляють реакцію Троммера або з Фелінгової рідиною.

З розчином крохмалю реакція буде негативна, з розчином крохмалю зі слиною внаслідок гідролізу - позитивна, спостерігається випадання червоного осаду оксиду купруму (I)

Наводимо схеми реакцій з Фелінгової рідиною і проби Троммера. Реакція з фелінгової рідиною:

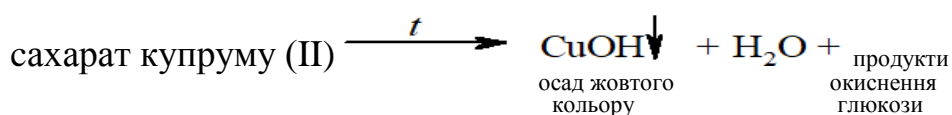


осад гідроксида купруму (Cu(OH)₂) розчиняється при додаванні розчину глюкози:

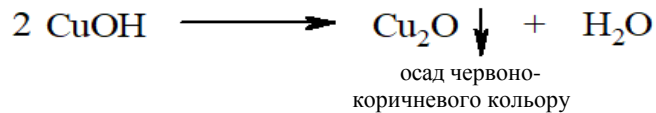


Утворюється прозорий синій розчин сахарата купруму (II).

Проба Троммера:



Кип'ятимо сахарат купруму (II):



Контрольні запитання

1. Фізіологічна роль білків в організмі.
2. Джерела повноцінних і менш повноцінних білків в організмі.
3. Причини доцільності обмеження джерел пуринових підстав в раціонах деяких контингентів населення.
4. Фізіологічні потреби в білках людей різної вікової категорії.
5. Есенціальним фактори, присутні в білках.
6. Подібність і відмінності жирнокислотного складу жирів тваринного і рослинного походження.
7. Які жири засвоюються краще? Перерахуйте контингент людей, в раціонах яких доцільно обмежити споживання яєчного жовтка.
8. Фізіологічна роль холестерину в організмі.
9. Назвіть явні і приховані жири.
10. У чому полягає біологічна ефективність жирів.
11. Фізіологічна роль макроелементів в організмі.
12. Фізіологічна роль мікроелементів в організмі.
13. Особливості мінерального складу харчових раціонів для дітей шкільного віку.
14. Наведіть приклади наслідки дефіциту і надлишку макроелементів в їжі.
15. Наведіть приклади наслідки дефіциту і надлишку мікроелементів в їжі.
16. Які вуглеводи не засвоюються організмом? Перерахуйте контингент людей, в раціонах яких доцільно обмежити споживання вуглеводів.
17. Фізіологічна роль вуглеводів в організмі.
18. У чому відмінність глюкози і фруктози
19. Назвіть легкозасвоювані вуглеводи.

Лабораторна робота № 13 «Будова та функції травної системи»

Мета: Вивчити функції різних відділів травної системи

План

- 13.1. Ознайомитися з будовою та функціями травної системи
- 13.2. Вивчити, в яких ділянках травного тракту і під впливом яких ферментів відбувається гідроліз складних харчових речовин
- 13.3. Вивчити, які харчові фактори стимулюють або гальмують секреторну, рухову функції окремих ділянок травної системи

13.1 Ознайомитися з будовою та функціями травної системи.

Існування організму, нормальний перебіг процесів життєдіяльності можливий лише за умови витрат органічних речовин і енергії та постійного відновлення їх. Однак для того, щоб речовини їжі, що надходять в організм, могли замінити витрачені органічні речовини та енергію, вони мають зазнати певних фізичних і хімічних перетворень в органах травної системи. Лише вода та мінеральні солі надходять з органів травлення до внутрішнього середовища в незмінному вигляді. Речовини, які утворюються в результаті реакцій розкладу, через стінки травного каналу потрапляють у кров і лімфу завдяки процесам всмоктування. Саме процеси розщеплення і всмоктування є головними процесами травлення. Далі поживні речовини, необхідні нашому організму, з кров'ю та лімфою транспортуються до всіх тканин та органів. *Травлення* - сукупність процесів механічної обробки їжі та хімічного розщеплення її компонентів на сполуки, які організм здатний засвоювати та включати в обмін речовин.

Будова травної системи людини

Травна система людини має такий самий загальний план будови (рис. 13.1), як і в інших ссавців. Анатомічно та функціонально вона поділена на травний канал і допоміжні органи травної системи. Загальна довжина травного каналу становить 8-10 м. Він простягається від ротового отвору до анального. Травний канал послідовно поділений на ротову порожнину, глотку, стравохід, шлунок, тонкий і товстий відділи кишечника, який закінчується прямою кишкою з анальним отвором. Допоміжними органами травної системи є зуби, язик, а також травні залози: слинні, печінка із жовчним міхуром і підшлункова залоза.

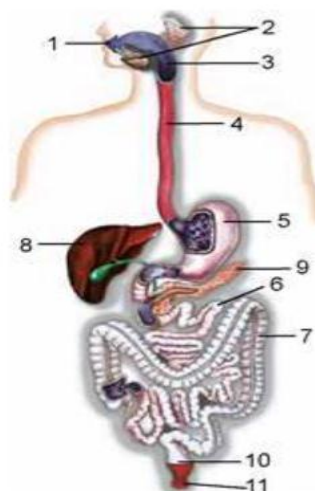


Рис. 13.1 Будова травної системи людини: 1 - ротова порожнина; 2 - слинні залози; 3 - глотка; 4 - стравохід; 5 - шлунок; 6 - тонкий кишечник; 7 - товстий кишечник; 8 - печінка; 9 - підшлункова залоза; 10 - пряма кишка; 11 - анальний отвір

Стінка травного каналу складається із чотирьох оболонок: слизової, підслизової, м'язової, серозної (рис. 13.2).

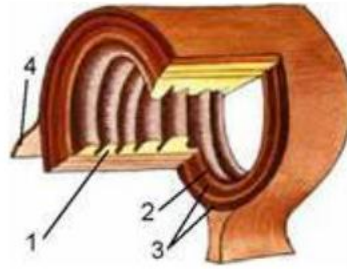


Рис. 13.2 Оболонки травного каналу: 1 - слизова; 2 - підслизова; 3 - м'язова; 4 - серозна

Кожна з них побудована певним типом тканин і виконує свої функції в процесах травлення.

Внутрішня слизова оболонка травного каналу виділяє слиз, який захищає його від механічного пошкодження твердими частками їжі та полегшує її просування. Крім слизу, клітини цієї оболонки виділяють травні ферменти, гормони та деякі інші речовини. Слизова оболонка, крім секреторної, виконує функцію всмоктування продуктів травлення та знезараження їх.

Підслизова оболонка побудована зі сполучної тканини. У ній міститься дуже багато кровоносних і лімфатичних судин та нервів. Вони регулюють секреторну функцію слизової оболонки.

М'язова оболонка побудована з двох шарів непосмугованих (гладеньких) м'язів. У внутрішньому шарі м'язові волокна розташовані кільцеподібно, а в зовнішньому - уздовж травного каналу. Між м'язами розташовані нерви, які регулюють рухи травного каналу.

Серозна оболонка утворена сполучною тканиною і вкриває травний канал ззовні. У ній розташовані судини та нервові волокна. Черевну порожнину вистеляє щільна двошарова сполучнотканинна оболонка - очеревина. Вона захищає органи травлення, утримує їх у певному положенні. Речовина, яку виділяє очеревина, пом'якшує їхні рухи.

Процеси травлення поділяють на:

- *порожнинне*, яке відбувається в порожнині шлунково-кишкового тракту. Воно складається з процесів механічної та хімічної обробки їжі. Механічна обробка їжі полягає в її подрібненні, зволоженні, перемішуванні з травними соками, набряканні та розчиненні. Хімічна обробка їжі відбувається теж поетапно: спочатку в ротовій порожнині, потім у шлунку і зрештою - у кишечнику;

- *пристінкове травлення* відбувається на поверхні внутрішньої оболонки травного каналу всередині клітин. Хімічні перетворення їжі здійснюються під впливом ферментів, біологічно активних речовин, здебільшого білкової природи, здатні прискорювати біохімічні реакції. Їх ще називають біологічними каталізаторами. Утворюються травні ферменти в клітинах травних залоз, які їх виділяють у складі слини й травних соків: шлункового, підшлункової залози, кишкового. Існують тисячі різних

ферментів. Кожен із них прискорює тільки певну хімічну реакцію: одні розщеплюють білки, інші - вуглеводи або жири тощо. Травні ферменти починають розщеплювати компоненти їжі в травному каналі. Продукти розщеплення усмоктуються в кров і лімфу. Завершуються ці процеси в клітинах. Там утворюються нові органічні сполуки, властиві тільки даному організмові.

Активність ферментів залежить від умов, у яких вони перебувають: температури та кислотності середовища (лужне, кисле, нейтральне). Наприклад, у разі підвищення температури тіла до +38 °С активність ферментів зростає. Подальше підвищення температури тіла знижує їхню активність. Одні ферменти активні в слабколужному середовищі (ферменти слини, травних соків кишків), інші - у кислому (ферменти шлунка). Ферменти, які перетравлюють їжу, здатні перетравлювати і тканини власного тіла. Запобігає цьому те, що більшість синтезованих ферментів виділяється в неактивному стані й активними стають лише в порожнині травного каналу. Слиз також захищає стінку травного каналу від дії травних ферментів.

Основні функції травної системи такі:

- Рухова функція забезпечує захоплення їжі, її подрібнення, змішування з травними соками, просування її по травному тракту, виведення неперетравлених решток назовні.
- Секреторна функція забезпечує виділення травних соків і слизу, гормонів, які регулюють діяльність травної системи.
- Функція розщеплення забезпечує розщеплення складних молекул на їхні складові під дією травних ферментів.
- Функція всмоктування забезпечує перехід води, мінеральних речовин, вітамінів і продуктів розщеплення молекул білків, жирів і вуглеводів у кров або лімфу.
- Функція виділення полягає у виведенні з організму деяких продуктів травлення, здебільшого не потрібних організму.

13.2. Вивчити, в яких ділянках травного тракту і під впливом яких ферментів відбувається гідроліз складних харчових речовин.

Результати представити у вигляді таблиці (табл.13.1).

Таблиця 13.1

Гідроліз складних харчових речовин у відділах ШКТ

Ділянка травного тракту	Речовина, що гідролізується	Фермент, що бере участь у гідролізі
Ротова порожнина	Крохмаль Мальтоза	α-амілаза мальтаза
Шлунок		
Тонка кишка		

13.3 Вивчити, які харчові фактори стимулюють або гальмують секреторну, рухову функції окремих ділянок травної системи.

Результати представити у вигляді таблиці (табл. 13.2)

Таблиця 13.2

Харчові фактори, що стимулюють або гальмують секреторну, рухову функції окремих ділянок травної системи

Відділ травної системи	Основна функція	Перелік основних факторів, що обумовлюють:	
		стимуляцію	гальмування
Ротова порожнина:	Органолептична оцінка їжі та <u>пиття</u>	Смакові речовини	Одноманітна їжа
Шлунок			
12 пала кишка, тонкий кишечник			
Товстий кишечник			

Контрольні запитання

1. Будова травної системи
2. Вкажіть чотири оболонки, з яких складається стінка травного каналу
3. Вкажіть основні функції травної системи
4. Назвіть ферменти, під впливом яких відбувається гідроліз складних харчових речовин у ротовій порожнині
5. Назвіть ферменти, під впливом яких відбувається гідроліз складних харчових речовин у шлунку
6. Назвіть ферменти, під впливом яких відбувається гідроліз складних харчових речовин у тонкій кишці.

Лабораторна робота № 14

«Дослідження впливу хлоридної кислоти на процес перетравлювання білків і дослідження перетравлювання вуглеводів амілазою слини. Дослідження емульгуючої властивості жовчі при перетравлюванні жирів та впливу комплексної дії ферментів соку підшлункової залози. Вплив харчових волокон на процеси травлення»

Мета: Вивчити значення хлоридної кислоти для перетравлювання білків та дослідити перетравлюваність вуглеводів амілазою слини. Вивчити емульгуючі властивості жовчі під час перетравлення жирів та дослідити вплив комплексної дії ферментів соку підшлункової залози. Визначення кислотності шлункового соку. Дослідження впливу харчових волокон на процеси травлення

План

- 14.1. Дослідити значення хлоридної кислоти для перетравлювання білків.
- 14.2. Дослідити перетравлюваність вуглеводів амілазою слини.

14.3. Вивчити емульгуючі властивості жовчі під час перетравлення жирів та дослідити вплив комплексної дії ферментів соку підшлункової залози.

14.4. Визначення кислотності шлункового соку

14.5. Вплив харчових волокон на процеси травлення

14.1. Дослідити значення хлоридної кислоти для перетравлювання білків.

Порівнюють інтенсивність перетравлення яєчного білку при нормальній та пониженій кислотності шлункового соку.

Обладнання та посуд: 1.термостат; 2. штатив з пробірками; 3. піпетки по 5 мл (2 шт.); 4. піпетки по 2 мл (1 шт.); 5. крапельниця (1 шт.).

Реактиви: натрій гідроксид, 10%-й розчин; купрум сульфат, 0,1%-й розчин.

Хід роботи

В дві пробірки кладуть невеликі шматочки звареного яєчного білку. В одну пробірку наливають 5 мл шлункового соку з нормальною кислотністю, в другу – стільки ж соку з пониженою кислотністю. Обидві пробірки інкубують протягом 45 хв. у термостаті при 37 °С. Після закінчення інкубації з кожної проби обережно зливають рідину в другі пробірки так, щоб в них не потрапили шматочки білку. Потім додають в них по 2 мл NaOH і по 1...2 краплі купрум сульфату (біуретова реакція). Відмічають, в якій пробірці з'явилось рожево-фіолетове забарвлення і яка його інтенсивність.

Результати досліджень заносять у протокол. У висновках відмічають вплив дії хлоридної кислоти на активність пепсину.

14.2. Дослідити перетравлюваність вуглеводів амілазою слини.

При додаванні 1%-го спиртового розчину йоду до рідини, яка містить крохмаль, вона набуває синьо-фіолетового кольору, а продукти розпаду крохмалю – декстрини – дають червоне забарвлення.

Моно- та дисахариди при кип'ятінні з реактивом Фелінга дають осад купрум (I) оксиду, який має червоний колір.

Обладнання та посуд: 1. пробірки (4 шт.); 2. піпетка; 3. термостат.

Реактиви: 1% розчин крохмального клейстеру; йод, 1%-й спиртовий розчин; реактив Фелінга (готують окремо 2 розчини. Розчин 1 – у мірній колбі місткістю 1 літр розчиняють 200 г калій–натрій тартрату і 150 г натрій гідроксиду і доводять водою до мітки. Розчин 2 – у мірній колбі місткістю 1 літр розчиняють у воді 40 г купрум (II) сульфату і доводять водою до мітки; перед використанням змішують рівні об'єми цих розчинів).

Хід роботи. Зібрати в першу пробірку 2,5 мл слини. Пронумерувати інші 3 пробірки. В другу з пронумерованих пробірок налити 1 мл води, в третю та четверту – по 1 мл слини. В кожну пробірку додати по 1 мл крохмального клейстеру. Поставити в термостат на 20 хв. при температурі 37° С. Потім у першу та другу пробірки додати по 1 краплі 1%-го спиртового

розчину йоду, а в третю – реактив Фелінга, довести її до кипіння (держати треба над вогнем щілиною від себе!).

У висновках відповісти на такі питання: на що вказує синє забарвлення в другій пробірці, на що вказує поява червоного осаду в третій пробірці; на що вказує відмінність у забарвленні проб слини у різних людей?

14.3. Вивчити емульгуючі властивості жовчі під час перетравлення жирів та дослідити вплив комплексної дії ферментів соку підшлункової залози.

План роботи:

14.3.1. Вивчити емульгуючі властивості жовчі під час перетравлювання жирів.

14.3.2. Дослідити вплив комплексної дії ферментів соку підшлункової залози.

14.3.1. Вивчити емульгуючі властивості жовчі під час перетравлення жирів.

Швидкість травлення харчових жирів ліпазою в дванадцятипалій кишці залежить від величини поверхні контакту субстрату і ферменту. Тому процесу гідролізу жирів сприяє їхнє емульгування, в результаті якого поверхня подрібнених частин стає величезною. Емульгування жиру в дванадцятипалій кишці відбувається завдяки наявності в ній натрій карбонату (приблизно 1%) і жовчі, яка містить жовчні кислоти. Хлоридна кислота, що поступає із шлунка з його соком та харчовою кашницею, утворює карбонатну кислоту з натрій карбонату, а кульки CO₂ подрібнюють жир. Такій зміні жиру сприяє й рухова активність стінок тонкої кишки. Злиттю подрібнених крапель жиру перешкоджають жовчні кислоти, які знижують поверхневе натягнення на межі фаз жир – вода, тобто сприяють емульгуванню жирів.

Обладнання та посуд: 1. штатив з пробірками; 2. крапельниця – 3 шт.; 3. індикаторний папірець.

Реактиви: соняшникова олія; натрій карбонат (сода), 1 %-й розчин; медична жовч, нейтралізована натрій карбонатом; хлоридна кислота, 1 %-й розчин.

Хід роботи. В три пробірки наливають приблизно по 1 мл соняшникової олії. В першу з них приливають рівний об'єм розчину натрій карбонату, в другу – стільки ж жовчі, в третю – води. Всі три пробірки одночасно струшують, спостерігають стійкість емульсії, що утворилася. Потім в пробірки з содою і жовчю додають по краплях хлоридну кислоту до кислої реакції (рН контролюють, наносячи скляною паличкою краплі суміші на індикаторний папірець), знову струшують. Порівнюють швидкість відокремлення жирового шару в пробірці з содою та жовчю.

Записують висновок і узагальнюють всі сторони впливання жовчі на травлення жирів та всмоктування продуктів гідролізу.

14.3.2. Дослідити вплив комплексної дії ферментів соку підшлункової залози.

Підшлунковий сік містить широкий спектр протео-, ліпо- і амілолітичних ферментів. В залежності від складу їжі ферментний зміст соку змінюється. При тривалому харчуванні їжею з високим вмістом вуглеводів відбувається адаптація підшлункової залози до цієї їжі і в її соці містяться більш активні амілолітичні ферменти. У випадку тривалого харчування їжею з високим вмістом білків будуть переважати протеолітичні ферменти. А при збільшенні в раціоні жирів – ліполітичні.

Обладнання та посуд: 1. термостат; 2. пробірки; 3. піпетки з грушею;

Реактиви: Казеїн 0,1%-й розчин, приготовлений на 0,1%-му розчині натрій гідрогенкарбонату; трибутирин 2%-й лужний розчин; крохмаль 0,1%-й розчин ; йод 0,5%-й розчин; оцтова кислота 5%-й розчин в 50%-му етанолі; нейтральрот 0,2%-й розчин у 60%-му етанолі; сік підшлункової залози у розведенні 1:200, 1:400, 1:800 (замість соку підшлункової залози можна використовувати ферментні препарати «Фестал»; перше розведення – 2 таблетки на 1 л дистильованої води).

Хід роботи. В пробірки №1, 2, 3 налити по 1 мл розчину казеїну, в пробірки № 4, 5, 6 – по 1 мл трибутирину, в пробірки № 7, 8, 9 – по 1 мл розчину крохмалю.

У всі три групи пробірок додати по 1 мл соку підшлункової залози в розведенні 1:200 або 1:400, або 1:800. Пробірки інкубують в термостаті на 20 хв. за температури 37 °С.

Потім в пробірки № 1, 2, 3 додати по 7...8 крапель 5%-го розчину оцтової кислоти (у випадку наявності білка там з'явиться каламутне коло), в пробірки № 4, 5, 6 – по 1 краплі розчину нейтральроту (цей індикатор у лужному середовищі має жовте забарвлення, в кислий – рожеве). В пробірку № 7, 8, 9 додають по 1 краплі 0,5%-го розчину йоду (у присутності декстринів він дає червоно-фіолетове забарвлення). Ступінь розведення підшлункового соку характеризує його активність і відповідає кількості умовних ферментних одиниць у 1 мл.

Результати дослідження записують в протокол. У висновках відповідають на такі питання: на що вказує зміна забарвлення індикаторів; яка активність соку підшлункової залози (вказати в умовних одиницях).

14.4. Визначення кислотності шлункового соку (ШС)

Мета: Навчитися визначати вільну і пов'язану НСІ і загальну кислотність шлункового соку (ШС).

Принцип методу: До складу ШС входять: вода, білки, ферменти (гастрин, пепсин, ліпаза), хлоридна кислота, муцин, хлорид натрію, кислі фосфорнокислі солі та інші речовини. Хлоридна кислота має дезінфікуючу дію: в її присутності гине більшість бактерій. При зниженій концентрації або повній відсутності хлоридної кислоти в шлунку розвиваються гнильні процеси і процеси бродіння і накопичуються органічні кислоти: молочна, масляна, оцтова та ін.

Дослід 1. Якісний аналіз шлункового соку.

1. Визначення реакції ШС. Одним з факторів, що визначають швидкість

перетравлення білків в шлунку, є кислотність ШС. 1 краплю профільтрованого ШС наносять скляною паличкою на синю лакмусовий папірець. У присутності кисло реагуючих речовин лакмусовий папірець набуває червоного кольору. При деяких захворюваннях в ШС можуть повністю бути відсутнім кисло реагуючі речовини.

2. Проба на вільну хлоридну кислоту. 1 краплю профільтрованого ШС наносять на червоний папірець «Конго». У присутності вільної хлоридної кислоти папірець набуває синього кольору.

3. Проба на молочну кислоту. Реакція на молочну кислоту заснована на її здатності утворювати з солями тривалентного заліза молочнокисле залізо, забарвлене в жовто-зелений колір.

До 20 крапель 1% розчину фенолу додають 1-2 краплі 1% розчину хлориду феруму (III). Виходить фенолят феруму, пофарбований у фіолетовий колір. У пробірку з реактивом додають по краплях ШС, що містить молочну кислоту. У присутності молочної кислоти синє забарвлення переходить в жовто-зелене за рахунок утворення молочнокислого заліза. При одночасному присутності хлоридної кислоти рідина знебарвлюється.

Дослід 2. Кількісний аналіз шлункового соку.

Визначення загальної кислотності, загальної хлоридної кислоти, вільної хлоридної кислоти і зв'язаної кислоти в одній порції ШС.

Принцип визначення кислотності ШС заснований на титруванні вільної HCl і кисло реагуючих речовин 0,01н NaOH.

Загальна кислотність ШС виражається кількістю мл 0,01н NaOH, що пішли на титрування 100 мл ШС в присутності індикатора - фенолфталеїну.

У нормі загальна кислотність дорівнює 40-60 одиницям (О).

Вільну хлоридну кислоту прийнято виражати кількістю мл 0,01н NaOH, що пішло на титрування 100 мл ШС, в присутності індикатора метилового жовтого.

У нормі вміст вільної хлоридної кислоти дорівнює 20-40 (О).

У нормі вміст зв'язаної хлоридної кислоти дорівнює 10-20 (Е).

Хід роботи: У колбу для титрування вносять піпеткою 0,5 мл досліджуваного ШС. Додають 1 краплю розчину метилового жовтого і 2 краплі розчину фенолфталеїну. При наявності в ШС вільної хлоридної кислоти він забарвлюється в червоний колір з рожевим відтінком, при її відсутності з'являється відразу жовте забарвлення. Пробу титрують 0,01н NaOH до появи оранжевого забарвлення і відзначають кількість лугу в мл, яке пішло на титрування вільної HCl ((1 пункт титрування). Далі титрування продовжують до появи лимонно-жовтого забарвлення (2Пункт титрування) і знову відзначають кількість лугу в мл, витрачену спочатку титрування. Потім титрування продовжують до появи рожевого забарвлення (3Пункт титрування). Відзначають кількість лугу, яке пішло на титрування від початку до кінця титрування (тобто, від початку до 3 пункту титрування).
Формули для розрахунку.

Кількість вільної HCl:

$$HCl_{\text{вільн.}} = \frac{a \cdot 10}{0,5},$$

де а - кількість 0,01н NaOH, яке пішло на титрування до 1 пункту; 0,5 – об'єм досліджуваного шлункового соку.

Кількість загальної HCl:

$$HCl_{\text{заг.}} = \frac{в \cdot 10}{0,5}$$

де в - середнє арифметична кількість лугу, яке пішло на титрування до 2 і 3 пунктів.

Кількість зв'язаної HCl:

$$HCl_{\text{зв'яз.}} = HCl_{\text{заг.}} - HCl_{\text{вільн.}}$$

Загальна кислотність (ЗК):

$$ЗК = (K \cdot 10) / 0,5,$$

де К - кількість 0,01н NaOH, яке пішло на титрування до 3 пункту.

Таблиця 14.1

Результати дослідів

Пункт титр.	Індикатор	Фарбування	Кількість 0,01н NaOH, яке пішло на титрування, мл				Кількість HCl, мл			Загальна кислотність
			V ₁	V ₂	V ₃	V _{ср}	Вільн.	Заг.	Зв'яз.	
1										
2										
3										

14.5. Вплив харчових волокон на процеси травлення

Харчові волокна - це хімічні сполуки входять до складу рослинних харчових продуктів і не здатні розщеплюватися протеолітичними ферментами травного тракту людини. За хімічною природою вони являють собою полісахариди: целюлоза, геміцелюлоза, пектинові речовини, а також лігнін і пов'язаних з ними білкових речовин, які формують клітинні стінки рослин.

Недолік харчових волокон в їжі призводить до зниження опірності людського організму впливу навколишнього середовища. Існує пряма залежність між недоліком харчових волокон в раціоні і розвитком ряду захворювань, таких як ожиріння, захворювання товстої кишки (запори, дивертикулез, рак), цукровий діабет, атеросклероз, ішемічна хвороба серця та ін.

Метилцелюлозу (МЦ) все ширше використовують в дієтичних раціонах як заміник засвоєваних вуглеводів, що не володіють енергетичною цінністю. Це баластні речовини збільшує обсяг їжі (поглинаючи велику кількість води), сприяє розвитку відчуття насичення, стимулює рухову активність стінок травного каналу.

Встановлено, що МЦ може впливати на інтенсивність перетравлення харчових речовин, в тому числі на гідроліз крохмалю α-амілазою, що

міститься в соку підшлункової залози. МЦ викликає гальмування амілоліза. Цей ефект може мати значення для уповільнення надходження з кишечника в кров продукту гідролізу крохмалю - глюкози і отже, для попередження гіперглікемії, а також утворення жирів, так як не відбувається мобілізація інсуліну, який бере участь в цьому процесі. Отже, споживання страв і напоїв, що містять МЦ, корисно для хворих на цукровий діабет, а також - ожирінням.

Визначення впливу МЦ на перетравлення крохмалю амілазою підшлункової залози проводиться шляхом зіставлення швидкості його гідролізу в контрольних пробах і в досвідчених. Це виявляється по зникненню синього забарвлення з йодом.

Мета: дослідження впливу метилцелюлози на швидкість перетравлення крохмалю.

Принцип роботи заснований на здатності крохмалю давати синє забарвлення з йодом. При перетравленні крохмалю утворюються декстрини червоно-бурого кольору.

Устаткування, посуд, реактиви: штатив із пробірками однакового діаметра з корковими пробками; піпетки градуйовані на 1 мл (1 шт.), на 5-10 мл (3 шт.); крапельниця (1 шт.); метилцелюлоза високов'язка, 1,5% розчин; крохмаль, 1% розчин; панкреатин, 1% розчин в 0.1 н. NaHCO_3 ; йод, 0.002 н. розчин (готується перед дослідом шляхом розбавлення водою 0,1 н. розчину в 50 разів); хлоридна кислота, 10% розчин.

Техніка виконання роботи. У три пробірки (№ 1, 2, 3) наливають по 1 мл крохмалю, потім в пробірки № 1 і № 2 додають по 1 мл води, в пробірку № 3 - 1 мл МЦ (дослідна проба). В кожену пробірку доливають точно по 2 краплі сильно розведеного розчину йоду (не припиняючи дію амілази). У дві пробірки: № 2 та № 3 (дослідну) доливають по 0,2 мл розчину панкреатину, починаючи з дослідної проби. Всі пробірки закривають пробками і залишають при кімнатній температурі. Спостерігають за швидкістю зміни синього забарвлення в пробірках № 2 і № 3 з панкреатином, що свідчить про розщеплення крохмалю (пробірка № 1 без панкреатину служить контролем).

Можна виміряти різницю в швидкості зміни забарвлення в пробірках № 1 (контроль) і № 2 кількісно, зазначивши за секундоміром, коли це найбільш чітко проявиться в пробірці № 2 (шляхом зіставлення з кольором пробірки № 1, куди панкреатин не додавала).

Потім доливають в пробірку № 2 кілька крапель (2-3 краплі) соляної кислоти для припинення дії ферменту і визначають, за який проміжок часу забарвлення з йодом в дослідній пробірці № 3 досягає тієї, яку має розчин в пробірці № 2, куди була долита кислота .

Примітка. Якщо панкреатин дуже активний і після його додавання синє забарвлення з йодом відразу зникає, заздалегідь підбирають розбавлення джерела ферменту, щоб чітко зміна кольору в пробі без МЦ відбувалося протягом 1-1,5 хв.

Приготування розчину метилцелюлози. 1,5 г МЦ заливають 50 мл окропу і залишають на кілька хвилин для набухання, час від часу

помішуючи. Потім додають 50 мл крижаної води, добре перемішують і поміщають в холодильник при 0...4°C

Контрольні запитання

1. Хімічна природа харчових волокон.
2. Роль харчових волокон в процесах травлення.
3. Джерела харчової сировини, багатого харчовими волокнами.
4. Харчові потоки, що формуються за рахунок використання харчових волокон мікрофлорою кишечника.
5. Роль НСІ в процесах травлення.
6. Роль ферментів в процесах травлення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Технічна мікробіологія: підручник / В. О. Коваленко, І. В. Цихановська, Т. А. Лазарева, О. В. Александров, А. А. Коваль, М. Г. Ілюха. – Харків: Світ Книг, 2013. – 679 с.
2. Мудрецова-Вісс К. А. Мікробіологія, санітарія та гігієна: підручник / К. А. Мудрецова-Вісс, А. А. Кудряшова, В. П. Делюхіна. – К.: Ділова література, 2001. – 388 с.
3. Фізіологія харчування: підручник / Л. Ф. Павлоцька, Н. В. Дуденко, І. В. Цихановська, Є. Я. Левітін, О. В. Москаленко, О. В. Александров, М. Г. Ілюха, І. В. Довгопол. – Суми: Університетська книга, 2011. – 473 с.
4. Фізіологія харчування: практикум / Л. Ф. Павлоцька, Н. В. Дуденко, І. В. Цихановська, Є. Я. Левітін, О. В. Москаленко, О. В. Александров, М. Г. Ілюха, І. В. Довгопол. – Суми: Університетська книга, 2012. – 152 с.
5. Гігієна і санітарія: опорний конспект лекцій / авт.: О. Л. Бобось, А. О. Медведєва, В. С. Михайлик. Київ : КНТЕУ, 2016. – 97 с.
6. Павлоцька Л.Ф., Дуденко Н.В., Дмитрієвич Л.Р. Основи фізіології, гігієни харчування та проблеми безпеки харчових продуктів: Навчальний посібник / Суми: Університетська книга, 2015.– 175 с.

Електронне навчальне видання комбінованого використання
Можна використовувати в локальному та мережному режимі

Цихановська Ірина Василівна
Александров Олександр Валентинович

МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ, САНІТАРІЯ ТА ГІГІЄНА

Методичні вказівки
до лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти першого
(бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за
спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво,
переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)»

В авторській редакції

Підписано до розміщення 28.03.2025. Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. арк. 6,1. Обсяг 2,087 Мб. Зам. № 142/25.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009
Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна