

Міністерство освіти і науки України
Харківський державний університет харчування та торгівлі
Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»

В.В. Євлаш, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ ПРАКТИКУМ

Харків
ХДУХТ, НТУ «ХПІ»
СВІТ КНИГ
2020

УДК 579.8(076)

ББК 28.4

Т38

Рекомендовано до видання: протокол НМК ХДУХТ № 5 від 03.06.2019 р.

Автори: В.В. Євлаш, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков

Рецензенти:

С.В. Бірюкова доктор медичних наук, професор, зав. кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти.

В.А. Кочмарський доктор ветеринарних наук, професор кафедри епізоотології і ветеринарного менеджменту Харківської державної зооветеринарної академії.

Технічна мікробіологія: практикум для здобувачів вищої освіти / В.В. Євлаш, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков – Х. : НТУ «ХПІ», ХДУХТ, 2020. – 180 с.

ISBN 978-966-2678-63-5

Курс дисципліни «Технічна мікробіологія» – базовий для вивчення інших предметів студентами всіх товарознавчих та технологічних спеціальностей. Викладання курсу надає в розпорядження студентів досить повний комплекс відомостей, необхідних для розширення теоретичної підготовленості та практичної діяльності. Крім того, викладання цього курсу дозволяє навчити студентів правильному ставленню до зберігання продуктів харчування та профілактики харчових захворювань.

Практикум вміщує учбовий матеріал, який обґрунтовує з наукових позицій важливі завдання професійної діяльності фахівців з товарознавства, експертизи товарів та спеціалістів ресторанної справи, в тому числі – науково-практичних знань з морфології та фізіології мікроорганізмів, біохімічних процесів, зумовлених життєдіяльністю мікробів, їх ролі у кругообігу речовин у природі, у зміні якості харчових продуктів і їхнього псування під час зберігання, а також ролі мікробів у біотехнологічних процесах.

Практикум рекомендовано для здобувачів вищої освіти, він також буде корисним для учнів коледжів та ПТНЗ, а також всім, хто цікавиться питаннями технічної мікробіології.

УДК 579.8(076)

ББК 28.4

© Євлаш В.В., 2020
Газзаві-Рогозіна Л.В., 2020
Бикова А.С., 2020
Циганков О.В. 2020
© НТУ «ХПІ», 2020
© ХДУХТ, 2020
© Світ Книг, 2020

Зміст

Вступ	
Вимоги до змісту та оформлення лабораторних робіт	
Техніка безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії	
Розділ 1. Методи дослідження прокариот. Морфологія прокариот	
1.1. Устаткування мікробіологічної лабораторії	
1.2. Методи стерилізації	
1.3. Дослідження морфології мікроорганізмів: вивчення бактерій, ціанобактерій	
1.4. Дослідження морфології мікроорганізмів: вивчення мікроскопічних грибів (цвілі) і дріжджів	
1.5. Лабораторна робота №1. Методи дослідження прокариот	
1.5.1. Приготування мікробіологічних препаратів	
1.5.2. Техніка мікроскопування	
1.5.3. Проведення роботи	
Контрольні питання до розділу 1	
Розділ 2. Цитохімічні методи дослідження мікроорганізмів	
2.1. Морфологія структури клітини прокариотів	
2.2. Забарвлення бактерій за Грамом. Способи фарбування включень цитоплазми і структур мікроорганізмів	
2.3. Лабораторна робота №2. Методи дослідження органоїдів, структурних елементів і включень мікроорганізмів	
2.3.1. Фарбування по Граму	
2.3.2. Виявлення кислотостійкості у бактерій	
2.3.3. Методика фарбування капсул	
2.3.4. Фарбування включень мікроорганізмів	
2.3.5. Фарбування спор у бактерій	
2.3.6. Вимірювання мікроорганізмів	
Контрольні питання до лабораторної роботи № 2	
Розділ 3. Харчування мікроорганізмів	
3.1. Поживні середовища, класифікація, склад і приготування	
3.2. Умови культивування мікроорганізмів	
3.3. Способи культивування	
3.3.1. Способи культивування аеробних мікроорганізмів	

3.3.2. Способи культивування анаеробних мікроорганізмів	
3.4. Техніка посіву культур на рідкі та щільні поживні середовища	
3.5. Визначення чутливості мікроорганізмів до УФ-випромінювання	
3.6. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків	
3.7. Визначення рухливості мікроорганізмів	
3.8. Лабораторна робота № 3. Приготування поживних середовищ для мікроорганізмів і посів культур. Вплив чинників зовнішнього середовища на мікроорганізми	
Контрольні питання до лабораторної роботи № 3	
Розділ 4. Культуральні ознаки мікроорганізмів. Стандартні мікробіологічні методи досліджень природних субстратів: води, повітря, ґрунту, продуктів тваринництва	
4.1. Особливості росту мікроорганізмів на щільних середовищах (культуральні ознаки)	
4.2. Морфологічні ознаки	
4.3. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів	
4.4. Характеристики обсіменіння навколишнього середовища і товарів мікроорганізмами. Кількісний облік мікроорганізмів	
4.4.1. Дослідження мікрофлори	
4.4.2. Мікробіологічне дослідження води	
4.4.3. Санітарно-бактеріологічне дослідження обладнання, інвентарю, рук персоналу і інших об'єктів, пов'язаних з виробництвом продуктів	
4.4.4. Мікрофлора зерна і борошна та методи її визначення	
4.4.5. Мікрофлора молока, молочних продуктів і методи її визначення	
4.4.6. Мікрофлора вершкового масла і маргарину	
4.4.7. Мікрофлора м'яса і методи її визначення	
4.4.8. Мікрофлора риби і рибних продуктів	
4.4.9. Мікрофлора цукру і методи її визначення	
4.4.10. Мікрофлора свіжих плодів і овочів	
4.4.11. Мікрофлора квашених овочів	
4.4.12. Мікрофлора банкових консервів і методи її визначення	
4.4.13. Мікрофлора солі	
Лабораторна робота № 4 Стандартні кількісні мікробіологічні методи дослідження природних субстратів: ґрунту, води, повітря	

та інших об'єктів.	
Контрольні питання до лабораторної роботи № 4	
Розділ 5. Перетворення мікроорганізмами безазотистих органічних речовин	
5.1. Бродіння	
5.1.1. Спиртове бродіння	
5.1.2. Молочнокисле бродіння	
5.1.3. Маслянокисле бродіння	
5.1.4. Оцтовокисле бродіння	
5.1.5. Пропіоновокисле бродіння	
5.1.6. Бродіння пектинових речовин	
5.1.7. Бродіння целюлози	
5.1.8. Амоніфікація або гниття білкових	
5.2. Окислення.	
5.2.1. Окислення жирів і вищих жирних кислот мікроорганізмами. Мікроорганізми - збудники псування жирів	
5.3. Взаємодії між мікроорганізмами	
5.4. Можливі шляхи регулювання життєдіяльності мікроорганізмів при зберіганні харчових продуктів	
5.5. Лабораторна робота № 5. Види бродіння і взаємини між мікроорганізмами. Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів	
5.5.1. Проведення якісних реакцій на спиртове, молочнокисле, оцтовокисле і маслянокисле бродіння	
5.5.2. Вивчення морфології оцтовокислих, молочнокислих і олійнокислих бактерій	
5.5.3. Вивчення типів взаємовідносин між мікроорганізмами	
Контрольні питання до лабораторної роботи № 5	
6. Словник мікробіологічних термінів	
7. Список літератури	
8. Додатки	
8.1. Рецепти приготування деяких барвників і розчинів	
8.2. Живильні середовища	
8.3. Склади дезінфекційних розчинів	

ВСТУП

Курс «Технічна мікробіологія» є однією з фундаментальних дисциплін в підготовці висококваліфікованих фахівців з товарознавства, експертизи товарів та спеціалістів ресторанної справи.

Під час вивчення цієї дисципліни студенти знайомляться: із зовнішнім виглядом, будовою і функціями основних груп мікроорганізмів, що викликають різноманітні види псування як продовольчих, так і непродовольчих товарів; з факторами, що визначають життєдіяльність мікроорганізмів; з їх значенням в технологічних процесах переробки харчової сировини, задачами мікробіологічного контролю на підприємствах харчової промисловості і торгової мережі; з можливими харчовими захворюваннями мікробної і немікробної природи; вивчає основи гігієни і санітарії.

Одним з головних напрямків дисципліни є вивчення методів ідентифікації неякісних продуктів і розробка заходів запобігання харчової сировини, продуктів харчування від псування мікроорганізмами.

Мета навчального посібнику – поглиблення теоретичних положень лекційного курсу мікробіології і освоєння методики мікробіологічного експерименту і мікробіологічного аналізу найважливіших харчових продуктів. У кінці кожної роботи наводяться питання для закріплення теоретичного і експериментального матеріалу.

Вимоги до змісту та оформлення лабораторних робіт

Лабораторна робота є невеликим науковим експериментом і звітом про виконане дослідження. До її оформлення є певні вимоги, в основі яких лежить докладний опис проведеного дослідження:

1. Лабораторні роботи оформляються в зошиті кожним студентом індивідуально. Лабораторний зошит підписується студентом до початку виконання першої лабораторної роботи.

2. Кожна лабораторна робота повинна містити такі структурні елементи:

а) найменування лабораторної роботи;

б) мета заняття;

в) перелік необхідних матеріалів і устаткування;

г) результати та обговорення: найменування завдання, експериментальний матеріал, отриманий ОСОБИСТО студентом в ході виконання лабораторної роботи. При вивченні морфології культур робляться їх замальовки при певних збільшеннях мікроскопу;

д) висновки.

Лабораторна робота, оформлена відповідно до даних вимог, надається в кінці КОЖНОГО ЗАНЯТТЯ на підпис викладачу.

Техніка безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії

Робота в мікробіологічній лабораторії вимагає суворого дотримання техніки безпеки.

- Підготовка мікробіологічної лабораторії до роботи. Щоб знизити кількість мікроорганізмів в повітрі і на різних поверхнях, в лабораторних приміщеннях застосовують різні способи дезінфекції.

- Повітря в лабораторії найпростіше дезінфікувати провітрюванням. Тривала вентиляція приміщення через кватирку (не менше 30-60 хв) призводить до різкого зниження кількості мікроорганізмів, особливо при значній різниці в температурі між зовнішнім повітрям і повітрям приміщення. Більш ефективний і найбільш популярний спосіб дезінфекції повітря – опромінення ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі від 200 до 400 нм.

- Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає ретельної обробки. Робочий стіл дезінфікують до початку роботи і після її закінчення. Для протирання поверхні столу

використовують розчини лізолу і хлораміну або 70 % (за обсягом) розчини ізопропилового або етилового спиртів.

- До роботи в навчальній мікробіологічній лабораторії допускаються особи після проходження інструктажу з техніки безпеки.

- До заняття допускаються студенти тільки при наявності медичного халата, довге волосся повинно бути підібраним, щоб уникнути його потрапляння в полум'я пальника.

- У мікробіологічну лабораторію заборонено вносити їжу, питну воду, сторонні речі. У лабораторії забороняється палити і приймати їжу.

- На робочому місці розміщуються тільки необхідні для виконання конкретної лабораторної роботи обладнання і матеріали. Сумки, одяг розміщуються в спеціально відведених для цього місцях.

- Починати роботу і переміщатися по лабораторії під час заняття можна тільки з дозволу викладача.

- Необхідно дотримуватись заходів безпеки при поводженні з електроприводами. Без дозволу викладача не можна включати електроприлади в мережу.

- При роботі з мікроорганізмами слід дотримуватися обережності і дотримуватися прийомів, що виключають можливість інфікування (на лабораторних заняттях студенти працюють з непатогенними мікроорганізмами, однак необхідно пам'ятати, що при посіві сапрофітних мікроорганізмів з навколишнього середовища випадково може бути внесена і патогенна мікрофлора).

- Забороняється торкатися мікробних культур руками. Всі препарати готують на спеціальних скляних містках над кристалізатором.

- У разі потрапляння досліджуваного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат або взуття необхідно повідомити про це викладачу і під його керівництвом провести дезінфекцію.

- На посуді, що застосовується для культивування мікроорганізмів, необхідно зробити напис, що містить назву культури, дату засіву, прізвище студента і номер групи.

- Всі предмети, використані при роботі з живими культурами, повинні бути знезаражені обпаленням в полум'я пальника, або занурені в дезінфікуючий розчин (предметні і покривні скельця, піпетки, шпателі).

- Всі засіяні пробірки, чашки або колби поміщаються в термостат або здаються викладачеві.

- Відпрацьований матеріал поміщається в певні ємкості для їх подальшого знезараження.

- В кінці роботи необхідно привести в порядок робоче місце, ретельно вимити руки і обробити ватяним тампоном із дезінфікуючим засобом. Халат скласти в поліетиленовий пакет.
- Приміщення провітрюють (30-60 хв), опромінюють УФ-лампами.

РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОКАРІОТ. МОРФОЛОГІЯ ПРОКАРІОТ

1.1 Обладнання мікробіологічної лабораторії

Для роботи в навчальній мікробіологічній лабораторії використовується наступне обладнання:

Мікроскоп. Мікроскоп являє собою оптичний прилад, що збільшує предмети в 40-1500 разів; він складається з механічної, оптичної та освітлювальної систем.

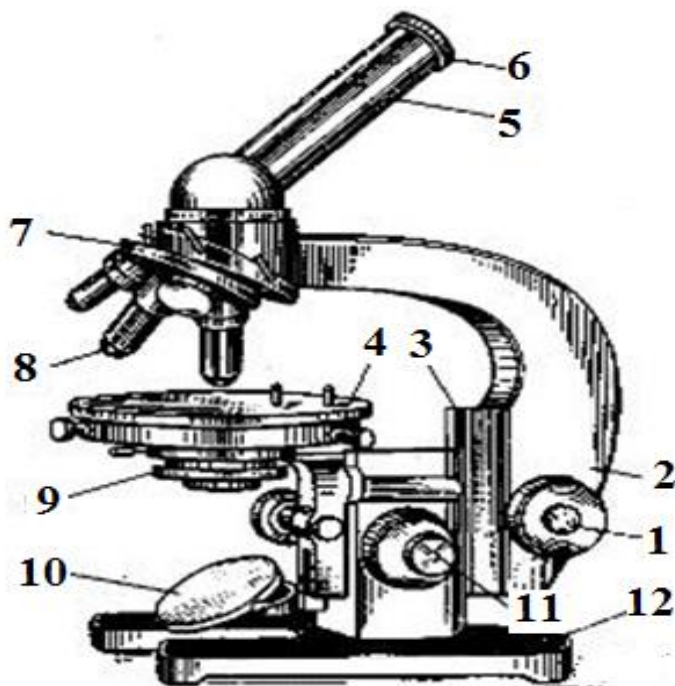


Рис. 1 – Мікроскоп

1— макрогвинт; 2 — тубусотримач; 3 — шарнирне з'єднання; 4 — предметний столик; 5 — тубус; 6 — окуляр; 7— револьвер; 8 — об'єктиви; 9 — конденсор; 10 — дзеркало; 11 — мікрогвинт; 12 — основа

До механічної системи мікроскопа відносять штатив, тубусотримач, тубус, предметний столик, гвинти.

Оптична система складається з об'єктива і окуляра.

Освітлювальна система складається з конденсора з діафрагмою і дзеркала.

Тубусотримач і штатив рухомо з'єднані між собою шарніром. Тубус – зорова труба мікроскопа. У верхню частину тубуса вставлений окуляр, а в нижню – обертається навколо своєї осі револьвер, в який угвинчені об'єктиви. Тубус пересувається вгору і вниз за допомогою

макрометричного і мікрометричного гвинтів. Один оборот мікрометричного гвинта перес-Гаєта тубус на 0,1 мм.

Тому мікрогвинти користуються для більш точного наведення, а для попередньої – використовують макрогвинт. Предметний столик призначений для розміщення досліджуваного матеріалу.

Конденсор складається з лінз, що збирають відбиті від дзеркала промені в світлової пучок, і направляють їх через отвір предметного столика на препарат. При визначенні рухливості нефарбованих препаратів конденсор повинен бути декілька опущений.

Діафрагма знаходиться між дзеркалом і конденсором і служить для регулювання кількості світла, що надходить в конденсор.

Об'єктив складається з системи лінз, укладених в металеву оправу. Передня лінза служить для збільшення предмета, інші – для корекції зображення. Сучасні біологічні мікроскопи мають не менше трьох об'єктивів. Сухі об'єктиви збільшують в 10 і 40 разів (між об'єктивами і препаратом знаходиться шар повітря), імерсійні – в 90-100 разів. На оправу кожного об'єктива нанесена цифра, яка вказує збільшення.

Окуляр складається з верхньої – очної і нижньої – збиральної лінз. На верхній частині окуляра є цифра, яка вказує збільшення. Окуляр збільшує тільки зображення.

Загальне збільшення мікроскопа отримується у результаті множення збільшення об'єктива на збільшення окуляра.

Робочий стіл для мікроскопіювання препаратів бажано розміщувати біля вікна або оснащувати джерелом світла. Спочатку проводять налаштування освітлення, для чого дзеркалом направляють пучок світла від джерела освітлення в об'єктив зі збільшенням в 10 раз. При правильному налаштуванні освітлення поле зору мікроскопа повинно бути у вигляді рівномірно освітленого кола. Після цього на предметний столик поміщають досліджуваний препарат, який закріплюють клемами і розглядають під мікроскопом, користуючись об'єктивами зі збільшенням в 10, 40 або 100 разів.

При роботі з об'єктивами 10x і 40x тубус мікроскопа обережно опускають за допомогою макрометричного гвинта, наближають об'єктив майже до препарату, але не торкаються його. Спостерігають в окуляр, злегка піднімаючи тубус тим же гвинтом до отримання зображення. За допомогою мікрометричного гвинта проводять точне налаштування об'єктива до отримання чіткого зображення предмета.

При роботі з імерсійним об'єктивом (збільшення в 100 разів) на препарат попередньо наносять краплю імерсійної олії, а потім, контролюючи збоку макрогвинтом, опускають об'єктив в краплю олії. Точне налаштування об'єктива проводять в зворотному напрямку до отримання чіткого зображення. При нанесенні краплі імерсійної олії не

відбувається розсіювання променя світла, а, значить, виходить чітке зображення.

Після закінчення роботи об'єктив піднімають, досліджуваний матеріал знімають з предметного столика. М'якою тканиною, змоченою в очищеному бензині або ефірі, видаляють імерсійне масло з об'єктива, на предметний столик поміщають квадрат з фланелі, опускають конденсор і прибирають мікроскоп в місце, що охороняє його від пилу і вогкості.

Будова світлового мікроскопа «МІКРОМЕД - 1»

Бінокулярний мікроскоп має тубус з двома окулярами. При спостереженні об'єкта обома очима одночасно досягається велика різкість глибини, менше втомлюється зір.

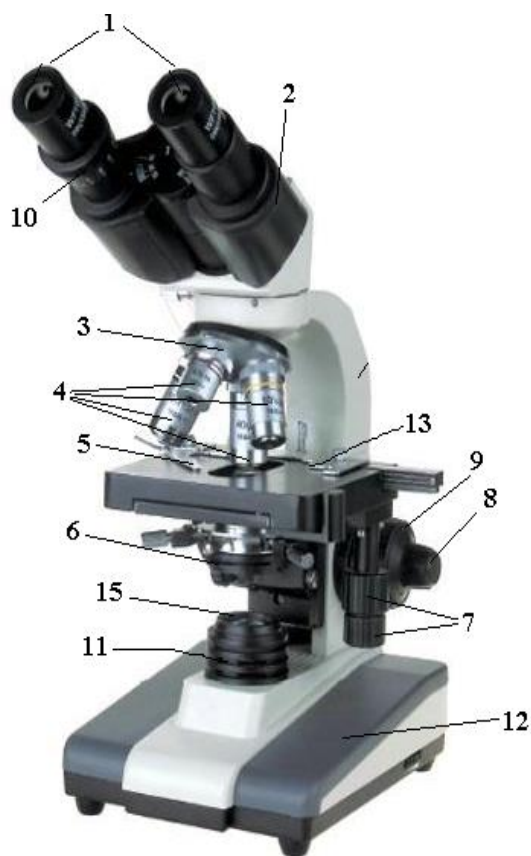


Рис. 2 – Мікроскоп з бінокулярною насадкою і вбудованим в підставу освітлювачем з галогенною лампою і блоком живлення
1 – окуляри; 2 – бінокулярна насадка; 3 – револьверний пристрій; 4 – об'єктиви; 5 – предметний столик; 6 – конденсор; 7 – рукоятка переміщення предметного столика в двох взаємо-перпендикулярних напрямленнях; 8 – рукоятка тонкого фокусування; 9 – рукоятка грубого фокусування; 10 – тубус; 11 – рукоятка регулювання яскравості горіння лампи; 12 – основа мікроскопа; 13 – препаратодій; 14 – гвинтовий упор (обмежувач переміщення предметного столика при фокусуванні); 15 – джерело світла

Принцип дії люмінесцентного мікроскопа заснований на здатності окремих об'єктів і барвників світитися при освітленні їх ультрафіолетовими променями. Люмінесцентні мікроскопи забезпечені джерелом ультрафіолетового світла і набором світлофільтрів. У бактерій дуже слабо виражена власна флюоресценція. Тому необхідно їх обробити флуоресцюючими фарбами (флуорохромами), які забарвлюють структурні елементи клітини в різні кольори.



Рис. 3 – Електронний мікроскоп, що просвічує

Електронна мікроскопія – це метод дослідження структур, що знаходяться поза межами видимості світлового мікроскопа і мають розміри менше одного мікрона (від 1 мкм до 1-5Å). Дія електронного мікроскопа заснована на використанні направленого потоку електронів, який виконує роль світлового променя в світловому мікроскопі, а роль лінз грають магніти (магнітні лінзи).

Електронна мікроскопія, при якій зображення отримують завдяки проходженню (просвічуванню) електронів через зразок, називається просвічуємою (трансмівною). При скануючій (растровій), або тунельній електронній мікроскопії пучок електронів швидко сканує поверхню зразка, викликаючи випромінювання, яке за допомогою катоднопроменевої трубки формує зображення на світлому екрані мікроскопа.

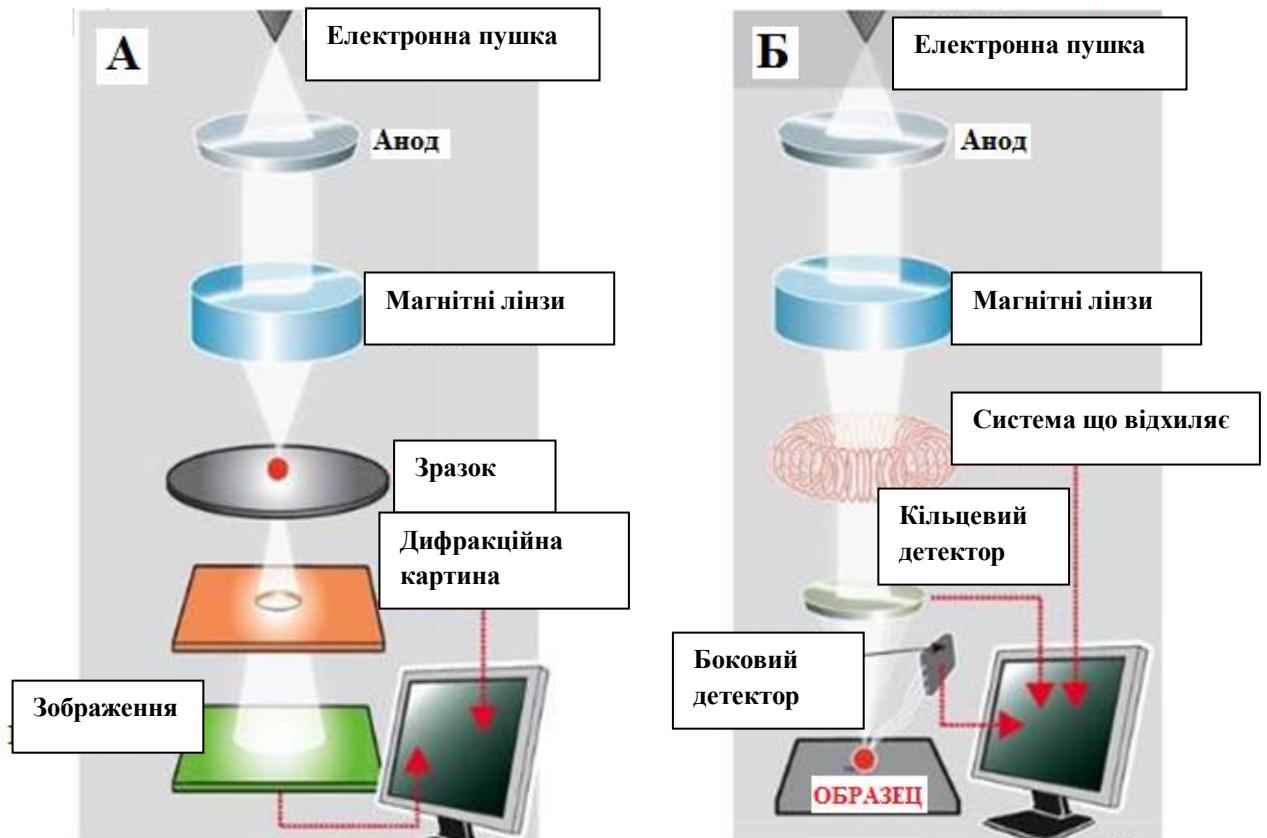


Рис. 4 - Схема електронного мікроскопа:
 А- трансмісивного; Б – скануючого

За допомогою електронної мікроскопії можна детально вивчати будову бактерій, вірусів, бактеріофагів.

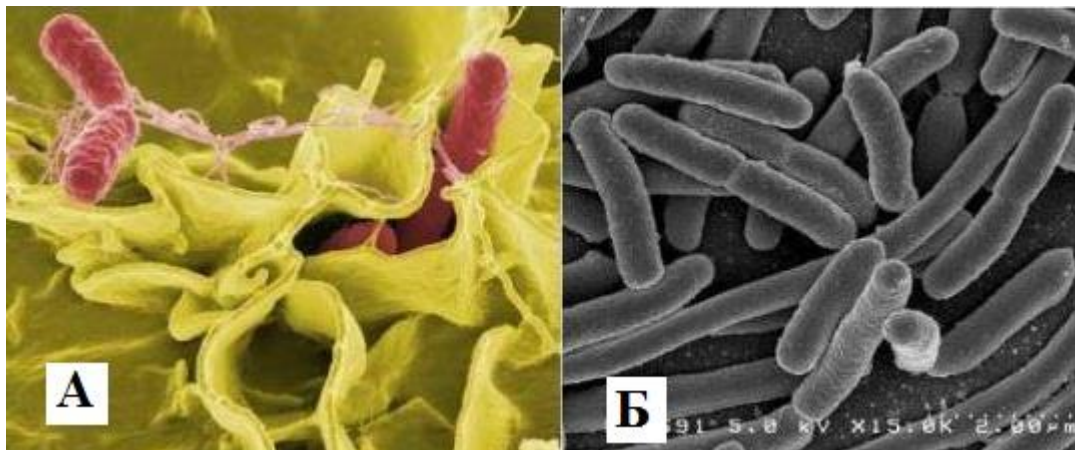


Рис. 5 – Зображення, отримані з використанням скануючої електронної мікроскопії:
 А – бактерії *Salmonella typhimurium* в клітинах людини;
 Б – бактерії *Escherichia coli*

Предметні скельця використовують для приготування мікробіологічних препаратів. Предметні скельця мають розміри 26x76 мм. Товщина скла 1 мм. Існують модифікації предметних скелець:

- скло предметне з заточеним краєм для розтяжки мазків;
- скло предметне з лункою для мікроскопії препаратів «висяча крапля»;
- скло предметне зі смугою для запису.

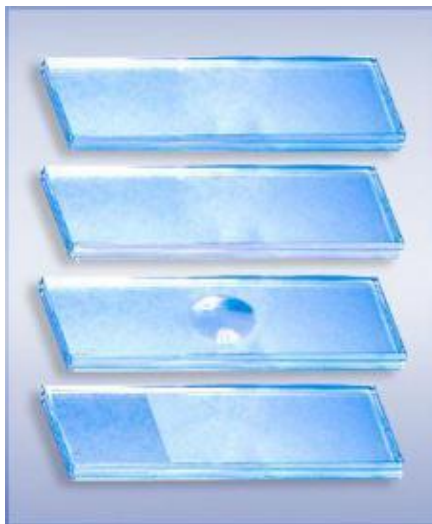


Рис. 6 – Скельця предметні різного призначення

Покривні скельця. Покривне скельце призначене для захисту об'єктива мікроскопа, а в разі отримання препарату «висяча крапля» на нього наноситься досліджувана культура мікроорганізмів. Товщина скла 0,2 мм. Розміри покривних скелець 18x18, 24x24, 24x48 мм. Вивчати під мікроскопом препарати, що не захищені покривним скельцем, категорично забороняється!

Бактеріологічна петля. Складається з петлетримача і власне петлі, виготовленої з ніхромової нитки різного діаметру.

Чашка Петрі зазвичай виготовляється з прозорого скла або пластмаси (прозорий полістирол) і може мати самі різні розміри. Найбільш часто використовуються чашки діаметром 50-100 мм і висотою близько 15 мм. Чашки використовуються в мікробіології для культивування колоній мікроорганізмів. Скляні чашки – багаторазові, але вимагають стерилізації перед повторним посівом. Чашки з пластичних матеріалів поставляють стерильними, в герметичній упаковці.

Шпатель Дрігальського призначений для засівання матеріалу на щільні поживні середовища. Випускаються шпателі L- і T-форми. Гладка поверхня робочої частини шпателя дозволяє уникати пошкодження живильного середовища.

Колба Виноградського – укорочені конічні колби з широким дном. Призначена для вирощування аеробних мікроорганізмів.

Колба Кауфмана – з довгим горлом. Призначена для вирощування анаеробних мікроорганізмів.

Піпетки – ємністю 1, 5, 10 мл, градуйовані піпетки на 1 мл та більше, пастерівські піпетки.

Бюретки, циліндри, хімічні склянки, воронки.

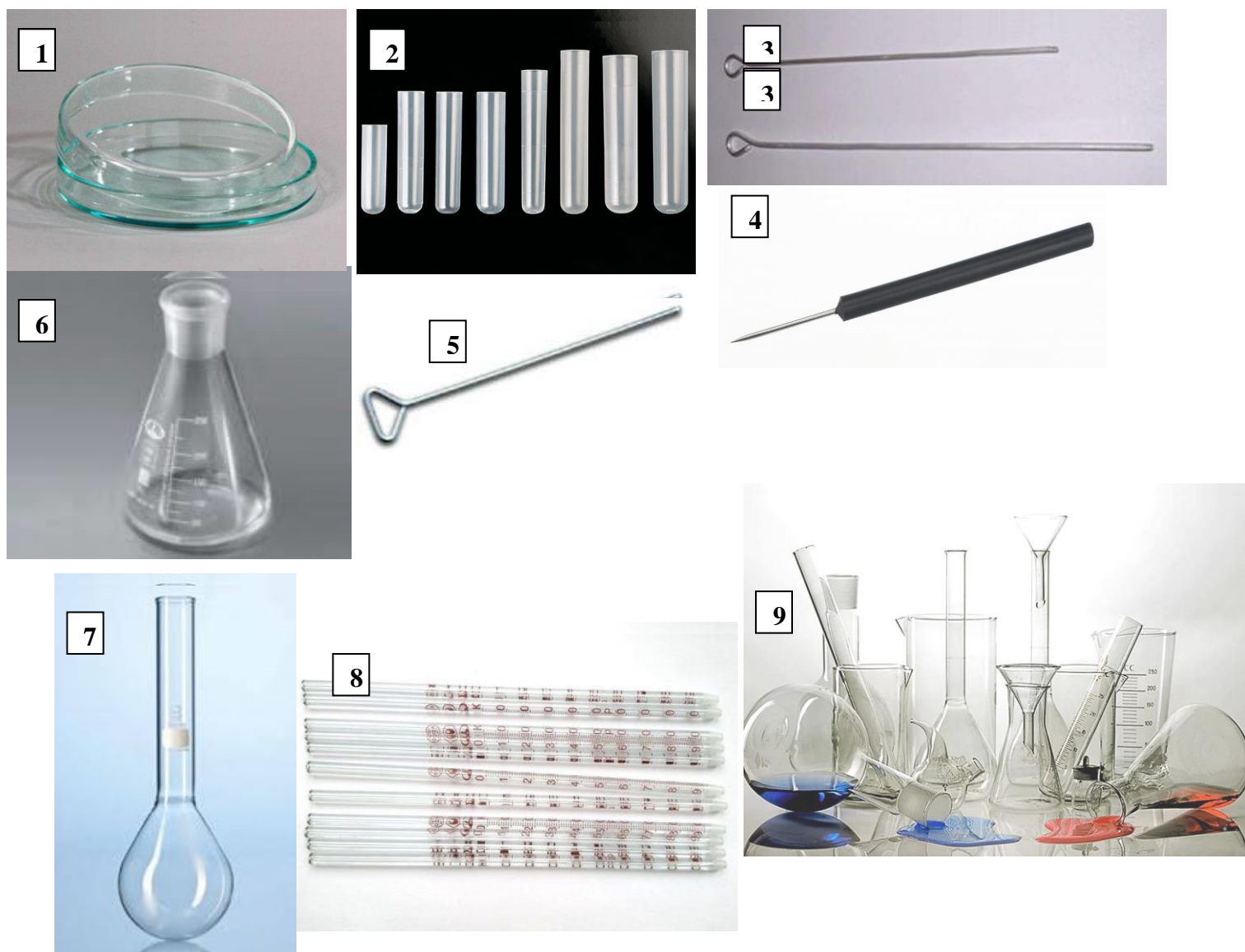


Рис. 7 - Мікробіологічний посуд:

1 — чашка Петрі; 2 — пробірка; 3 — петля бактеріологічна; 4 — голки мікробіологічні; 5 — шпатель Дригальського; 6 – колба Виноградського; 7 – колба Кауфмана; 8 – піпетки; 9 – бюретки, циліндри, хімічні склянки, воронки

Термостат – прилад для підтримки постійної температури в обмеженому обсязі. У мікробіологічній практиці використовують для створення оптимальної температури при вирощуванні культур мікроорганізмів, для інкубації посівів, складається з ізольованою

камери, яка дозволяє утримувати сталість температури у всьому просторі камери

1.2 Методи стерилізації



Мета процесу стерилізації полягає в повному видаленні або знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор всередині або на поверхні предмета. Стерилізації піддаються поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини і т. і. Всі способи стерилізації поділяють на фізичні, механічні та хімічні; або на термічні і холодні.

Термічна стерилізація заснована на знищенні мікробів за допомогою високих температур. До термічної стерилізації відносяться:

Фламбування – стерилізація шляхом прожарювання в полум'ї дрібних металевих або скляних предметів. Найбільш швидкий і доступний метод стерилізації. Однак його використання обмежується тільки термостійкими матеріалами. Таким способом стерилізують бактеріологічні петлі, металеві пінцети, скляні шпатель, палички, предметні скельця, порцелянові ступки і інші інструменти. При прожаренні знищуються всі мікроорганізми (вегетативні і спорові форми).



Кип'ятіння – один з найпростіших способів стерилізації. Проводиться в стерилізаторі. Кип'ятіння триває від 15-30 хв до 2 год при температурі близько 100 °С. Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети – шприци, голки, скляні трубки та ін. При цьому гинуть вегетативні форми мікроорганізмів і частково спори. Кип'ятінням в дистильованій воді стерилізують мембранні фільтри.

Стерилізація сухим жаром – проводиться гарячим повітрям в печі Пастера або сушильній шафі при температурі 160-170 °С протягом 1,5-2 год з моменту досягнення цих температур.

Стерилізують сухим жаром скляний посуд – чашки Петрі, піпетки, шпатель (загорнуті в папір), а також пробірки, колби. При цьому гинуть спорові і неспорові форми мікроорганізмів. Обгорнутий в папір простерилізований матеріал можна зберігати.

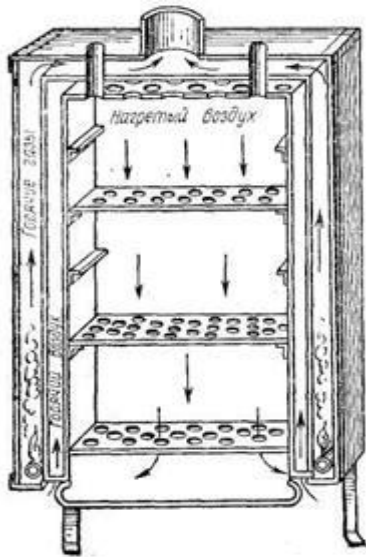


Рисунок 8. Піч Пастера

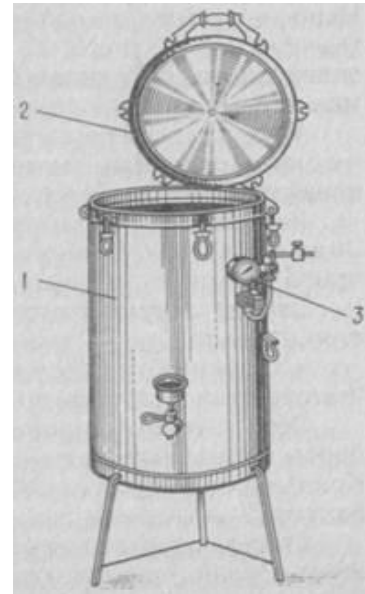


Рисунок 9. Апарат Коха

Стерилізація текучим паром – проводиться гарячим вологим повітрям в апараті Коха від 45 хв до 1,5 год залежно від обсягу матеріалу, що стерилізується. Стерилізують живильні середовища, які не можна нагрівати вище 100 °С, наприклад МТЖ (при температурі вище 100 °С він розріджується і не застигає). Спосіб не цілком надійний – повністю гинуть вегетативні форми мікроорганізмів, а спори зберігаються. Для досягнення повної стерилізації середовищ в апараті Коха застосовують дробну стерилізацію.

Стерилізація паром під тиском (автоклавування) – проводиться насиченою водяною паром в автоклаві. Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металевий двостінний котел, здатний витримувати високий тиск. Внутрішня частина котла – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується. Основні режими стерилізації: 15-30 хв при надмірному тиску 0,5 атм (температура досягає 110 – 112 °С); 15-45 хв при надмірному тиску 1,0 атм (температура досягає 121 °С); 10-30 хв при надмірному тиску 1,5 атм (температура досягає 126 °С). Зазвичай в лабораторній практиці стерилізація під тиском проводиться при 1,5 атм і температурі 112 °С або при 2 атм і температурі 120 °С протягом 20-30 хв.

Після закінчення часу стерилізації, нагрівання припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пар. Стерилізують паром під тиском поживні середовища МПБ, МПА, скляний посуд, перев'язувальний матеріал, хірургічні інструменти та ін. Автоклавування є швидким і надійним способом стерилізації, при якому гинуть всі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.



Рис. 10 - Схема автоклава:

1 – стерилізаційна камера; 2 – кран для виходу повітря; 3 – манометр;
 4 – запобіжний клапан; 5 – водопарова камера; 6 – воронка для заповнення автоклава водою; 7 – отвори для надходження пари в стерилізаційну камеру;
 8 – кришка автоклава; 9 – підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються

В автоклаві з незагвинченою кришкою при відкритому крані для випуску пари можна проводити стерилізацію текучим паром.

Пастеризація – нагрівання рідини в стерильному посуді при температурі 60-90 °С протягом 10-30 хв. Застосовують для рідких середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості при високих температурах. Пастеризують молоко, вершки, вино, пиво, соки та ін. При цьому повністю зберігаються вітаміни і смакові якості продуктів. Пастеризовані продукти тривалого зберігання не підлягають, так як при цьому способі стерилізації гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори залишаються. У лабораторній практиці цим способом користуються для відділення спороутворюючих видів від неспороутворюючих.

Дробна стерилізація (тиндалізація) – використовується для стерилізації живильних середовищ і розчинів, які псуються при використанні температур вище 100 °С і заснована на обробці матеріалу, що стерилізується в кілька прийомів. Дробним може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха. Рідину доводять до 100 °С і продовжують витримувати при цій температурі 10 хв. За цей час всі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Потім рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30 °С), і через кілька годин знову пропускають пар. Двох-трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор.

Холодні способи стерилізації: хімічна стерилізація або дезінфекція, різні фізичні методи стерилізації (крім використання температурного чинника) і механічне звільнення від мікроорганізмів.

Хімічні методи стерилізації – застосування дезінфектантів і антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використання антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з виборчою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів при дезінфекції відбувається в результаті гідролізу компонентів клітини, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів. Метод хімічної стерилізації застосовують при дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець і т.ін.

До антисептиків або дезінфікуючих засобів відносяться: мила, фарбники, солі важких металів, окислювачі (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти, кислоти, антибіотики і ін.

Стійкість мікроорганізмів до їх дії може істотно змінюватися в залежності від таких факторів як концентрація активного компонента, тривалість контакту, рН, температура, вологість. Серед використовуваних летючих стерилізуючи – окис етилену, окис пропілену, озон, метилбромід, формальдегід. Ці речовини можуть бути використані для стерилізації пластмасових центрифужних пробірок, пластмасових чашок Петрі, оптичних інструментів, сироватки крові та ін.

Хімічні засоби неспецифічної дії використовуються для оброблення приміщень, обладнання, різних предметів. Наприклад, спирти використовуються в концентрації 60-70 % і ефективні відносно вегетативних клітин. Феноли застосовуються для дезінфекції приміщень.

Фізичні методи стерилізації: стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивними випромінюваннями, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти і ін.

Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів. Ультрафіолетові промені використовуються для стерилізації центрифужних пробірок, наконечників для піпеток, матеріалів з термолабільної пластмаси. Час опромінення визначається потужністю лампи, часом впливу, ступенем і видовим складом мікроорганізмів забрудненого матеріалу. Вегетативні форми більш чутливі до опромінення, ніж спори, які в 3-10 разів стійкіші. Від -УФ-опромінення мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або другими захисними оболонками. Обмеженням при використанні даного методу стерилізації є низька проникаюча здатність УФ-променів і висока поглинаюча здатність води і скла.

Механічний метод стерилізації (стерилізація фільтруванням) застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і впливу хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, летючі речовини і ін.). Спосіб полягає в пропусненні рідин і

газів через спеціальні дрібнопористі фільтри (бактеріальні), діаметр пор яких не перевищує 0,45 – 0,2 мкм.

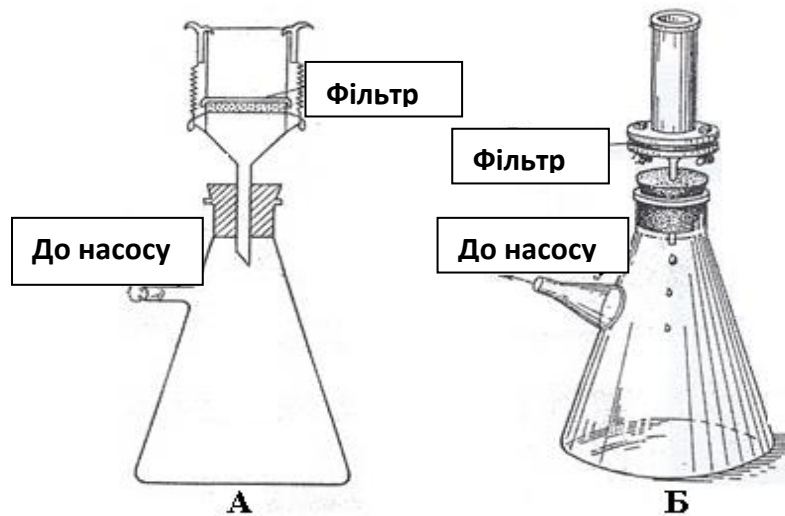


Рис. 11 - Прилади для стерилізації фільтруванням:
А – зі скляним тримачем; Б – з металевим тримачем

1.3. Дослідження морфології мікроорганізмів: вивчення бактерій, ціанобактерій

Бактерії. Під загальним поняттям «бактерії» описано понад 1600 видів мікроорганізмів-прокаріотів, які не мають справжнього складноорганізованого ядра. Більшість представників бактерій – одноклітинні організми, що розрізняються розмірами і фізіологічними властивостями.

Хімічний склад бактеріальної клітини подібний до хімічного складу клітин інших живих організмів. Компонентами мікробної клітини є вода, мінеральні речовини та органічні сполуки — білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та ліпіди.

За формою всі бактерії можна розділити на кулясті (або коки), паличкоподібні, звисті і нитчасті.

До морфологічних властивостей бактерій відносяться не тільки форма, але і розмір клітин, розташування клітин в просторі, наявність спор і капсул, рухливість і характер забарвлення бактерій за Грамом. Найбільш типова морфологія бактерій в молодих культурах.

Серед основних морфологічних форм бактерій розрізняють:

1. Кулясті (кокові), які за характером взаєморозташування поділяються на:

мікрококи (лат. Micro – маленький). У природі зустрічаються у вигляді одиночних кулястих клітин.

диплококи (лат. Diploos – подвійний) – бактерії, з'єднані по дві клітини;

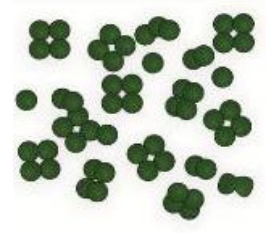
тетракоки (лат. Tetra — чотири) – групуються по чотири клітини;



Micrococcus luteus



Neisseria meningitides

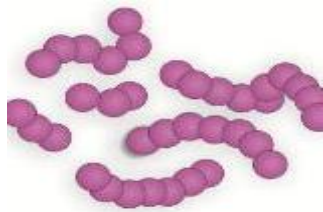


тетракоки

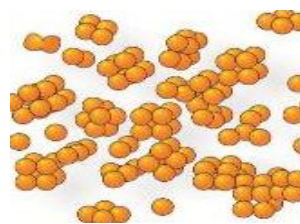
стрептококи (лат. Streptos – ланцюжок) – бактерії, що утворюють у результаті поділу клітин в одній площині ланцюжки різноманітної довжини.

сарцини (лат. Sarceo – з'єдную) – кулясті бактерії, що групуються по 8 клітин. Розташовуються у вигляді куба, з кожної сторони якого по 4 клітки.

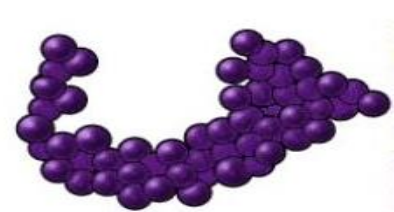
стафілококи (лат. Staphylo – гроно) – клітини внаслідок безладного поділу утворюють скупчення, що нагадують за зовнішнім виглядом гроно винограду.



Streptococcus mutans



Sarcina lutea



Staphylococcus aureus

2. Паличкоподібні бактерії. До них відносять форми, що утворюють спори (роди *Bacillus*, *Clostridium* та ін) і не утворюють їх (роди *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* та ін). Цитоплазма клітин *Pseudomonas stutzeri* прокрашується рівномірно, оскільки це неспорообразуюча паличка, і під мікроскопом клітини виглядають як тонкі, чітко окреслені, рівномірно окрашені палички.

Палички, що утворюють спори, називають бацилами. Спороутворення у бактерій – спосіб перенесення несприятливих зовнішніх впливів. У клітині утворюється лише одна спора. Розрізняють три види спороутворення:

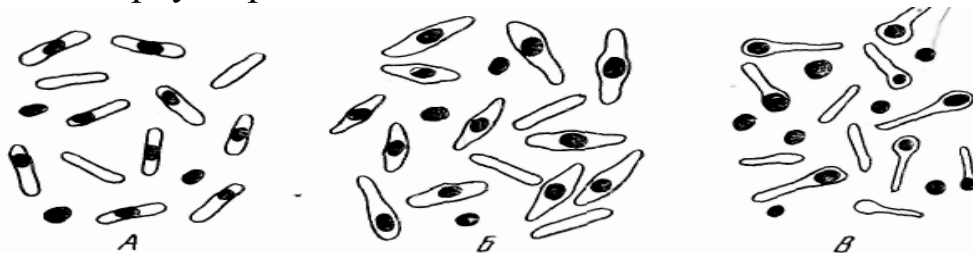
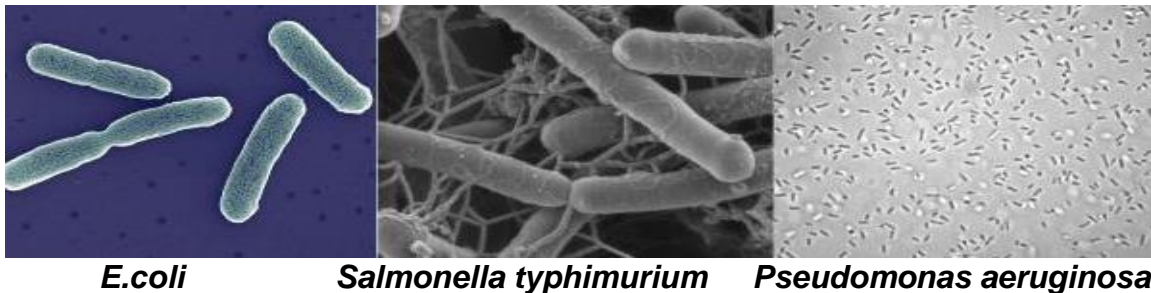


Рис. 12 - Типи спороутворення у бактерій

А – Бацилярний; Б – Клостридіальний; В - Плектридіальний

Паличкоподібні бактерії розрізняються за формою: правильні: ентеробактерії (представники сімейства Enterobacteriaceae), псевдомонади (рід *Pseudomonas*);



і неправильні (коринебактерії (*Corynebacterium*)).



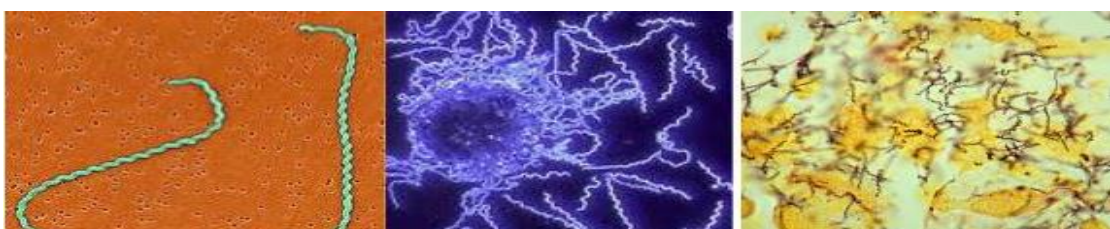
Corynebacterium diphtheria

3. Кручені форми – за характером і кількістю завитків вони діляться на:

вібріони (злегка зігнуті палички або неповні завитки);

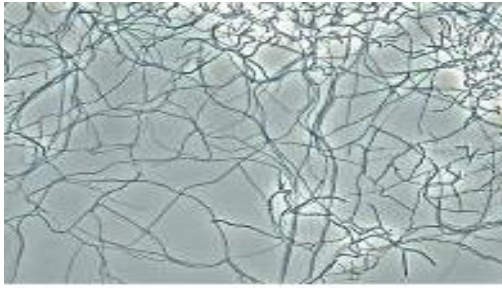
спірили (від лат. *spiro* – штопор; один або кілька завитків);

спірохети, які в свою чергу, діляться на: лептоспіри (завитки з загнутими гачкоподібними кінцями – S-подібна форма); боррелії (4–12 неправильних завитків); трепонеми (14–17 рівномірних дрібних завитків).

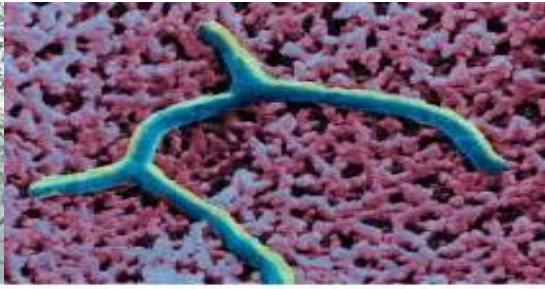


Leptospira interrogans *Borrelia burgdorferi* *Treponema pallidum*

4. Нитчасті форми, до яких відносять актиноміцети (Actinomycetales). Ця група мікроорганізмів займає проміжне положення між бактеріями і грибами, тому її представників називають грибобактеріями. Вони одноклітинні, як бактерії, але утворюють міцелій, як гриби; діаметр ниток у них дуже малий, як у бактерій (не більше 0,5–0,8 мкм), але гіфи міцелію довгі і гіллясті, як у грибів.

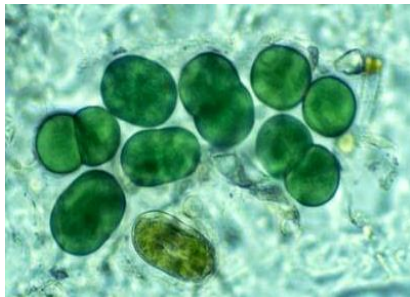


Actinomyces israeli



Streptomyces sp.

Актиноміцети здатні утворювати різні пігменти: чорні, бурі, червоні, зелені та ін. Широко поширені в природі, знаходяться в ґрунті, воді, зустрічаються на рослинних і тваринних залишках. При попаданні на харчові продукти надають їм «землистий» запах і викликають псування.



Ціанобактерії або синьо-зелені водорості – тип великих грамнегативних бактерій, здатних до фотосинтезу, що супроводжується виділенням кисню. Ціанобактерії – одноклітинні, нитчасті і колоніальні мікроорганізми. У Південній Америці та Китаї ціанобактерії родів *Spirulina* і *Nostoc* через нестачу інших видів продовольства використовують в їжу: їх висушують, а потім готують борошно.

1.4. Дослідження морфології мікроорганізмів: вивчення мікроскопічних грибів (цвілі) і дріжджів

Гриби. Поєднують ознаки рослин і тварин. Гриби – це гетеротрофні еукаріотичні організми, що володіють виключно осмотрофним, тобто всмоктуючим, типом харчування. Такий спосіб харчування обумовлює характерні особливості морфології і фізіології грибів.

Гриби відносяться до організмів, які характеризуються наявністю диференційованого ядра, відсутністю хлорофілу, наявністю у багатьох видів властивих органів – гіф, які переплітаючись, утворюють міцелій (грибницю). Особливістю грибів є те, що у них способи розмноження різноманітні і суттєво відрізняються від бактерій – вегетативний спосіб і спорами (нестатевий і статевий шляхи).

Плісневі гриби (цвілі) за своїм розвитком стоять вище не тільки бактерій, але й дріжджів. Серед плісневих грибів зустрічаються одноклітинні та багатоклітинні організми. Тіло грибів – це сплетення тонких розгалужених ниток-гіф, яке називається міцелієм або

грибницею. У багатоклітинних грибів гіфи розділені поперечними перегородками. У одноклітинних – перегородки відсутні, і міцелій є однією дуже розгалуженою клітиною.

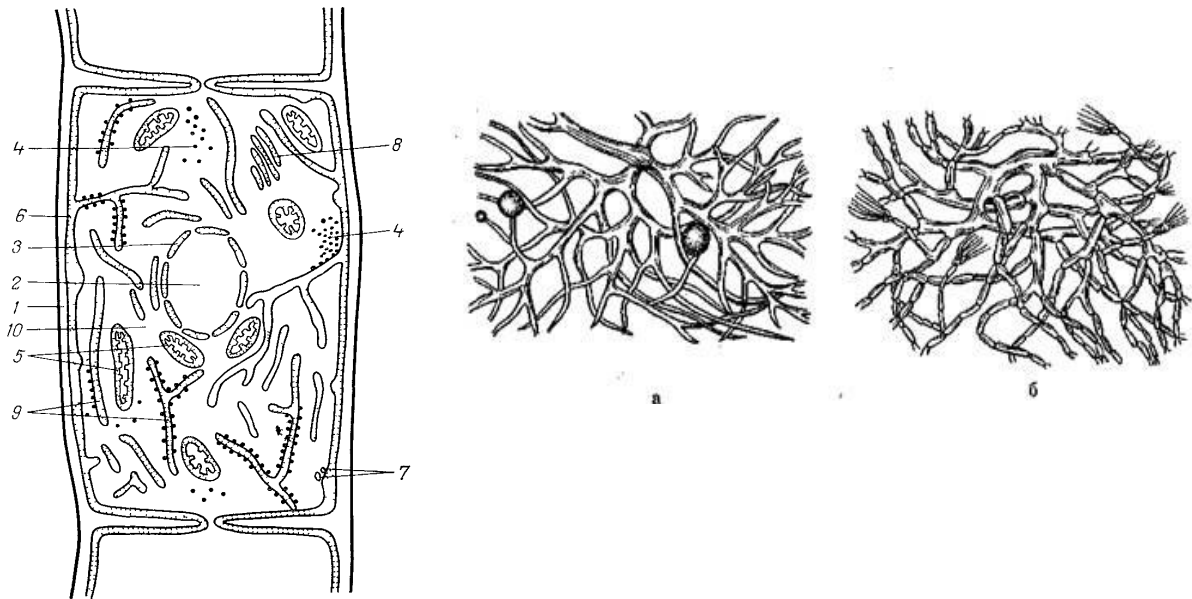


Рис. 13 - Будова клітини та міцелію грибів:

1 – клітинна стінка; 2 – ядро; 3 – ядерна оболонка; 4 – рибосоми; 5 – мітохондрії; 6 – цитоплазматична мембрана; 7 – лізосоми; 8 – апарат Гольджі; 9 – ендоплазматична сітка; 10 – цитоплазма; *a* - одноклітинний; *б* - багатоклітинний

Вегетативне тіло найчастіше представляє собою міцелій, повністю занурений в субстрат – це забезпечує максимально ефективний витяг поживних речовин всією поверхнею тіла, багаторазово розгалужені гіфи міцеліальних грибів прагнуть пронизати весь доступний субстрат. Але заглибленість міцелію викликає труднощі з поширенням спор, тому споронесучі органи у більшості грибів виносяться над поверхнею субстрату з утворенням складно влаштованих структур – плодових тіл (рис. 14, 15).

Більшість грибів здатне до вегетативного (безстатевого) і статевого розмноження. Характерний плеоморфізм — наявність одночасно декількох видів споронесення, наприклад, безстатевого і статевого.

Вегетативне розмноження – частинами міцелію або брунькуванням гіф.

Спороутворення. Залежно від способу утворення розрізняють ендогенні та екзогенні спори.

• **Ендогенні спори (спорангіоспори)** характерні для нижчих грибів. Утворюються всередині особливих клітин, які називаються спорангіями.

• **Екзогенні спори** називають конидіями, вони є у вищих і у деяких нижчих грибів. Утворюються на вершинах або збоку спеціальних гіф - конидиєносців, орієнтованих вертикально, які можуть бути простими або розгалуженими. Покриті щільною оболонкою, тому досить стійкі, але і без листя. Можуть підхоплюватися повітряними потоками або тваринами і переноситися на значні відстані. При проростанні дають ростову трубку, а потім гіфи.

Багато видів грибів, будучи невибагливими до нестачі вологи (ксерофіти), є збудниками псування різних зневоднених харчових продуктів в тому числі зерна і кормів. Деякі гриби здатні утворювати токсичні речовини в харчових продуктах і кормах і викликати отруєння у людей і тварин. Інші, утворюючи величезну кількість летючих спор, під час згодовування сухого корму можуть проникати в органи дихання птахів, викликаючи їх масову загибель. Гриби широко поширені в природі, викликають пліснявіння різноманітних харчових продуктів, як тваринного, так і рослинного походження (зерна, хліба, плодово-ягідної сировини), невибагливі до живильних речовин, в сирих приміщеннях (мезофіли) можуть розвиватися навіть при порівняно низьких температурах (близьких до 0 °С).

Рис. 14 - Пліснява під мікроскопом

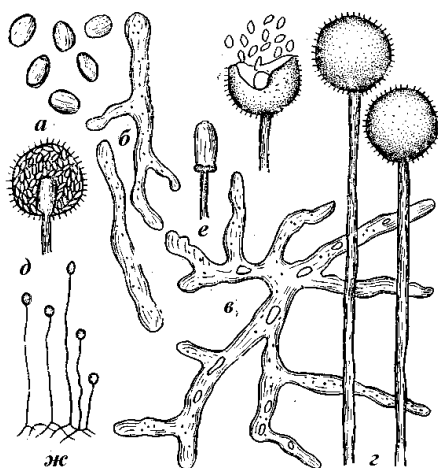
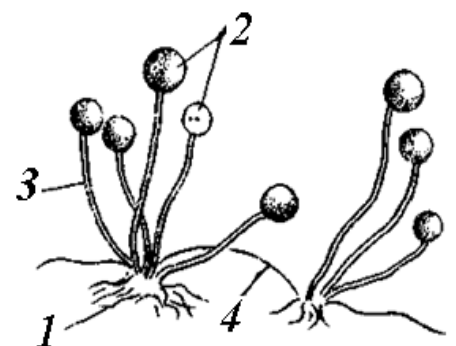


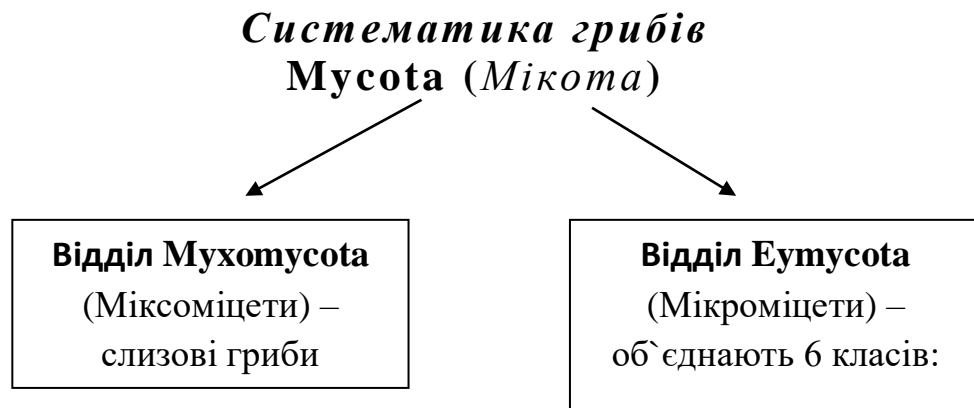
Рис. 15- *Mucor mucedo*:

а – спори, б – спори, що проростають, в – міцелій, г – спорангієносець, д – спорангій у розрізі, е – колонка, ж – загальний вид плісені



Ризопус: 1 – ризоїди, 2 – спорангії, 3 – спорангієносці. 4 –

В основу систематики грибів покладено комплекс ознак, основними з яких є будова міцелію, способи розмноження та різновид плодових тіл. У залежності від цих особливостей всі гриби, які є збудниками псування харчових продуктів чи використовуються в промисловості, поділяються на шість відділів.



1. Клас Хитридіоміцети (Chytridiomycetes). Це гриби, у яких дуже слабо розвинутий міцелій. Розмножуються вони утворенням зооспор. (НИЖЧІ ГРИБИ)

2. Клас Ооміцети (Oomycetes). Мають неклітинний міцелій. Нестатеве розмноження – зооспорами, що утворюються у зооспорангіях, статеве – ооспорами. (НИЖЧІ ГРИБИ)

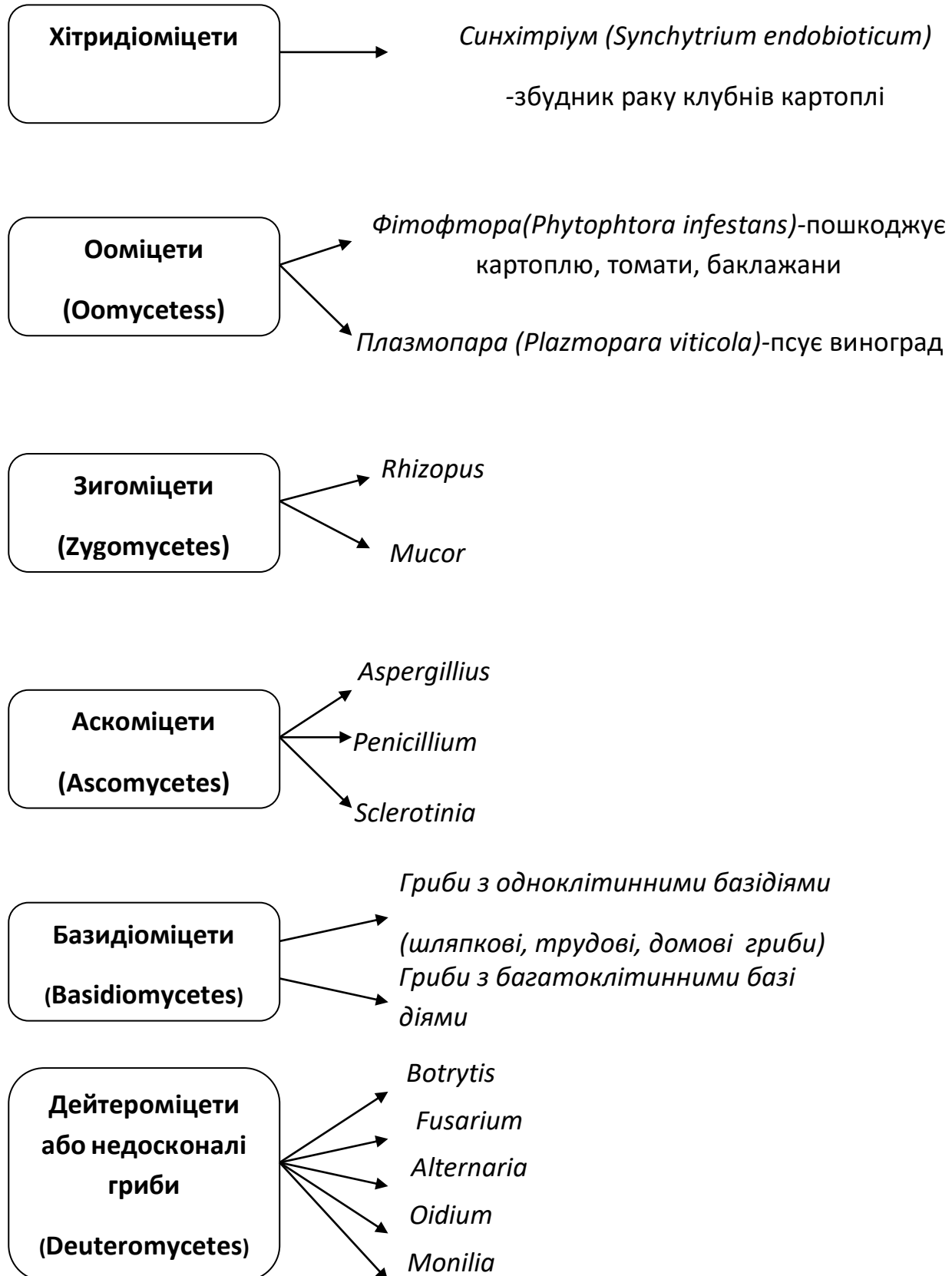
3. Клас Зигоміцети (Zygomycetes). Мають одноклітинний міцелій. Вегетативне розмноження проходить шляхом утворення спорангієспор, а при статевому – утворюються зигоспори. (НИЖЧІ ГРИБИ)

4. Клас Аскоміцети (Ascomycetes). Мають багатоклітинний міцелій. Вегетативне розмноження здійснюється за допомогою конідій. При статевому розмноженні утворюються аскоспори. (ВИЩІ ГРИБИ)

5. Клас Базидіоміцети (Basidiomycetes), розмножуються переважно статевим шляхом – базидіоспорами. (ВИЩІ ГРИБИ)

6. Клас Дейтероміцети, або Недосконалі гриби (Fungi imperfecti, Deiteromycetes) з багатоклітинним міцелієм, розмножуються виключно вегетативним шляхом – оїдіями. (ВИЩІ ГРИБИ).

Класифікація плісневих (цвілевих) грибів



Дріжджі. Група грибів, які не мають типового міцелію і існують у вигляді окремих клітин, які брунькуються або діляться. Утворюють обмежені безбарвні, жовті або червоні колонії. Діаметр клітин від 8 до 15 мкм. Форма різноманітна: еліпсова, грушоподібна, округла, циліндрична.

Розмножуються вегетативним і статевим шляхом. Вегетативні способи розмноження – брунькування і ділення; статевий спосіб розмноження пов'язаний з утворенням спор.



Рис. 16 - Дріжджі:

а) що брунькуються;
б) що діляться

До дріжджів, що брунькуються, відносяться представники «культурних» дріжджів роду *Saccharomyces* (сахароміцети), до діляться – види роду *Schizosaccharomyces* (шизосахароміцетів), рис. 16.

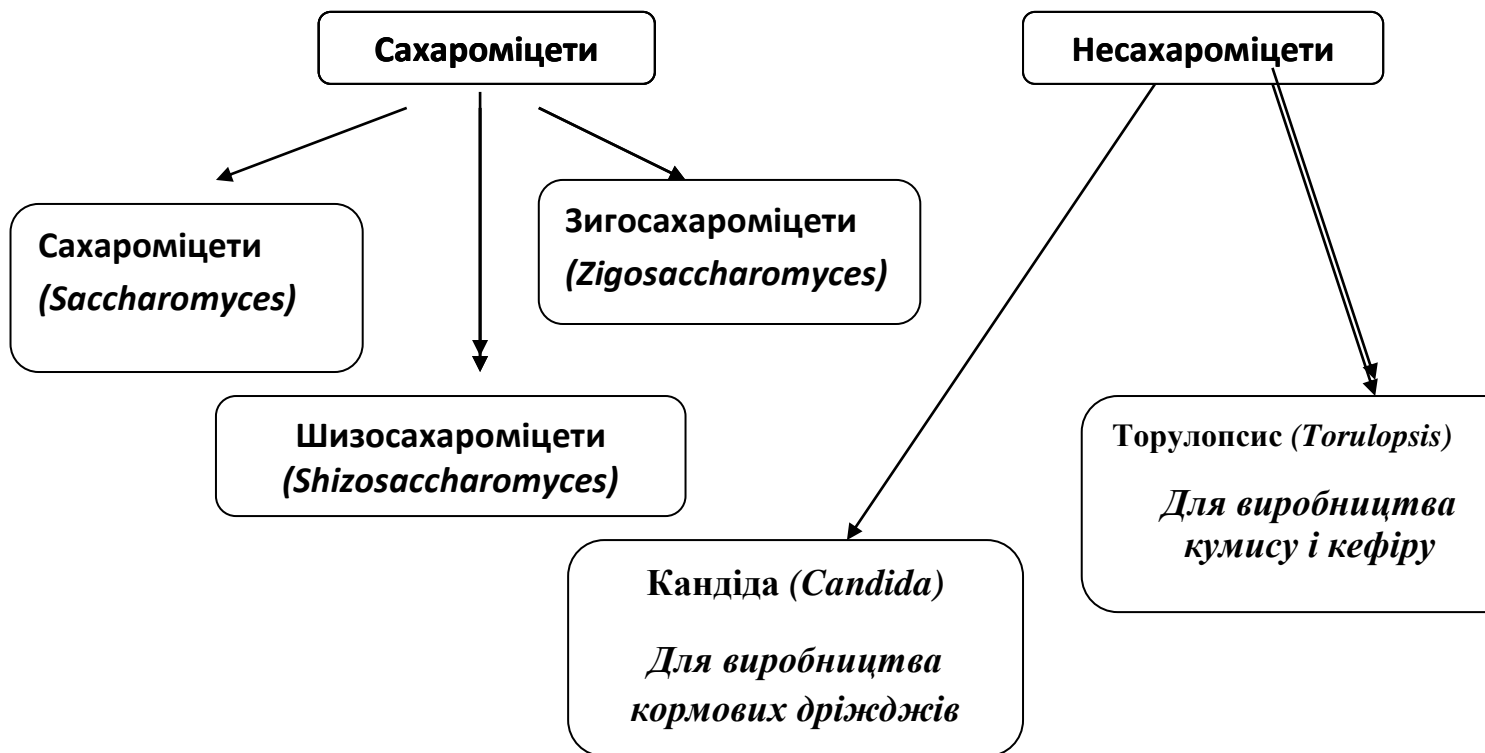
Класифікація дріжджів

Класифікація дріжджів ґрунтується на способах їх розмноження. Усі дріжджі за здатністю утворювати спори поділяють на дві родини:

- ***перша родина - сахароміцетів (Saccharomycetaceae);***
- ***друга родина - несахароміцетів (Non-saccharomycetaceae).***

До родини *сахароміцетів* (у перекладі "цукрові гриби") належать усі справжні дріжджі, які викликають процес спиртового бродіння і можуть утворювати спори.

До родини *несахароміцетів* належать усі несправжні дріжджі, тобто дріжджі, які не здатні до спороутворення і розмножуються тільки брунькуванням.



1.5 Лабораторна робота № 1 "Методи дослідження прокаріот"

Мета роботи:

1. Ознайомитися з технікою безпеки при роботі з мікроорганізмами та обладнанням робочого місця в мікробіологічній лабораторії.
2. Підготувати до стерилізації, необхідний для подальшої роботи в лабораторії, посуд.
3. Вивчити методи дослідження мікроорганізмів.
4. Оволодіти методами приготування мікробіологічних препаратів.
5. Вивчити морфологічні форми мікроорганізмів.
6. Закріпити отримані знання при дослідженні демонстраційних препаратів.

Матеріали та обладнання:

Інструкція з техніки безпеки при роботі з культурами мікроорганізмів; журнал з техніки безпеки; мікроскоп; імерсійна олія; мікробіологічні петлі і голки; чашки Петрі; предметні скельця; покривні скельця; шпателі Дригальського; піпетки Пастера; піпетки скляні градуйовані; циліндри скляні; плоскодонні колби; полоски фільтрувального паперу.

Підготовка посуду до стерилізації:

Посуд перед стерилізацією ретельно миють, сушать і загортають в папір для збереження стерильності після прогрівання. Кожну піпетку загортають окремо в довгі смужки паперу шириною 4-5 см. У широкі кінці піпеток, попередньо вставляють ватні тампони. Обмотку починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують у кінця з тампоном. Папір має щільно охоплювати піпетку. Загорнуті піпетки для запобігання паперу від забруднення і розривів загортають по кілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали. Шпателі обгортають окремо аналогічно піпеткам, використовуючи для обмотки смужки паперу більшої ширини. Чашки Петрі загортають разом по 2-4 штуки. Колби, пробірки й інші судини закривають ватними пробками, а зверху паперовими серветками.

Посуд, підготовлений до стерилізації, завантажують в сушильну шафу не дуже щільно, щоб забезпечити циркуляцію повітря і рівномірний прогрів предметів що стерилізуються і включають нагрів. Відзначають час, коли температура в шафі досягне 165-180 °С і підтримують цю температуру протягом двох годин. При нагріванні вище 180 °С папір і пробки починають обуглюватися. Після закінчення стерилізації вимикають нагрів і не відкривають шафу до тих пір, поки температура в ній не впаде до 80 °С, так як при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу і тріснути сильно нагріте скло.

Простерилізований посуд зберігають в закритому, захищеному від пилу місці. Розгортають безпосередньо перед використанням.

1.5.1 Виготовлення мікробіологічних препаратів

При приготуванні препаратів з культури бактерій, які вирости на поживних середовищах, необхідно дотримуватися правил асептики.

Техніка взяття культури для приготування препарату

Пробірку з культурою беруть в ліву руку так, щоб поверхня живильного середовища з нальотом мікроорганізмів, що вирости, була звернена догори і добре видна (рис. 17). Пробірку тримають в горизонтальному або трохи похилому положенні. У праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і прожарюють її в полум'ї пальника (1). Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають ватяну пробку до долоні, виймають її з пробірки і тримають так під час наступних маніпуляцій (2). Краї відкритої пробірки з культурою мікроорганізмів обпалюють у полум'ї пальника (3) і після цього вводять в пробірку стерильну петлю (4). Взнявши

невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату, виймають петлю з пробірки, стежачи за тим, щоб стерпний матеріал не торкався стінок або країв пробірки.

Шийку пробірки знову обпалюють у полум'ї пальника (5), потім обпалюють ватяну пробку і закривають нею пробірку (6). Якщо кінець ватної пробки загориться, то не слід кидати пробку. Її потрібно швидко ввести в пробірку, де вата сама згасне. Ні в якому разі не можна дути на пробку, що загорілась, так як це тільки посилить горіння (!).

Закриту ватним корком пробірку з культурою ставлять в штатив, а вилучений матеріал використовують для приготування препарату або для пересіву культури в свіже середовище (7). Обпалюють петлю в полум'ї пальника (8).

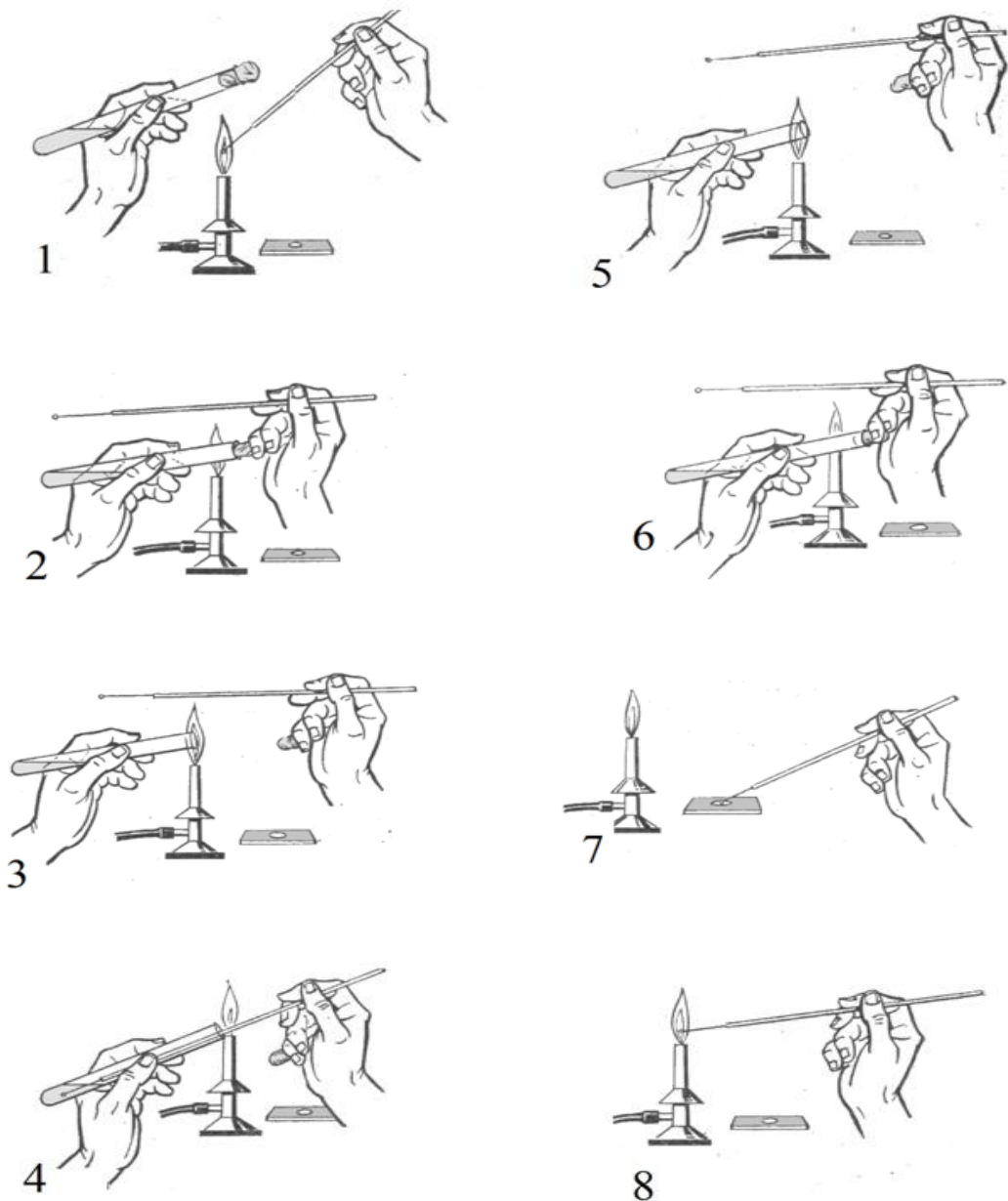


Рис. 17. Взяття культури з дотриманням правил асептики

При взятті культури, що виросла на чашці Петрі спочатку необхідно відзначити ізольовану колонію з боку дна чашки. Потім обпалюють петлю в полум'ї пальника, поблизу полум'я пальника злегка піднімають край чашки, петлею обережно відколюють частину колонії і, не зачіпаючи краю чашки, поміщають культуру на предметне скло. Обпалюють петлю.

Для приготування прижиттєвих бактеріальних препаратів використовуються методи роздавненою і висячої краплі. Методами «роздавнена» і «висяча» крапля зазвичай готують препарати великих мікроорганізмів, наприклад дріжджів і мікроскопічних грибів.

Метод «роздавненої краплі»

Метод застосовують для виявлення рухливості клітин мікроорганізмів, спостереження за розмноженням, розвитком і проростанням спор, встановлення реакції мікроорганізмів на хімічні сполуки і фізичні фактори впливу, вивчення розмірів клітин, характеру їх розташування, визначення запасних речовин в клітині (рис. 18).

1. На середину чистого, знежиреного предметного скла наносять краплю фізіологічного розчину або води.

2. У краплю води бактеріологічною петлею вносять невелику кількість бактеріальної культури і перемішують.

3. Обережно накривають покривним склом, попередньо поставивши його на ребро. Крапля тонким шаром заповнює простір між покривним і предметним склом.

4. Для видалення бульбашок повітря покривне скло обережно притискають скляною паличкою до предметного і видаляють фільтрувальним папером надлишки рідини.

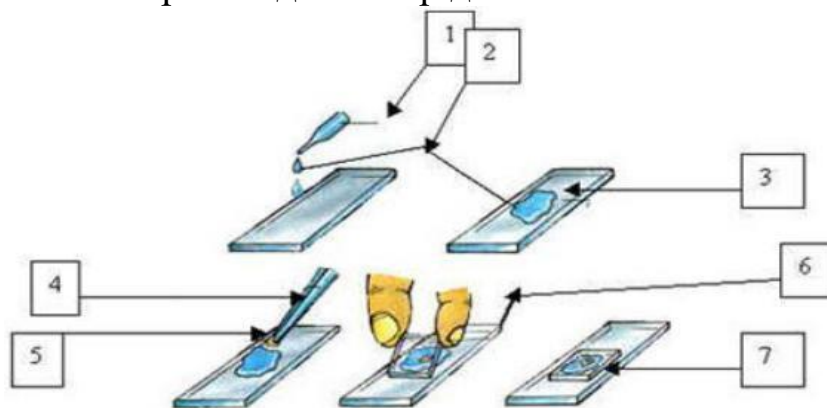


Рис. 18 - Виготовлення препарату «роздавнена крапля».

За допомогою піпетки (1) крапля води (2) наноситься на середину чистого знежиреного скла (3), куди за допомогою бактеріологічної петлі

(4) вносять культуру мікроорганізмів (5), не допускаючи розтікання рідини (6) краплю обережно накривають покривним склом (7).

Метод “висячої краплі”

1. На чисте покривне скло наносять краплю фізіологічного розчину або води.

2. Культуру мікроорганізмів наносять бактеріологічною петлею на покривне скло.

3. Беруть предметне скло з лункою і, знежирюють його, наносять тонкий шар вазеліну по краю лунки за допомогою зубочистки або скляної палички.

4. Предметне скло з лункою накладають на покривне скло з бактеріальною культурою.

5. Акуратно перевертають мазок покривним склом вгору поміщають препарат на предметний столик. Крапля вільно висить у луночці і довго не висихає, що дозволяє тривалий час спостерігати за рухливістю мікробних клітин (рис. 19).

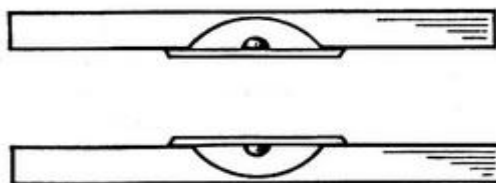


Рис. 19 - Препарат «висяча крапля»

При цьому методі фарбування об'єкта проводять «прижиттєвими» барвниками – вітальне забарвлення. Прижиттєвими фарбниками можуть служити метіленовий синій, нейтральний червоний в концентраціях від 0,001 до 0,0001 %.

Препарат «відбиток»

Для знайомства з формою спор і міцелію актиноміцетів і грибів роблять препарат «відбиток». Чисте покривне скло накладають на газон мікроорганізму, злегка натискають на нього пінцетом, і негайно ж знімають, намагаючись не зрушити в сторону. Отриманий препарат поміщають відбитком вниз в краплю води, на предметне скло і розглядають під мікроскопом в сухій системі.

Цей препарат також зручний для вивчення природного розташування клітин в колоніях мікроорганізмів.

Фіксовані препарати мікроорганізмів

Під фіксацією мається на увазі така обробка живого об'єкта, яка дає можливість швидко перервати перебіг життєвих процесів в об'єкті, зберігши його тонку структуру. В результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще фарбуються. Фіксація необхідна і в разі роботи з патогенними мікроорганізмами (в цілях безпеки).

Приготування фіксованих препаратів включає наступні етапи: приготування мазка, висушування, фіксацію і фарбування.

1. Приготування мазка. На чисте знежирене предметне скло наносять краплю водопроводної води. Прокаленою бактеріологічною петлею вносять культуру, перемішують і розмазують по скла на площі 2 – 4 см².

2. Висушування мазка. Мазок сушать на повітрі при кімнатній температурі. Якщо висушування мазка уповільнено, то препарат можна злегка нагріти в струмені теплого повітря, тримаючи його високо над полум'ям пальника. Сильне нагрівання препарату не рекомендується щоб уникнути коагуляції білків, що спотворює структуру і форму клітин.

3. Фіксація мазка. Фіксацію мазка проводять над полум'ям пальника при дослідженні форми клітин або за допомогою хімічних сполук для вивчення внутрішньої структури клітин. У першому випадку препарат три-чотири рази повільно проводять нижньою стороною над полум'ям пальника. У другому випадку – обробляють препарат 96 %-ним спиртом або сумішшю рівних частин етилового спирту і ефіру (суміш Никифорова), або рідиною Карнуа (96 % етиловий спирт + хлороформ + крижана оцтова кислота у співвідношенні 6: 3: 1).

4. Фарбування препарату. Препарат розміщують на препаратотримувачі. На мазок наносять кілька крапель барвника. Залежно від виду барвника і цілі дослідження тривалість фарбування варіює від 1 до 5 хв. Після закінчення фарбування препарат промивають водою, видаляють воду фільтрувальним папером, підсушують на повітрі і проводять мікроскопію.

1.5.2 Мікроскопія препаратів

Правила роботи із світловим мікроскопом:

1. Установіть мікроскоп у робоче положення, тобто так, щоб колонка штатива була повернена в бік дослідника, а дзеркало – у напрямку джерела світла.

2. Центруйте мікроскоп. Для цього повертайте револьвер доти, поки об'єктив малого збільшення не стане в центрі отвору предметного столика (до відчуття легкого поштовху).

3. Освітїть поле зору. Для цього, дивлячись в окуляр лївим оком і не закриваючи праве, повертайте дзеркало до джерела світла доти, поки поле зору не освїтїться рївномірно. Не слїд допускати попадання на дзеркало мікроскопа прямих сонячних променїв.

4. Покладїть препарат на предметний столик так, щоб об'єкт опинився над отвором столика під об'єктивом.

5. Дивлячись з боку, за допомогою макрогвинтів опустїть тубус так, щоб об'єктив наблизився до препарату, але не торкався його. Забороняється опускати тубус, дивлячись при цьому в окуляр, це може призвести до псування препарату та об'єктива.

6. Дивлячись в окуляр, обертом макрогвинтів у зворотній бїк (на себе), повільно піднімайте тубус, поки в полі зору не з'явиться чїтке зображення об'єкта. Відстань від об'єкта до об'єктива при малому збільшенні складає приблизно 1 см.

7. Під час роботи лїву руку тримати на мікрометричному гвинті, який злегка обертають не більше як на півоберта. Завдяки цьому досягається можливість розглядати як поверхневі, так і більш глибокі ділянки об'єкта. Препарат треба розглядати, повільно рухаючи його на предметному столику або повертаючи самий предметний столик.

8. Переходячи з малого на велике збільшення, ще при малому збільшенні покладїть у центр зору ту частину об'єкта, яку треба вивчати.

9. Обертом револьвера поставте над препаратом об'єктив великого збільшення. Дивлячись з боку, повільно і обережно опускайте тубус, щоб об'єктив(^x40) майже наблизився до препарату, але не торкнувся його. Після цього, дивлячись в окуляр, повільно піднімайте тубус до появи обрисовування предмета. Для наведення чїткостї використовуйте тїльки мікрогвинт. Відстань від об'єкта до об'єктива при великому збільшенні складає приблизно 1 мм.

10. Користуючись мікрометричним гвинтом, домагайтеся чїткого зображення об'єкта.

11. Працюючи з імерсійним об'єктивом, на предметне скло наносять краплю кедрової олії, в яку обережно занурюють об'єктив (^x90 тїльки з позначкою "ІМ"), не торкаючись ним предметного скельця, і дивлячись в окуляр, піднімають тубус мікрогвинтом до появи зображення.

Увага! При фокусуванні користуються тїльки мікрометричним гвинтом. Кедрова олія створює однорїдне середовище для заломлення світлових променїв, а це

важливо, коли розглядають препарати при великому збільшенні, тому що це додаткове оптичне середовище.

12. Не слід розгвинчувати окуляр і об'єктиви.

13. Якщо ви не бачите об'єкта під великим збільшенням, значить препарат не був точно поставлений у центрі поля зору при малому збільшенні. У цьому випадку переведіть револьвер знову у мале збільшення і повторіть роботу спочатку.

14. Переміщуючи мікроскоп, треба брати його за ручку штатива, не крутити без потреби частини мікроскопа.

15. Перед дослідженням предметів і після нього оптичну систему мікроскопа протирають марлею або м'якою серветкою.

Занурювати в імерсійну рідину можна тільки імерсійним об'єктиви (не сухі).

1.5.3 Хід роботи:

1. Приготувати препарати культури дріжджів "роздавлена крапля" і фіксований. Препарат "роздавлена крапля" підфарбувати метиленовим синім. Мікроскопіювати.

Так диференціюють живі і мертві клітини дріжджів. Мертві клітини фарбуються швидше і яскравіше за рахунок підвищення проникності клітинної оболонки. Результати замалювати в лабораторному журналі.

2. Вивчити культуральні та морфологічні ознаки цвілевих грибів. Приготувати фіксований препарат цвілевих грибів (хліб, овочі). Мікроскопіювати, замалювати.

Приготування препаратів грибів для мікроскопіювання виробляють двома обпаленими і потім охолодженими препаративними голками. Відбирають невеликий шматочок міцелію разом з плодоносними гіфами. Переносять його на добре знежирене предметне скло в краплю суміші гліцерину і етанолу (1: 1) або гліцерину і води (1: 4). Обережно, не порушуючи структури міцелію, розправляють гіфи голками, після чого накривають покривним склом і злегка притискають. Препарат переглядають з об'єктивом х40.



Oidium tuckeri

Борошниста роса, також звана оїдіумом, оїдієм або попільничкою – це досить поширене захворювання, що вражає в основному виноград. Збудником інфекції є - гриб (лат. Oidium

tuckeri). Хвороба проявляється у вигляді білястого і схожого на пил борошнистого нальоту на вегетативних органах рослин. В результаті зараження виноградної лози спорами гриба листя і суцвіття засихають, а плоди розтріскуються, приходячи в непридатність.

Для приготування препарату гриба **оїдіум** (*Oidium*) необхідно зняти (злегка зскрібаючи) голкою його білий міцелій з субстрату. При проведенні мікроскопічного дослідження слід встановити септованість (багатоклітинність) міцелію і відсутність спеціальних органів розмноження. Гриб розмножується оїдіями, які утворюються на кінцях гіф шляхом їх розчленування у вигляді безбарвних клітин прямокутної або округлопрямокутної форми. У препараті іноді можуть спостерігатися ланцюжки оїдій, що не розпалися.

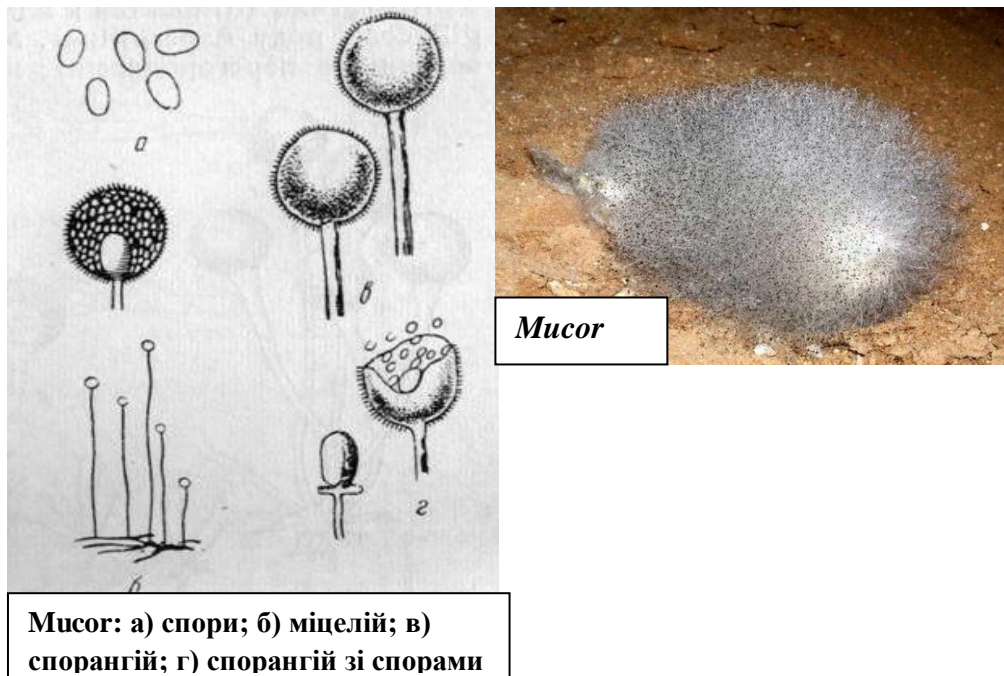
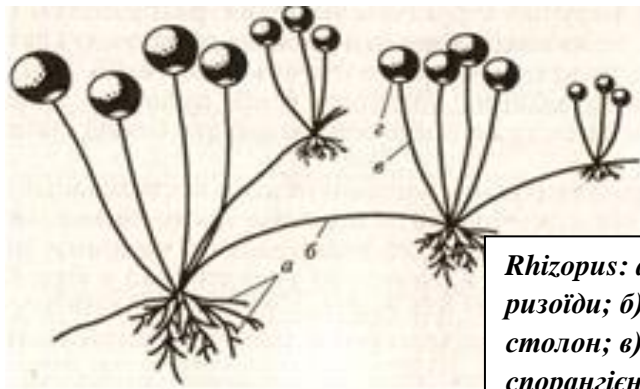


Рис. 20 - Гриб мукор (*Mucor*)

Для приготування препарату гриба **мукор** (*Mucor*) потрібно взяти його пухнастий повітряний міцелій червонувато-сірого кольору і накладати покривне скло обережно, без різкого кидка, щоб не роздавити спорангії – вмістилище спор.

До мукорових грибів відноситься **різопус** (*Rhizopus*), який відрізняється від мукора розвитком ризоїдів і столонів, які служать для захоплення нової площі.



Rhizopus: а) ризоїди; б) столон; в) спорангієносець;



Рис.21 - Гриб ризопус (*Rhizopus*)

Для приготування препарату гриба **аспергілус** (*Aspergillus*) необхідно взяти повітряний пофарбований міцелій з краю колонії.

При вивченні відзначають: розмір колоній, їх форму, щільність, будову зовнішнього краю і центру, характер поверхні, колір колоній, забарвлення суб-страта і зворотного боку колоній, виділення крапель рідини (ексудату). На щільних середовищах міцеліальні гриби утворюють округлі або широко поширені по поверхні, пухнасті, ниткоподібні, павутиноподібні, ватоподібні або мучнистоподібні колонії, що не вростають в субстрат. Вегетативний міцелій більшості видів не забарвлений. Пігментований тільки плодоносний міцелій. Тому молоді колонії мають білий або сіруватий колір. У міру розвитку органів плодоношення колонії набувають жовтий, рожевий, бежевий, червоний, зелений, чорний або інший колір.

При проведенні мікроскопічного дослідження слід виявити одноклітинну будову міцелію і органи розмноження – спорангієносці. Розглянути їх по всій довжині, пересуваючи відповідним чином препарат. Спорангієносцями мукора, як правило, є прості утворення, що відростають від грибниці поодинокі. Спорангії, що сидять на їхніх верхівках (колонках), великі, кулясті, з масою спор, які видно через тонку прозору оболонку спорангія. Спорангіоспори – одноклітинні, округлі або еліпсоїдні, гладкі, безбарвні або сіруватого кольору. У препараті завжди є багато спор, які висипалися з деяких спорангіїв що лопнули. Результати записують в таблицю:

Номер колонії	Розмір колонії	Форма колонії	Структура колонії			Характер поверхні	Колір	
			Зовнішній край	Центр	Профіль		повітряного міцелію	субстратного міцелію

Розмір (діаметр) вимірюють лінійкою в міліметрах: дрібні, точкові – найменш 1 мм; колір колоній і субстрат під колоніями (від білосніжного до темного); форма - буває кругла, овальна і т.д; край – в міру необхідності встановлюють за допомогою лупи; поверхня – буває гладка, зерниста, зморшкувата, концентрично або радіально покреслена, горбиста, борошниста, матова, блискуча, волога, суха і ін.; прозорість – буває прозора, напівпрозора, непрозора; структура колонії – буває однорідна, дрібнозерниста, волокниста тощо; профіль – буває вигнутий, схожий на краплю, тонкий, опуклий, увігнутий; суміш (визначають при торканні поверхні колонії бактеріальної петлею) – буває щільна, м'яка, тягуча, тістоподібна і ін. (див. 4.1, рис. 44-45).

Колонії, що розрізняються хоча б однією з зовнішніх ознак, слід розглядати як різні типи. Кожен вид мікробів має повністю певний тип колонії, тому за кількістю типів колоній в чашках Петрі можна орієнтовно судити про різноманітність видового складу бактеріальний флори досліджуваного продукту.

При вивченні окремих збудників пліснявиння харчових продуктів і промислових товарів необхідно вміти розпізнавати їх: встановити назву, приналежність до того чи іншого класу, сімейству, роду, виду.

Товарознавці харчових продуктів і непродовольчих товарів найчастіше оперують назвою роду гриба. Рід гриба визначається за ключем:

Ключ для визначення пліснявих грибів до роду

1. Гриби розмножуються спорангіоспорами, що знаходяться всередині спорангіїв – (2).

2. Гриби розмножуються конідіями, що утворюються зовні на особливих конидієносцях, рідше прямо на міцелії, – (5). Спорангієносцями, що несуть спорангії, зазвичай прості, рідше просто розгалужені. Спорангії всі однакові – (3). Спорангієносцями розгалужені. Спорангії двох видів: великі на головній осі і дрібні (спорангіоли) на бічних гілках – (4).

3. Спорангієносці поодинокі, прості, іноді розгалужені. Спорангії дрібні або великі, завжди однорідні, безбарвні або пофарбовані. Спори круглі або еліпсоїдні, гладкі, безбарвні або сіруваті. Мукор (Mucor). Спорангієносці розташовані куциками, що виростають на столонах з

одного центру, з великими чорними головками. Спори сірі, округло-яйцеподібні, зморшкуваті. Різопус (*Rhizopus*).

4. Кущоподібні гілки розташовані мутавчато на головній осі спорангієносцями в один або кілька ярусів. Місця відгалуження не роздуті. Спори циліндричні і еліпсоподібні, безбарвні. Тамнідіум (*Thamnidium*).

5. Конідії утворюються на особливих конідієносцях, відмінних від звичайних вегетативних гіф – (6). Конідієносці або мало відрізняються від звичайних гіф, або їх немає зовсім, і конідії утворюються прямо на міцелії – (14).

6. Конідієносці рясно гілкуються по-різному – (7). Конідієносці не розгалужуються або іноді гілкуються, але слабо. Розгалуження просте, вильчате або кущеподібне – (9).

7. Галуження деревоподібне – (8). Галуження кистевидне або багаторазово вильчате, конідії розташовуються ланцюжками, гладкі, безбарвні або пофарбовані, округлі. Пеніциліум (*Penicillium*).

8. Конідієносці деревовидно-розгалужені, великі. Гілки розташовуються безладно, конідії на кінцях гілок розвиваються кущиками, безбарвні, яйцевидні, гладкі. Ботритіс (*Botrytis*). Конідієносці деревовидно-розгалужені. Гілки розташовуються мутавчато. Конідії утворюються пучками або поодиноці, еліпсоїдальні або витягнуто-яйцеподібні, безбарвні або слабофарбовані. Вертициліум (*Verticillium*).

9. Конідієносці нерозгалужені, довгі з кущиками великих грушовидних конідій на кінці. Конідії двоклітинні, безбарвні або рожеві. Колонії гриба жовто-рожеві. Трихотеціум (*Trichotecium*). Конідієносці і конідії іншої форми – (10).

10. Конідієносці розгалужуються. Розгалуження просте, рідше вильчате – (11). Прості (Як виняток, просто розгалужені). Конідієносці мають на кінці булавовидне або бульбашковидне здуття, іноді таке здуття відсутнє – (12).

11. Конідії великі, неправильної форми, усіяні бородавочками, розташовані ланцюжками, пофарбовані в коричневий колір. Колонії на початку пухнасті, потім слизові, з сильним неприємним запахом. Акауліум (*Acaulium*). Конідії безбарвні, довгі, серпоподібні, багатоклітинні (з поперечними перегородками), іноді розташовані ланцюжком одна за одною або з'являються прямо на міцелії. Дерновинки гриба часто пофарбовані в рожевий колір (особливо нижня сторона). Фузаріум (*Fusarium*).

12. Кінці конідієносців булавовидно або пузиревидно роздуті і кругом покриті стеригмами, що несуть ланцюжки конідій, – (13). Розширення на кінці часто відсутні, стеригми розташовуються тільки на вершині конідієносців, але не ростуть на всі боки. Конідії дрібні,

округлі, гладкі, безбарвні, на стерігмах розташовуються ланцюжками. Цітромаїцес (Cytromyces).

13. Стерігми, що покривають булавоподібні здуття, прості, нерозгалужені, несуть ланцюжки конідій. Конідії округлі, гладкі або шипуваті, пофарбовані або безбарвні. Аспергіллус (Aspergillus).

14. Конідії утворюються прямо на міцелії – (16). Конідії утворюються на конідієносцях, мало відрізняються від звичайних гіф, – (15).

15. Конідієносці видно лише при культурі в "висячій краплі". Конідії легко розсипаються – (17). Місця утворення конідій видно в звичайному мікроскопічному препараті – (18).

16. Одноклітинні конідії, безбарвні, веретеноподібні або округлопродовгуваті. Конідії слизові, чорні. Дематіум (Dematium). Конідії одноклітинні, яйцеподібні, дріжджеподібні. Молоді колонії схожі на дріжджеподібні, потім стають кошлатими. Монілії (Monilia).

17. Конідії виходять простим поділом міцелію і легко відпадають, безбарвні, прямокутні, іноді з'єднані в короткі ланцюжки. Оїдіум (Oidium). Конідієносці довгі, багатоклітинні. Конідії неправильної форми (довгі, округлі або лимоноподібні), пофарбовані в світлий оливковозелений колір. Кладоспоріум (Cladosporium).

18. На повільно зростаючих колоніях немає справжніх конідієносців. Дрібні, блискучі, жовто-коричневі конідії утворюються дуже довгими ланцюжками на кінцях звичайних гіф. Катенуларія (Catenularia). Великі, багатоклітинні, округло-грушоподібної або загострено-витягнутої форми конідії утворюються в поодинці або короткими ланцюжками на коротких бічних гілках вегетативних гіф, що грають роль конідієносців. Альтернарія (Alternaria).

3. Приготувати фіксований препарат молочнокислих бактерій (кефір, йогурт). Мікроскопіювати і замалювати.

При приготуванні мазка з кефіру і йогурту матеріал прожареною петлею наносять на середину предметного скла. До краплі потрібно присунути під кутом 45 ° інше предметне скло. Щільно притискаючи це скло в тому ж положенні під кутом, просунути його наліво по предметному склу з досліджуваним матеріалом. Виходить рівномірно розподілений по поверхні скла мазок. Забарвлення препарату провести за допомогою метиленового синього. Кількість фарби має покрити всю поверхню мазка. Забарвлення проводиться протягом 3 - 5 хвилин.

* Якщо ознаки визначаємого гриба підходять під ознаки, що описані в пункті, то слід переходити до пункту що зазначено у дужках та продовжувати визначення шляхом обирання (в цьому пункті) опису, що підходить.

Після закінчення терміну фарбування зайву фарбу злити з препарату та промити його легким струменем водопровідної води. Частину води, що залишилася на склі обережно видалити фільтрувальним папером. Пофарбований мазок повинен бути абсолютно сухим.

4. Приготувати препарат «роздавлена крапля» настою гороху або картоплі і вивчити форми бактерій.

Звернути увагу на характер спороутворення, руху паличковидних форм. Зробити замальовки в лабораторному журналі.

Контрольні питання до лабораторного заняття 1

1. Основні правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами.
2. Види устаткування, яке застосовується в мікробіологічній лабораторії.
3. Пристрій оптичної частини мікроскопа.
4. Основні технічні характеристики мікроскопа.
5. Порядок роботи з мікроскопом.
6. Особливості імерсійного об'єктива мікроскопа і правила роботи з ним.
7. Способи стерилізації посуду та інструментів.
8. Види термічної стерилізації.
9. Хімічна стерилізація.
10. Стерилізація фільтруванням.
11. Використання випромінювань для стерилізації.
12. Які об'єкти, підлягають пастеризації, при якій температурі її проводять і протягом якого часу?
13. У яких випадках застосовують метод тиндалізації?
14. У якому апараті проводять стерилізацію сухим жаром?
15. Перерахуйте фізичні методи стерилізації.
16. Що таке асептика?
17. Що таке антисептика?
18. Назвіть хімічні речовини, які найбільш часто застосовуються для дезінфекції.
19. Умови, необхідні для вирощування мікроорганізмів: температура, аерація, кислотність середовища.
20. Як впливає на мікроорганізми зміна вологості навколишнього середовища?
21. Які групи мікроорганізмів виділяють в залежності від показників оптимальної температури їх зростання?
22. За якою основною ознакою вчені ділять клітинні форми життя на прокаріоти і еукаріоти?
23. Основні групи кулястих бактерій.
24. Основні групи паличковидних бактерій.

25. Будова тіла грибів.
26. Що таке міцелій?
27. Особливості мікроорганізмів, що відносяться до групи дріжджів.
28. Що вивчає морфологія мікроорганізмів?
29. У чому відмінність прокаріотної клітини від еукаріотної?
30. Основні морфологічні типи бактерій. Використання морфологічних характеристик в ідентифікації мікроорганізмів.
31. Яку будову має дріжджова клітина?
32. Якими способами розмножуються дріжджі?
33. У чому відмінність культурних і диких дріжджів?
34. Як відбувається розмноження мікроскопічних міцеліальних грибів?
35. Назвіть ознаки характерні для грибів і спільні з рослинами і тваринами.
36. До якого царства - еукаріотів або прокаріотів - відносяться гриби?
37. За допомогою яких органел пересуваються бактерії?
38. У чому подібність і відмінності грибів з рослинами, з тваринами?
39. У чому полягають відмінності у функціях спор у бактерій і грибів?
40. Методика приготування препарату «роздавлена крапля» живої культури мікроорганізмів.
41. Методика приготування препарату "висяча крапля".
42. Методика приготування фіксованого препарату мікроорганізмів.

РОЗДІЛ 2. ЦИТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

2.1 Морфологія структури клітини прокаріотів

Вивчення морфології мікроорганізмів в пофарбованому стані є найбільш поширеним в мікробіології методом. Цей метод дозволяє вивчити морфологічні особливості клітин мікроорганізмів і дає можливість знайти відмінності між ними, а іноді – точно визначити досліджуваний мікроорганізм. Крім того, цей метод зручний в практичній роботі і легко доступний завдяки простоті техніки фарбування.

Обов'язковими органоїдами бактеріальної клітини є: нуклеоїд, цитоплазма, цитоплазматична мембрана.

Необов'язковими структурними елементами є: клітинна стінка, капсули, спори, пілі, джгутики.

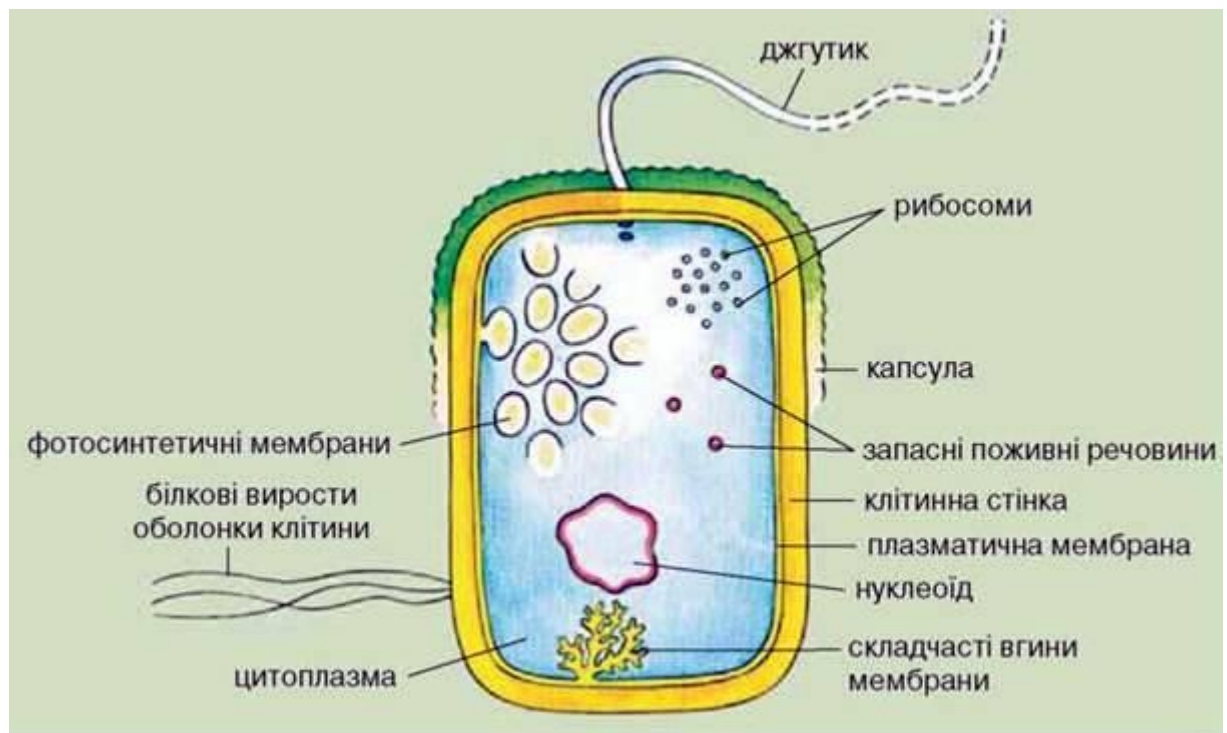


Рис. 22 - Морфологія клітини прокаріот

У центрі бактеріальної клітини знаходиться нуклеоїд - ядерне утворення, представлене найчастіше однією хромосою кільцеподібної форми. Складається з двохланцюгової нитки ДНК. Нуклеоїд не відокремлений від цитоплазми ядерною мембраною.

Цитоплазма – складна колоїдна система, яка містить різні включення метаболічного походження (зерна волютину, глікогену, гранулези та ін.), рибосоми та інші елементи білоксинтезуючої системи, плазмиди (позануклеоїдне ДНК), мезосома (утворюються в результаті інвагінації цитоплазматичної мембрани в цитоплазму, бере участь в

енергетичному обміні, спороутворенні, формуванні міжклітинної перетинки при розподілі).

Цитоплазматична мембрана обмежує із зовнішнього боку цитоплазму і виконує ряд найважливіших функцій – бар'єрну (створює і підтримує осмотичний тиск), енергетичну (містить багато ферментні системи – дихальні, окислювально-відновлювальні, здійснює перенесення електронів), транспортну (перенесення різних речовин в клітку і з клітки), рецепторну і сигнальну.

Клітинна стінка – властива більшості бактерій (крім мікоплазм і деяких інших, які не мають справжньої клітинної стінки, мікроорганізмів). Вона має низку функцій, перш за все, забезпечує механічний захист і постійну форму клітин, з її наявністю в значній мірі пов'язані антигенні властивості бактерій. Основна хімічна сполука клітинної стінки, яка специфічна тільки для бактерій – пептидоглікан (муреїн).

Від структури і хімічного складу клітинної стінки бактерій залежить важлива для систематики ознака бактерій - відношення до фарбування за Грамом. Відповідно до нього виділяють дві великі групи - грампозитивні (грам +) і грамнегативні (грам-) бактерії (рис. 23). Стінка грампозитивних бактерій після фарбування по Граму і подальшому промиванні етанолом зберігає комплекс йоду з генціанвіолетом і магнієвими солями рибонуклеїнових кислот (пофарбовані в синьофіолетовий колір), грамнегативні бактерії втрачають цей комплекс і відповідний колір після обробки і фарбуються в рожевий колір за рахунок докрасування фуксином.

Особливості клітинної стінки грампозитивних бактерій: потужна, товста, нескладно організована клітинна стінка, в складі якої переважають пептидоглікан і тейхоеві кислоти, немає ліпополісахаридів (ЛПС), часто немає діамінопімелінової кислоти.



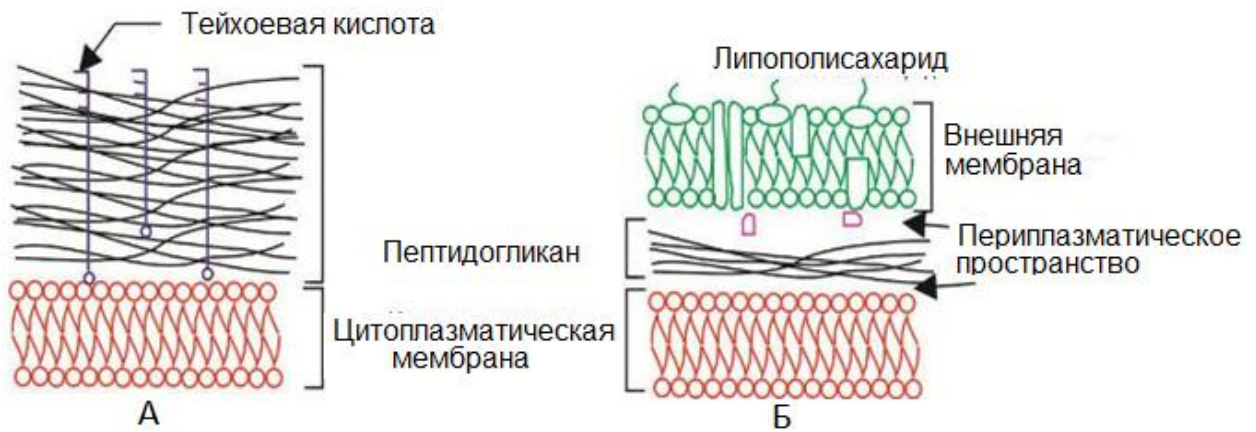
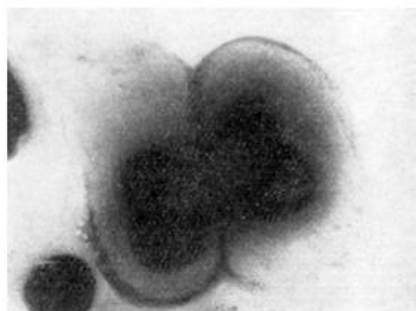


Рис 23 - Будова клітинної стінки Гр+ (А) і Гр- (Б) – бактерій.

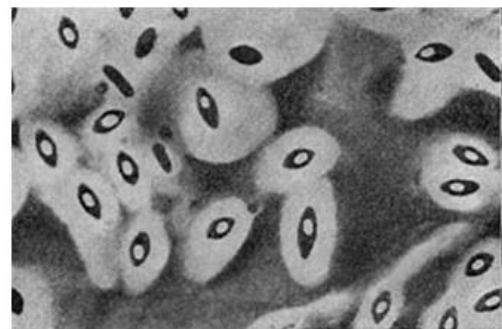
Особливості клітинної стінки грамнегативних бактерій: **клітинна стінка значно тонша**, ніж у грампозитивних бактерій, містить ЛПС, ліпопротеїни, фосфоліпіди, **діамінопімелінову кислоту**. Влаштована більш складно – є зовнішня мембрана, тому клітинна стінка тришарова.

При обробці грампозитивних бактерій ферментами, які руйнують пептидоглікан, виникають повністю позбавлені клітинної стінки структури – протопласти. Обробка грамнегативних бактерій лизоцимом руйнує тільки шар пептидоглікану, не руйнуючи повністю зовнішньої мембрани; такі структури називають сферопластами.

До поверхневих структур бактерій відносяться капсула, джгутики, мікрворсинки.



Капсула навколо клітин
Azotobacter chroococcum



Капсула навколо клітин *Clostridium*

Рис. 24 - Капсули

Капсула або слизивий шар оточує оболонку ряду бактерій. Капсула є захисною структурою (насамперед від висихання), у ряді мікроорганізмів – фактором патогенності, перешкоджає фагоцитозу, пригнічує перші етапи захисних реакцій – розпізнавання і поглинання. У сапрофітів капсули утворюються в зовнішньому середовищі, у патогенів – частіше в організмі господаря. Існує ряд методів

забарвлення капсул залежно від їх хімічного складу. Капсула частіше складається з полісахаридів, рідше – з поліпептидів.

Джгутики. Рухливі бактерії можуть бути ковзаючі (пересуваються по твердій поверхні в результаті хвилеподібних скорочень) або плаваючі, що пересуваються за рахунок ниткоподібних спірально вигнутих білкових (флагеллінових за хімічним складом) утворень – джгутиків.

Фібрії або вії – короткі нитки, у великій кількості оточуючі бактеріальну клітину, за допомогою яких бактерії прикріплюються до субстрату (наприклад, до поверхні слизових оболонок).

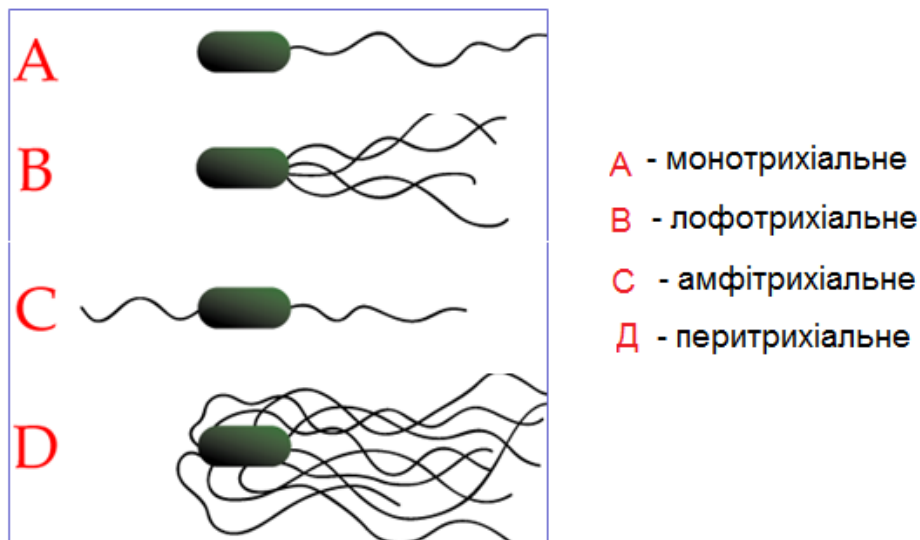


Рис. 25 Основні типи розташування джгутиків

Пілі – ниткоподібні білкові структури, жорсткі, закріплені в клітинній стінці. Сприяють адгезії мікробних клітин на субстраті. Пілі другого типу мають таку саму будову, забезпечують кон'югацію у бактерій (F-пілі (фактор фертильності)). Вони передають генетичну інформацію від F + до F- бактерій. Пілі третього типу мають дуже велику довжину. На цих пілях адсорбуються бактеріофаги. Вони беруть участь в процесах лізису бактерій і передачі генетичної інформації.

Таксис— рухливі реакції у відповідь на різні стимули, властиві організмам, які вільно пересуваються, деяким клітинам і органоїдам.

Фототаксис – реакція рухливих мікроорганізмів у відповідь на світловий стимул. Характерний для бактерій, слизових грибів, синьо-зелених водоростей. За характером руху розрізняють 2 основних типи: топотаксис і фоботаксис. При топотаксисі клітини рухаються наведено до джерела світла (позитивний топотаксис) або від нього (негативний), при фототаксисі клітина змінює напрямок руху на

протилежний на межі ділянок з різною освітленістю (шокова реакція, реакція «переляку»).

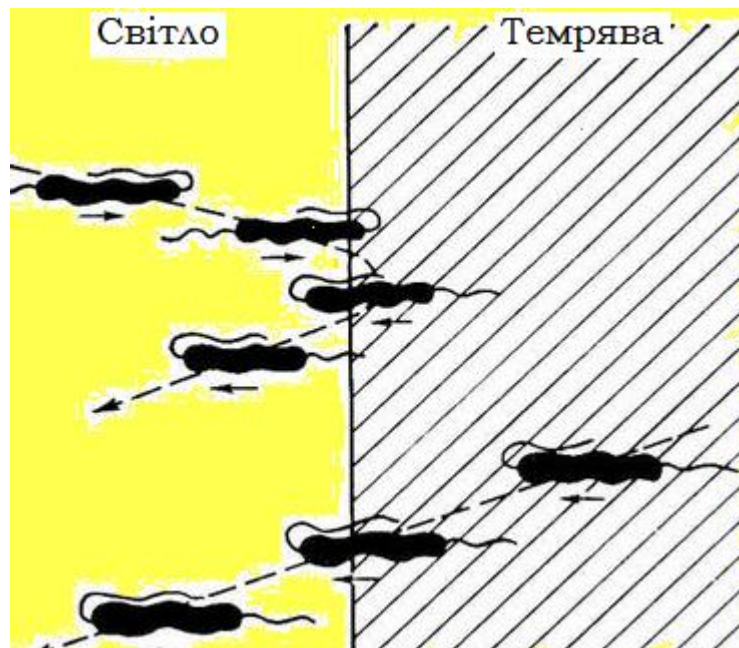


Рис. 26 - Фототаксис

Хемотаксис – рух одноклітинних організмів або рухомих клітин багатоклітинних у відповідь на хімічний подразник. Характерний для бактерій, водоростей, грибів, бактерій бродіння і гниття

Бактерії здатні реагувати не на будь-які хімічні сполуки, а тільки на певні і різні для різних бактерій. Такі речовини називають **хемоефекторами**. Серед **ефекторів** є речовини, які залучають бактерії, – атрактанти, і речовини що їх відлякують – репеленти.

У багатьох мікроорганізмів, вирощених в результаті обмінних процесів в цитоплазмі утворюються включення. До них відносяться відкладення жиру, поліоксімаляної кислоти, волютина (поліфосфатів), крохмалеподібних полісахаридів (глікогену, гранулези), сірки та інших речовин.

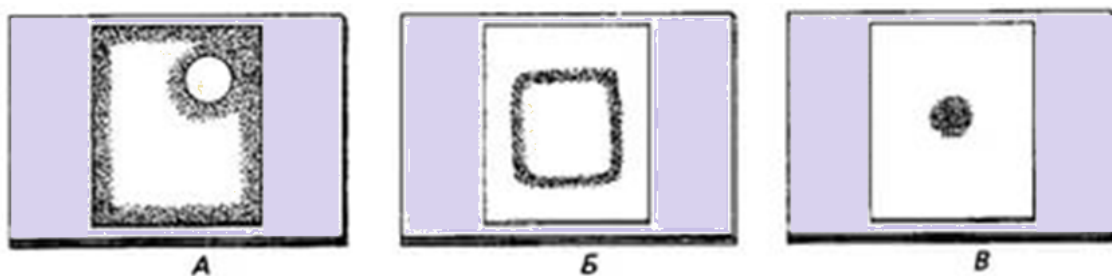


Рис. 27 Хемотаксис

Рух по градієнту концентрації називається позитивним хемотаксисом, проти – негативним хемотаксисом.

Позитивний хемотаксис викликають речовини – атрактанти, а негативний – репеленти. Оскільки деякі, потрібні клітинам, сполуки в концентрованому виді небезпечні, напрям хемотаксису залежить не лише від градієнта, але і від абсолютних показників концентрації певної речовини. Наприклад, хлорид натрію викликає позитивний таксис в слабкому розчині і негативний – у концентрованому (осмотаксис, обумовлений концентрацією солей).

До хемотаксису відноситься також аеротаксис, обумовлений киснем. Аеробні бактерії рухаються по градієнту кисню, а анаеробні – проти.



Аеробні бактерії скупчуються біля краю покривного скельця і навколо бульбашек повітря, які потрапили до середовища (А). Мікроаерофільні бактерії залишаються на деякій відстані від краю покривного скельця (Б). Строго анаеробні бактерії скупчуються в центрі (В)

Рис. 28. Аеротаксис

2.2 Забарвлення бактерій за Грамом. Способи фарбування включень, цитоплазми і структур мікроорганізмів

Приготування забарвленого препарату включає приготування мазка, фіксацію мазка і фарбування препарату.

При фарбуванні мазка препарат поміщають на препаратотримувач. На мазок наносять кілька крапель барвника. Залежно від виду барвника і цілі дослідження тривалість фарбування змінюється від 1 до 5 хвилин, в окремих випадках до 3 хвилин і довше. Після закінчення фарбування препарат промивають водою, фільтрувальним папером видаляють залишки води, підсушують на повітрі і проводять мікроскопію. Проникнення фарби в мікробну клітину (фарбування препаратів мікробів) не є механічним процесом.

Механізм забарвлення слід розглядати як фізико-хімічний процес. З'єднання протопласта мікробної клітини з барвником є в більшості випадків досить міцним, не піддається руйнуванню або простому

вимивання водою. У ряді випадків різні складові частини клітини вибірково фарбуються різними барвниками.

Барвники ділять на позитивні і негативні. Позитивні барвники забарвлюють клітини (при кімнатній температурі протягом 30-60 секунд), негативні – простір, що оточує мікроорганізми. В результаті клітини виглядають силуетами на тлі барвника.

Для фарбування мікроорганізмів застосовують кислі і основні барвники. Перші вступають в реакцію з речовинами основної, другі – кислотної природи. Оскільки в білках є основні групи (NH_2) і кислотні (COOH) радикали, клітинні структури добре фарбуються і тими і іншими барвниками.

З основних барвників в мікробіології найбільш часто застосовують: червоні – нейтральний червоний, сафранін, фуксин; сині – метиленова синь; фіолетові – генціан фіолетовий, кристалічний фіолетовий; зелені – метиленовий зелений, малахітовий зелений; брунатні – везувін, хризоїдін; чорні – індулін.

Кислі барвники можуть бути такими: червоні і рожеві – кислий фуксин, еритрозин; чорні – нігрозин; жовті – конго, флуоресцин.

Існують прості і диференційовані способи забарвлення фіксованих препаратів мікроорганізмів. При простих методах забарвлення використовується один барвник, при цьому забарвлюється вся клітина і добре видно її форми і розміри. Складні методи полягають в послідовному фарбуванні двома або кількома барвниками, при цьому забарвлюється не вся клітина, а лише певні її структури, наприклад ядерний апарат. В правильно пофарбованому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а забарвленими виявляються тільки клітини мікроорганізмів або їх структури.

Забарвлення за Грамом

Вперше запропоновано в 1884 р. датським вченим Х. Грамом для виявлення бактерій в гістологічних зрізах. В основі механізму забарвлення за Грамом лежать особливості хімічного складу і будови клітинних стінок бактерій.

Суть методу полягає в тому, що при обробці генціанвіолетом і йодом в клітинах одних мікроорганізмів утворюється відносно стійкий і нерозчинний в спирті комплекс, який утримується ними при обробці спиртом. Ці мікроорганізми відносять до грампозитивних, вони залишаються забарвленими на синьо-фіолетовий колір. Грамнегативні бактерії знебарвлюються спиртом, їх виявляють, додатково фарбуючи контрастною фарбою (водним фуксином).

Для забарвлення беруть клітини молодих (18 – 24 год.) культур бактерій, тому що з віком в бактеріальній популяції збільшується

кількість мертвих клітин, які завжди грамнегативні, а деякі грампозитивні бактерії стають грамнегативними (наприклад, *Lactobacillus*).

2.3 Лабораторна робота № 2. Забарвлення бактерій за Грамом. Методи дослідження органоїдів, структурних елементів і включень мікроорганізмів

Мета роботи: набуття навичок приготування фіксованих забарвлених препаратів мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: мікроскоп; імерсійне масло; предметні і покривні скла; бактеріологічні петлі і голки; крапельниці з барвниками; реактив Нікіфорова; стерильні піпетки; препаратотримувач; кристалізатор; фільтрувальна папір; 5 % розчин сірчаної кислоти; 1 % розчин сірчаної кислоти; 5 % розчин хромової кислоти.

Хід роботи:

2.3.1 Забарвлення за Грамом

На знежирене предметне скло нанести тонкий мазок досліджуваного матеріалу (*Bacillus mesentericus*, *Lactococcus lactis*). Мазок висушити на повітрі, зафіксувати над полум'ям спиртівки і фарбувати протягом 2 хвилин фенольним розчином генціан фіолетового (або кристалічного фіолетового), тримаючи скло в похилому положенні. Злити барвник і, не промиваючи препарат водою, нанести на нього розчин Люголя на 2 хвилини (до почорніння мазка). Скло і в цьому випадку тримати в похилому положенні.

Злити розчин Люголя і, не промиваючи водою, обробити, безперервно похитуючи скло, 96 % спиртом протягом 30–60 секунд (час впливу спирту істотний, тому що при перевищенні зазначеного терміну знебарвлюються і грампозитивні клітини, а при недостатньому терміні обробки препарат виявляється перефарбованим) і відразу промити препарат водою. Потім слід дофарбувати препарат фуксином Пфейфера протягом 2 хвилин. Злити надлишок барвника і промити водою.

Висушити препарат фільтрувальним папером і досліджувати з імерсійною системою. Після цієї обробки грампозитивні мікроорганізми забарвлюються на синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні набувають рожеве забарвлення.

Визначення належності бактерій до грампозитивних або грамнегативних можна проводити за допомогою експрес-аналізу з 3 % розчином КОН. Для цього на предметне скло поміщають краплю розчину лугу в яку вносять бактеріологічною петлею досліджувану

культуру і перемішують протягом 60 сек. Якщо суспензія мікроорганізмів в лугу стає в'язкою або желеподібною, то культура відноситься до грамнегативних, в іншому випадку – до грампозитивних.

2.3.2 Виявлення кислотостійкості у бактерій

Кислотостійкість – властивість характерна для мікобактерій, нокардій і деяких актиноміцетів. Вона пов'язана з особливостями хімічного складу клітинних стінок, головним чином з наявністю в них складних ліпідів і міколових кислот. Ця властивість полягає в збереженні забарвлення клітинами цих бактерій при обробці їх кислотою.

Найбільшого поширення набув спосіб виявлення кислотостійкості за **Ціль-Нільсеном**: На фіксований приготований звичайним способом мазок помістити смужку фільтрувального паперу, рясно змочити папір карболовим фуксином Циля і нагрівати препарат над полум'ям протягом 5 хвилин. Не допускати висихання препарату, при необхідності в нього потрібно додати одну – дві краплі води. Не доводити також барвник до кипіння. Як тільки з'являться пари, препарат відводять в сторону.

Після закінчення фарбування і охолодження препарату папір видалити, а мазок промити водою до зникнення барвника в стоці. Потім препарат промокнути фільтрувальним папером і занурити на 3–5 секунд в 5% розчин сірчаної кислоти. Знову промити водою, промокнути папером і дофарбувати протягом 3–5 хвилин метиленовим синім Леффлера. Препарат ретельно промити водою, висушити і досліджувати з імерсійною системою. Кислотостійкі бактерії забарвлюються на червоний колір, а некислотостійкі – на синій.

2.3.3 Методика фарбування капсул

Клітини багатьох мікроорганізмів оточені капсулою або слизом. Ці структури мають консистенцію гелю, їх погано видно при мікроскопії живих клітин. Для виявлення капсул застосовують спосіб негативного забарвлення за допомогою рідкої туші, при цьому на забарвленому тлі спостерігаються незабарвлені капсули навколо клітин.

А) Виявлення капсул за методом Буррі (рис.29). Нанести на предметне скло трохи культури (1) і краплю туші (2) на відстані приблизно однієї третини від краю. Правою рукою приставити шліфоване скло вузьким краєм до скла зліва від крапель під кутом 45 °. Просунути шліфоване скло вправо до зіткнення з краплею, потім швидким рухом справа наліво зробити мазок. Крапля повинна бути невеликою і такою, щоб весь мазок містився на склі, не доходячи 1–1,5

см до його краю. Не можна припиняти розмазування і забирати скло раніше, ніж крапля буде вичерпана. Мазок висушити на повітрі і мікроскопувати.

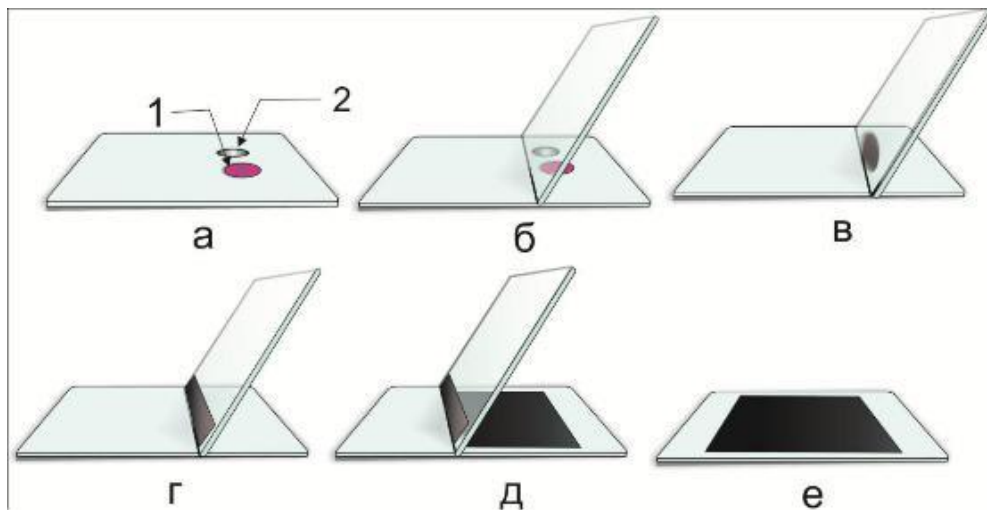
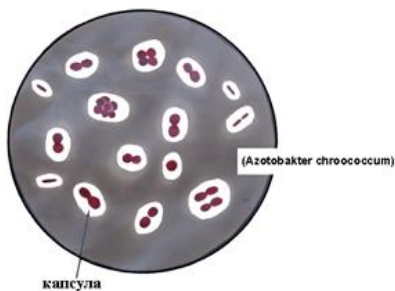


Рис. 29 - Розтяжка мазка

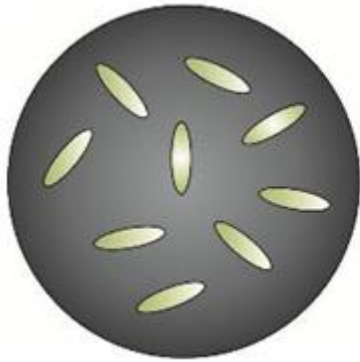
Б) Виявлення капсул за методом Буррі-Гінса. Приготувати мазок на предметному склі за методом Бурі. Висушити на повітрі. Фіксувати з сумішшю Нікіфорова (спирт і ефір 1: 1) на 15–20 хв. Обережно промити водою. На мазок нанести фуксин на 3–5 хв. Промити водою. Висушити на повітрі. Мікроскопувати з імерсією.



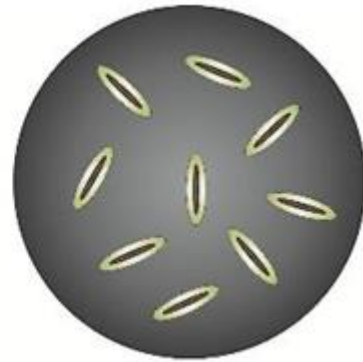
Увага! Фільтрувальним папером не користуватися, щоб не пошкодити препарат.

*На тлі чорної туші в препараті чітко виділяються рожево-малинові клітини азотобактера (*Azotobacter chroococcum*), оточені безбарвними капсулами великих розмірів. Клітини мають паличкоподібну форму або у вигляді великих коків, з'єднаних попарно і покритих загальної капсулою.*

Препарат за Буррі-Гінсом під мікроскопом: фон чорний, клітини бактерій червоні, капсули незабарвлені (барвники не сприймають).



Забарвлення за Буррі



Забарвлення за Буррі-Гінсом

Рис. 30 – Препарати для виявлення капсул у бактерій

2.3. Фарбування включень клітин мікроорганізмів

Запасні речовини в клітинах мікроорганізмів (включення) можуть бути представлені гранулами полісахаридів. У клітинах дріжджів накопичуються включення глікогену. Для збагачення дріжджових клітин глікогеном їх вирощують на солодовому середовищі. Вуглевод **гранульоза** (крохмалеподібна речовина) накопичується в клітинах маслянокислих бактерій. Об'єктом дослідження може служити накопичувальна культура маслянокислих бактерій.

Її отримують у такий спосіб: *за трос – четверо діб до заняття в пробірці поміщають дрібно нарізану неочищену картоплю (1/3 пробірки), на кінчику ножа вносять крейду і доливають доверху водопровідною водою. Пробірки поміщають на водяну баню при 70 °С нагрівають 10 хвилин, потім охолоджують і ставлять в термостат при 30 °С.*

Запасна речовина мікроорганізмів може бути представлена також поліфосфатами – **волютином**. Волютин це запасна фосфор- і азотовмісна речовина, похідне нуклеїнової кислоти. Характерна його властивість – спорідненість до основних барвників і **метахромазія**, тобто здатність набувати інший колір, ніж колір забарвленої речовини. У клітинах прокаріотів волютин локалізований в цитоплазмі, в клітинах еукаріот – в вакуолях.

Фарбування гранул.

До краплі суспензії дріжджів на предметному склі додати краплю розчину Люголя. Препарат накрити покривним склом і мікроскопувати з сухими об'єктивами x10, x40. Гранули крохмалеподібних речовин забарвлюються на синій колір, а гранули глікогеноподібних – на червоно-брунатний.

Фарбування волютину і метакроматину.

Для виявлення волютину у дріжджів застосовують такий метод. Фіксований в полум'ї спиртівки мазок забарвлюють метиленовим синім протягом 3 хвилин. Барвник злити, препарат промити водою і не висушуючи, нанести на мазок невелику краплю 1 % розчину сірчаної кислоти. Мазок накрити покривним склом і мікроскопувати з сухими об'єктивами x10, x40.

Для виявлення волютину у бактерій використовують **метод Омелянського**. Приготувати тонкий мазок клітин, висушити його на повітрі, зафіксувати в полум'ї спиртівки. На фіксований мазок налити карболовий фуксин (фуксин Ціля) і фарбувати клітини протягом 1 хвилини. Розчин барвника злити, промити препарат водою і знебарвити 1 % розчином сірчаної кислоти протягом 20–30 секунд. Потім кислоту злити, препарат промити водою і додатково дофарбувати 30 секунд метиленовим синім. Знову промити водою, висушити і мікроскопувати з імерсійною системою. Гранули волютину мають червоний колір, їх добре видно на тлі синьої цитоплазми.

Фарбування гранулези і глікогену.

Для виявлення глікогену готують мазок, сушать на повітрі, фіксують розчином Нікіфорова протягом 5 хвилин. Мазок забарвлюють розчином Люголя протягом 1-2 хв. Промивають водою, накривають покривним склом і проводять мікроскопію з імерсією. Гранули глікогену забарвлюються на червоно-брунатний колір. Якщо препарат нагріти до 60 °С, забарвлення глікогену зникає, а при охолодженні препарату відновлюється.

Для виявлення гранульози на предметне скло наносять краплю досліджуваного матеріалу і додають краплю розчину Люголя. Препарат закривають покривним склом і проводять мікроскопію. Включення гранульози забарвлюються на сіро-синій колір.

2.3.5 Фарбування спор у бактерій

Розташування спор в клітці і зовнішній вигляд клітини із спорою – видова ознака. Форма спори – округла або овальна. Вони можуть бути розташовані в центрі (центральне положення), зміщені ближче до одного з кінців клітини (проміжне, або субтермінальне положення) і перебувати на одному з її кінців (кінцеве, або термінальне положення) – рис. 31.

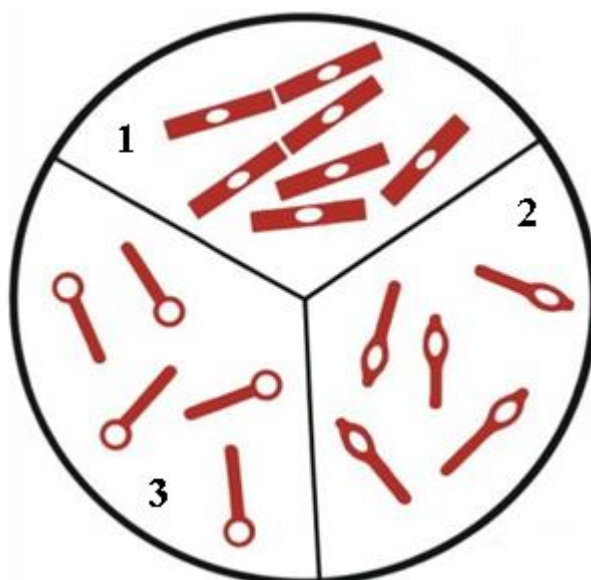


Рис. 31 - Спороутворення

1 – бацилярне; 2 – клостридiальне; 3 – плектрiдiальне

1. Бацилярне – присутність спори не змінює зовнішнього вигляду клітини, тому що її діаметр не більше діаметра вегетативної частини клітини;

2. Клостридiальне – діаметр спори більший за діаметр вегетативної частини, клітка розширена в місці знаходження спори, при цьому клітина має вигляд веретена або лимону;

3. Плектрiдiальне – спора знаходиться на кінці клітини, її діаметр більший за діаметр клітини, а вегетативна частина при цьому зовнішнього вигляду не змінює.

Спори бактерій кислотостійкі, тому важко забарвлюються, що пояснюється великою щільністю оболонки, низькою концентрацією вільної води в ній і високим вмістом ліпідів в спорах. У препаратах, забарвлених простими способами або за Грамом, спори залишаються безбарвними. Якщо мікроорганізм здатен до спороутворення, то необхідно звернути увагу на тип спороутворення, розташування спори в клітині, форму вільних спор і визначити їх розміри. З цією метою переглядають клітини 2–3 добової культури, тому що більшість спороутворюючих бактерій проходять за цей період часу всі стадії розвитку – від вегетативної клітини до вільної спори.

Спори, порівняно з цитоплазмою, характеризуються більш високим показником заломлення світла, тому при мікроскопуванні в світлому полі їх видно як більш темні включення на тлі спори.

Всі способи забарвлення спор засновані на єдиному принципі. Спочатку спори протрують різними речовинами (хромовою, соляною, сірчаною, оцтовою кислотами, аміаком, їдким натром або перекисом водню), потім фарбують клітку із спорою при нагріванні і

знебарвлюють цитоплазму, а потім додатково забарвлюють її контрастним барвником.

Метод Циля-Нільсена в модифікації Мюллера. На фіксований і охолоджений препарат нанести 5 % розчин хромової кислоти. Через 5-10 хвилин кислоту змити водою. Потім на мазок накласти шматочок фільтрувального паперу і рясно змочити карболовим фуксином Циля. Препарат підігріти, тримаючи високо над полум'ям, до появи парів, але не доводячи до кипіння розчину барвника на склі. Коли папірець підсохне, підлити нову порцію барвника і знову підігріти. Цю процедуру проводять 3–4 рази, після чого папірець викидають. Потім занурити препарат пінцетом в стаканчик з 1 % розчином сірчаної кислоти на кілька секунд для знебарвлення вегетативної частини клітини.

Препарат після обробки кислотою ретельно промити водою. Підфарбувати клітини метиленовим синім протягом 1–2 хв і промити водою. Просушити препарат фільтрувального папером і досліджувати під мікроскопом з імерсією. Спори забарвлюються на рожевий колір фуксином, а вегетативна частина клітин – на блакитний колір метиленовим синім.

Методика забарвлення спор за способом Ауескі. На приготований висушений мазок налити 1–2 % розчин соляної кислоти і підігріти на полум'ї до відходження парів (3–4 рази). Промити водою, висушити, фіксувати над полум'ям. Фарбувати через фільтрувальний папір розчином фуксину при нагріванні (до появи парів) протягом 3–5 хв. Потім препарат знебарвити 5 % розчином сірчаної кислоти протягом декількох секунд (16–18 с) до блідо-рожевого забарвлення, повільно рахуючи від 21 до 40.

Промити водою та висушити. При мікроскопії видно спори (червоні) і вегетативні клітини (сині).

У роботі використовують наступний мікробний матеріал:

спора № 1 – спороутворення центральне, бацилярне (*Bacillus mycoides*);

спора № 2 – спороутворення субтермінальне, кластридiale (*Clostridium butyricum* або *Clostridium pasteurianum*);

спора № 3 – спороутворення термінальне, плектридiale (*Clostridium pectinovorum*).

Замальовують в зошиті кольоровими олівцями бацили з різним розташуванням спори та спороутворенням і дають пояснення до малюнків.

2.3.6 Вимірювання мікроорганізмів

Розміри клітин мікроорганізмів визначають під мікроскопом за допомогою окулярної лінійки (мікрометра) або окулярного гвинтового мікрометра. У коків вимірюють діаметр, у інших форм – довжину і ширину клітини.

Результати вимірювань виражають в мікрометрах, (мкм). Для вимірювання краще використовувати живі, а не фіксовані клітини, тому що фіксація і забарвлення може трохи змінювати їх розміри. Якщо клітини рухливі, препарат злегка підігрівають або до краплі досліджуваної суспензії додають краплю 0,1 % водного розчину агар-агару.

В окуляр мікроскопа вставляють окулярну лінійку. На столик мікроскопа кладуть препарат, фокусують об'єкт і визначають, скільком розподілам лінійки відповідає довжина і ширина клітини при цьому збільшенні мікроскопа. Щоб результат був достовірним, вимірюють не менше 10-20 клітин.

Однак поділами окулярного мікрометра не можна безпосередньо виміряти клітку, тому що ділення лінійки переглядають тільки через верхню лінзу окуляра, а клітини – через об'єктив і окуляр. Тому необхідно визначити ціну поділу окулярного мікрометра для даного збільшення мікроскопа і висловити її в мкм. Це роблять за допомогою об'єктивного мікрометра. Об'єктивний мікрометр являє собою нанесену на скло лінійку довжиною 1мм, яка розділена точно на 100 частин, так що одну поділку її відповідає 0,01 мм або 10 мкм.

Для визначення ціни ділення окулярної лінійки на столик мікроскопа замість препарату поміщають об'єктивний мікрометр і спочатку при малому збільшенні фокусують зображення лінійки.

Потім переміщують її в центр поля і змінюють об'єктив на той, при якому вимірювали клітини. Переміщаючи столик мікроскопа і повертаючи окуляр, встановлюють мікрометри так, щоб їх шкали були паралельні і одна перекривала іншу. Поєднують одне з поділок шкали мікрометрів і знаходять їх наступне поєднання. Встановлюють, яку частину ділення об'єктивного мікрометра складає одну поділку окулярної лінійки.

Наприклад, на рис. 32 видно, що дві поділки шкали об'єкт мікрометра відповідають п'ятьом поділкам шкали окуляр-мікрометра. В цьому разі одна поділка окуляр-мікрометра дорівнюватиме $20/5=4$ мкм. Отже, ціна поділки окуляр-мікрометра при даному збільшенні мікроскопа становить 4 мкм. Знайшовши ціну поділки окуляр-мікрометра, можна вимірювати величину мікробних клітин без об'єкт мікрометра. Для цього визначають під мікроскопом, якій кількості

поділок шкали окуляр-мікрометра відповідає розмір досліджуваного об'єкта і множать її на ціну поділки.

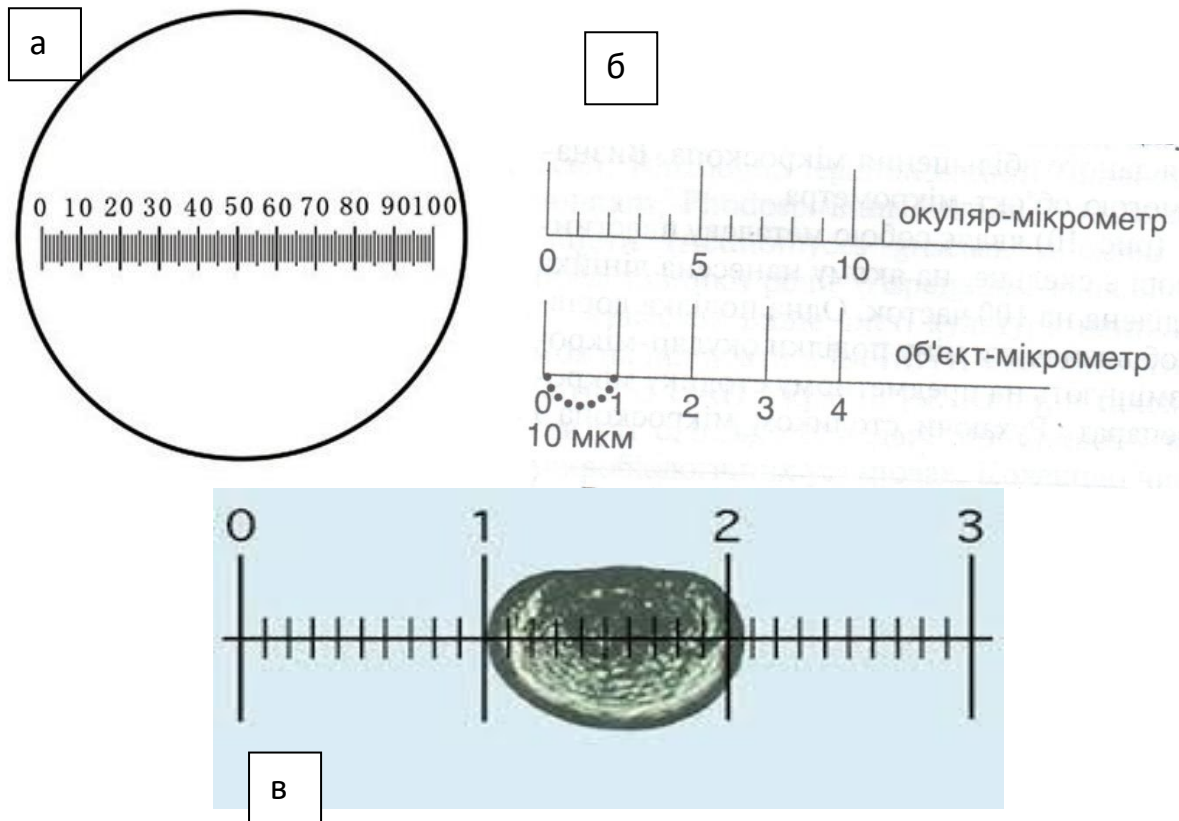


Рис. 32 – Шкала об'єкт мікрометр, шкала окуляр-мікрометр

а) окуляр-мікрометр; б) об'єкт-мікрометр, окуляр-мікрометр;

в) клітина під мікроскопом.

Точні розміри клітин можна визначити, використовуючи гвинтовий окулярний мікрометр (рис.33), котрий закріплюють на тубусі мікроскопа, попередньо вийнявши окуляр. В окулярі гвинтового мікрометра є нерухома шкала з ціною поділки 1 мм і рухома пластинка з перехрестям. Платівка пов'язана з мікрометричним гвинтом-барабаном і переміщується разом з перехрестям від його обертання. Ціну поділу барабана для кожного об'єктива визначають також за допомогою об'єктивного мікрометра. Для вимірювання клітини обертанням гвинта – барабана підводять перехрестя до кінця клітини і відзначають розподіл на барабані. Потім, обертаючи барабан, переміщують перехрестя до кінця клітини і відзначають знову поділ на барабані. Визначають, скільком контрольними позначками гвинта-барабана відповідає розмір клітини і множать отримане значення на ціну поділки барабана при даному збільшенні мікроскопа.



Рис. 33 - Гвинтовий окулярний мікрометр

Контрольні питання до лабораторної роботи № 2

1. Будова клітинної стінки грампозитивних бактерій.
2. Будова зовнішніх покривів клітин грамнегативних бактерій.
3. Техніка забарвлення мікроорганізмів за Грамом.
4. У чому полягає різниця між простими та диференційованими методами забарвлення мікроорганізмів?
5. В яких випадках застосовують диференційовані способи забарвлення бактерій?
6. На чому заснований спосіб негативного забарвлення мікроорганізмів?
7. Які речовини відносять до внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів?
8. У чому полягають особливості будови нуклеоїда бактеріальної клітини?
9. Методи забарвлення нуклеоїдів у бактерій.
10. Що таке капсула, який її хімічний склад, морфологія і функції? Методи забарвлення бактеріальних капсул.
11. За яких умов спостерігається процес капсулоутворення у бактерій (сапрофітних і патогенних)?
12. Забарвлення бактерій для визначення їх кислотостійкості.
13. Спороутворення у бактерій, будова спор, розташування в клітці і їх функції.
14. Локалізація спор в бактеріальній клітці.
15. Чим викликане утворення спор у бактерій?
16. Які типи спороутворення вам відомі?
17. Як відбувається утворення спор у бактерій?
18. Яку функцію виконує спороутворення у бактерій?
19. У чому полягає основа методів виявлення спор у бактерій?
20. Забарвлення спор.
21. Як розташовані джгутики у монотрихів, лофотрихів, амфітрихів і перитрихів?

РОЗДІЛ 3. ХАРЧУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

3.1 Поживні середовища, класифікація, склад і приготування

Для дослідження фізіологічних властивостей мікроорганізми вирощують в лабораторних умовах.

Вирощування мікроорганізмів в лабораторних умовах називається **культивуванням**, а вирощені на поживному середовищі мікроби – **культурою**. При культивуванні відбувається збільшення біомаси – маси клітинної речовини певного мікроорганізму.

Культивування мікроорганізмів є одним з основних методів мікробіології. Від уміння культивувати мікроорганізми в лабораторних умовах в значній мірі залежать успіхи їх вивчення і практичного застосування. Культивування засноване на знанні фізіолого–біохімічних особливостей мікроорганізмів і розумінні значення фізико – хімічних умов середовища для їх життєдіяльності.

Культури, що складаються з різних видів мікроорганізмів, називають **змішаними**, а **чиста культура** – це популяція клітин, що походить від єдиної клітини. Чисті культури отримують працюючи в стерильних умовах, шляхом вирощування ізольованих колоній мікроорганізмів, зазвичай у чашці Петрі. Чашка Петрі повинна містити відповідні поживні речовини для даного мікроорганізму. Перед виділенням чистої культури з будь-якого харчового продукту або природного субстрату (наприклад: ґрунту, води), в якому даний мікроорганізм знаходиться в невеликих кількостях, спочатку отримують накопичувальні культури, проводячи культивування в елективних умовах.

Накопичувальні культури складаються переважно з клітин мікроорганізмів одного виду.

Елективні (накопичувальні) умови – умови, що сприяють розвитку однієї культури і обмежують розвиток супутніх мікроорганізмів. Прикладом елективних умов може бути підвищена температура (для виділення термостійких форм бактерій), підвищена кислотність, підвищена концентрація солі і т.д.

При спеціальних способах посіву, коли в живильне середовище вноситься одна клітина, в результаті її розмноження утворюється сукупність особин, яка називається **клон**. Якщо клон розвивається на поверхні щільного поживного середовища, у міру зростання числа особин він утворює видиме неозброєним оком скупчення мікробів, яке називається **колонією**.

Мікроорганізми одного виду, виділені з певного джерела зовнішнього середовища (з ґрунту, організму людини, тварини, харчового продукту та ін.), називаються **штамом**.

Внесення клітин мікроорганізму або досліджуваного матеріалу до живильного середовища для отримання накопичувальної культури називають **посівом або інокуляцією**.

Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища до іншого називають пересівом або **пасивуванням**.

Зазвичай мікроорганізми вирощують при певній постійній температурі в термостатах. Культивування при певній температурі називається **інкубацією**.

За способом живлення бактерії діляться на дві великі групи: автотрофи (здатні синтезувати органічні речовини самі) і гетеротрофи (споживають готові органічні речовини).

1. Аутотрофи здатні синтезувати вуглеводи з простих неорганічних сполук.

Аутотрофи поділяються на фотосинтетиків (харчування за рахунок фотосинтезу) і хемосинтетиків (використовують енергію хімічних реакцій для синтезу органічних речовин).

2. Гетеротрофи отримують готові органічні сполуки (глюкоза, багатоатомні спирти).

Гетеротрофи – це сапрофіти і паразити.

За джерелами азоту всі мікроорганізми діляться на **прототрофи** і **ауксотрофи**.

1. Прототрофи самі синтезують складні азотовмісні сполуки з простих.

2. Ауксотрофи отримують азот в готовому вигляді (азотовмісні сполуки). До цієї групи відносять патогенні і умовно-патогенні мікроорганізми.

Залежно від того, які поживні речовини – органічні або неорганічні – є донорами електронів, всі мікроорганізми поділяють на дві групи.

1. Органотрофи – організми, які використовують в якості донорів електронів органічні сполуки;

2. Літотрофи – організми, здатні використовувати як донорів електронів неорганічні речовини (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} і т. д.).

Живильне середовище – речовина або суміш речовин, які застосовуються для культивування макро- і мікроорганізмів. Існує безліч стандартних біологічних поживних середовищ.

Живильні середовища розрізняються за складом, призначенням і консистенцією.

За складом середовища для культивування ділять на три групи: природні або натуральні, штучні або напівсинтетичні, і синтетичні середовища.

Натуральними називають середовища, які складаються з продуктів тваринного і рослинного походження. До таких середовищ відносяться овочеві або фруктові соки, тканини тварин, розведена кров, молоко, вода морів, озер і мінеральних джерел, а також відвари або екстракти, отримані з природних субстратів, як, наприклад, м'ясо, гній, ґрунт, різні частини рослин. На натуральних середовищах добре розвивається багато мікроорганізмів, тому що в таких середовищах є всі компоненти, що необхідні для їх росту і розвитку. Однак ці середовища мають складний і непостійний хімічний склад, тому мало придатні для вивчення фізіології обміну речовин мікроорганізмів, оскільки не дозволяють врахувати споживання ряду компонентів середовища і утворення продуктів обміну по ходу розвитку. Натуральні середовища використовуються головним чином для підтримки культур мікроорганізмів, накопичення їх біомаси і діагностичних цілей.

Прикладами **натуральних середовищ** невизначеного складу, які широко застосовуються в лабораторній практиці, служать м'ясопептонний бульйон, неохмелене пивне сусло, дріжджове і картопляне середовище, ґрунтова витяжка та ін.

Дріжджове середовище використовується для культивування гетеротрофних мікроорганізмів. Основа дріжджового середовища - дріжджова вода. Для її приготування 70 - 100 г свіжих пресованих або 7 - 10 г сухих дріжджів 30 хв кип'яють в 1 л води і після осадження клітин дріжджів рідина декантують або фільтрують через вату. До фільтрату додають 1 л води, ще раз 30 хв кип'яють і знову фільтрують. До 100 мл отриманої дріжджовий води додають 1-2 г вуглеводів і мінеральні солі, найчастіше K_2HPO_4 (0,1г) і $NaCl$ (0,5 г). Доводять рН середовища до 6,8-7,2. Середовище стерилізують при 0,5 атм 20 - 30 хв.

Дріжджовий екстракт. 100 г пресованих дріжджів розвести в 100 мл води, суміш кип'ятити 1 год, тричі фільтрувати через паперовий фільтр і стерилізувати 30 хвилин при 115 °С.

Дріжджова вода. 5 г сухих дріжджів розмішати в 100 мл води, кип'ятити 10 хвилин, фільтрувати через паперовий фільтр і стерилізувати по 30 хвилин текучим паром щодня протягом 3 діб.

Дріжджовий автолізат. 40 г свіжих пресованих або 10 г сухих дріжджів залити водою і перемішати до отримання гомогенної маси, потім додати кілька кристалів тимолу або 1-2 мл хлороформу і витримати в термостаті при 50-55 °С три доби. За цей час клітини дріжджів відмирають, а ферменти залишаються активними і

гідролізують білки, а також інші біополімери. Через 3 доби отриманий автолізат після ретельного перемішування кип'ятити на слабкому вогні 20 хв і фільтрувати через паперову пульпу, використовуючи воронку Бюхнера. Дріжджовий автолізат стерилізувати при 0,5 атм. 15 хв і зберігати в холодильнику.

Кукурудзяний екстракт - готовий продукт заводів крохмале-патокової промисловості. Він містить амінокислоти, вітаміни, досить велику кількість органічних кислот (молочної, оцтової та мурашиної) і мінеральні солі. Кукурудзяний екстракт вносять в середовища від 0,5 до 5 г на 10 мл; стерилізують при 0,5 атм.

М'ясопептонний бульйон (МПБ). 500 г м'яса, звільненого від кісток, жиру і сухожиль, дрібно нарізати або пропустити через м'ясорубку, залити 1 л водопровідної води і залишити при кімнатній температурі на 12 годин або в термостаті при 30 °С на 6 ч, а при 37 °С - на 2 год. За цей час з м'яса екстрагуються різні речовини, в тому числі водорозчинні вітаміни. Потім м'ясо віджати через марлю, і отриманий настій кип'ятити 30 хв. При цьому згортаються білки. Остиглу масу фільтрують через ватяний фільтр і доливають водою до початкового об'єму. До м'ясної води додають 1 % пептону і 0,5 % NaCl.

МПБ - багате живильне середовище, але воно майже не містить вуглеводів. У разі необхідності їх додають до МПБ в кількості 1-2 г на 100 мл. МПБ стерилізують при 1 атм.

Солодове (неохмеленне пивне) сусло - добре середовище для деяких молочнокислих і оцтовокислих бактерій, дріжджів, мікроскопічних грибів і інших представників гетеротрофних мікроорганізмів. Основні компоненти сусла - вуглеводи (до 90 % від загальної маси сухого залишку) і азотовмісні сполуки (до 6-7 % від загальної маси сухого залишку). З вуглеводів в найбільшій кількості містяться мальтоза і декстрини. До складу сусла входять вітаміни, переважно групи В, органічні кислоти і мінеральні солі.

Приготування сусла: Зерно ячменю замочити в холодній воді і проростити при 35 °С. Після того, як паростки стануть вдвічі більше, ніж довжина зерна, зерно висушують до повітряно-сухого стану і отримують солод. Для приготування сусла солод крупно розмелюють і 250 г його беруть на 1 л води. Для кращого виділення ферменту амілази суміш підігрівають при 57 °С до припинення фарбування розчину при додаванні йодного розчину (йодна проба на вміст крохмалю). Проби на вміст крохмалю проводять у порцеляновій чашиці у краплі рідини.

Сусло процідити через полотно, отриманий фільтрат нагріти до кипіння і кип'ятити 5 - 10 хвилин, потім фільтрувати через паперовий фільтр. Таке сусло містить 10 – 20 % цукру. Його зміст визначають по щільності розчину за допомогою сахариметра. Сусло розбавити водою

до концентрації цукру 6 – 8 % і стерилізувати при 115 °С і тиску 0,5 атм. 30 хвилин.

Приготування сусло-агару. До приготовленого сусла додати 2 % агару, кип'ятити до розплавлення агару, фільтрувати через полотно і стерилізувати таким же способом, як сусло.

Приготування молочно-сольового агару. Мірним циліндром відміряти 100 мл 2 % стерильного агару, що містить 6,5 % хлориду натрію. Додати до нього 10 мл знежиреного стерильного молока.

Картопляне середовище використовується для культивування спороутворюючих бактерій, представників роду *Caulobacter* і деяких інших хемоорганотрофних бактерій

Приготування картопляного середовища: Нарізати в хімічний стакан ємністю 150 мл скибочками 20 г очищеного, промитого водою картоплі, залити 100 мл водопровідної води, варити 30 хвилин. Відвар фільтрувати через паперовий фільтр і додати воду до початкового об'єму. До отриманої рідини додати 2 г агар-агару, кип'ятити до його розчинення і встановити нейтральну реакцію середовища (рН 7). Середовище стерилізують 20 хвилин при 1 атм.

До **штучних** або **напівсинтетичних** середовищ відносять середовища, до складу яких поряд з сполуками відомої хімічної природи входять речовини невизначеного складу – природні продукти. Такі середовища знаходять широке застосування в технічній мікробіології для отримання амінокислот, вітамінів, антибіотиків та інших важливих продуктів життєдіяльності мікроорганізмів.

До напівсинтетичних середовищ відносяться, наприклад, м'ясопептонний бульйон з глюкозою і фосфорнокислим калієм, картопляне середовище з глюкозою і пептоном. Основою в зазначених середовищах є компонент невизначеного складу.

До напівсинтетичних середовищ слід віднести також середовища, головними частинами яких є сполуки відомого складу – вуглеводи, нітрати або солі амонію, фосфати та інші, а з'єднання невизначеного складу – гідролізат казеїну, дріжджовий автолізат, кукурудзяний екстракт – додаються як фактори росту і вітамінів.

Синтетичні середовища – це середовища, до складу яких входять тільки певні, хімічно чисті сполуки, взяті в точно зазначених концентраціях. Синтетичні середовища найбільш зручні для дослідження обміну речовин мікроорганізмів. Знаючи точний склад і кількість вхідних в середу компонентів, можна вивчити їх споживання і перетворення у відповідні продукти обміну.

Для розробки синтетичних середовищ необхідно знати потреби мікроорганізмів в джерелах живлення і основні особливості їх обміну речовин. Залежно від потреб мікроорганізмів синтетичні середовища

можуть мати великий набір компонентів, як, наприклад, середовища для ряду молочнокислих бактерій, але можуть бути і досить простими за складом, як середовища для автотрофних мікроорганізмів.

У більшості випадків синтетичні середовища готують на водопровідній воді і мікроелементи не додають, тому що вони в невеликих кількостях завжди містяться у водопровідній воді і можуть надходити в середовище зі скла посуду. Зазвичай обмежуються внесенням тільки тих мікроелементів, до яких досліджуваний мікроорганізм проявляє підвищену вимогливість. У спеціальних цілях, наприклад, при вивченні потреб мікроорганізмів в окремих компонентах мінеральних солей, для приготування синтетичних середовищ використовують дистильовану воду. В цьому випадку мікроелементи вносять в середовище обов'язково.

За призначенням розрізняють загальноживані (стандартні), елективні та диференційно-діагностичні (індикаторні) середовища.

Звичайні, або загальноживані (стандартні), середовища придатні для вирощування більшості мікробів: м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), м'ясопептонний желатин (МТЖ) та ін.

Елективні середовища забезпечують переважний розвиток одного виду або групи мікроорганізмів і менш придатні або навіть зовсім непридатні для розвитку інших. Елективні середовища застосовують для виділення мікроорганізмів з місць їх природного середовища існування або для отримання накопичувальних культур певного виду з матеріалу, що містить змішану культуру (цукровий бульйон, жовчний бульйон, агар з кров'ю і т. д.).

Диференційно-діагностичні середовища служать для диференціації різних видів мікроорганізмів на підставі відмінностей в обмінних процесах. До складу цих середовищ зазвичай вводять речовини, що дозволяють вивчити особливості ферментів досліджуваних культур. Диференційно-діагностичними середовищами користуються для ідентифікації невідомих видів мікроорганізмів. До них відносять середовища для визначення здатності мікробів до розщеплення білків (м'ясопептонний желатин), ферментації вуглеводів (середовища Гісса, Ендо та ін.), гемолітичної здатності (кров'яний агар), відновлювальної здатності (середовища, що містять барвники, які знебарвлюються при відновленні та ін.) і т.д.

За консистенцією розрізняють рідкі, щільні і сипучі середовища.

Рідкі середовища широко застосовують для з'ясування фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів, для накопичення біомаси або продуктів обміну, а також підтримки і зберігання багатьох мікроорганізмів, що погано розвиваються на щільних середовищах. У

лабораторній практиці застосовують рідкі середовища: МПБ, пептонна вода, цукровий бульйон і ін.

Щільні середовища використовують для виділення чистих культур (отримання ізольованих колоній) в діагностичних цілях (встановлення морфології колоній, особливостей росту на скошеному агарі і ін.), для зберігання культур, кількісного обліку мікроорганізмів, визначення їх антагоністичних властивостей і в ряді інших випадків. Прикладом щільних поживних середовищ є МПА, МТЖ, згорнутий яєчний білок, картопля та ін.

Сипучі середовища застосовують в промисловій мікробіології. До них відносять, наприклад, розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, просочені живильним розчином.

Ущільнення середовищ

Для ущільнення середовищ застосовують агар-агар, желатин і кремнекислий гелі.

Агар-агар використовують особливо часто. Це складний полісахарид, який отримують з морських водоростей. Його випускають у вигляді пластин, «стеблинок» або порошку. Агар-агар зручний тим, що більшість мікроорганізмів не використовують його як поживний субстрат. У воді агар-агар утворює гелі, що топляться при 100 °С, а стають твердими при температурі близько 40 °С. Тому на щільних середовищах можна культивувати мікроорганізми практично при будь-якій зручній для їхнього росту температурі.

При охолодженні агар виділяє «конденсаційну» воду. Чим менша концентрація агару, тим більше виділяється води.

Найчастіше агар додають до середовищ в кількості 1,5 %. Якщо необхідно отримати більш вологе середовище, вносять 1,0 %, а більш щільне і сухе – 2-3 % агару. Середовище з агаром нагрівають на киплячій водяній бані до повного його розплавлення. Якщо планують вирощувати мікроорганізми на скошеному агаризованому середовищі в пробірках, то кожену пробірку заповнюють середовищем не більше ніж на 1/3. Щоб середовище не підсихало, його скошують після стерилізації, перед посівом. Для цього пробірки з розплавленим на киплячій водяній бані середовищем встановлюють в похилому положенні (рис. 34) і дають середовищу застигнути. Скошене щільне середовище не повинно доходити до ватяної пробки на 4-6 см. Середовище, що призначене для культивування бактерій в чашках Петрі, розливають по 20-25 мл в пробірки більшого обсягу, ніж для скошеного агаризованого середовища, або стерилізують в колбах. В останньому випадку до стерилізації агар НЕ розплавляють.

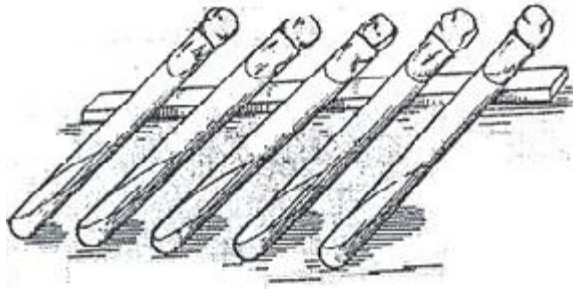


Рис. 34 - Приготування скошеного агаризованого середовища в пробірках

Желатин – це екстракт, отриманий із субстратів багатих колагеном – білок кісток, хрящів, сухожиль, луски. Утворений желатином гель, плавиться при температурі 25 °С, яка є нижчою за звичайну температуру інкубації багатьох мікроорганізмів (30–37 °С). Крім того, желатин розріджується протеолітичними ферментами, які мікроорганізми виділяють у середовище. Ці властивості желатину обмежують його застосування в якості ущільнюючого засобу.

Желатин використовують головним чином в діагностичних цілях – для виявлення протеолітичної активності мікроорганізмів, а також для отримання гігантських і глибинних колоній дріжджів. У першому випадку вживають м'ясо – пептони, у другому – сушений желатин.

До рідкого середовища додають 10 – 20 % желатину, залишають набухати 5-10 хв і нагрівають на водяній бані до розчинення. Доводять рН середовища до 6,8-7,0. Желатин має кислу реакцію і має велику буферність, тому на нейтралізацію йде більше лугу, ніж, наприклад, на нейтралізацію МПА. Желатинові середовища стерилізують при 0,5 атм 15 хв або дрібно – 3 рази по 20 хв в кип'ятильнику Коха. Повторна стерилізація желатинових середовищ, особливо при рН середовищ нижче 6,0 або вище 7,3 не рекомендується, оскільки желатин частково гідролізується і втрачає гелеутворюючі властивості.

Кремнекислий гель (силікагель) використовують як тверду основу для синтетичних середовищ чітко визначеного складу.

3.2 Умови культивування мікроорганізмів

Для життєдіяльності мікроорганізмів істотне значення мають не тільки склад живильного середовища, а й такі фактори, як кислотність середовища, аерація, температура, світло, вологість. Розвиток мікроорганізмів можливий лише в певних межах кожного фактору, причому для різних груп мікроорганізмів ці межі часто неоднакові.

Фактори зовнішнього середовища, що впливають на мікробну клітину:

- Фізичні (температура, висушування, світло, радіація та ін.);
- Хімічні (антисептики, дезінфікуючі засоби та ін.);
- Біологічні (антибіотики, фітонциди, бактеріофаги, лізоцим).

Знання впливу факторів зовнішнього середовища на мікроорганізми дозволяє прискорити вирощування корисних видів, підвищити інтенсивність біотехнологічних процесів, здійснювати міри профілактики та лікування захворювань мікробного походження. Різні фактори зовнішнього середовища широко використовуються для подовження строків збереження харчових продуктів та пригнічення розвитку збудників мікробного псування.

Вплив факторів зовнішнього середовища вивчають шляхом вирощування мікроорганізмів під впливом або після впливу досліджуваного фактора. Результат впливу виявляють за інтенсивністю росту мікроорганізмів в живильних середовищах, або за їх ферментативною активністю.

Ступінь впливу факторів зовнішнього середовища на мікробну клітину залежить від механізму та тривалості впливу фактору, інтенсивності впливу (дози, концентрації), від фізичних та хімічних умов середовища, а також від видової стійкості мікроорганізму.

Активна **кислотність середовища (рН)** має вирішальне значення для росту багатьох мікроорганізмів. Більшість бактерій найкраще росте при рН близько 7,0, а мікроскопічні гриби надають перевагу слабокислим середовищам. Тому в приготованих середовищах завжди слід визначити значення рН. Значні відхилення від оптимальних значень пригнічують розвиток мікробних клітин, змінюють направленість біохімічних процесів. Це має велике практичне значення. Явище анабіозу в кислому середовищі покладено в основу консервування харчових продуктів шляхом маринування і квашіння. У лабораторній практиці зручно використовувати різні рідкі або паперові індикатори. Широко застосовується, наприклад, рідкий двоколірний індикатор, бромтимоловий синій (бромтимолблау). Його колір змінюється від жовтого до синього при зсуві рН від 6,0 до 7,6. При рН 7,3 індикатор має синє-зелене забарвлення.

Використовують також універсальний індикатор, який змінює забарвлення в інтервалі рН від 1 до 12.

Аерація. Кисень входить до складу води і органічних сполук, тому завжди потрапляє до клітини. По відношенню до молекулярного кисню мікроорганізми ділять на чотири групи: **облігатні аероби, мікроаерофіли, факультативні аероби (анаероби) і облігатні анаероби.** Для визначення належності мікроорганізмів до тієї чи іншої

групи, мікробну суспензію висівають у пробірки з розплавленим і охолодженим до температури 45 °С агаризованим живильним середовищем. Посів можна проводити уколком. Суворі аероби ростуть на поверхні середовища і в верхньому шарі, мікроаерофіли – на деякій відстані від поверхні. Факультативні анаероби зазвичай розвиваються по всій товщі середовища. Суворі анаероби ростуть тільки в глибині середовища, у самого дна пробірки (рис. 35).

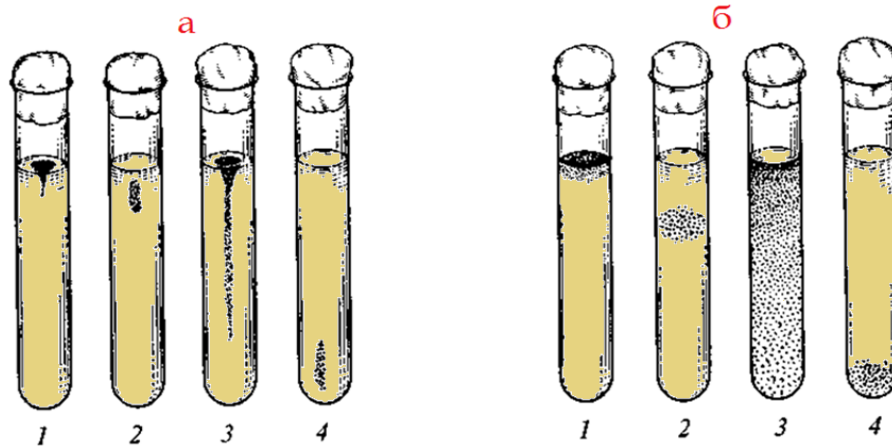


Рис. 35 - Зростання мікроорганізмів при посіві уколом (а) і при посіві в розплавлене щільне середовище (б)

1 – аероби; 2 – мікроаерофіли; 3 – факультативні анаероби; 4 – анаероби

Температура. Температура, при якій відбувається інтенсивний ріст мікроорганізмів, називається оптимальною. Найменша температура, за якої спостерігається деякий розвиток мікроорганізмів називається мінімальною. Найвища температура за якої можливий розвиток мікроорганізмів називається максимальною. По відношенню до температури мікроорганізми ділять на три групи:

- Психрофіти розмножуються та проявляють активність за низьких температур: мінімум – -10...0 °С, оптимум – 10...15 °С, максимум – 30 °С. Для вирощування психрофітів використовують холодильні камери.

- Мезофіли розвиваються при температурах: мінімум – 5...10 °С, оптимум – 25...35 °С, максимум – 45...50 °С;

- Термофіли розвиваються при високих температурах: мінімум – 30 °С, оптимум – 50...60 °С, максимум – 70...80 °С.

Відношення мікроорганізмів до температур, які перевищують максимальну для їх розвитку, характеризує їх термостійкість. Вона неоднакова у різних мікроорганізмів і залежить від особливостей виду, віку клітин, хімічного складу середовища та інших факторів. Загибель клітин відбувається не миттєво, а протягом певного часу. Найбільшу термостійкість мають спори бактерій.

На згубній дії високих температур базуються методи знищення мікробів в харчових продуктах і об'єктах – пастеризація та стерилізація.

Світло. Для зростання переважної більшості мікроорганізмів освітлення не потрібне. Навпаки, прямі сонячні промені негативно впливають на їх розвиток. Світло необхідне для зростання фототрофних мікроорганізмів. Однак природне освітлення використовують рідко, тому що воно не постійне і погано контрольоване. Як правило, фототрофи вирощують в люміностах, тобто в камерах, освітлених лампами розжарювання або флуоресцентними лампами денного світла. Потрібна температура в люміностах створюється завдяки вентиляції або холодильному пристрою.

Осмотичний тиск середовища. осмотичний тиск середовища визначається концентрацією розчинених в ній речовин. Нормальний розвиток мікроорганізму відбувається, коли осмотичний тиск в клітині дещо вищий ніж в живильному середовищі. Такий стан клітини називають тургор ним. Підвищення осмотичного тиску середовища викликає зневоднення клітини – **плазмоліз**. При дуже низькому осмотичному тиску середовища виникає явище **плазмоптісу** (переповнення цитоплазми водою і розрив оболонки клітини). (Рис. 36, 37).

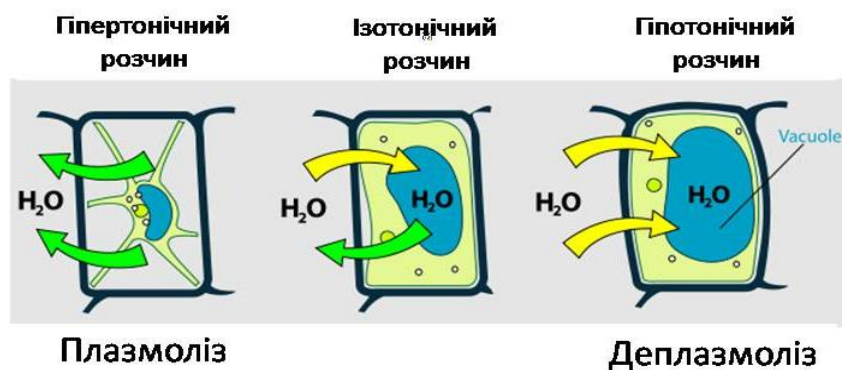


Рис. 36 - Плазмоліз та деплазмоліз

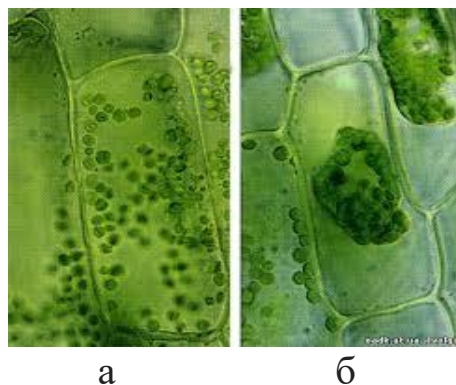


Рис. 37 - Деплазмоліз (а), плазмоліз (б) у рослинній клітині

3.3 Способи культивування мікроорганізмів

3.3.1 Способи культивування аеробних мікроорганізмів

Культивування на поверхні щільних і рідких середовищ. В цьому випадку мікроорганізми вирощуються на поверхні щільного середовища або в тонкому шарі рідкого середовища і отримують кисень безпосередньо з повітря. При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу зіткнення середовища з повітрям. Для цього середовища наливають тонким шаром в посуд з широким дном – чашки Петрі або колби Виноградського. У рідких середовищах аеробні мікроорганізми ростуть, утворюючи на поверхні плівку. Факультативні анаероби розвиваються не тільки на поверхні, але і в товщі рідкого середовища, викликаючи більш-менш рівномірне його помутніння. Поверхнєве культивування мікроорганізмів застосовується як в лабораторних умовах, так і в промисловості.

Глибинне культивування в рідких середовищах. Всі способи глибинного культивування аеробних мікроорганізмів зводяться до збільшення поверхні зіткнення живильного середовища з киснем повітря. Слід мати на увазі, що при глибинному культивуванні в рідких середовищах мікроорганізми використовують розчинений кисень, але розчинність кисню у воді невелика. Тому, щоб забезпечити зростання аеробних мікроорганізмів в товщі середовища, його необхідно постійно аерувати.

Найбільш простий і широко поширений в лабораторній практиці спосіб глибинного культивування – вирощування на гойдалках, які забезпечують струшування або обертання колб або пробірок зі швидкістю 100-200 і більше оборотів в хвилину. Чим більше швидкість обертання, тим більше зіткнення середовища з повітрям і вище насичення її киснем.

Аерувати культуру мікроорганізмів можна продуванням товщі середовища стерильним повітрям. Цей спосіб особливо широке застосування знайшов у промисловій мікробіології при отриманні біомаси та різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів - антибіотиків, ферментів, кислот. Повітря стерилізується шляхом проходження через активоване деревне вугілля, скляну вату, просочену антисептиком, або спеціальні тканини з полімерів.

У ферментерах примусову аерацію зазвичай поєднують з механічним перемішуванням середовища мішалками, швидкість обертання яких може досягати сотень і навіть тисяч оборотів на хвилину.

Схема ферментера для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів наведена на рис. 38.

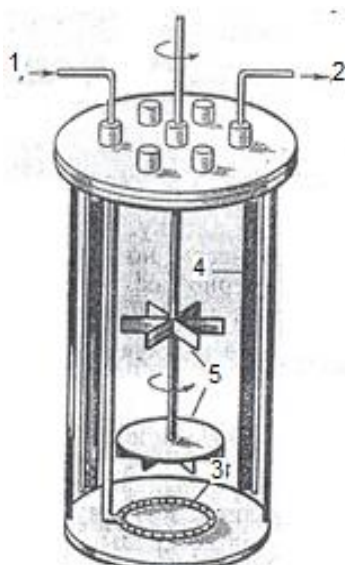


Рис. 38 - Схема ферментера для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів:

1 – вхід для повітря; 2 – вихід повітря; 3 – барботер; 4 – відбійники; 5 – мішалка

3.3.2 Способи культивування анаеробних мікроорганізмів

Вирощування анаеробних мікроорганізмів більш складне, ніж культивування аеробів, тому що зіткнення культур анаеробів з киснем повітря має бути зведено до мінімуму або повністю виключено. Для цього використовують різні прийоми.

Вирощування в високому шарі середовища. Це найбільш простий спосіб обмеження доступу повітря до культури. Рідину наливають у посуд для культивування високим шаром. Тому що не можна стерилізувати середовища, якщо вони займають більше половини висоти посуду, частину середовища стерилізують окремо і стерильно доливають її у посуд для культивування відразу ж після посіву. Безпосередньо перед посівом середовище кип'ятять або прогрівають на киплячій водяній бані 30-40 хв, потім швидко охолоджують, щоб в ньому не встиг розчинитися кисень повітря, і вносять на дно посівний матеріал.

Якщо розвиток мікроорганізмів не супроводжується газоутворенням, поверхню середовища можна залити шаром стерильного вазелінового масла, парафіну або їх сумішшю (співвідношення 1:3), шаром стерильного водного агару або закрити судини для культивування стерильними пробками: скляною притертою або гумовою.

Культивування у в'язких середовищах. Дифузія кисню в рідину зменшується зі збільшенням її в'язкості. Тому у в'язких середовищах, таких як картопляне або середовища з кукурудзяним або іншим борошном, добре розвиваються деякі облігатні анаероби, наприклад, збудники маслянокислого або ацетонобутилового бродіння. В'язкість рідких середовищ легко збільшити, якщо додати до них 0,2-0,3 % агару.

Вирощування в товщі щільного середовища. Цим прийомом користуються для отримання ізольованих колоній при виділенні чистих культур або визначенні чисельності анаеробних мікроорганізмів. Посівний матеріал вносять у розплавлене і охолоджене до 48-50 °С щільне, бажано освітлене середовище, ретельно перемішують і залишають в пробірках або переливають стерильною піпеткою в заздалегідь простерилізовані трубки Буррі або чашки Петрі. Поверхню середовища в пробірках заливають парафіном. Трубки Буррі – це скляні трубки, довжиною 20-25 см, діаметром 1,0 1,5 см. Трубки стерилізують, закривши обидва кінця ватяними пробками. Перед посівом ватяну пробку у одного кінця замінюють стерильною гумовою, через інший кінець трубки вносять середовище з посівним матеріалом і закривають цей кінець також гумовою пробкою (рис. 39).

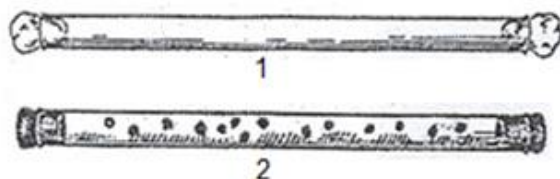


Рис.39 - Трубка Буррі:

1 – трубка, підготовлена до стерилізації; 2 – колонії анаеробних мікроорганізмів в товщі агаризованого середовища

При використанні чашок Петрі для вирощування анаеробів засіяне щільне середовище наливають в кришку чашки і, після того як середовище застигне, щільно притискають до його поверхні дно чашки. Зазор між стінками дна і кришки, де середовище стикається з повітрям, заливають стерильним парафіном (рис. 40).

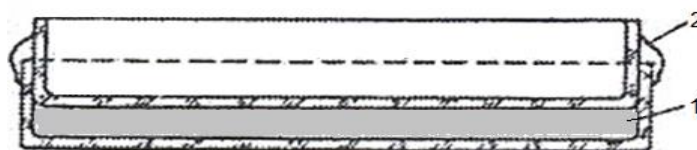


Рис. 40 - Культивування анаеробів в чашці Петрі:

1 - щільне середовище, 2 – парафін

3.4 Техніка посіву на щільні і рідкі поживні середовища

Посів на щільні середовища. Найчастішим методом посіву культури мікроорганізмів є посів на чашку Петрі з агаризованим середовищем. Посів культури на поверхню здійснюється одним з трьох способів:

- посів рисою – проводять петлю по прямій лінії посередині живильного середовища;
- посів штрихом – проводять зигзагоподібну лінію, ковзаючи петлею по поверхні середовища від одного краю чашки Петрі до іншого;
- суцільний посів (газон) – розтирають матеріал безперервними круговими рухами по всій поверхні живильного середовища.

При посіві на щільні середовища потрібно стежити, щоб не подрятати середу петлею. Посів проводиться безпосередньо біля запаленого пальника, у полум'ї якого стерилізується петля. Петлю з узятим матеріалом швидко переносять в чашку Петрі, злегка відкривши кришку (рис. 41). Потім чашку Петрі підписують, вказавши назву посівного матеріалу і дату посіву, і поміщають її в термостат кришкою вниз.

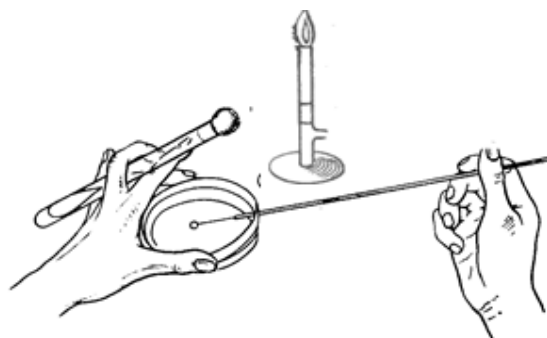


Рис. 41 - Посів на щільне живильне середовище в чашку Петрі

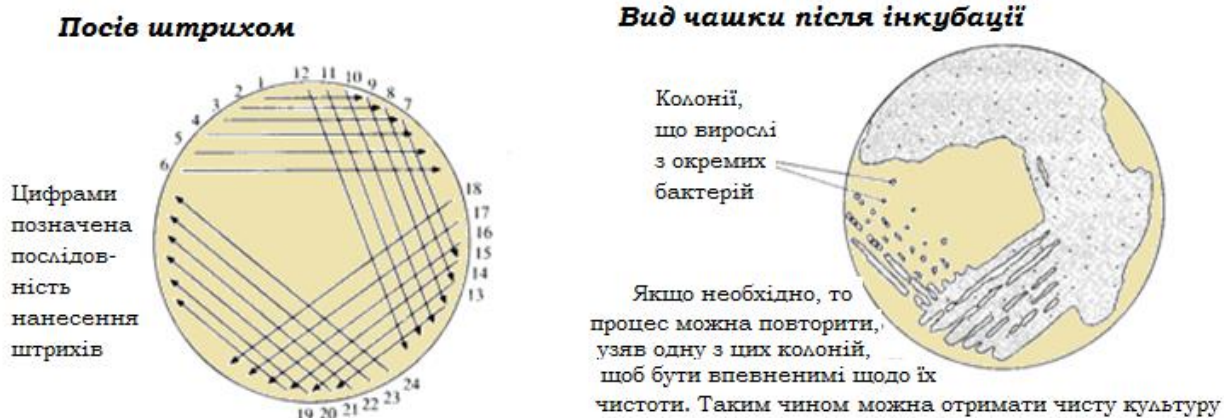


Рис.42 - Посів штрихом на щільне живильне середовище

Для посіву в товщу щільного живильного середовища готують суспензію культури в стерильній водопровідній воді або у фізіологічному розчині. Набирають 0,1-1 мл суспензії в піпетку (залежно від ступеня передбачуваного мікробного забруднення) і виливають в порожню стерильну чашку Петрі. Слідом за цим в чашку заливають 15 – 20 мл м'ясопептонного агару, розплавленого і охолодженого до температури 40 – 45 °С. Для рівномірного розподілу досліджуваного матеріалу в живильному середовищі закрити чашку з вмістом злегка повертають по поверхні столу.

3.5 Визначення чутливості мікроорганізмів до УФ-випромінювання

Енергія, що розповсюджується в просторі у вигляді електромагнітних хвиль, називається променистою енергією. Різні її спектри надають на мікроорганізми неоднаковий вплив. Радіохвилі не здійснюють біологічної дії, інфрачервоні – при адсорбції їх організмом викликають нагрівання. Видиме світло діє на фотосинтезуючі мікроорганізми сприятливо, будучи основним джерелом енергії. Всі інші бактерії краще розвиваються в темряві. Навіть розсіяне світло затримує їх розмноження. А видиме світло значної інтенсивності може викликати пошкодження і загибель клітин. Від згубної дії видимого світла мікроорганізми оберігає здатність утворювати пігменти.

Найбільш активно на бактерії діє ультрафіолетова частина спектра, що виявляє або летальну, або мутагенну дію залежно від природи мікроба і дози опромінення.

Лабораторний досвід щодо впливу ультрафіолетових променів на життєдіяльність мікроорганізмів здійснюється в такий спосіб. У стерильну чашку Петрі з МПА вносять краплю суспензії бактерій, яку рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дригальського. Потім на центральну частину суцільного газону мікроорганізмів поміщають стерильний трафарет, і, відкривши чашку, щоб поставити її під опромінювач кварцевої лампи на 20-30 хв на відстані від джерела випромінювання 10-20 см. Потім трафарет прибирають, чашки закривають і інкубують при 28 °С. Результати досвіду спостерігають через 5–7 днів. Зростання мікроорганізмів видно лише на тій ділянці агару, який був закритий трафаретом від дії ультрафіолетових променів. Інша частина середовища стерильна. Згубна дія променів залежить від відстані, часу експозиції і виду мікроорганізму, який піддавався опроміненню.

3.6 Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків

Антибіотики – це специфічні речовини, що утворюються клітиною в процесі життєдіяльності, а також їх похідні та синтетичні аналоги, що мають здатність пригнічувати розвиток мікроорганізмів або затримувати розвиток злоякісних новоутворень. Антибіотики відрізняються від неспецифічних метаболітів (кислоти, спирти), високою біоактивністю щодо чутливих мікроорганізмів. Їх діючі концентрації виражаються в мікрограмах або навіть десятих і сотих частках мкг / мл. Антибіотики виявляють вибірковість біологічної дії. Не всі мікроорганізми, перебуваючи в контакті з антибіотиком, чутливі до нього, і тому діляться на **чутливі** і **резистентні** (стійкі).

Деякі антибіотики пригнічують ріст невеликого числа видів мікроорганізмів і є антибіотиками **вужького спектра дії** (бензилпеніцилін, новобіоцин, гризеофульвін), інші пригнічують ріст багатьох мікроорганізмів – **антибіотики широкого спектра дії** (тетрациклін, хлорамфенікол).

Антибіотики можуть пригнічувати розвиток мікроорганізмів (**бактеріостатична дія**), вбивати їх (**бактерицидна дія**) і розчиняти (**бактеріолітична дія**).

Для доказу антибіотичної активності та вибірковості дії антибіотиків на мікроорганізми ставитися такий досвід. У чашку Петрі засівають суцільним газоном культуру мікроорганізму і зверху накладають стерильним пінцетом круглі шматочки фільтрувального паперу, просочені різними антибіотиками. Чашки Петрі витримують 2 години при кімнатній температурі для кращої дифузії антибіотиків в товщу агаризованого середовища, а потім, не перевертаючи, поміщають в термостат на 24 год при температурі 30 °С. Через добу відзначають утворення зон пригнічення росту досліджуваних мікроорганізмів навколо дисків. Якщо досліджувана бактерія чутлива до певних антибіотиків, то навколо дисків виявляються зони відсутності росту культури.

Діаметр зони пригнічення росту вимірюють і роблять висновок про дію антибіотиків на даний мікроорганізм.

Може бути встановлено три результати: антибіотик не діє на мікроорганізм (зона відсутня), антибіотик діє слабо (діаметр зони <15 мм), середня дія антибіотика (діаметр зони від 15 до 25 мм), антибіотик має сильну дію (діаметр > 25 мм).

Фітонциди – це речовини, які продукуються рослинами і мають згубну дію на мікроорганізми. Характерними представниками

фітонцидів є ефірні олії, які виробляють з рослинної сировини промисловими способами.

Фітонциди різних рослин мають різну потужність і силу дії. Наприклад, екстракти з часника, туї, чорнобривців і сосни викликають лізис бактерій *E.coli* і *St.aureus*. Екстракт з календули не змінює зростання цих культур, а екстракт з цибулі відносно добре впливає на кишкову паличку і не виявляє ніякої дії на золотистий стафілокок.

3.7. Визначення рухливості

Роблять посів досліджуваної культури в стовпчик 0,2-5 %-ного напіврідкого агару методом уколу. Для того щоб особливості росту виявилися найбільш чітко, прокол роблять в безпосередній близькості від стінки пробірки. Посів поміщують в термостат на 24 години. Вироблений таким чином посів дає можливість виявити і відокремити рухомі мікроорганізми від нерухомих.

Нерухомі форми бактерій ростуть по лінії уколу, утворюючи невеликі вирости циліндричної або конічної форми. Навколишнє середовище при цьому залишається прозорим. Рухливі мікроби викликають виражене помутніння, що розповсюджується більш-менш рівномірно по всій товщі середовища.

3.8 Лабораторна робота № 3. Приготування поживних середовищ для мікроорганізмів. Культивування мікроорганізмів. Вплив чинників зовнішнього середовища на мікроорганізми

Мета роботи:

1. Ознайомитися з класифікацією поживних середовищ
2. Вивчити методи стерилізації поживних середовищ і обладнання.
3. Набути навичок приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів. Вивчити основи культивування мікроорганізмів на поживних середовищах.
4. Освоїти техніку посіву культур на поживні середовища та методи виділення чистих культур.
5. Дослідити вплив УФ-випромінювання, осмотичного тиску, рН середовища, температури, антибіотиків та фітонцидів на ріст мікроорганізмів.

Прилади, реактиви, посуд: йодний розчин (1 г йодистого калію розчинити в 5 мл води, до отриманого розчину додати 1 г йоду і довести об'єм суміші дистильованою водою до 300 мл); колби для

приготування середовищ; скляні палички; набір мінеральних солей, глюкоза, пептони, жовч, агар-агар; водяна баня; ваги; шпателі; термометр; порцелянова чашка; піпетки; паперові фільтри, полотно, вата.

3.8.1. Хід роботи

Приготувати поживні середовища.

1. Приготувати МПА. Для цього 0,8 г сухого бульйону і 0,4 г пептона суспензують в 40 мл дистильованої води і кип'ятять 5 хв, при необхідності бульйон фільтрують. В отриманому МПБ розчиняють при нагріванні 1 г агару. Доводять реакцію середовища до слаболужної 20 % розчином Na_2CO_3 (за універсальним індикаторним папером). Гарячу середу фільтрують, розливають в три пробірки. Першу пробірку заповнюють на 1/4 – 1/3 об'єму; другу пробірку – на 1/3 – 1/2 об'єму, третю – на 2/3. На пробірках необхідно написати назву живильного середовища.

2. Приготувати сусло-агар. Для цього 5 г солоду змішують з 40 мл дистильованої води. Суміш підігрівають до 55-58 °С до зникнення реакції на крохмаль (синє забарвлення з йодом), потім фільтрують. До сусла додають 1 г агару, кип'ятять до розчинення. Гаряче середовище розливають в три пробірки. Першу пробірку заповнюють на 1/4 – 1/3 об'єму; другу пробірку – на 1/3 – 1/2 об'єму, третю – на 2/3. Пробірки підписують (вказують назву середовища).

3. Приготувати дріжджове середовище. Для цього 5 г пресованих дріжджів розводять в 40 мл дистильованої води, кип'ятять 20 хв, фільтрують з піском. Додають 0,5 г сахарози, 0,05 г K_2HPO_4 , 0,02 г NaCl і 1 г агару, Доводять рН середовища до нейтрального значення. Середовище кип'ятять, фільтрують на лійці гарячого фільтрування і розливають в три пробірки. Першу пробірку заповнюють на 1/4 – 1/3 об'єму; другу пробірку – на 1/3 – 1/2 об'єму, третю – на 2/3. Пробірки підписують.

4. Приготувати картопляне середовище. Для цього 10 г очищеної картоплі варять у 50 мл води протягом 30 хвилин. Фільтрують через 3 шари марлі, доливають стерильною водою до початкового рівня, додають 1 г агару. Реакція середовища повинна бути нейтральною

5. Пробірки закрити ватяними пробками і ковпачками з фольги, простерилізувати в автоклаві протягом 30 хвилин.

6. Приготувати пробірки зі скошеними середовищами.

7. Після застигання поживних середовищ зробити посів мікроорганізмів на ці середовища. Провести посів культур в пробірку уколом, штрихом в чашку Петрі (2 чашки) і штрихом в скошену середу.

8. Опромінити ультрафіолетовою лампою одну з чашок Петрі.
9. У чашку Петрі засіяти культуру суцільним газоном і накласти 3 стерильних диска, просочених різними антибіотиками.
10. Всі посіви інкубувати при температурі 37°C протягом 48 годин.
11. На наступному занятті підрахувати кількість колоній, що виростили, розглянути і замалювати колонії бактерій. Описати їх культуральні ознаки. Зробити висновки щодо дії антибіотиків на мікроорганізми. Заміряти зони відсутності росту мікробів навколо дисків з антибіотиками.

Вивчити вплив підвищеного осмотичного тиску середовища на мікроорганізми.

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

Вивчити вплив високих температур на мікроорганізми

1. Чашки Петрі з застиглим МПА розкреслити з боку дна на три сектори і позначити їх за часом нагрівання культури: 0, 10, 30 хв.
2. Суміш бактерій посіяти петлею на сектор 0 (контроль). Метод посіву – штриховий поверхневий
3. Пробірку з культурою помістити у водяну лазню за температури 80 °C і прогріти 10 хв. Зробити висів прогрітої культури на сектор, позначений «10» (час прогріву).
4. Знову помістити пробірку з культурою у водяну лазню, прогріти додатково 20 хв. І зробити висів культури на сектор «30» (загальний час прогріву).
5. Підписати чашку з дна: № групи, дату і помістити в термостат за температури 37 °C на 24 години.
6. Проаналізувати ріст бактерій на МПА в чашці Петрі: порівняти інтенсивність росту бактерій в секторах відповідно до тривалості нагрівання культури за температури 80 °C.
7. Врахувати ріст, позначити інтенсивність росту позначками: «+++» – рясний ріст, «+» – незначний ріст, «-» – відсутність росту.
8. Результати досліджень записати в таблицю:

Назва культури	Інтенсивність росту після нагрівання		
	0	10 хв.	30 хв.

Вивчити вплив рН середовища на мікроорганізми.

1. У штативі на робочому місці – ряд позначених пробірок, що містять стерильний МПА з різними значеннями рН: 3,0; 7,0; 9,0.

2. У кожену пробірку стерильно внести бактеріологічною петлею суміш гнильних бактерій (протей) і поставити пробірки в термостат за температури 37 °С на 24 години.

3. Проаналізувати ріст бактерій у пробірках із МПА за різними значеннями рН. Відзначити інтенсивність росту гнильних бактерій за рН середовища: 3,0; 7,0; 9,0.

4. Позначити інтенсивність росту позначками:

«++» – рясний ріст, «+» – незначний ріст, «-» – відсутність росту.

5. Результати досліджень записати в таблицю.

6.

Назва культури	Інтенсивність росту за рН середовища		
	3,0	7,0	9,0

Вивчити вплив на мікроорганізми антибіотиків і фітонцидів

1. Дві чашки Петрі з застиглим МПА надписати з боку дна (№ групи, дата). Покласти чашки на стіл догори кришкою, відібрати стерильною піпеткою із пробірки краплю суспензії культури стафілококу і нанести її на поверхню МПА.

2. Потім стерильним шпателем круговими рухами розтерти культуру по поверхні агара.

3. 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. Стерильним скальпелем помістити кашку часнику в центрі живильного середовища з посівом бактерій.

4. Закрити чашки і, не перекидаючи (кришкою до гори), поставити її до термостату, витримати за 37 °С протягом 24 годин.

5. Проаналізувати ріст бактерій на поверхні МПА у чашках Петрі у присутності антибіотиків (фітонцидів). Заміряти зону затримки росту культури (у мм) і зробити висновок про чутливість стафілокока до антибіотика. Якщо зона затримки росту культури складає до 15 мм –

мікроб має малу чутливість до даного антибіотика; більше 25 мм – високу чутливість.

6. Відсутність зони затримки вказує на стійкість мікроорганізма до дії даного антибіотика. Результати досліджень записати у таблицю:

Назва культури	Результат	Назва антибіотика або фітонциду	
	Зона затримки росту, мм		
	Чутливість		

Контрольні питання до роботи № 3

1. На які групи діляться мікроорганізми залежно від типу харчування?
2. Метаболізм бактерій. Ферменти. Практичне застосування і використання біохімічної активності мікробів.
3. У чому відмінності катаболізму і анаболізму?
4. Поясніть сенс термінів «прототрофи» і «ауксотрофи».
5. Поясніть відмінності між автотрофними і гетеротрофних мікроорганізмами.
6. Які відмінності в джерелах живлення паразитів і сапрофітів?
7. У чому полягає функція пермеаз?
8. Визначте відмінності між пасивною і полегшеною дифузійми.
9. Яку роль відіграють екзоферменти в харчуванні бактерій?
10. Як називаються бактерії, які в якості джерела енергії використовують сонячне світло?
11. Як поживні речовини потрапляють в клітину? Що таке поживне середовище і для чого воно призначено? На які групи діляться поживні середовища?
12. Загальні вимоги, яким повинні задовольняти поживні середовища.
13. Класифікація середовищ за складом компонентів і призначенням мікроорганізмів.
15. Назвіть основні компоненти поживного середовища для гетеротрофних мікроорганізмів.
16. Що таке елективні поживні середовища?
17. Яким чином можна створити елективні умови для культивування мікроорганізмів?
18. Вплив аерації на процес культивування мікроорганізмів.
19. Культивування аеробних мікроорганізмів.
20. Культивування анаеробних мікроорганізмів
21. Вплив температурного режиму на процес культивування мікроорганізмів.
22. Періодичне і безперервне культивування.
23. Натуральні середовища, їх використання, приклади натуральних середовищ.

24. Які поживні середовища називають синтетичними? Де їх використовують?
25. Класифікація поживних середовищ за фізичним станом.
26. Основні загусники, використовувані для отримання щільних поживних середовищ.
27. Що таке накопичувальна культура? У чому полягає сутність методу накопичувальних культур?
28. Способи ущільнення середовищ; речовини, що застосовуються для ущільнення середовищ, їх характеристика та області застосування.
29. Загальноживані (стандартні) середовища для вирощування бактерій, дріжджів, цвілі.
30. Середовища, що дозволяють отримати прискорене зростання одних мікробів при одночасному придушенні зростання інших видів.
31. Способи стерилізації поживних середовищ.
32. Зростання і розмноження бактерій. Фази розмноження мікробної популяції.
Взаємовідносини мікробних популяцій в ценозах.
33. Типи взаємовідносин між мікроорганізмами.
34. Методи дослідження антагоністичної активності мікроорганізмів.

РОЗДІЛ 4. КУЛЬТУРАЛЬНІ ОЗНАКИ МІКРООРГАНІЗМІВ. СТАНДАРТНІ МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СУБСТРАТІВ: ВОДИ, ПОВІТРЯ, ГРУНТУ И ПРОДУКТІВ ТВАРИННИЦТВА

4.1 Особливості росту мікроорганізмів на щільних середовищах (культуральні ознаки)

Ознаки, які виявляються при розвитку культур мікроорганізмів на поживних середовищах, носять назву культуральних. До них відносяться: характер росту на різних (твердих, рідких) поживних середовищах, тип колонії, здатність до розрідження желатину і деякі інші.

З культуральних ознак мікроорганізмів найбільш істотним є будова колоній. Колонії – це скупчення великої кількості клітин мікроорганізмів одного і того ж виду, які можна побачити неозброєним оком на поверхні субстрату. Спори або окремі клітини мікробів, потрапляючи при посіві на певне місце щільного субстрату, не можуть як в рідині розсіюватися по всьому середовищі, а проростають і розмножуються на одному і тому ж місці, утворюючи колонії.

Колонії на чашці спочатку групують за культуральними ознаками:

Залежно від того, де розвивалися клітини (на поверхні щільного поживного середовища, в товщі його або на дні посудини), розрізняють поверхневі, глибинні і донні колонії. Утворення поверхневих колоній – найсуттєвіша особливість росту багатьох мікроорганізмів на щільному субстраті. Такі колонії відрізняються великою різноманітністю. При їх описі враховують такі ознаки:

- форму – округла, амебоподібна, неправильна, ризоїдна і та ін.;
- розмір (діаметр) – вимірюють в міліметрах: великі (діаметром 4-6 мм і більше); середні (2-4 мм); дрібні (1-2 мм) і точкові (не більше 1 мм) колонії.
- поверхня – гладка, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, з концентричними колами або радіально покреслена;
- профіль (рельєф) – плескатий, опуклий, кратероподібний і та ін.;

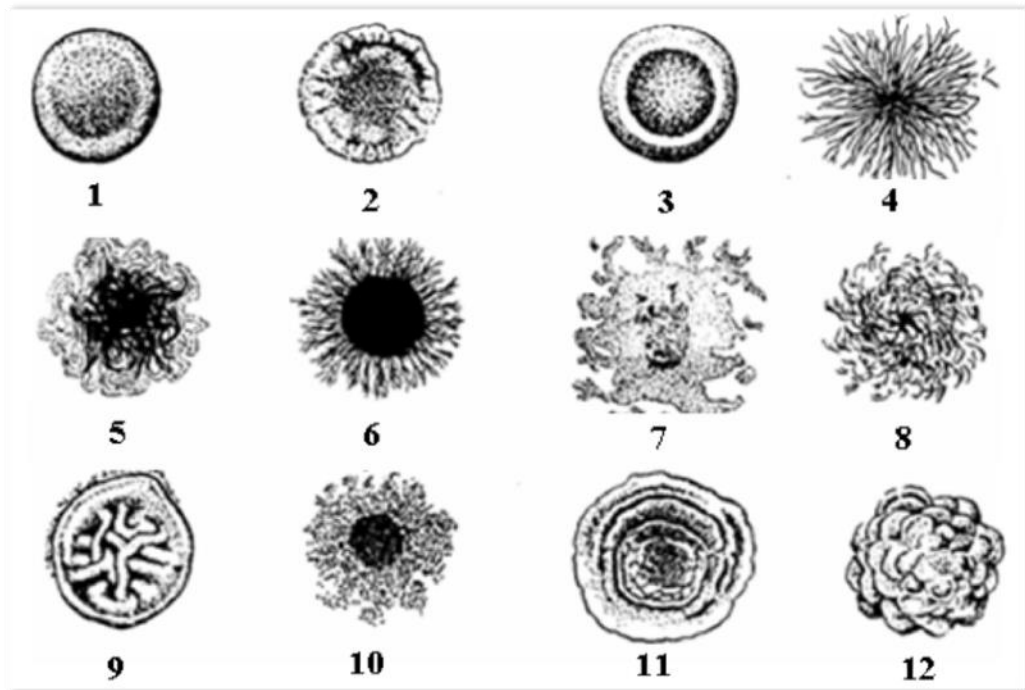


Рис. 43 - Форми колоній

1 - кругла; 2 - кругла з фестончатим краєм; 3 - кругла з валиком по краю; 4, 5 - ризоїдні; 6 - з ризоїдним краєм; 7 - амебоподібна; 8 - ниткоподібна; 9 - складчаста; 10 - неправильна; 11 - концентрична; 12- складна.

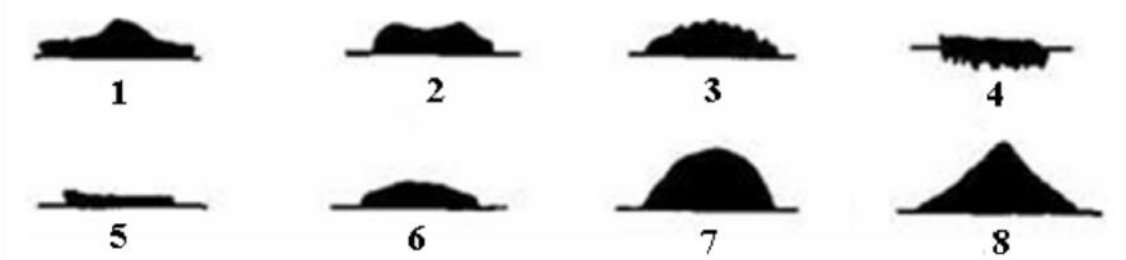


Рис. 44 - Профіль колоній

1 - вигнутий; 2 - кратероподібний; 3 - горбистий; 4 - врісний в субстрат; 5 - плескатий; 6 - опуклий; 7 - краплеподібний; 8 - конусоподібний

- блиск і прозорість – колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора;
- колір – безбарвна або пігментована – біла, жовта, золотиста, помаранчева, бузкова, червона, чорна і т.ін., відзначають виділення пігменту в субстрат;
- край – рівний, хвилястий, зубчастий, торочкуватий та ін .;

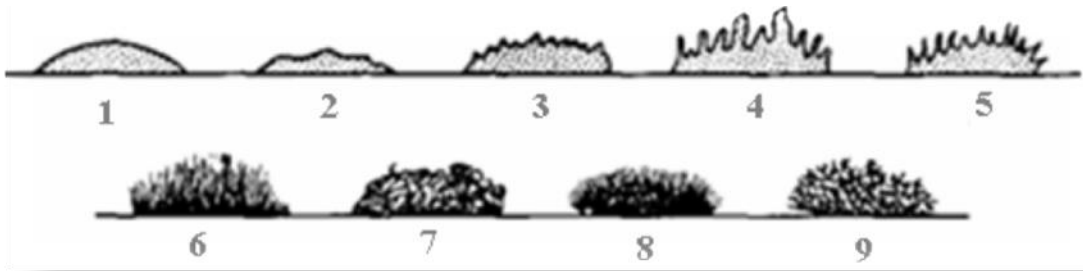


Рис. 45 - Край колоній

1- гладкий; 2 - хвилястий; 3 - зубчастий; 4 - лопатевий; 5 - неправильний;
6 - війчатий; 7 - нитчастий; 8 - ворсинчастий; 9 – гіллястий.

- структуру – однорідна, дрібно- або грубозерниста та ін.;

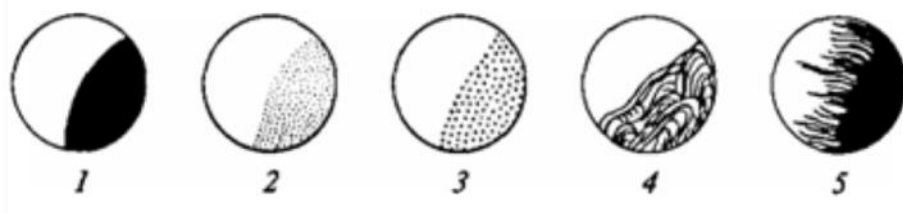


Рис. 46 - Структура колонії

1 - однорідна; 2 - дрібнозернистий; 3 - грубозерниста; 4 - струйчата;
5 – волокниста

• консистенцію визначають, торкаючись до поверхні колонії петлею. Колонія може легко зніматися з агару, може бути щільною, м'якою або вrostати в агар, слизевою (прилипати до петлі), тягучою, мати вигляд плівки (знімається цілком), бути крихкою (легко ламається при дотику петлею).

При описі зростання мікроорганізмів по *штриху* також відзначають такі особливості: убогий, помірний або рясний, суцільний з рівним або хвилястим краєм, чоткоподібний, що нагадує ланцюжок ізольованих колоній, дифузний, перистий, деревовидний, або ризоїдний. Характеризують оптичні властивості нальоту, його колір, поверхню і консистенцію.

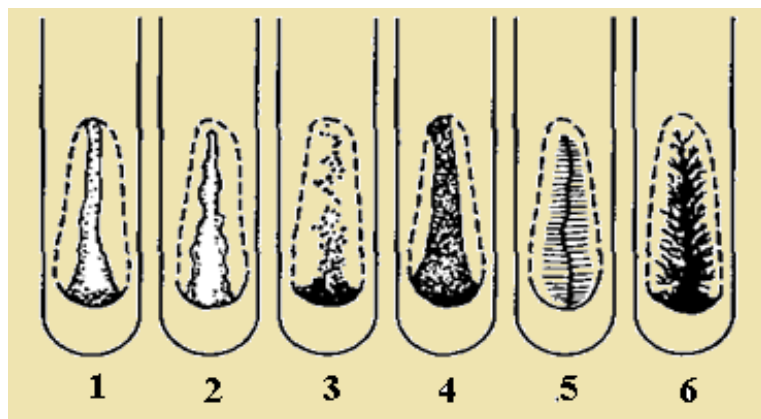


Рис. 47 – Зростання бактерій по штриху:

1 – суцільний з рівним краєм; 2 – суцільний з хвилястим краєм; 3 – чоткоподібний; 4 -дифузний; 5 – перистий; 6 – ризоїдний

Особливості колонії можуть змінюватися з віком, вони залежать від складу середовища і температури культивування.

Зростання мікроорганізмів на рідких поживних середовищах враховують, використовуючи 4-7 добові культури, вирощені за стаціонарних умов.

Вивчення колонії грає дуже важливу роль, тому що часто визначає успішність всієї подальшої роботи щодо ідентифікації виділеної культури; особливо в тих випадках, коли з матеріалу необхідно виділити конкретний вид.

4.2 Морфологічні ознаки

До морфологічних ознак мікробів відносяться форма і розміри клітин, характер поділу клітин, визначення рухливості, особливості спороутворення і джгутикування, наявність капсули, включень, забарвлення за Грамом та ін.

Для опису морфологічних ознак з домінуючих колоній готують препарати-мазки: петлею беруть трохи мікробного матеріалу, розмазують по склу, фіксують у полум'ї, фарбують кристалвіолетом 30-60 с і проводять мікроскопію з імерсією. Описують форму клітин, наявність або відсутність спор, капсул і замальовують в лабораторному журналі. Роблять висновки про переважаючі форми мікроорганізмів.

4.3 Фізіолого-біохімічні властивості

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей включає встановлення способу харчування досліджуваної бактерії (фото-/хемотрофи, авто/гетеротрофи) і типу енергетичного метаболізму

(здатність до бродіння, аеробного або анаеробного дихання або фотосинтезу). Важливо визначити такі ознаки, як відношення бактерії до молекулярного кисню, температури, рН середовища, солоності, освітленості та інших факторів середовища. До цієї групи ознак також входить перелік субстратів, які утилізуються як джерела вуглецю, азоту і сірки, потреба у вітамінах та інших факторах росту, утворення характерних продуктів метаболізму, наявність деяких ферментів. Для цього використовують спеціальні тести.

4.4 Характеристики обсіменіння навколишнього середовища і товарів мікроорганізмами. Кількісний облік мікроорганізмів

Мікроорганізми поширені в природі повсюдно: в ґрунті, водоймах, на різних поверхнях, в тілі людини і тварин. Одним з найбільш сприятливих субстратів для розвитку різноманітних мікроорганізмів є ґрунт. З ґрунту мікроорганізми потрапляють в повітря і воду. Ґрунт, вода і повітря можуть служити джерелом мікробного забруднення харчових продуктів, лікарської сировини і препаратів, виробничих приміщень, а також джерелом зараження людей патогенними мікроорганізмами. Однак визначення в об'єктах довкілля патогенних мікроорганізмів є складним, тому що вони перебувають там тимчасово і містяться в невеликих кількостях, а методи їх виявлення тривалі і трудомісткі. Тому для характеристики обсіменіння навколишнього середовища мікроорганізмами визначають **мікробне число і вміст санітарно-показових мікроорганізмів**.

Мікробне число (ЗМЧ) – це загальний вміст мікроорганізмів в одиниці ваги або обсягу досліджуваного об'єкта (*1 г ґрунту, 1 мл H₂O, 1 м³ повітря*).

Санітарно-показові мікроорганізми – це мікроорганізми, які постійно містяться у виділеннях людини і деяких теплокровних тварин; не перебувають у інших природних резервуарах або не мають інших природних середовищ існування; після виділення в навколишнє середовище зберігаються життєздатними протягом строків, близьких до термінів виживання деяких патогенних бактерій, що виділяються з організму тими ж шляхами; не можуть інтенсивно розмножуватися в довкіллі, тобто їх кількість залишається постійною певний період часу після потрапляння до навколишнього середовища; легко виявляються сучасними мікробіологічними методами і піддаються кількісному

визначенню; є типовими для диференціації від інших видів і стабільними за своїми ознаками.

Основними санітарно-показовими мікроорганізмами для різних об'єктів навколишнього середовища є наступні: *E. coli*, *S. faecalis* – для води; *E. coli*, *S. faecalis*, *C. Perfringens* – для ґрунту; *S. haemolyticus*, *S. viridans*, *S. aureus* – для повітря; *E. coli*, *S. faecalis*, *S. aureus* – для предметів побуту.

Для кількісної характеристики мікробної забрудненості ґрунту, води та інших об'єктів найбільш часто вживають показники: **колі-титр**, **колі-індекс** і **перфрингенс-титр**.

Колі-титр – це найменша кількість досліджуваного матеріалу, в якому виявляється життєздатна *E. coli*, коли-титр виражається в мілілітрах для води і в грамах для твердого матеріалу.

Колі-індекс – кількість клітин кишкової палички в 1 л води або 1 г ґрунту.

Санітарна оцінка показника: присутність в об'єкті підвищеної кількості бактерій групи кишкової палички свідчить про незадовільний санітарний стан об'єкта.

Існує два основних, принципово різних методи кількісного обліку мікроорганізмів в досліджуваному об'єкті: прямий підрахунок клітин під мікроскопом (в рахункових камерах, на фіксованих забарвлених мазках, на мембранних фільтрах) і шляхом культивування на поживних середовищах. На щільних середовищах – чашковий метод Коха, на рідких середовищах – метод граничних розведень або метод титру (див. 4.4.3). Методи прямого рахунку клітин під мікроскопом дають можливість врахувати чисельність, мікроорганізмів в субстраті найбільш повно. Однак при цьому визначаються найчастіше живі і мертві клітини. Крім того, одне тільки спостереження мікроорганізмів під мікроскопом не дозволяє судити про те, які процеси проводять вони в даному субстраті.

Clostridium perfringens є санітарно-показовим мікроорганізмом, тому що ці бактерії живуть в кишечнику теплокровних тварин і людини. Виявлення *Cl. perfringens* свідчить про фекальне забруднення (ці бактерії утворюють спори, що дозволяє їм тривалий час зберігатися в навколишньому середовищі). У вітчизняній практиці кількісний облік клостридій передбачений при дослідженнях ґрунту, лікувальних грязей, води відкритих водойм. Визначення цього мікроорганізму проводять і в деяких харчових продуктах, але вже як збудника харчових отруєнь.

При санітарно-мікробіологічному дослідженні ґрунту враховують комплекс показників, серед яких перфрингенс-титр. Для визначення перфрингенс-титру користуються розведеннями ґрунтової суспензії

(чистий ґрунт засівають в розведенні 10^{-1} - 10^{-3} , забруднений від 10^{-4} до 10^{-5}). По 1 мл з обраних розведень засівають в пробірки з 5 мл стерильного знежиреного молока або залізусульфітного середовища Вільсона-Блера. Посіви інкубують при 43 °С протягом 24-48 год, після чого враховують результати по характерному згортанні молока (утворення губчастого згустку у верхній частині пробірки і просвітлення сироватки) або за утворенням колоній *Clostridium perfringens* в агаровом стовпчику середовища Вільсона-Блера (колонії чорного кольору різної інтенсивності кольору, мають форму двоопуклої лінзи, грудочки вати або «літачка»). З колоній роблять мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують і обчислюють перфрингенс-титр. Клітини *Cl. perfringens* – рухливі (рідше нерухомі) короткі товсті палички з закругленими кінцями. Утворюють овальні або круглі ендоспори, розташовані центрально і надають клітинам веретеноподібну форму (спори також можуть розташовуватися термінально або субтермінально). В мазках розташовані поодинокі, попарно, у вигляді ланцюжків або паралельно один до одного, грампозитивні, каталазонегативні. Граничне розведення ґрунтової суспензії, яке дає на молочному середовищі розмноження *Cl. perfringens*, означає титр цього мікроорганізму в ґрунті.

Для чистої води перфрингенс-титр становить 0,01 і вище, для забрудненої – 0,009-0,0001, для сильно забрудненої – 0,0009 і нижче.

4.4.1 Дослідження мікрофлори повітря

Повітря – несприятливе середовище для мікроорганізмів, не є середовищем постійного проживання, а тільки тимчасового перебування або перенесення мікроорганізмів, однак кількість їх може бути значною. В повітрі немає поживних речовин, постійної оптимальної температури, часто відсутня волога, також згубно діють на мікроби сонячні промені. Мікроорганізми потрапляють в повітря, головним чином, з пилом або краплями рідини, з поверхні ґрунту, рослин, тварин, транспорту, водної поверхні. Особливо сильно забруднюється повітря мікроорганізмами при наявності пилу і великої скупченості людей.

Мікроби в повітрі поширені нерівномірно. На харчових виробництвах доводиться вважати, що мікрофлора з повітря – це фактор забруднення напівфабрикатів і готової продукції небажаною мікрофлорою. Для дослідження забрудненості повітря мікроорганізмами запропоновано кілька методів. Найбільш простим є метод осідання мікроорганізмів на поверхню щільного поживного середовища (**седиментаційний метод Коха**).

Метод полягає в тому, що стерильну чашку Петрі з м'ясопептонним агаром кладуть на аркуш чистого паперу. Кришку знімають і кладуть поруч, не перевертаючи. Тривалість експозиції становить 5 хвилин, після чого чашку Петрі закривають кришкою, обертають папером (заклеюють скотчем), перевертають догори дном, щоб уникнути розмиву колоній конденсаційною водою, підписують і поміщають в термостат при 28-30 °С на 48 годин. За кількістю колоній, що вирости можна судити про ступінь забрудненості повітря мікроорганізмами.

Р. Кох експериментально встановив, що за 5 хв на поверхню 100 см² осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л, або 0,01 м³ повітря. Щоб розрахувати, скільки мікробів міститься в 1 м³ повітря над відкритою при посіві чашкою Петрі з МПА, необхідно зробити наступне:

а) Підрахувати в чашці число колоній, що вирости (n). Колонія - це **отомство** однієї мікробної клітини на живильному середовищі.

б) Розрахувати площу чашки Петрі, для чого треба виміряти діаметр внутрішньої чашки з середовищем і розрахувати за формулою:

$$S_{\text{чашки Петрі}} = \pi r^2$$

в) Визначити кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря. Знаючи, скільки мікробів виростило на площі чашки Петрі, можна перерахувати, скільки їх було б на 100 см², а це, за методикою Коха, відповідає їх змісту в 0,01 м³, тобто в 1 м³ їх повинно бути в 100 разів більше.

Залежно від діаметра і площі чашок Петрі були розраховані постійні множники, на які треба множити число колоній, що вирости на даній чашці.

Діаметр чашки в см	Площа чашки в см ²	Множник розрахунку числа мікробів в 1 м ³
8	50	100
9	63	80
10	78	60
11	95	50

Наприклад: якщо на чашці площею 78 см² виростило 25 колоній, то кількість мікробів в 1 м³ = 25х60 = 1500.

Новий (як-то не пов'язано ні з чим. Ви описували метод Коха, а це к чому?) метод дуже зручний для практичної роботи. Ним широко користуються для з'ясування ступеня забруднення повітря в різних приміщеннях, коли ставлять завдання визначення загального

санітарного стану або ефективності вентиляції і прибирання приміщення. Застосовуючи спеціальні середовища, цим методом можна визначити забрудненість повітря різними групами і видами мікроорганізмів.

Критерії для санітарної оцінки повітря житлових приміщень (кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря):

Оцінка повітря	Загальна кількість мікроорганізмів в 1 м ³ повітря	
	Зимовий період	Літній період
Чисте	до 1500	до 4500
Забруднене	більше 1500	більше 4500

Оцінка санітарного стану повітря виробничих приміщень

Повітря виробничих приміщень може стати джерелом мікробного забруднення продуктів.

Санітарно-гігієнічна оцінка повітря проводиться за двома мікробіологічними показниками: загальної бактеріального обсіменіння (**КМАФАНМ** – кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів) і змістом санітарно-показових мікроорганізмів – гемолітичних стрептококів і стафілококів. Повітря приміщень вважається чистим, якщо КМАФАНМ не перевищує 1500 КУО/м³ (КУО – колонієутворюючі одиниці), а гемолітичних стрептококів і стафілококів не більше 16 в 1 м³. Як поживні середовища використовують м'ясопептонний агар (для визначення КМАФАНМ) і кров'яний агар (для визначення гемолітичних стрептококів і стафілококів).

Для визначення мікроорганізмів у повітрі використовують седиментаційний і аспіраційний методи.

Седиментаційний метод заснований на мимовільному осіданні пилинок і крапель разом з мікроорганізмами на поверхню щільного поживного середовища у відкритих чашках Петрі.

Аспіраційний метод полягає в примусовому осіданні мікроорганізмів з повітря на поверхні щільних поживних середовищ. Здійснюється аспіраційний метод за допомогою спеціальних приладів (наприклад, приладу Кротова), забезпечених вентиляторами, які засмоктують повітря в прилад через клиноподібну щілину. У приладі повітря вдаряється об поверхню щільного поживного середовища у відкритій чашці Петрі.

Окрім нормованих мікробіологічних показників в повітрі виробничих цехів і холодильниках на підприємствах харчової промисловості визначають наявність спор мікроскопічних грибів і дріжджів, які довільно осідають на поверхні сусло-агару або середовища Сабуро за 5 хвилин. Посіви культивують при кімнатній температурі протягом 5-ти діб. Санітарно-гігієнічна оцінка проводиться за 3-х бальною шкалою.

Стан повітря відмінний, якщо в посівах спори грибів і дріжджів не виявлені; гарний, якщо на поверхні середовища осідає до 2 спор грибів, а спори дріжджів не встановлені; задовільний, якщо в чашках Петрі після культивування виростає не більше 5-ти колоній грибів і 2-х колоній дріжджів.

Для зниження бактеріального обсіменіння повітря проводять провітрювання і вологе прибирання приміщень. Знизити вміст мікроорганізмів в повітрі можна також шляхом його фільтрації через повітряні фільтри, застосовуючи фізичні і хімічні методи знезараження повітря: обробку ультрафіолетовими променями; препаратами, що містять хлор, у вигляді випарів і аерозолів. Ефективним способом є озонування повітря.

4.4.2 Мікробіологічне дослідження води

Ступінь зараженості води мікроорганізмами має важливе значення в технології харчового виробництва. Якість води для виробництва повинна повністю відповідати ДСТУ і іншим вимогам санітарного нагляду. Збудники багатьох харчових кишкових захворювань (бактерії дизентерії, черевного тифу, паратифів та ін.) виділяються хворими і бактеріоносіями разом з фекаліями в зовнішнє середовище і, отже, можуть потрапляти у відкриті водойми і водні джерела.

Безпосереднє визначення патогенних мікробів у воді в умовах харчових підприємств і лабораторій, по-перше, не допускається, по-друге, методично ускладнене, тому що багато їх видів не піддаються вирощуванню на стандартних поживних середовищах. Тому в лабораторній практиці присутність цих мікроорганізмів у воді зазвичай встановлюють непрямим шляхом, а саме:

- 1) визначають загальну кількість мікроорганізмів в 1 мл води;
- 2) визначають зараженість води БГКП (бактерії групи кишкової палички), тому що останні є специфічними представниками кишкової мікрофлори людини, де містяться у величезних кількостях (сотні мільйонів на 1 г фекалій).

Виявлення в воді БГКП вказує на її фекальне забруднення і свідчить про можливу присутність у воді збудників зазначених вище

кишкових захворювань. Таким чином, БГКП виконують роль санітарно-показових мікроорганізмів при визначенні доброякісності питної води, харчових продуктів, санітарного стану технологічного обладнання. У стандартах передбачені гранично допустимі норми вмісту бактерій кишкової групи в воді і продуктах харчування.

БГКП об'єднує групу схожих між собою бактерій: *Escherichia coli commune*, *Escherichia coli citrovomm*, *Escherichia coli aerogenes*, *Bad paracoli* та ін.

Основними морфологічними і фізіологічними ознаками цієї групи є такі:

- 1) короткі безспорові, грамнегативні, в більшості своїй рухливі палички;
- 2) аероби і факультативні анаероби;
- 3) зброджують цукор: глюкозу, лактозу, маніт (залежно від різновиду) при температурах 43-45 °С протягом 24 годин з утворенням кислоти і газу;
- 4) ростуть на фуксіносульфітному агарі (середя Ендо) у вигляді темно-червоних колоній з металевим зеленувато-золотистим блиском або червоних і рожевих колоній з більш темним центром.

При санітарно-гігієнічній оцінці води важливо не тільки знайти БГКП, але необхідно врахувати і кількість цих бактерій, що дозволить судити про ступінь фекального забруднення води. Для обліку в воді визначають титр кишкової палички (*coli-titp*) і індекс (*coli-індекс*). Коли-титром називається найменша кількість води (в мл), в якій виявлена хоча б одна паличка БГКП, коли-індекс – це кількість паличок, знайдених в одному літрі досліджуваної води.

За ДСТУ для питної води, що пройшла очищення, коли-титр повинен бути не нижче 300, коли-індекс – не більше 3, загальна кількість мікроорганізмів – не більше 100 в 1 мл води.

Для визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води роблять глибинний посів 1 мл досліджуваної води на м'ясопептонний агар (МПА) в чашку Петрі. Якщо вода сильно забруднена, посів проводять з розведенням (залежно від ступеня забрудненості).

Методика посіву (чашковий метод Коха). Цей метод є найбільш поширеним для визначення загальної мікробного обсіменіння різних субстратів. Сутність чашкового методу полягає в тому, що виробляють посів певного обсягу досліджуваного матеріалу в чашки Петрі з щільним поживним середовищем. При подальшому вирощуванні посіву в термостаті з кожної клітини в результаті розмноження утворюється колонія; кількість їх підраховують.

Як поживне середовище для обліку бактерій застосовують м'ясопептонний агар, для підрахунку цвілевих грибів і дріжджів – сусло-агар. Робота цим методом включає три етапи: приготування розведень, посів на щільне поживне середовище в чашки Петрі і підрахунок колоній, що вирости.

Приготування розведень. Кількість мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища, як правило, велика, тому для отримання окремих колоній готують ряд розведень досліджуваної речовини. Розведення готують в стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині (0,5 % розчин NaCl), зазвичай користуються десятикратними послідовними розведеннями (1:10, 1: 100, 1: 1000 т. д.).

При дослідженні продукту твердої консистенції на технічних вагах відважують, за допомогою годинникового скла і стерильного скальпеля пробу продукту (10г), переносять до стерильної ступки і розтирають в однорідну масу, додаючи стерильний кварцовий пісок. Отриману навіску кількісно і асептично переносять до колби з 99 (90) мл стерильної води або фізіологічного розчину – отримаємо 1-е розведення (1:10). Суспензію в колбі ретельно збовтують протягом 3-5 хв, іншою стерильною піпеткою беруть 1 мл отриманої суспензії і переносять до пробірки з 9 мл стерильної води (для приготування кожного розведення обов'язково використовують окрему піпетку). Це друге розведення 1:100. Суспензію цього розведення перемішують за допомогою іншої стерильної піпетки, вбираючи і випускаючи з неї отриману суспензію. Цю процедуру повторюють 3-5 разів, що забезпечує перемішування суспензій і зменшує адсорбцію клітин на стінках піпетки. Потім цією ж піпеткою беруть 1 мл цієї суспензії і переносять її в наступну пробірку – це розведення 1:1000.

Аналогічно готують і наступні розведення. Ступінь розведення досліджуваного зразка визначається передбачуваною кількістю мікроорганізмів у зразку, і, відповідно, число розведень тим більше, чим більше мікроорганізмів у вихідному субстраті (рис. 48). Оптимальним розведенням вважається таке, при засіву якого на щільному живильному середовищі виростає від 50 до 100 колоній.

Посів на агарізовані середовища в чашки Петрі для поверхневого зростання.

У стерильні чашки Петрі наливають розплавлену на киплячій водяній бані щільну середу, по 20-30 мл в кожну. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки не застигне агар. Потім їх витримують 2-3 доби при 30 °С кришками вниз для підсихання поверхні середовища і перевірки його стерильності. Для посіву відбирають чашки, середовище

в яких залишилося стерильним. Коли використовують елективні середовища або виділяють і враховують мікроорганізми, що вимагають підвищеної вологості, посів проводять одразу ж або незабаром після застигання агару. Посів роблять з певних розведень, залежно від передбачуваної кількості мікроорганізмів в досліджуваному субстраті.

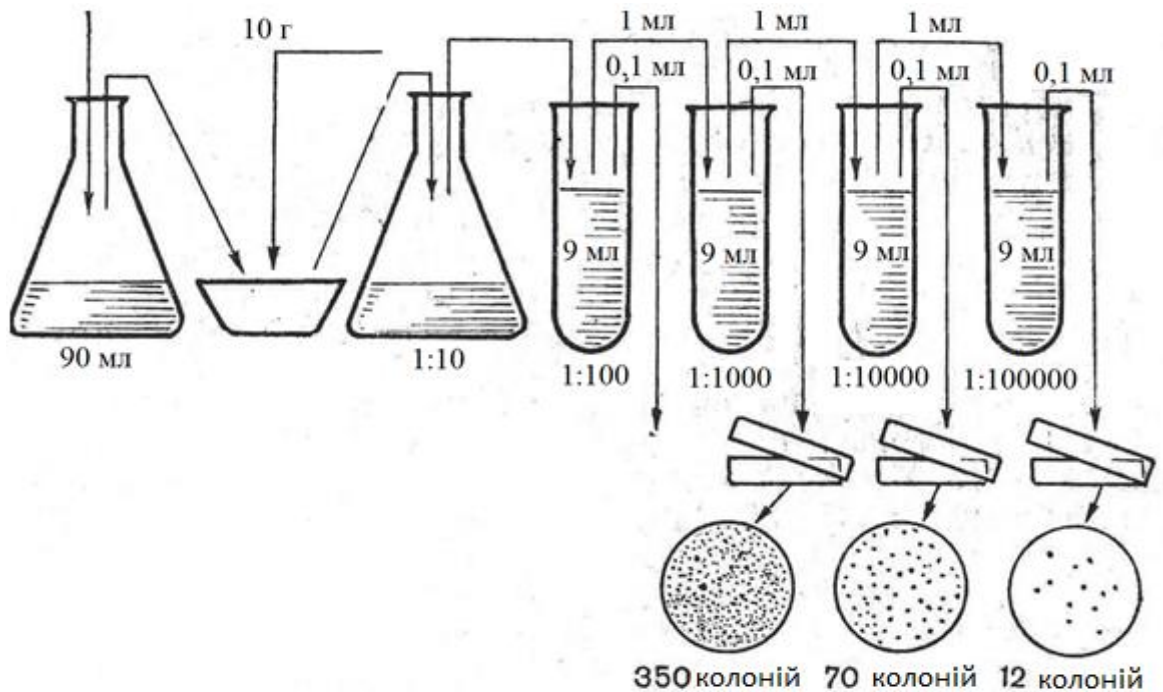


Рис.48 - Схема приготування розведень суспензії мікроорганізмів і посіву

Стерильною піпеткою наносять певний обсяг (зазвичай 0,05, 0,1 або 0,2 мл) відповідного розведення, попередньо ретельно перемішаного, на поверхню агарового середовища в чашці Петрі. Цей обсяг розподіляють по поверхні середовища стерильним шпателем (Дригальського). Потім цим же шпателем проводять по всій поверхні в другій чашці, куди посівний матеріал не вносили. При виявленні мікроорганізмів, кількість яких в субстраті відносно невелике, посівний матеріал розподіляють по поверхні середовища тільки в одній чашці Петрі. З кожного розведення роблять, таким чином, 4-6 паралельних висівів. Для паралельних посівів з одного розведення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем. Для посівів з різних розведень, кожного разу використовують нову стерильну піпетку і новий шпатель. Чашки з засіяними середовищами поміщають в термостат, відрегульований на певну температуру, сприятливу для розвитку досліджуваних мікроорганізмів, перевернувши їх догори дном.

Для глибинного посіву (в товщі середовища) використовують зазвичай мірні кількості густого середовища, заготовлені в пробірках по

10-15 мл. Культуру вносять у пробірку з розплавленим і охолодженим до 40-45 °С агаром, а потім заливають суміш в чашку Петрі. Можливий і інший спосіб глибинного посіву: суспензію мікроорганізмів вносять безпосередньо в стерильну чашку Петрі на дно, злегка відкривши кришку, а потім заливають її розплавленим і охолодженим агаром. Середовище з культурою ретельно перемішують круговими рухами чашки, не піднімаючи її з поверхні столу. Після цього чашку залишають на столі до застигання агару.

Посіви води вирощують в термостаті при температурі 30-35 °С протягом 24 год, після чого підраховують кількість колоній на чашці. *За прийнятими нормами вважається, що добра питна вода містить в 1 мл до 100 мікроорганізмів, сумнівна від 100 до 500 мікроорганізмів, якщо забруднення вище 500, то вода вимагає очищення.*

Для визначення титру кишкової палички у воді запропоновані методи бродильних проб, мембранних фільтрів та інших. Бродильний метод заснований на здатності БГКП зброджувати цукор з утворенням газу і кислот в умовах підвищених температур (43–45 °С).

Для посіву води використовують рідке середовище Буліра (м'ясна вода – 1 л, пептони – 10 г, маніт – 15г, NaCl – 5г, 1 % водний розчин нейтральрот – 2 мл, який додають після доведення рН середовища до 7,0–7,2). Вказане середовище розливають в пробірки з маленькими перевернутими пробірочками (поплавками) і стерилізують дрібно або 30 хв при 0,5 атм в автоклаві.

Для посіву беруть 1 мл досліджуваної води. Засіяні пробірки ставлять на 45 годин в термостат при температурі 43–45 °С максимальної для БГКП, але гнітючої для розвитку більшості інших сапрофітних мікроорганізмів. При розвитку БГКП на середовищі Буліра відзначають наступне:

- 1) помутніння (розвиток бактерій);
- 2) накопичення газу в поплавцях (збродження маната);
- 3) зміна забарвлення (кишкова паличка відновлює нейтральрот, завдяки чому червоне забарвлення зникає і середовище набуває солом'яно-жовтого кольору).

Якщо газу і каламуті немає, це вказує на відсутність фекального забруднення. Наявність газу і помутніння або тільки помутніння вказує на можливість присутності БГКП.

Посів на середовище Ендо. У зв'язку з тим, що в пробах досліджуваної води, а також в змивах з устаткування, сировини, напівфабрикатів, харчових продуктів, рук працівників та інших об'єктів можуть бути присутніми різні бактерії, що зброджують маніт з утворенням газу, то для точного встановлення наявності БГКП з пробірок роблять пересів на специфічне середовище Ендо (спосіб

приготування вказано на етикетці промислово приготовленого сухого середовища Ендо). Готове середовище в розплавленому стані має червонуватий колір, застиглий в чашках Петрі – кремовий.

Середовище Ендо готується на 2–3 доби. При більш тривалому зберіганні його необхідно тримати в холодильнику.

Пересів з середовища Буліра на середовище Ендо роблять у такий спосіб: олівцем по склу розмічають дно чашки на сектори по кількості пробірок, в яких виявлено помутніння і газоутворення. З кожної пробірки, захопивши невелику кількість матеріалу, роблять висів за допомогою петлі в відповідний сектор на чашку. Посів роблять штрихом, проводячи петлею зигзаг по поверхні агару для отримання ізольованих колоній. Чашки з посівом поміщають в термостат при 37 °С на 24 год.

Після закінчення терміну вирощування колонії досліджують. При розвитку на середовищі Ендо типова кишкова паличка утворює характерні колонії червоного кольору з металевим блиском, іноді темно-червоні та рожеві з темним центром.

Якщо бродильна проба на середовище Буліра позитивна і культура на середовищі Ендо має яскраво-червоні колонії, можна вважати встановленим присутність в досліджуваних пробах БГКП.

З типових колоній слід приготувати мазки і пофарбувати їх по Граму. Виявлення в мазках грамнегативних паличок підтверджує наявність бактерій кишкової групи.

4.4.3 Санітарно-бактеріологічне дослідження обладнання, інвентарю, рук персоналу і інших об'єктів, пов'язаних з виробництвом продуктів

Відбір проб для дослідження мікрофлори обладнання проводиться методом змиву тампоном змоченим стерильною водою з площі обмеженою рамкою-шаблоном. Рамка-шаблон виготовляється з дроту і має площу 100 см² (10 x 10).

Перед взяттям проби шаблон фламбірують – обпалюють у полум'ї пальника. Ватний тампон змочують водою з пробірки з 10 мл стерильною водою і, зробивши змив, опускають його в пробірку. Пробірку добре струшують і роблять посів по 1 мл на МПА і в пробірки з середовищем Буліра або Кесслера для виявлення БГКП. Посіви вирощують при t °37 °С протягом 24 год. З огляду на кількість колоній на МПА роблять перерахунок на 1 см² площі обладнання за формулою $M = n \cdot 10 / s$, де M – загальна бактеріальна забрудненість, n – кількість колоній в 1 мл змиву, 10 – кількість стерильної води (мл), s – площа з

якої проведений змив. Розрахувавши загальну забрудненість об'єкта, заповнюють таблицю і роблять висновок про його санітарний стан.

Оцінка	Загальна забрудненість КУО / см ² .
Чистий	до – 10 000
Помірне забруднення	10000 – 100 000
Сильна забрудненість	Більше 100 000

Аналіз мікрофлори рук

Для перевірки особистої гігієни обслуговуючого персоналу виконують аналіз рук на кишкову паличку і загальну кількість бактерій.

Готують ватні тампони, стерилізують їх, занурюють в пробірки з 2 мл стерильної води або ізотонічного розчину хлориду натрію, при цьому тампон не повинен торкатися поверхні рідини, змочують тампон безпосередньо перед взяттям проб. Змиви з рук отримують, ретельно протираючи долоні, міжпальцеві і піднігтьові області вологим стерильним тампоном на дерев'яній палочці. Тампон занурюють в ту ж пробірку, в якій він змочувався, додаючи ще 8 мл стерильної води і віджимають (розведення 1:10).

Загальну мікробну забрудненість визначають, засіваючи 1 мл змиву, в глибину розплавленого МПА в чашці Петрі, як це описано для визначення мікробного числа води. Посіви вирощують добу при 37 °С протягом 48 годин, підраховують кількість колоній, що вирости і визначають загальну мікробну забрудненість даного об'єкта. Для виявлення дріжджів і грибів роблять посів на сусло-агар.

Контроль чистоти рук та спецодягу працівників

Періодично проводять контроль обробки рук хлорним вапном, для чого окремі ділянки рук протирають ватним тампоном, змоченим йодкрохмальним розчином (суміш розчинів – 6 % розчину йодистого калію і 4 % розчину розчинного крохмалю в рівних співвідношеннях). Якщо тампон і поверхні рук в місцях зіткнення з тампоном забарвлюються на синьо-бурий колір, то це свідчить про присутність іонів хлору.

Чистоту рук можна перевірити також за допомогою індикаторних папірців для визначення бактерій групи кишкової палички. Для цього індикаторний папірець змочують у стерильній воді і накладають на руку. Потім папірець поміщають в пакет, запаюють і термостатують протягом 12 годин при 37 °С. Поява рожевих плям свідчить про присутність БГКП (бактерії групи кишкової палички).

Аналіз чистоти рук працівників проводять (без попередження) перед початком виробничого процесу тільки у робочих, які

безпосередньо стикаються з чистим обладнанням або продукцією. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 мл змиву при відсутності кишкових паличок:

Кількість мікроорганізмів в 1 мл змиву з рук	Оцінка чистоти
До 1000	Відмінно
1000-5000	Добре
5000-10000	Задовільно
Понад 10000	Погано

Халати, куртки, фартухи, рукавички з тканини періодично досліджують на присутність кишкових паличок шляхом посіву 1 см³ змивної води в середу Кесслера. Кишкові палички на спецодязі мають бути відсутні.

Щоб визначити ступінь обсіменіння досліджуваного об'єкта (мікробне число), необхідно результат підрахунку кількості колоній в чашках Петрі, помножити на знаменник відповідного розведення і обчислити середнє арифметичне число з отриманих цифр. Середнє арифметичне число вираховується тільки з цифр одного порядку. Наприклад, при аналізі посіву отримали таку кількість колоній в чашках Петрі: I - 150, II - 95, III - 8. Отримані цифри множимо на знаменник відповідного розведення:

$$I - 150 \times 100 = 15000$$

$$II - 95 \times 1000 = 95000$$

$$III - 8 \times 10000 = 80000$$

$$15000 + 95000 + 80000 = 210000$$
$$210000 : 3 = 70000$$

Отже, в узятій наважці досліджуваного продукту міститься 70000 бактерій. За отриманими результатами розраховують кількість бактерій в 1 г або 1 см² досліджуваного продукту.

4.4.4 Мікрофлора зерна і борошна та методи її визначення

Типовою мікрофлорою доброякісного свіжозібраного зерна є епіфітні бактерії роду *Erwinia* (*Erwinia herbicola*) або «трав'яна паличка». Кількість цих бактерій іноді становить 90 % від загального числа мікроорганізмів на зерні, що певною мірою є показником свіжості зерна і його доброї якості. З числа грибів на зерні відразу після збирання переважно виявляються так звані «Польові гриби» – представники класу недосконалих грибів: роду *Alternaria*, *Cladosporium*, *Dematium* і ін. При збиранні зерна в умовах високої вологості на ньому переважають гриби

роду *Fusarium*, *Helminthosporium* які руйнують зародок і різко знижують схожість зерна вже в період його збирання.

При подальшому зберіганні зерна, що пройшло своєчасну необхідну післязбиральну обробку (очищення, вентилявання, підсушування і т.п.), епіфіти і польові гриби на ньому досить швидко зникають. Загальна кількість мікроорганізмів знижується. З числа бактерій виявляються в невеликих кількостях спороутворюючі палички типу *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* та ін. Серед грибів – переважають цвілі – види *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Найбільш активний розвиток цвілі зберіганні і гнильних бацил відбувається при саморозігріванні зерна, коли температура в насипу досягає 30-40 ° С і більше. В процесі самозігрівання різко погіршується якість зерна – воно темніє, злежується, набуває стороннього запаху і смаку.

Кількісний та якісний склад мікрофлори борошна залежить від ступеня обсіменіння мікроорганізмами зерна, а також від сортності помелу. Оскільки основна маса мікробів знаходиться на поверхні зерна, то в високосортному борошні завжди менше мікробів, ніж в борошні низькосортному, яке містить більшу кількість висівок. Обсіменіння борошна мікрофлорою сильно залежить не тільки від сорту, але й від вологості, температури і тривалості зберіганні. При зберіганні борошна з вологістю вище стандартної (14-15 %) відбувається розмноження мікробів, що призводить до комкування і злежування продукту. При більш активному розвитку мікрофлори виникають різні вади борошна – пліснявіння, прогоркання, прокисання.

Найбільш небезпечними серед бацил є різновиди *Bacillus Subtilis*, які потрапляють в борошно при помелі зерна, що піддавалося саморозігріву. Вегетативні клітини гнильних бацил гинуть при $t = 98-100$ °, яка виникає в м'якушці при випічці хліба. Однак, термостійкі спори бацил переносять нагрівання до 120 °С. Зберігаючись в хлібі, вони при недостатньому охолодженні й затримці реалізації розвиваються в м'якушці пшеничного хліба, розкладають білки і крохмаль, утворюють слизисті речовини – **декстрини**. В результаті м'якуш хліба набуває гнильного запаху і тягучу консистенцію.

Гнильні бацили складають специфічну мікрофлору борошна. Тому в практиці хлібопечення кожен партію борошна перевіряють на наявність спор зазначених бацил. На підставі отриманих результатів дається оцінка якості борошна за мікробіологічним показником – кількість спор бацил в 1 г борошна. При наявності в 1 г борошна до 200 спор – борошно вважається нормальним. Від 200 до 1000 спор – мука сумнівної якості. Від 1000 спор і більше – мука сильно заражена спорами і не повинна використовуватися для випічки крупно-штучних виробів (буханок, батонів та ін.). Таке борошно може бути використане

для дрібноштучних виробів з низькою вологістю (сухарі, бублики, сушки і ін.).

4.4.5 Мікрофлора молока, молочних продуктів і методи її визначення

Молоко за живильною цінністю є ідеальним продуктом для живих організмів в т.ч. мікроорганізмів. Молоко у вимені здорової корови практично стерильне, рН свіжого молока - 6,8. Однак відразу після доїння молоко забруднюється мікрофлорою із зовнішнього середовища: шерсті тварин, кормів, доїльного обладнання і т.д.

Характеристика молочнокислих бактерій. Грампозитивні. Можуть бути коками й паличками. Містять запасні речовини волютин і глікоген (тому добре забарвлюються метиленовою синню). Вони нерухомі, неспоріві, факультативні анаероби (аеротолерантні). Серед них є мезофіли і термофіли. Джерело вуглецю – моно- й дисахариди (глюкоза, фруктоза, лактоза). Джерело азоту – білки (казеїн молока) – аміногетеротрофи. Вимогливі до фосфору, кальцію, вітамінів – ауксогетеротрофи. Ацидофіли.

У молоці, отриманому при дотриманні санітарних правил переважають мікрококи, в невеликій кількості містять молочнокислі стрептококи, сарцини та ін.

Забруднене молоко може містити значну кількість бактерій групи кишкової палички, молочнокислих, маслянокислих і гнильних бактерій. Під час подальшого зберігання молока змінюється кількість в ньому бактерій, що містяться в ньому, і співвідношення між окремими видами. Характер цих змін залежить від температури, тривалості зберігання та складу мікрофлори при отриманні. Слід зазначити кілька фаз:

Бактерицидна фаза: відразу після доїння число бактерій в молоці не збільшується і навіть іноді знижується. Це пояснюється тим, що в парному молоці містяться бактерицидні речовини – лактеніни, лізоцим та ін. Здатні пригнічувати розвиток бактерій. Тривалість бактерицидної фази залежить від кількісного обсіменіння молока мікрофлорою і температури його зберігання. Чим швидше молоко охолоджують після доїння, тим більш тривалою стає його бактерицидна фаза. Наприклад, якщо в молоці з $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (парне) бактерицидна фаза триває всього до 3 годин, то при охолодженні молока до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ бактерицидна фаза досягає 36 годин.

Після закінчення бактерицидної фази настає фаза змішаної мікрофлори. При цьому розвиваються всі мікроорганізми, що потрапили в молоко. Але поступово починають переважати молочнокислі бактерії. В кінці фази відзначається підвищення кислотності молока і настає фаза

молочнокислих бактерій. У цій фазі молочнокислі бактерії швидко розвиваються і пригнічують інші мікроорганізми. Молоко при цьому сквашується.

Різні види молочнокислих бактерій утворюють різну кількість молочної кислоти, що пояснюється їх неоднаковою кислотостійкістю. Більш стійкі гомоферментативні паличкоподібні бактерії, вони утворюють до 2-3,5 % молочної кислоти, в той час як молочнокислі стрептококи лише до 1 %. По відношенню до температури молочнокислі бактерії можна розділити на мезофільні (з оптимумом росту при 25-35 °С) і термофільні – (оптимум 40-45 °С).

При подальшому зберіганні молока зі збільшенням концентрації молочної кислоти пригнічується розвиток самих молочнокислих бактерій, число їх починає знижуватися. На сквашеному молоці створюються умови для розвитку псевдодріжджів і цвілевих грибів. Зростання бактерій пригнічується. В результаті розвитку грибів *Oidium lactis*, видів *Penicillium* та ін. Кислотність молока знижується, внаслідок споживання ними молочної кислоти і створюються сприятливі умови для розвитку гнильних бактерій, які прискорюють процес розпаду білків молока, що призводить продукт до остаточного псування.

У молоці збереженому при t нижче 10 °С молочнокислі бактерії майже не розмножуються, що сприяє розвитку холодостійких бактерій роду *Pseudomonas* або маслянокислих клостридій, які викликають прогорання продукту.

У даний час в молоці і молочних продуктах визначають такі мікробіологічні показники: **КМАФАнМ** (кількість мезофільних аеробних і факультативно-аеробних мікроорганізмів); **БГКП** (бактерії групи кишкової палички); **КПС** (коагулязопозитивний стафілокок).

Кожну групу визначають за відповідною методикою: **КМАФАнМ** – методом посіву та обліку бактерій на МПА з крейдою (для виявлення молочнокислих бактерій до основного середовища додають 2-3% крейди). Метод виявлення БГКП в молоці і молочних продуктах заснований на здатності бактерій кишкової групи зброджувати лактозу в середовищі Кесслера (див. Додаток) з утворенням кислоти і газу.

По 1 мл. пастеризованого молока засівають в пробірки з 5 мл середовища Кесслера і поміщають в термостат при 30 °С на 24 години. Після чого пробірки переглядають і за наявністю в них газоутворення імовірно судять про присутність БГКП. Для ідентифікації з пробірок, в яких спостерігається бродіння, проводять посів на діагностичну щільну середу Ендо.

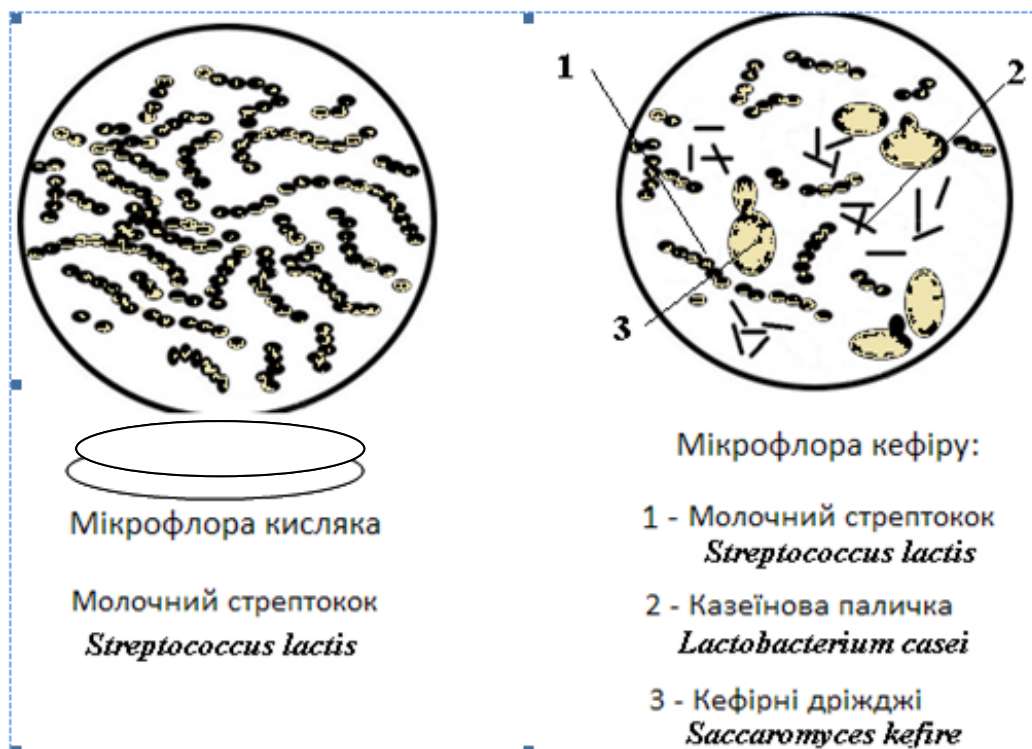


Рис. 49 - Мікрофлора молочнокислих продуктів

4.4.6 Мікрофлора вершкового масла і маргарину

Мікрофлора масла залежить від мікрофлори молока і складається в основному з молочнокислих бактерій. Кількість бактерій в маслі, виготовленому зі свіжих вершків або сметани, може сягати мільйонів в 1 г продукту. Інші види бактерій можуть потрапляти в масло з апаратури, повітря, води та ін. Відомо, що бактерії можуть розвиватися тільки в плазмі масла. Плазма – це водний розчин білків, молочного цукру і солей, плазма поширена в маслі у вигляді краплин різної величини (дисперсійна фаза).

Зберігання масла при недостатньо низьких температурах погіршує його якість в основному в результаті розвитку в ньому мікробіологічних процесів. Тому для характеристики якості масла має значення загальна кількість в ньому бактерій (КМАФАнМ), в т.ч. гнільних і жиророзщеплювальних видів, розвиток яких призводить до пептонізації і глибокого розпаду білка і жиру з утворенням гнильного сирного запаху і гіркого смаку. Прогоркання масла викликають також багато видів цвілевих грибів в т.ч. *Oidium lactis*, *Penicillium glaucum*, рідше гриби з роду *Cladosporium*, *Alternaria* та ін. Гриби зазвичай розвиваються на поверхні масла, але деякі види (*Cladosporium*) здатні рости в пустотах погано спресованого масла. Гриби утворюють на поверхні і в пустотах чорні і кольорові нальоти, розщеплюють білок і

жир, що виявляється у вигляді різних вад масла – осалювання, прогоркання, поява гнильного та інших неприємних запахів.

Маргарин – цей продукт отримується шляхом змішування рослинних олій, тваринних жирів, сквашеного і свіжого молока або води. Для покращення консистенції, смаку і аромату додають сіль, цукор, вершкове масло, барвники, вітаміни та ін. Для отримання сквашеного молока застосовують спеціальні закваски, що є сумішшю чистих культур гомо- і гетероферментативних молочнокислих бактерій (*Streptococcus lactis*, *Str. Cremoris*, *Str. citrovoms*). Заквашене молоко збільшує стійкість маргарину при зберіганні. Крім молочнокислої мікрофлори, в маргарині містяться інші мікроорганізми, що потрапляють із сировини, води, повітря, обладнання тощо. Найбільш небезпечними збудниками псування можуть бути спороутворюючі гнильні бактерії типу *Bacillus subtilis*. Вони розкладають білки, які входять до плазми маргарину, що надає продукту гнильний запах і гіркий смак. Бесспоріві бактерії роду *Pseudomonas* розщеплюють жири з утворенням продуктів розпаду, які надають маргарину прогірклий смак. Плісняви також розкладають жири, змінюють смак, запах, а іноді і колір готового продукту. В 1 г маргарину за нормальних умов зберігання може бути від декількох десятків до сотень тисяч і більше мікроорганізмів.

4.4.7 Мікрофлора м'яса і методи її визначення

М'ясо належить до найважливіших харчових продуктів. Високий вміст в сирому м'ясі води (до 75 %) і білкових речовин (20 %) робить м'ясо гарним живильним субстратом для мікроорганізмів, особливо для гнильних бактерій. М'ясо здорових забійних тварин стерильне. Тільки в тканинах хворих, стомлених перед забоєм тварин можуть бути виявлені деякі види бактерій. Велика їх кількість потрапляє на м'ясо під час забою і обробки, особливо, коли при обробленні туш пошкоджується кишківник. У тій або іншій кількості мікроорганізми потрапляють на м'ясо з вовни і шкіри тварини, з інструментів, якими користуються при обробці туш, з повітря і т.д.

Груповий та видовий склад бактерій в сирому м'ясі має різномірний характер. Найбільш часто виявляються представники групи Кмафанм – *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, деякі види гнильних бацил, молочнокислі, а також БГКП та інші. При сприятливих умовах бактерії швидко розмножуються, поступово проникають в товщу м'яса, викликаючи його псування. Швидкість процесів псування м'яса залежить від температури і вологості навколишнього повітря, а також від ступеня обсіменіння його мікрофлорою.

Найчастіше псування м'яса проявляється у вигляді **гниття** і **ослизнення**, іноді у вигляді **кислотного бродіння** і **пліснявіння**. Гниття м'яса зазвичай відбувається при t вище $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (оптимальна температура $25\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$) і викликається гнильними аеробними і анаеробними бактеріями. Серед аеробів найбільш поширені *Bacterium proteus*, *Pseudomonas*, гнильні бацили типу *Bac.subtilis*, серед анаеробів – *Clostridium sporogenes*.

У початковій стадії гниття розвивається під дією аеробних бактерій, у міру поглиблення процесу все більшу роль набувають анаероби. М'ясо при цьому змінює колір, стає сіро-зеленим, ослизнюється і розм'якшується. Гниття супроводжується появою огидного запаху. Поряд з розпадом білкових речовин, відбувається глибоке розщеплення жиру і в результаті м'ясо стає повністю непридатним.

Ослизнення м'яса може відбуватися в умовах підвищеної вологості при t від 2 до $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, що сприяє розвитку слизеутворюючих, холодостійких, аеробних безспорних бактерій *Achromobacter*, *Pseudomonas* та ін. Для попередження ослизнення охолоджене м'ясо слід зберігати при t від 0 до $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ при вологості повітря $85\text{--}90\%$.

Кислотне бродіння м'яса проявляється в появі неприємного кислого запаху, зміні забарвлення на сірий колір і розмя'кшенні продукту. На практиці цей процес іноді називають «засмагою». Збудниками даного виду псування є деякі види анаеробних клостридій. Часто спостерігається при поганому знекровленні туш, при недостатньо швидкому охолодженні і погану вентиляцію при зберіганні парного м'яса.

Пліснявіння м'яса є наслідком розвитку на його поверхні цвілевих грибів, найчастіше видів *Penicillium* (зелена цвіль), *Rhizopus* (сіра цвіль), *Alternaria* і *Cladosporium* (чорна цвіль). Пліснявіння виникає при поганій вентиляції, підвищеній вологості і відносно низькій температурі повітря в камерах зберігання. Циркуляція повітря сприяє підсиханню поверхні м'яса і попереджає розвиток цвілі. Найкращими умовами для затримки росту мікрофлори і запобігання псування м'яса є швидке охолодження туш після забою, підтримання в камерах зберігання досить низької температури і вологості близько 85% .

За якістю або свіжістю м'ясо ділять на три категорії – свіже, сумнівної свіжості і несвіже. Свіжим вважається м'ясо за умови, якщо кількість МАФАМ не перевищує 100 тис. (10^5 КОЕ / г) продукту.

Для визначення свіжості м'яса крім органолептичної оцінки проводять бактеріоскопічне дослідження, що дає можливість швидко визначити ступінь обсіменіння продукту мікрофлорою і орієнтовно встановити ступінь його якості. При бактеріоскопічному дослідженні роблять препарат-відбиток з поверхні м'яса, шляхом притискання до

нього стерильного предметного скла. Отримані мазки підсушують, фіксують у полум'ї пальника і забарвлюють фуксином, а також по Граму.

На підставі бактеріоскопічного дослідження встановлюють такі ознаки характеризують якість м'яса:

Свіже. На відбитках мікроорганізми або не виявляють, або видно поодинокі екземпляри коків або паличок в полі зору мікроскопа. На склі не помітно залишків тканин м'яса, що розіклалися.

Сумнівної свіжості. На відбитках кілька десятків коків (20-30) або кілька паличок. Крім мікробів, явно помітні сліди розпаду м'язової тканини.

Несвіже. На відбитках м'яса переважають бактерії у вигляді паличок – майже все поле зору мікроскопа всіяне ними. Велика кількість розклавшихся тканин м'язів.

Виявлення в препаратах забарвлених за Грамом **грам-паличок** свідчить про вміст у продукті БГКП, протеза та інших видів гнильних бактерій.

Бактеріоскопія. Для бактеріоскопічного дослідження готують два мазки-відбитка: один з поверхневих, а другий з глибоких м'язів. Препарати висушують на повітрі, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. Підрахунок мікробів проводять не менш ніж в п'яти полях зору і виводять середнє арифметичне на одне поле. Одночасно з урахуванням кількості мікробів звертають увагу на якісний склад мікрофлори (коки або палички) і інтенсивність забарвлення препаратів.

Препарати-відбитки зі свіжого м'яса забарвлюються погано. При мікроскопії препаратів з поверхневого шару м'яса виявляються поодинокі палички і коки; з глибоких шарів мікрофлора в більшості випадків відсутня.

Препарати-відбитки з м'яса підозрілої свіжості забарвлюються добре. В поле зору препарату, зробленого з поверхневого шару м'язів, десятки мікроорганізмів, а з глибоких шарів – до 20-30 мікробів, переважно коків.

Препарати-відбитки з зіпсованого м'яса забарвлюються інтенсивно, на склі помітні залишки розкладених м'язових волокон. У кожному полі зору препаратів, як з поверхневих, так і з глибоких шарів м'яса, виявляється, в середньому, більше 30 мікробів з переважанням паличок. При розкладанні м'яса коки майже відсутні; поле зору всіяне паличками.

4.4.8 Мікрофлора риби і рибних продуктів

Кількісний та видовий склад природної мікрофлори живої риби залежить від умов її існування, тобто мікробного населення товщі води і

донного мулу, а також сезону і способу лову. Поверхня риб покрита слизом (глюкопротеїдами – муцин, амінокислоти та ін.). У слизу виявляються здебільшого **Грам**– палички, типу *Pseudomonas*, а також **Грам**+ мікрококи. При t води 4-8 °С переважають палички, при t води 14-25 °С – мікрококи. Спороутворюючі аеробні, анаеробні, БГКП для поверхневої мікрофлори нехарактерні, а іноді практично відсутні.

Однак в кишківнику мікрофлора більш численна і різноманітна. Хімічний склад риби (вода 50-80 %, білки 15-20 %, жир 0,1-30 %) є виключно сприятливим середовищем для розвитку різноманітних, і перш за все, гнильних мікроорганізмів. Риба менш стійка в зберіганні порівняно з м'ясом. М'ясо риб більш пухке, в складі жиру переважають жирні ненасичені кислоти і він легко окиснюється. М'ясо здорових живих риб практично стерильне. У снулої риби опірність тканин знижується (автоліз). Навіть в умовах зберігання при t близько 0 °С кількість мікроорганізмів через 1–2 доби різко зростає, перш за все на поверхні шкіри в слизу і зябрах.

Велике значення для отримання якісних рибних продуктів має правильно організована первинна обробка риби. При ретельній мийці кількість мікроорганізмів знижується на 80-90 %. Патрання знову призводить до збільшення поверхневого обсіменіння риби, тому ретельна мийка після патрання обов'язкова. Філетування змінює не тільки кількісний, але й якісний склад мікрофлори. При цьому важливе значення має загальний санітарний стан виробництва – чистота обладнання, інструментів тощо. Термін зберігання охолодженої риби обмежений 10-12 днями, тому що протягом цього терміну помітно активізується розвиток психрофільних гнильних бактерій (*Pseudomonas*). Більш дієвий процес – заморожування проводять при температурі від –30 до –35 °С, температура тіла риби –18 °С. При такій температурі риба може зберігатися тривалі терміни. Але слід враховувати, що багато видів мікроорганізмів при заморожуванні зберігаються і при розморожуванні починають швидко розмножуватися.

Є дані про здатність розмноження деяких видів бактерій при t від -2 до -7 °С. Найбільш стійкі при заморожуванні спори бацил, мікрококи, галофільні бактерії, цвілеві гриби. Чим більше було мікроорганізмів в рибі перед заморожуванням, тим більше їх залишиться після. Отже, потрібно заморожувати рибу відразу після вилову. Заморожування не руйнує токсини, що вже утворилися.

Солона риба

Відносно до солі мікроорганізми поділяють на три групи:

1. Галофоби – солечутливі. Здебільшого це патогенні гнильні види (концентрація NaCl не вище 6 %).

2. Факультативні галофіли або солестійка група – бацили, клостридії, коки, цвілі. Типовий представник *Staphylococcus aureus*, добре розвивається в середовищах, що містять від 8 до 12 % солі.

3. Облигатні галофіли. Не ростуть у відсутності солі. Необхідно не менше 12 % NaCl. Типовий вид *Halobacterium Solinarium*.

Виживання мікроорганізмів в солі (тузлуках) при посолі риби залежить від багатьох факторів: t, pH, забрудненість мікрофлорою самої солі, її концентрація та ін. В самосадній (озерній) солі часто присутні червоні галофіли, які розвиваються на солоній рибі при сухому засолі і викликають ваду під назвою «фуксин» - червоний слизистий наліт, що має різкий неприємний запах. Тому є обов'язковим мікробіологічний контроль солі на галофіли (посів солі на МПА з вмістом 20 % солі).

Під час зберігання солоної риби змінюється склад її мікрофлори, знижується її загальна кількість, зберігаються солестійкі й галофільні види (мікрококи, бацили). З'являються також деякі види молочнокислих бактерій (в оселедці). Консервуючу дію солі при посолі риби можна посилити додаванням бензойної або сорбінової кислот.

Основну консервуючу роль в технології приготування **копченої риби** грає фракція фенолів і органічних кислот коптильного диму. Ця фракція утворює оцтову, саліцилову й бензойну кислоти, але особливо мурашину кислоту – речовини, що мають активну антимікробну дію. Дія фенолів і органічних кислот зростає при підвищенні температури, тому ефект більший при гарячому копченні. Однак риба гарячого копчення менш стійка при подальшому зберіганні в порівнянні з рибою холодного копчення, тому що вона містить більше вологи і менше солі. Важливе значення при зберіганні має вигляд упаковки. Найбільш добре зберігається копчена риба в поліетиленових пакетах з вакуум-упаковкою.

4.4.9 Мікрофлора цукру і методи її визначення

У цукровий пісок мікроорганізми потрапляють при відбілюванні, сушінні, упаковці й зберіганні. Найбільш легко інфікується цукор з підвищеною вологістю. При вологості цукру не більше 0,15 % (стандарт) мікроорганізми зберігають життєздатність, але не розвиваються. Але якщо при вологості 0,15 % в 1 г цукру знаходиться в середньому 50 шт. бактерій, то при вологості до 1,3 % їх кількість зростає до 10 000 в 1 г.

У цукрі зустрічаються мезофільні й термофільні бактерії, аеробні та анаеробні. Серед них є газоутворюючі й кислотоутворюючі. Серед термофілів переважають бацили з надзвичайно термостійкими спорами.

У цукровому піску зустрічаються також дріжджі і цвілеві гриби, головним чином види родів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Цукор з надлишковим обсіменінням мікроорганізмами, може бути причиною псування кондитерських виробів, наприклад вафель, шоколадних начинок, рулетів та ін. Цукор є одним з основних джерел внесення термофільної мікрофлори при виготовленні консервів. Відомі кілька видів псування, зумовлених розвитком термофілів, що збереглися в консервах (зеленому горошку, пюреподібних консервах для дитячого харчування та ін.) у вигляді залишкової мікрофлори після стерилізації.

1. Плоскокисле псування, типовий збудник *Vacillus stearothermophilus*. Ці бактерії при засвоєнні вуглеводів утворюють не газ, а кислоти – оцтову, мурашину та ін. Продукти набувають кислий смак.

2. Бомбажне псування. Збудник – анаеробний термофіл – *Clostridium thermsaccharolyticum*. В результаті життєдіяльності цих клостридій утворюється CO₂ і водень, банки здуваються.

Існують норми допустимої кількості термофілів в цукрі, який використовується в консервній промисловості:

Всього спор термофілів не більше 125 в 10 г цукру.

Спор збудників плоского скисання не більше 50 в 10 г цукру.

4.4.10 Мікрофлора свіжих плодів і овочів

За хімічним складом плоди і овочі (соковите рослинна сировина) представляють собою сприятливе середовище для розвитку самих різних мікроорганізмів: бактерій, міцеліальних грибів, дріжджів.

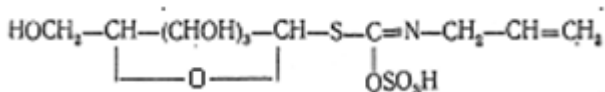
На поверхні непошкоджених плодів і овочів при збиранні завжди знаходиться значна кількість мікроорганізмів, багато з яких не беруть участь в їх псуванні. Їх називають епіфітами. Число епіфітів та їх видовий склад коливається залежно від виду плодів і овочів, ґрунтових, кліматичних, погодних умов і т.п.

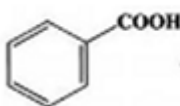
На поверхні коренеплодів і інших овочів переважає різноманітна ґрунтова мікрофлора: бацили, клостридії, актиноміцети. На плодах переважають оцтовокислі, молочнокислі бактерії, всілякі види дріжджів з числа сахаро- і несахароміцетів. На пошкоджених при механічному збиранні, перестиглих, розм'якшених, внаслідок тривалого зберігання або за несприятливих умов, плодах число епіфітів спочатку зростає і з'являються специфічні види – збудники різних типів псування. Хвороби плодів і овочів в практиці носять назву «гнилі».

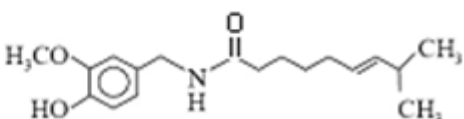
Багато плодів і овочів утворюють специфічні антимікробні речовини, що перешкоджають до певної міри розвитку тих чи інших

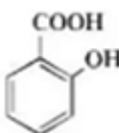
збудників: фітонциди, алкалоїди, глюкозиди, ефірні масла, органічні кислоти і т.п.

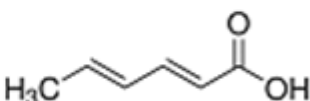
Наприклад, лук і часник утворюють алліцин $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$

Хрон, гірчиця - глікозид синігрин 

Морква містить бензойну кислоту 

Перець - капсаїцин 

Клюква, брусника - саліцилову кислоту 

Рябина - сорбінову кислоту 

які є природними консервантами

«Гнилі» бувають сухі і мокрі. При мокрій гнилі відбувається швидке розкладання рослинної тканини з розм'якшенням і зволоженням м'якоті плодів. При сухій – тканина зморщується, висихає або перетворюється в порошок. Переважання грибів в числі збудників «гнилей» пояснюється високим вмістом вуглеводів і невеликою кількістю білків, а також високою кислотністю плодів, ягід і деяких овочів (томати). Овочі містять більше білків (картопля, морква), а також мають нейтральну реакцію середовища, тому частіше зустрічається бактеріальне псування. Іноді псування плодів і ягід викликається дріжджами. Інтенсивність розвитку хвороб на плодах і овочах залежить від багатьох умов: сортових особливостей, вихідної якості сировини при закладці на зберігання, активності збудників, температури і вологості повітря в сховищі та ін. Лежкість овочів і плодів забезпечується своєчасністю збору врожаю і відсутністю механічних пошкоджень. В першу чергу при зберіганні псуються недостиглі, перестиглі, а також пошкоджені плоди і овочі. Найбільш сприятлива температура зберігання в межах 1-3 °С.

ХВОРОБИ КАРТОПЛІ



Фітофтора (*Phytophthora infestans*) – клас ооміцети. При захворюванні уражаються листя, стебла і бульби. З'являється в другій половині літа після цвітіння картоплі. З надземних частин рослини спори з дощовою водою проникають в ґрунт і заражають бульби. На бульбах хвороба проявляється у вигляді бурих, злегка вдавлених твердих плям.

При нормальних умовах зберігання інфекція від хворих бульб до здорових не передається. Головна небезпека фітофтори полягає в тому, що вона полегшує зараження бульб іншими гнилями – фузаріозами і мокрою гниллю).



Фузаріоз або суха гниль викликається деякими видами грибів роду *Fusarium*. На зараженій бульбі з'являються бурі плями, покриті на поверхні невеликими яснозабарвленими подушечками, які представляють собою міцелій гриба з конідієносцями. Із розвитком захворювання бульби буріють і зморщуються, всередині них утворюються порожнечі.

Фузаріоз розвивається, головним чином, у другій половині періоду зберігання, заражаються переважно бульби пошкоджені чи заражені фітофторою. За сприятливих умов (особливо при підвищеній вологості повітря) хвороба передається від хворих бульб здоровим.



Мокра гниль. Викликається деякими видами бактерій, які живуть в ґрунті. Потраплянню бактерій в бульби сприяє підвищена вологість ґрунту, а також пошкодження бульб. На зараженій бульбі з'являються бурі або чорні мокнучі плями, тканина розм'якшується і бульба в кінці кінців може перетворитися на слизову кашеподібну масу з неприємним запахом. Особливо часто мокрою гниллю уражаються бульби, що пошкоджені фітофторою, а також підморожені, збережені при високій вологості повітря. Ця гниль поширюється зазвичай гніздами, тому що передається при безпосередньому зіткненні бульб.

ГНИЛІ ОВОЧІВ



Біла гниль моркви та інших овочів.

Збудником білої гнилі моркви, а також баштанних культур, огірків, капусти та інше є патогенний гриб склеротинія (*Sclerotinia libertiana*) – клас аскомицетів. Міцелій гриба впроваджується в тканини овочів, утворюючи на їх поверхні білі пухнасті нальоти. Уражена тканина швидко розм'якшується і розпадається. Пізніше на грибниці утворюються відносно великі чорні склероції, які опадають і можуть зберігатися в овочесховищі тривалий час. При проростанні склероцій на них утворюється величезна кількість спор, за допомогою яких заражаються всі нові партії овочів.



Чорна суха гниль моркви. Збудник хвороби *Alternaria radicina* відноситься до класу недосконалих грибів. На коренеплодах з'являються сухі чорні вдавлені плями. Гниль найчастіше починається з верхівки, іноді збоку. Уражена тканина чорніє і покривається пухнастим нальотом. Хвороба заноситься в сховище з зараженими коренеплодами.



Мокра бактеріальна гниль моркви. Викликається деякими видами бактерій, особливо часто *Bacterium carotovorum*. Гниль зазвичай починається з кінчика кореня моркви. Уражена тканина розм'якшується і швидко перетворюється на слизову кашеподібну масу з неприємним запахом. Постійним джерелом інфекції є ґрунт, з частинками якого бактерії заносяться в сховище.



Сіра гниль капусти – найбільш поширений вид захворювання свіжої капусти. Викликається грибом *Botrytis cinerea*, що належить до класу дейтеромицетів. Загнилі качани з поверхні покриваються сірим пухнастим нальотом – міцелієм гриба. Верхні листки ослизнюються і буріють. Хвороба швидко поширюється в сховищі за допомогою конідій гриба, що утворюються в величезній кількості. Паразит заноситься в сховище з ураженими овочами або зберігається в залишках врожаю.



Шийкова сіра гниль цибулі. Викликається грибом виду *Botrytis allii*. Гниль виявляється на цибулі тижня через два після збирання. Гниль починається зазвичай з низько обрізаної шийки. Зовнішні лусочки зморщуються, а внутрішні загнивають і покриваються сірою цвілью з чорними склероціями.

Тканина цибулини розм'якшується, стає водянистою, ніби вареною.

ХВОРОБИ ПЛОДІВ І ЯГІД

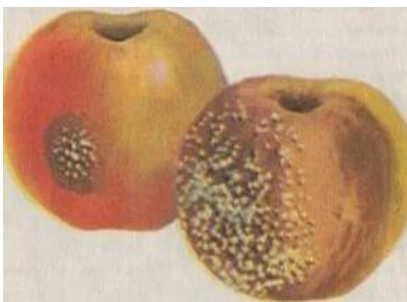
Відомо, що збудниками псування плодів і ягід як в процесі дозрівання, так і при зберіганні в більшості випадків є різні види грибів.



Плодова гниль яблук, груш, а також кісточкових плодів (*Monilia fructigena*) – широко поширене небезпечне захворювання. Здебільшого інфекція потрапляє в плоди ще в саду в результаті проникнення шкідників і механічних пошкоджень. На місці пошкодження з'являється невелика бура пляма, яка поступово розростаючись, охоплює весь плід. М'якоть

плоду буріє, розм'якшується і стає губчастою.

Пізніше на поверхні плода утворюються сірувато-бурі бородавки, розташовані концентричними колами (конідіальне споросіння). При підвищеній температурі і вологості хвороба розвивається дуже швидко, при зниженій (0 – 5 °С) уражені плоди зазвичай чорніють, тверднуть, поверхня їх стає блискучою, як би лакованою, плоди перетворюються в склероції («мумії»). Частина зморщених муміфікованих плодів залишається висіти на деревах, частина зимує з опалим листям. Такі плоди служать в подальшому джерелом інфекції.



Блакитна і сиза пліснява (гниль). Збудник *Penicillium expansum*. Уражає плоди під час зберігання. Інфекція проникає в місцях пошкодження шкірки. М'якоть плоду стає водянистою, набуває пліснявий запах. Бура поверхня плоду зморщується і покривається конідіями у вигляді дрібних подушечок

блакитно-сірого кольору. Втрати врожаю іноді сягають до 80 %. Плоди набувають токсичності – **патулін**.



Гірка гниль. Збудники: *Gloeosporium album* і *Colletotrichum fructigenum*. Вражають плоди ще в саду. На плодах утворюються різко окреслені бурі поглиблені плями з блідо-рожевими крапками (подушечки з конідіями). М'якоть плоду стає гіркою. Перший із зазначених видів грибів розвивається більш активно при більш високих температурах, другий – при знижених. В холодильниках плоди уражаються гіркою гниллю частіше в другій половині терміну зберігання.

ХВОРОБИ ЦИТРУСОВИХ ПЛОДІВ



Блакитна цвіль (*Penicillium italicum*). Інфекція проникає через механічні пошкодження шкірки в період збирання, транспортування і зберігання. При контакті з хворими плодами заражаються здорові, особливо перезрілі плоди. У фазі спороносіння пошкоджені ділянки набувають блакитного кольору, шкірка розм'якшується, м'якоть стає гіркою.



Чорна гниль (*Alternaria citri*). Характерна ознака – при зберіганні на шкірці плоду з'являється невелика темно-брунатна з чорним забарвленням в центрі. Гниль поступово проникає в м'якоть. М'якоть темніє і руйнується, іноді стає сухою і твердою.

4.4.11 Мікрофлора квашених овочів

Молочнокисле бродіння при квашенні плодів і овочів виникає спонтанно в результаті діяльності молочнокислих бактерій, які постійно перебувають на рослинній сировині. Щоб вони отримали доступ до цукристого соку в клітинах овочів – капусту подрібнюють, пересипають сіллю (2-3 %), щільно укладають в ємності і залишають під гнітом. У початковій стадії бродіння розвиваються бактерії (молочнокислі, оцтовокислі), дріжджі та ін. В капусті утворюються кислоти, CO₂, спирт. Потім, завдяки CO₂, створюються анаеробні умови для переважного розвитку молочнокислих бактерій. В першу чергу розвиваються гетероферментативні бактерії – *Leucomostoc*, на зміну їм

приходять паличкоподібні гомоферментативні – *Lactobacillus plantarum* і гетероферментативні *Lactobacillus brevis*, дріжджі.

Швидкість сквашування капусти залежить від температури. Оптимальна t – 20-25 °С, при якій бродіння протікає протягом 6-8 діб. Утворюється молочна кислота (1,5-2 %) яка має консервуючу дію, а сполуки бічних реакцій надають продукту характерні органолептичні властивості.

Після закінчення бродіння квашену капусту слід зберігати при температурі 0-3 °С, щоб затримати розвиток сторонньої мікрофлори – плівчастих дріжджів, цвілі, оцтовокислих, маслянокислих і гнильних бактерій. Рекомендується застосування чистих культур молочнокислих бактерій в заквасках.

Квашення огірків (соління).

Йде в дві стадії: 1– попередня (1-2 дні) – сіль 6-7 % до накопичення 0,3-0,4 % кислоти при температурі 20-22 °С, а потім повільна стадія при температурі від –1 до + 2 °С.

Спочатку процес починають гетероферментативні *Lactobacillus brevis* і *Lactobacillus fermenti*, потім переважають *Lactobacillus plantarum*. Види псування: ослизнення, розм'якшення, поява плівки. Гарний результат дає додавання 0,1 % сорбінової кислоти. Роздування огірків – утворення пустот внаслідок розвитку дріжджів і бактерій кишкової групи.

4.4.12 Мікрофлора банкових консервів і методи її визначення

Виробництво консервів засноване на принципі герметизації і термічної обробки продукту. Підготовлені продукти закладають в бляшані або скляні банки, які герметично (з видаленням повітря) укупувають і стерилізують або пастеризують. Основна сировина (плоди, овочі, м'ясо та ін.), а також допоміжні матеріали (сіль, цукор, прянощі та ін.), що входять до складу консервів, завжди в тій чи іншій мірі засіяні різними мікроорганізмами. Серед них можуть зустрічатися збудники псування, що мають термостійкі спори а також токсиноутворюючі види.

При підготовці продуктів до стерилізації деякі технологічні операції, такі як миття, бланшування й особливо обсмажування, знижують забрудненість мікроорганізмами. Інші – доочищення вручну, різання, приготування фаршу, укладання в банки та інше знову підвищують її. Режимми термічної обробки консервів (температура і тривалість) встановлюють в першу чергу на підставі термостійкості мікроорганізмів, здатних до токсиноутворення в продуктах, а також основних збудників псування кожного виду консервів. **Термостійкість**

– це відношення виду мікроорганізму до температури, що перевищує максимальну для його розвитку.

Надійність режиму стерилізації залежить не тільки від кількісного і видового складу мікрофлори продукту, що консервується. Велике значення має хімічний склад продукту, його рН. У кислому середовищі стерилізація здійснюється швидше, тому що прискорюється денатурація білків і клітини відмирають швидше. Високий вміст жиру, сіль, цукор підвищують термостійкість. У промисловості для кожного виду консервів встановлюють певний режим стерилізації.

Консерви з невисокою кислотністю (овочеві, рибні, м'ясні та інші, які мають рН > 4,4), стерилізують при t від 110° до 120° °С від 20 до 50 хв (залежно від виду продукту). Консерви з кислотністю рН < 4,4 (деякі овочеві, плодово-ягідні) пастеризують при t від 85° до 100° °С, що забезпечує загибель основних збудників псування даних продуктів – неспорутворюючих бактерій, дріжджів, цвілевих грибів.

У практиці консервної промисловості тільки для продуктів особливого призначення домагаються абсолютної стерильності. Для більшості консервів потрібна промислова стерильність, яка забезпечує загибель потенційних збудників специфічного псування, а також токсичних видів.

Ефективність стерилізації залежить від вихідної кількості мікроорганізмів в продукті. Чим більше їх було, тим більше залишається після стерилізації. Часто в загальній масі зустрічаються окремі спори більш термостійкі в порівнянні з більшістю. Вони зберігаються після стерилізації як «залишкова мікрофлора» консервів. До складу цієї мікрофлори в стерилізованих консервах входить обмежена кількість видів, які: не впливають на якість продукту (нейтральні); викликають псування (бомбаж, плоске скисання та ін.); збудники харчових бактеріальних отруєнь. У пастеризованих консервах псування можуть викликати «залишкові» молочнокислі бактерії, дріжджі, але особливо небезпечними є маслянокислі клостридії.

Залишкова мікрофлора стерилізованих консервів представлена спороутворюючими бактеріями, серед яких переважають три групи: мезофільні бацили, мезофільні клостридії і термофільні клостридії і бацили.

Мезофільні бацили.

Це – рід *Bacillus*, палички, **грам+**, утворюють ендоспори, факультативні анаероби, більшість живуть в ґрунті. За своїми фізіологічними властивостями діляться на дві підгрупи: а) культури, що утворюють при розкладанні вуглеводів велику кількість газів; б) культури, які розкладають вуглеводи з утворенням кислоти, але не газу.

До першої підгрупи належать *Bacillus polymyxa* і *Bacillus macerans*. Вони розкладають крохмаль, пектинові речовини, інтенсивно зброджують гексози, пентози, органічні кислоти, спирти. Стійкі до кислот, розвиваються в консервах, що містять до 25 % сахарози. Викликають утворення піни, слизу, кислуватий запах (в компотах, томатних консервах та ін).

До другої підгрупи належать *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (в визначнику Берджі вважається як синонім *Bacillus subtilis*).

У багатьох представників цієї групи активно виражені протеолітичні властивості, вони розщеплюють білки і дезамінують амінокислоти. Вони утворюють кислоти (молочну) і етилацетат з глюкози, розкладають інші вуглеводи також з утворенням кислот, відновлюють нітрати. Розмножуються в широкому діапазоні температур від 5 °С до 40-45 °С.

Кількість спор мезофільних бацил в продуктах перед стерилізацією обчислюється десятками і сотнями клітин в 1 м. Вони часто виявляються не тільки в продуктах перед стерилізацією, а й серед залишкової мікрофлори – готових консервів, але, як правило, не викликають видимих змін властивостей і якості продуктів.

При дослідженні тисяч банок різних видів доброякісних консервів (рослинних і м'ясних) виявлено, що 58-60 % залишкової мікрофлори належало до мезофільних бацил (*Bacillus subtilis*, *Bac. Mesentericus* і ін., а також до їх різних штамів і різновидів). Цілком доброякісні на вигляд і смак консерви можуть містити якусь кількість зазначених видів бацил, які не розвиваються в банках, внаслідок ослаблення їх біохімічної і фізіологічної активності після термічної обробки, а також через нестачу кисню. Можливість розвитку мезофільних бацил в консервованих продуктах визначається кількістю їх обсіменіння, рН і рецептурою консерв. Вид *Bacillus cereus* також належить до цієї групи, але є потенційно небезпечним збудником харчових отруєнь (токсикоінфекції). *Bacillus cereus* – аероб, $t_{opt.} = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, оптимум рН від 7,0 до 9,5, володіє протеолітичними властивостями і може розщеплювати цукор, здатний розвиватися при концентрації солі до 10-15 % і цукру до 30-60 %, широко поширені в природі, для мікрофлори кишечника не характерні.

Мезофільні кластридії.

Ця група найбільш небезпечна, як залишкова мікрофлора консервів. Основне їх місце проживання – ґрунт. Мезофільні кластридії – це спороутворюючі **грам+** палички, температура розвитку від 10 °С до 45 °С, каталазонегативні, строгі анаероби.

Властивості кластридій різноманітні – вони розкладають білки і зброджують вуглеводи, розщеплюють пектинові речовини, крохмаль і

т.п. При аналізі готових консервів, а також продуктів перед стерилізацією основну увагу зосереджують на виявленні в них клостридій.

Харчові отруєння викликають два види: *Clostridium botulinum* і *Clostridium perfringens*.

За своїми біохімічними властивостями і здатності до токсиноутворення клостридії можна розділити на три підгрупи:

а) **гнильні клостридії** – розкладають переважно білки. Дуже термостійкі спори. Викликають почорніння продукту, не розвиваються при рН нижче 5,6, викликають бомбаж м'ясних і м'ясоовочевих консервів. Типові види *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrificum*.

б) **розкладають білки, але можуть зброджувати вуглеводи.** Це штами А, В, F, С, D, Е. Термостійкість спор до 121 °С, Період накопичення токсину в консервах при t° від 10 до 45 °С коливається від 3-х до 300 діб.

Можливість розвитку і токсиноутворення залежить від рН (межа рН 4,4), вмісту солі або цукру в продукті (солі не більше 10 %, цукру не більше 50 %). Зовні розвиток в продукті часто не проявляється, особливо в підкисленому середовищі. Контроль банок і продукту за зовнішнім виглядом практично не можливий. Визначають токсичність продукту шляхом біопробы (на мишах).

До групи токсичних клостридій відноситься також *Clostridium perfringens* – типи А, В, С, D, Е. Найбільш небезпечні А і С. В основному розвиваються в м'ясних продуктах. Широко поширені в природі – зустрічаються на сировині рослинній та тваринній, в воді, прянощах, крупі, борошні. Можуть розвиватися в консервах з рН від 3,5 до 5,3 і вище. У цілісно консервованих помідорах, шпинаті, щавлевому пюре, консервованих огірках, консервах з м'ясом діючих при t від 16 °С і далі, що супроводжується бомбажом банок. При рН вище 5,6 в продуктах майже завжди утворюються токсини.

в) **маслянокислі** – *Clostridium butyricum*. Виявляють сахаролітичні властивості. Більш кіслотостійки, ніж протолітичні види. Маслянокислі бактерії викликають бомбаж консервів, в тому числі томатопродуктів, при цьому продукт як би кипить. Зустрічаються в рибних консервах в томатному соусі. Токсин не утворюють. В результаті продукт набуває неприємний кисло-гнильний запах, піниться.

Термофільні клостридії і бацили.

Великої шкоди консервному виробництву можуть принести термофільні мікроорганізми – бацили і клостридії. Діють при t = 50-60 °С. Вони мають термостійкі спори й витримують найвищі режими стерилізації. Сильно всіяними можуть бути овочі, особливо картопля, зелений горошок, цукор, борошно, молоко, різні спеції. Іноді сировина

містить до 10 тисяч спор на 1г продукту. Якщо забрудненість 1г продукту до стерилізації така, то готова продукція може містити від 10 до 100 % нестерильних банок.

Серед термофілів, як і серед мезофілів, зустрічаються аероби, облигатні анаероби і факультативні анаероби. Аеробні – *Bacillus aerothermophilus*. Факультативно-анаеробні – *Bacillus coagulans*, *Bac. stearothermophilus*. Облигатні анаероби: *Clostridium thermosaccharolyticum*. Термофіли можуть викликати три види псування: плоскокисле сірководневе й бомбаж.

Плоскокисле псування характеризується прокисанням продукту, але без зовнішньої зміни банки. Розрідження, розшарування продукту викликають *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*. Всі вони утворюють (з вуглеводів) кислоти: молочну, оцтову, іноді мурашину без видимого газоутворення. Добре розвиваються в зеленому горошку, цукровій кукурудзі та багатьох видах пюреподібних консервів, вміст яких підкисляється до рН 4,0-4,5 (початкова рН 6,0-6,2).

Bacillus coagulans були виділені різними дослідженнями з консервів «Пюре з моркви», «Пюре з шпинату», «Суп-пюре томатний» та інших консервів для дитячого і дієтичного харчування.

Сірководневе псування: збудник – *Clostridium nigrificans*. Продукт чорніє, тому що йде розкладання цистеїну з утворенням H_2S , який дає з залізом продукту або банки чорне забарвлення.

Бомбаж: збудник – термофена *Clostridium thermosaccharolyticum*. Виділяє CO_2 , H_2 , кислоти: оцтову, масляну, білки не розкладає.

У пастеризованих консервах – компотах, соках можуть зберігатися молочнокислі бацили – лейконосток (викликає слизові грудки, тягучість). В рибних консервах в олії і напівконсервах, які погано прогриваються (шинка в банках) можуть зберігатися стафілококи. На органолептики вони не впливають, але можуть стати причиною харчових отруєнь (стафілококовий ентеротоксин).

Окрім залишкової мікрофлори, в консервах може бути присутною і викликати псування, так звана «вторинна мікрофлора», яка потрапляє в банки після стерилізації, в результаті їх негерметичності, найчастіше зі зворотньої води при охолодженні банок в автоклавах. Видовий склад вторинної мікрофлори найрізноманітніший. Виявлення неспорують видів в консервах свідчить про негерметичність банок. Іноді такий результат свідчить про некваліфікований аналіз.

4.4.13 Мікрофлора солі

По відношенню до солі мікроорганізми поділяються на три групи:

1. **Галофоби** – солечутливі. Група включає більшість патогенних і гнильних видів (концентрація NaCl не вище 6 %).

2. **Факультативні галофіли** – солестійка група – бацили, клостридії, коки, цвілі. Типовий представник *Staphylococcus aureus*, добре розвивається в середовищах, які містять від 8 до 12 % солі.

3. **Облігатні галофіли** – солелюбиві. Не ростуть у відсутності солі. Необхідно не менше 12% NaCl. Типовий вид *Halobacterium Solinarium*.

Різні види солі розрізняються за кількісним і якісним складом мікроорганізмів, які містяться в них. Кам'яна та виварювальна сіль в момент видобутку зазвичай не містить мікрофлори, але ці види солі можуть значно забруднюватися при перевезенні і зберіганні. Кількість мікроорганізмів в самосадній і морській солі коливається в широких межах – від одиниць до сотень тисяч клітин в 1 г. Сіль, яка використовується при посолі риби, зазвичай містить 10^1 - 10^5 / г, а іноді і вище. Критичний показник – не більше 10^3 / г. Зберігання в сухому приміщенні веде до зниження обсіменіння. Порушення умов зберігання веде до розвитку мікроорганізмів.

За якісним складом мікрофлора солі досить різноманітна. У ній можуть міститися різні представники спороутворюючої мікрофлори, мікрококи, різноманітні кольорові бактерії з роду *Flavobacterium*, коринебактерії, дріжджі, спори цвілевих грибів. Близько 75 % мікрофлори самосадної солі представлені спороутворюючими мезофільними і психрофільними бактеріями роду *Bacillus* (*B. mesentericus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*). Мікрофлору кам'яної солі представляють здебільшого мікрококи й сарцини. У той же час грамнегативні бактерії родів *Pseudomonas* і *Achromobacter* в солі зазвичай відсутні. Вони гинуть ще при її отриманні.

Червоні галофіли. Ці мікроорганізми при розвитку на поживних середовищах і на рибі утворюють рожевий і червоний пігмент. Це видозмінена *Serratia marcescens* (відома раніше під назвою *Bacterium prodigiosum* – "чудова паличка"), *Serratia salinaria*, *Micrococcus roseus*.

Група червоних галофілів розвивається на середовищах, що містять 20-25 % солі. Утворюють колонії від блідо-рожевих до яскраво-червоних. У них яскраво виражений поліморфізм. Оптимальна температура їх розвитку 37-45 °С, при 0 °С вони не розвиваються. Аероби, тільки деякі штами мікроаерофіли. Вони здатні розвиватися при низькій відносній вологості (75 %), здатні також розвиватися в широкому діапазоні рН – від 6 до 10 (оптимальна рН дорівнює 7-7,6). Деякі з них здатні витримувати рН 5,6 до 6 місяців. Червоні галофіли здатні розкласти білкові молекули з утворенням сірководню та індолу при утриманні солі 25-30 %. Кількість червоних галофілів в різних зразках солі може коливатися від 0 до 10^5 / г.

При зберіганні солі на відкритому повітрі й під вакуумом кількість мікроорганізмів в ній зменшується (приблизно на 75 %), при зберіганні в закритій посудині – збільшується в 2-3 рази. Зі збільшенням температури інтенсивність відмирання червоних галофілів збільшується.

Для знищення мікроорганізмів сіль піддають температурній обробці – при 100 °С протягом 20 хв, 150 °С – 15 хв. Важливо, щоб сіль не містила органічних сполук.

Необхідно робити мікробіологічний контроль солі на галофіли. (Посів солі на МПА з вмістом 20 % солі). 5 г солі + 95 мл води. Повинно бути не більше 100 КУО / г. Дріжджі і гриби повинні бути відсутніми.

4.5 Лабораторна робота № 4. Стандартні кількісні мікробіологічні методи дослідження природних субстратів: ґрунту, води, повітря та інших об'єктів

Мета заняття – освоєння кількісного методу обліку мікроорганізмів шляхом рахунку колоній.

1. Ознайомитися з методами кількісного обліку мікроорганізмів, способами «взяття середньої» проби.
2. Ознайомитися з методами визначення загальної кількості мікроорганізмів (мікробного числа) в різних об'єктах.

4.5.1 Хід роботи

1. Провести підрахунок кількості колоній, які вирости на чашках Петрі на попередньому занятті, описати їх культуральні ознаки (див. 4.1), мікроскопувати й визначити чистоту культури в колоніях. Для цього виконують дії в такій послідовності:

- а. Визначити **колір** колонії.
- б. Описати **характер поверхні** колонії.
- в. Реєструвати **положення** колонії **на поживному середовищі** (поверхнєве або глибинне).

Закінчують вивчення колонії, переглядаючи її крайову зону під мікроскопом на малому збільшенні:

- а. Визначити **характер краю** колонії.
- б. Описати **структуру** колонії.
- в. **Мазок** з колонії необхідний для виявлення морфологічних властивостей виділеної культури. Як правило, мазок забарвлюють по Граму.

2. Описати чутливість бактерій до антибіотиків і УФ випромінювання (Див. 3.5 і 3.6).

3. Провести посів мікроорганізмів з повітря седиментаційним методом Коха (див. 4.4.1). На наступному занятті провести розрахунки і зробити висновок про кількість мікробів в приміщенні, де проводився аналіз мікрофлори повітря.

4. Провести аналіз водопровідної води й води з відкритого водоймища.

5. Методом глибинного посіву на МПА в чашки Петрі, на наступному занятті дослідити вирощені колонії, провести розрахунки і визначити мікробне число води см. 4.4.2.

Мікробне число води - це загальна кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 мл води. Для санітарно-мікробіологічного дослідження водопровідної води проби беруть з вуличних колонок, колодязів і кранів внутрішніх водопроводів. Крани обпалюють, потім повністю відкривають і спускають воду протягом 10 хв, потім відбирають проби води з дотриманням вимог асептики, не змочуючи пробки, в кількості не менше 0,5 л. Якщо вода піддавалася хлоруванню, то її збирають в колби, що містять 2 мл 1,5 % -ого стерильного розчину тіосульфату натрію. При посіві в щільне середовище 1 мл води вносять в порожню стерильну чашку Петрі, куди потім наливають 10-12 мл розплавленого МПА (45 °С) і ретельно перемішують. Після застигання агару посіви інкубують при 37 °С 24 години. Із однієї проби води засівають 3 паралельних чашки і не тільки на МПА, а й на сусло-агар для виявлення росту дріжджів та грибів, в цьому випадку посіви інкубують 2-3 доби при температурі 24 °С.

6. Зробити змиви з обладнання і рук (см. 4.4.3). Зробити посіви змивів на МПА і середовища. На наступному занятті провести підрахунок і аналіз мікрофлори.

7. Провести посів борошна для визначення в ньому кількості спор гнильних бацил, типу *Bacillus Subtilis*.

Для цієї мети потрібно приготувати суспензію з наважки борошна та 100 мл стерильної води, пастеризувати її на водяній бані при 80 °С протягом 10 хвилин (для знищення вегетативних клітин бактерій, а також дріжджів і грибів). З прогрітого зразка зробити посіви на МПА, помістити чашки в термостат з t 30-35 °С.

Вирощені колонії підрахувати і зробити перерахунок на 1 г борошна. Дати оцінку якості борошна. Колонії описати, приготувати з них фіксовані препарати з фарбуванням фуксином, мікроскопувати з імерсією. Замалювати.

8. а) Зробити фіксовані препарати з різних видів молочнокислих продуктів – кефіру, йогурту, ацидофіліну, сметани, продуктів, виготовлених із застосуванням біфідобактерій. Пофарбувати метиленовою синню. Дивитися з об'єктивом 40х або з імерсією. Замалювати.

Присутність молочної цвілі, дріжджів і відсутність молочнокислих стрептококів вказує на незадовільність приготування, порушення технології або неправильне зберігання продукту. Виняток становлять кефір і кумис, де обов'язково присутні в полі зору 2-5 дріжджових клітини, оскільки ці продукти - результат комбінованого бродіння - молочнокислого і спиртового.

Орієнтовні санітарно-бактеріологічні нормативи для молока і молочних продуктів

Харчовий продукт	Допустимі бактеріологічні показники		
	дані мікроскопічного дослідження	загальне мікробне число	колі-титр
Молоко, вершки	Не проводиться	Група А - трохи більше 75000; Група В - не більше 150000; фляжне - 300 000	Група А-не менше 3, група В і фляжне - не менше 0,3
Сухе молоко	Не проводиться	Не більше 2500	Не допускається
Кисле молоко, ряжанка, йогурт	Молочнокислі стрептококи, палички	Не визначається	0,3
Кефір	Молочнокислі стрептококи, палички, одиничні дріжджі	Не визначається	0,3
Сир, сметана	Молочнокислий стрептокок	Не визначається	Не менше 0,001-0,0001
Морозиво, молочні коктейлі	Не проводиться	Не більше 100000	Не менше 0,3

б) Визначити загальну кількість мікроорганізмів, в т.ч. молочнокислих бактерій в пастеризованому і сухому молоці, шляхом безпосереднього посіву продукту (для сухого молока посів змиву) на щільну середу МПА з крейдою. На наступному занятті описати вирости колонії і заповнити таблицю:

Інгредієнти	Розведення		
	1:10	1: 100	1: 1000
Засіваються обсяги молока, мл	1	1	1
М'ясопептонний агар, мл	10	10	10
Кількість колоній, що вирости			
Результат			

в) Провести посів масла або маргарину на щільне середовище МПА з крейдою для обліку загальної кількості мікроорганізмів і виявлення кислотоутворюючих бактерій.

Для проведення посіву наважку продукту вносять у колбу з 100 мл. стерильної водогінної води, попередньо нагрітої до $t = 45$ °С. Після ретельного перемішування з розведенням 1: 100 зробити посів 1 мл на чашку і залити зазначеним середовищем.

г) Зробити посів на суслувий агар для виявлення та обліку грибів

9. а) Визначити свіжість м'яса і натуральних напівфабрикатів бактеріоскопічним методом (див. 4.4.7). Свіжість м'яса характеризується показниками загального бактеріального обсіменіння в 1 г або на 1 см² поверхні.

Оцінка свіжості м'яса

Якість м'яса	pH	Бактеріоскопічна картина
1. Свіже	5,6-6,2	В мазках-відбитках мікробів немає або є поодинокі бактеріальні клітини на поверхні м'яса
2. Сумнівна свіжість	6,3-6,5	В мазках-відбитках з глибини м'яса виявляють 20-30 коків і поодинокі палички, на поверхні - кілька десятків клітин в полі зору. Є розкладені м'язові волокна
3. Несвіже	6,6 і більше	У мазках-відбитках з поверхні та з глибини м'яса виявляється маса клітин, здебільшого палички, є безліч м'язових волокон, що розпалися

б) Визначити кількість мікроорганізмів на 1г продукту в м'ясі замороженому і м'ясному фарші методом посіву змиву на МПА.

10. а) Визначити загальну кількість мезофільних, в т.ч. слизеутворюючих бактерій в 1 г цукру-піску.

Для цього наважку цукру 20 г. в 100 мл стерильної водогінної води струшувати до повного розчинення цукру після чого провести посів по 2 мл на МПА для обліку загальної кількості мікроорганізмів і на цукровий агар (МПА + 10% сахароза) для обліку слизеутворюючих видів. Посіви вирощують в термостаті при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 48-72 годин. Після чого визначити загальну кількість мезофільних бактерій на МПА і число слизеутворюючих, шляхом підрахунку слизових каплеподібних колоній на цукровому агарі. Зробити препарати, пофарбувати, дивитися з імерсією.

б) Визначити загальну кількість спор термофільних аеробів і окремо число спор, збудників плоского скисання в 10 г цукру.

Для цієї мети підготувати розчин цукру 10 г в 100 мл стерильної води, колбу з розчином цукру витримати в киплячій водяній бані впродовж 5 хв, охолодити розчин. Провести посів 2 мл в чашку і залити глюкозопептонним середовищем такого складу: пептон 5 г, глюкоза 5 г, агар 15 г, бромкрезол пурпур (індикатор) 0,04 г, вода 100 мл. Посіви вирощувати в термостаті при $t = 55-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 48 годин. Після чого підрахувати загальну кількість колоній термофілів на глюкозопептонному агарі з індикатором і число колоній, збудників плоского скисання, навколо яких на фіолетовому або пурпуровому тлі середовища утворюється жовтий ореол, внаслідок взаємодії кислоти, що утворилась, з індикатором. Вибрати 2-3 переважачі колонії, описати їх і приготувати препарати для мікроскопування. На підставі отриманих даних дати оцінку якості цукру.

11. Приготувати препарати на предметних скельцях з пошкоджених фузаріозом бульб картоплі; коренеплодів моркви, уражених білою гниллю (склеротинія); капусти, ураженої сірою гниллю; плодів яблук, уражених в сильному ступені плодовою гниллю та ін. Розглянути під мікроскопом з об'єктивами 8х і 40х. Замалювати.

12. Перевірка герметичності банок. Для цього чисті банки (скло або бляшанка) тих чи інших консервів занурюють у воду у вертикальному положенні з таким розрахунком, щоб шар води над банкою сягав 25-30 мм. Воду нагрівають до $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримують банки в гарячій воді протягом 5-7 хв. Поява бульбашок повітря в будь-якому місці свідчить про негерметичність банки. Такі банки аналізу не підлягають.

13. Аналіз продукту з чистої герметичної банки будь-якого виду стерилізованого продукту (зелений горошок, м'ясо-овочеві консерви та ін.) Проводиться таким чином: протирають кришки спиртом, потім

ватний тампон підпалюють і пробивають кришки металевим загостреним пробійником (діаметр в перерізі 1 см). Відбирають пробу продукту стерильними скляними трубочками з внутрішнім діаметром 0,8 см. Вносять пробу (приблизно 2-3 г) в кожну з двох пробірок з МПБ (для виявлення аеробів) і в кожну з двох пробірок із середовищем Кітт-Тароцці (див. Додаток .) для виявлення анаеробів.

Пробірки витримують в термостаті з t 35-37 °С протягом 72 годин, після чого переглядають. При виявленні ознак зростання (помутніння, газ та ін.) з пробірок із МПБ роблять звичайний посів на МПА (для аеробів). З пробірок із середовищем Кітт-Тароцці роблять глибинний посів в чашки, заливають товстим шаром (до 1 см) МПА, ретельно перемішують і після застигання середовища посів накривають стерильним предметним склом, щільно притискаючи його до поверхні агару. При наявності анаеробів вони утворюють колонії, які розвиваються вузькою смужкою в товщі агару ближче до центру скла. З виростих колоній зробити фіксовані забарвлені препарати, дивитися з імерсією

14. Дослідження мікрофлори солі:

а) зробити посів розчину солі на МПА з вмістом 20% солі (5г солі + 95 мл води);

б) визначити кількість мікроорганізмів на 1г продукту в рибі: замороженій; засоленій, гарячого копчення методом посіву змиву на МПА.

Приготувати фіксовані препарати, що вирости на агарі, найбільш характерних колоній. Дивитися з імерсією. Замалювати.

Контрольні питання до лабораторної роботи № 4

1. Існуючі методи обліку мікроорганізмів.
2. Поняття «мікробного числа».
3. Поняття «санітарно-показові мікроорганізми».
4. Відбір проби при дослідженні обсіменіння мікроорганізмами поверхні об'єкту.
5. Відбір проби при дослідженні обсіменіння рук.
6. Визначення кількості мікроорганізмів в повітрі.
7. Суть методу рахунку колоній; середовища, що застосовуються в цьому методі для вирощування бактерій, дріжджів і цвілі.
8. Переваги і недоліки методу рахунку колоній при оцінці мікробного обсіменіння об'єкта.
9. Які види мікробних уражень характерні для харчових продуктів і продовольчої сировини?
10. Назвіть цілі та завдання санітарної мікробіології.
11. Які мікроорганізми називають санітарно-показовими?

12. Дайте характеристику БГКП (бактерій групи кишкової палички) і назвіть види мікроорганізмів, що входять в цю групу.
13. Наявність яких бактерій свідчить про свіже фекальне забруднення води?
14. Які показники визначають при санітарно-мікробіологічному дослідженні води?
15. Що таке "мікробне число" і як його визначають?
16. Який метод використовують для виявлення БГКП у воді?
17. Назвіть санітарно-показові мікроорганізми, за наявністю яких в повітрі можна оцінити його чистоту?
18. На яких середовищах культивують БГКП?
19. Способи підрахунку колоній, що вирости в чашках Петрі.
20. Ознаки колоній, що враховуються при вивченні культуральних властивостей бактерій.
21. Визначення понять «змішана» і «чиста» культура.
22. Завдання і методи виділення чистих культур мікроорганізмів.
23. Принцип виділення чистих культур за методом Коха.
24. Визначення чистоти культури бактерій.

РОЗДІЛ 5. ПЕРЕТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТИХ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН

5.1 Бродіння

Процеси бродіння викликані мікроорганізмами, є найважливішими етапами перетворень безазотистих органічних сполук. Ці перетворення дуже складні і різноманітні. Кожен вид бродіння викликається певним видом (групою) мікроорганізмів. Багато видів бродіння широко використовуються в промисловості. З іншого боку, збудники багатьох бродінь викликають псування харчових продуктів і напоїв.

5.1.1 Спиртове бродіння

Спиртове бродіння – це процес анаеробного перетворення вуглеводів з утворенням етилового спирту, вуглекислого газу і виділенням невеликої кількості енергії.

Цей вид бродіння викликається різними мікроорганізмами: дріжджами *Saccharomyces*, грибами роду *Oidium*, *Monilia*, *Mucor*, а також бактеріями *Sarcina ventriculi*, деякими видами *Enterobacteriaceae* і *Clostridium*. Для більшості перелічених вище мікроорганізмів спирт є бічним продуктом і тільки для дріжджів *p. Saccharomyces* він – головний кінцевий продукт бродіння, тому що вони найбільш повно і швидко розщеплюють цукор до кінцевих продуктів, внаслідок чого мають найбільш важливе промислове значення. Ряд галузей промисловості заснований на життєдіяльності дріжджів (виноробство, виробництво спирту, пивоваріння, хлібопекарське виробництво).

Анаеробна природа спиртового бродіння вперше була встановлена Пастером. Хід бродіння дуже складний, він складається з декількох етапів, в яких беруть участь ферменти дріжджової клітини.

Сумарне рівняння спиртового бродіння:



Здатність дріжджів зброджувати цукор протягом певного часу називається енергією бродіння. Енергія бродіння визначається шляхом визначення кількості CO_2 , що утворилися і етилового спирту.

Для спостереження за ходом спиртового бродіння в трубку Дунбара або посуд Ейнгорна наливають 20 % розчин сахарози так, щоб заповнити запаяний кінець трубки або судини. Вносять 2-3 г пресованих пекарських дріжджів, закривають отвір трубки або судини

ватяномарлевым корком і ставлять в термостат з температурою 30 °С. Через 1-1,5 години у запаяного кінця трубки або судини відбувається витіснення рідини, яка виділилася в процесі спиртового бродіння вуглекислим газом. Про інтенсивність бродіння судять за кількістю CO_2 , що виділився.

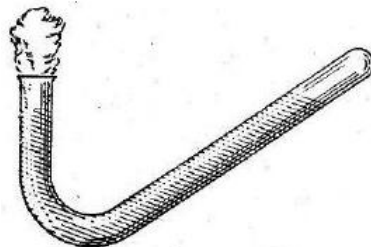


Рис.50 - Трубка Дунбара

Постановка досліду

Як поживне середовища для дріжджів використовують середовище такого складу:

Сахароза – 15 г; KN_2PO_4 – 0,3 г; пептони – 0,5 г; MgSO_4 – 0,1 г; вода 100 мл

Середовище розливають по 100 мл у колби ємністю 250-300 мл і стерилізують при 0,5 атм. 30 хв. В колбу зі 100 мл середовища вносять 1 г сухих пресованих дріжджів. Колбу закривають каучуковим корком, в який вставлений затвор Мейссля. Цей затвор легко пропускає CO_2 , що виділяється, але затримує пари води і спирту, які поглинаються наливою в затвор концентрованою сірчаною кислотою. На затвор надягають товстостінну каучукову трубку, верхній кінець якої закритий шматочком скляної палички, а бокова стінка має невеликий поздовжній розріз. Колби зважують на технічних вагах з точністю до 0,01 г і ставлять в термостат при температурі 28 °С на дві-три доби.

Умови, що сприятимуть розвитку дріжджів, але перешкоджають росту інших мікроорганізмів, будуть такими:

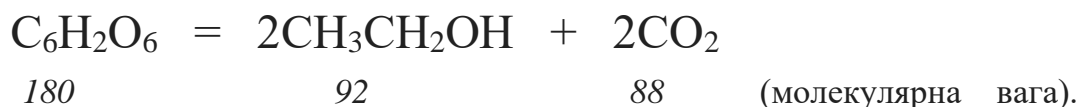
1. Висока концентрація цукру (15 %);
2. Кисле середовище за рахунок KN_2PO_4 (рН = 5,0);
3. Накопичення значної кількості спирту;
4. Анаеробні умови.

Сума цих факторів робить середовище елективним для культури дріжджів.

Дослідження результату досліду на спиртове бродіння

Кінець бродіння встановлюється після припинення газоутворення. Після закінчення досліду колбу знову зважують. Кількість виділеної вуглекислоти в грамах визначають за різницею між початковою масою колби та її кінцевою масою після бродіння.

Для визначення енергії бродіння використовують сумарне рівняння спиртового бродіння:



З цього рівняння випливає, що на долю CO_2 припадає майже 50 % збродженого цукру.

Наприклад, в нашому досліді середовище містить 15г цукру. З цієї кількості може виділитися близько 7-7,5г вуглекислоти. Знаючи кількість вуглекислоти, що виділилася, легко визначити кількість утвореного спирту і кількість збродженого цукру (енергія бродіння).

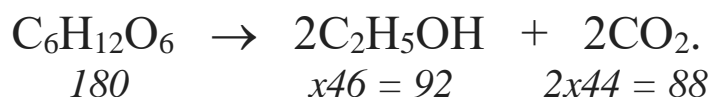
Приклад розрахунку

1. Визначають масу виділеного вуглекислого газу. Це можна зробити, підрахувавши різницю маси бродильної колби при постановці досліді і після його закінчення.

$$a = m_1 - m_2,$$

де *a* - маса виділеної вуглекислоти; *m*₁ - маса колби при постановці досліді; *m*₂ - маса колби після закінчення бродіння.

2. За масою виділеного CO_2 можна визначити кількість утвореного в досліді спирту і збродженого цукру, користуючись сумарним рівнянням спиртового бродіння:



Припустимо, що втрата у вазі колбочки (тобто кількість утвореного CO_2) дорівнює 7,0 г, тоді виходячи з вищевказаного рівняння, кількість утвореного спирту (*x*₁) дорівнюватиме:

$$\begin{array}{rcl} 88 \text{ г CO}_2 & - & 92 \text{ г C}_2\text{H}_5\text{OH}; \\ 7 \text{ г CO}_2 & - & x_1 \text{ г C}_2\text{H}_5\text{OH}. \end{array}$$

$$x_1 = 7,3 \text{ г спирту.}$$

Кількість збродженого цукру (*x*₂) відповідно дорівнюватиме:

$$\begin{array}{rcl} 88 \text{ г CO}_2 & - & 180 \text{ г C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6; \\ 7 \text{ г CO}_2 & - & x^2 \text{ г C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6. \end{array}$$

$$x_2 = 14,3 \text{ г цукру.}$$

3. Визначають інтенсивність бродіння (x_3).

Якщо в 100 мл середовища за рецептом 15 г цукру (100 %), то 14,3 г зброженого цукру становить $x_3\%$.

$$\begin{aligned} 15 \text{ г } C_6H_{12}O_6 & - 100 \% ; \\ 14,3 \text{ г } C_6H_{12}O_6 & - x_3 \% . \\ x_3 & = 96 \% \end{aligned}$$

5.1.2 Молочнокисле бродіння

Молочнокисле бродіння – процес анаеробного окиснення вуглеводів, кінцевим продуктом якого є молочна кислота.

Молочнокислі бактерії відносяться до родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Хоча ця група морфологічно гетерогенна (включає довгі і короткі палички, коки), в фізіологічному відношенні її можна охарактеризувати досить добре. Всі пов'язані з нею бактерії грам-позитивні, не утворюють спор (за винятком *Sporolactobacillus inulinus*) і в переважній більшості нерухомі. Всі вони використовують як джерело енергії вуглеводи і виділяють молочну кислоту.

Відомі два типи молочнокислого бродіння: *гомоферментативне* і *гетероферментативне*. Вони відрізняються один від одного збудниками, субстратами бродіння, механізмом перетворення вуглеводів і кінцевими продуктами:

Характеристика молочнокислого бродіння. Тип бродіння	Шлях перетворення вуглеводів	Основні кінцеві продукти	Збудники
Гомоферментативне	Гліколіз (Шлях Ембдена-Мейергофа-Парнасу)	Молочна кислота	<i>p. Streptococcus (S. faecalis)</i> , <i>p. Lactococcus (L. lactis)</i> <i>p. Pediococcus (P. cerevisiae)</i> <i>p. Lactobacillus</i> <i>n/p Thermobacterium</i> <i>n/p Streptobacterium (L. delbruckii, L. bulgaricus, L. lactis, L. plantarum, L. casei)</i>
Гетероферментативне	Гексозомонофосфатний (пентозофосфатний)	Молочна кислота,	<i>p. Leuconostoc (L. mesenteroides)</i> ,

	окислювальний, шлях Варбурга-Діккенса- Хорекера)	оцтова кислота, етиловий спирт, CO ₂ , діацетил, ацетоїн	<i>L. lactis</i>) <i>p. Lactobacillus</i> <i>n / p Betabacterium</i> (<i>L.fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i>)
--	--	---	---

Потреба в факторах росту. Характерна риса молочнокислих бактерій – це їх потреба в ростових речовинах. Молочнокислі бактерії є ауксотрофами, більшість з них потребує ряд вітамінів і амінокислот, а також пуринів і піримідинів. З іншого боку, багато з них мають здатність, якої немає у більшості мікроорганізмів: вони можуть утилізувати молочний цукор (лактозу).

Поширення і місця знаходження. Поширення молочнокислих бактерій в природі визначається їх складними потребами в поживних речовинах і способом отримання енергії (бродиння). Ці бактерії майже ніколи не виявляються в ґрунті або водоймах. У природних умовах вони зустрічаються:

а) в молоці, місцях його переробки і молочних продуктах (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*, *S. diacetylactis*);

б) на рослинах і на рослинних залишках, що розкладаються (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*);

в) в кишківнику й на слизових оболонках людини і тварин (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium* та ін.).

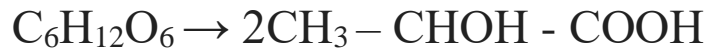
Завдяки утворенню великих кількостей молочної кислоти, до якої вони в значній мірі толерантні, молочнокислі бактерії за відповідних умов можуть досить швидко розмножуватися, витісняючи інші мікроорганізми. З цієї причини їх легко культивувати на елективних середовищах і легко виділяти. Природні накопичувальні культури цих бактерій містяться в кислому молоці і молочних продуктах, кислому тісті, кислій капусті, силосі й т.п.

Катаболізм вуглеводів і продукти бродиння

Розрізняють гомоферментативне і гетероферментативне молочнокисле бродиння, в залежності від продуктів, які виділяються окрім молочної кислоти, та їх відсоткового співвідношення. Відмінність також полягає в різниці шляхів отримання пірувату при деградації вуглеводів гомо- і гетероферментативними молочнокислими бактеріями.

Гомоферментативне молочнокисле бродіння

При гомоферментативному молочнокислому бродінні вуглеводень спочатку окиснюється до пірувату гліколітичним шляхом, потім піруват відновлюється до молочної кислоти за допомогою лактатдегідрогенази. Продуктом гомоферментативного молочнокислого бродіння є молочна кислота, яка становить не менше 90 % всіх продуктів бродіння.



Streptococcus lactis:

S. faecalis, *S. salivarius*, *S. pyogenes*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*,
S. diacetylactis

Термобактерії (температурний оптимум 40-50 °С; при 15 °С не ростуть):

L. lactis, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. Delbruckii*

Стрептобактерії (температурний оптимум 30-37 °С; при 15 °С ростуть)

Lactobacillus casei, *L. plantarum*, *Sporolactobacillus inulinus*

Гетероферментативне молочнокисле бродіння:

При гетероферментативному молочнокислому бродінні утворюється більше продуктів: молочна кислота, оцтова кислота, етанол, двоокис вуглецю:



Збудники:

Leuconostoc mesenteroides (*Betacoccus*) оптимум температури 20-30 °С;

L. cremoris

Бета-бактерії:

Lactobacillus brevis - температурний максимум близько 45 °С

L. fermentum - температурний максимум близько 45 °С

L. viridescens, *Bifidobacterium bifidum* - оптимум температури 36-38 °С

Застосування молочнокислих бактерій в сільському господарстві і виробництві харчових продуктів

На молочнокислому бродінні засновано отримання багатьох харчових продуктів, а також виробництво силосу для потреб тваринництва.

Приготування силосу. Молочнокислі бактерії, що мешкають на рослинах, відіграють велику роль при запасанні кормів для худоби. Для приготування силосу використовують листя цукрових буряків, кукурудзу, картоплю, трави і люцерну. Рослинну масу пресують і додають до неї мелясу, щоб підвищити відношення С / N, мурашину або яку-небудь неорганічну кислоту, щоб заздалегідь забезпечити прискорене зростання лактобацил і стрептококів. За таких умов відбувається контрольоване молочнокисле бродіння.

Приготування кислої капусти. Кисла капуста теж є продуктом, в приготуванні якого беруть участь молочнокислі бактерії. У дрібно нарізаній, посипаній сіллю (2-3 %) і спресованій білокачанній капусті при доступі повітря починається молочнокисле бродіння.

Молочні продукти. Молочнокислі бактерії, що утворюють кислоту і надають продуктам певний смак, знаходять широке застосування в молочній промисловості. Стерилізоване або пастеризоване молоко або вершки зброджують, додаючи закваски чистої («стартові») культури молочнокислих бактерій.

Мікробні закваски та умови отримання основних молочнокислих продуктів:

Молочний продукт	Культура, що входить до складу закваски	Температура інкубації, °С	Тривалість інкубації, год
Сметана, пахтаньє	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	22	18
Йогурт	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. Bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	43-45	2,5 - 3
Кисле молоко (кисляк)	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i>	30-35	6-8
Кисле молоко Мечніковське	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. Bulgaricus</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i>	40-45	3-5
Кефір, кумис	<i>Lactobacillus lactis</i>	15 - 22	

	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus Kefiranofaciens</i> <i>Streptococcus</i> дріжджі <i>Saccharomyces lactis</i> і роду <i>Torulopsis</i> , оцтовокислі бактерії		24 - 36
Сир	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S. cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	22 (35)	18 (5)
Ряжанка	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. Bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	40-45	2,5-3

Йогурт отримують з пастеризованого гомогенізованого цільного молока, інокулював *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (після внесення закваски молоко витримують 2-3 години при 43-45 °С). Під назвою біойогурт в продаж надходить кисле молоко, сквашене *Lactobacillus acidophilus* і *Streptococcus thermophilus*. Закваску кефіру готують на так званих «кефірних зернах», які містять неповністю вивчену суміш мікроорганізмів, яка включає лактобацили, стрептококи, мікрококи і дріжджі.

Корисні для здоров'я людини властивості молочнокислих бактерій вперше описані І. І. Мечниковим. На сьогодні широко використовується поняття «пробіотик» для позначення живих мікроорганізмів (переважно молочнокислих бактерій), вживання яких з їжею в достатній кількості сприятливе діє на здоров'я. У складі пробіотичних кисломолочних продуктів активно використовуються біфідобактерії.

Біфідобактерії – це облигатна і домінуюча частина кишкової мікрофлори здорової людини і теплокровних тварин. Вона проявляє антагоністичну активність по відношенню до патогенних, умовно-патогенних і небажаних мікроорганізмів у кишківнику. В даний час ідентифіковано 24 види біфідобактерій (від лат. Bifidus – роздвоєний, розщеплений надвоє), об'єднаних в рід *Bifidobacterium*.

Найбільш вивченими видами біфідобактерій є: *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum* та ін. Типовий вид -*B. bifidum*.

Морфологія біфідобактерій. Біфідобактерії це надзвичайно варіабельні за формою палички – прямі, вигнуті, розгалужені, роздвоєні Y- або V-форми, булавоподібні, лопатоподібні. Клітини розташовуються поодинокі, парами, іноді ланцюжками або розетками,

розмір клітин 0,5-1,3 x 1,5-8 мкм. Грампозитивні, не утворюють спор і капсул, нерухомі. Мікроскопічна картина кожного виду біфідобактерій має особливості за розміром, формою і розташуванням клітин.

При вирощуванні культур біфідобактерій на печінковому агарі або в молоці розгалуження зникає, клітини стають грамваріабельними, слабкіше забарвлюються кислими і лужними барвниками, з'являється багато гранульованих форм, які іноді можна прийняти за коки. Грануляція у біфідобактерій спостерігається також в середовищах з високим вмістом сухих речовин.

У молоці біфідобактерії розвиваються повільно, тому що коров'яче молоко не є природним середовищем для них. Однією з причин поганого росту біфідобактерій в молоці служить розчинений в ньому кисень. У них не виявлено казеолітичної активності, тобто вони можуть засвоювати казеїн тільки після часткового гідролізу. В результаті розщеплення казеїну утворюються поліпептиди, глікопептиди, аміносахариди, що стимулюють ріст біфідобактерій.

Пришвидчення росту біфідобактерій в коров'ячому молоці стимулюють екстракти дріжджів, гідролізоване молоко, а також вони збільшують співвідношення білок: лактоза.

5.1.3 Маслянокисле бродіння

Маслянокисле бродіння це процес анаеробного розкладання вуглеводів, при якому утворюється масляна кислота, CO₂, H₂ і інші побічні продукти.

Сумарне рівняння маслянокислого бродіння:



Окрім масляної кислоти, в процесі бродіння, в помітних кількостях, утворюється оцтова кислота, а при зміщенні реакції в кислий бік (до рН 5,5) – в великих кількостях утворюються бутиловий спирт і ацетон. Енергетичним матеріалом для маслянокислих бактерій служить крохмаль, водорозчинні вуглеводи типу декстринів, ді-і моносахариди, органічні кислоти (молочна і піровиноградна) і спирти – маніт і гліцерин. Як джерело азоту вони використовують різні азотисті сполуки; пептони, амінокислоти, аміачні солі, а деякі навіть атмосферний азот.

Збудники цього процесу – маслянокислі клостридії широко поширені в ґрунтах, в придонних мулових відкладеннях та інших місцях, де немає доступу повітря. *Clostridium spp.* входять до складу нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту (**автохтонна**

мікрофлора); іноді їх виявляють на шкірі і в порожнині рота (алохтонна мікрофлора). До роду *Clostridium* відносяться також вельми небезпечні патогенні види: *Clostridium tetani* – збудник правця, *Clostridium perfringens* – збудник газової гангрени, *Clostridium botulinum* – продуцент екзотоксину, одного з найсильніших біологічних отрут (ботулізм).

Всі види роду об'єднані в групи залежно від здатності зброджувати ті чи інші органічні сполуки.

Перша група – сахаролітичні види *Clostridium*, зброджують розчинні вуглеводи, крохмаль або пектин з утворенням бутирату, ацетату, CO_2 і H_2 . Бродіння за участю деяких мікроорганізмів групи призводить до утворення з сахаридів додаткових нейтральних сполук (бутанола, пропанола, ацетону, невеликих кількостей етанолу). До групи входять бактерії, що викликають маслянокисле й ацетонобутилове бродіння: *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butylicum*, *C. acetobutylicum* та ін.

Друга група – протеолітичні види *Clostridium*, зброджують амінокислоти. Мають сильні протеолітичні властивості й здатні до інтенсивного гідролізу білків з подальшим зброджуванням амінокислот. Зростання мікроорганізмів в середовищах з білком супроводжується утворенням аміаку, CO_2 , H_2 , жирних кислот і великої кількості летких сполук з неприємним запахом. До групи належать види: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. botulinum* та ін. Багато представників роду *Clostridium*, зброджують амінокислоти, здатні також до зброджування вуглеводів.

Третя група – види *Clostridium*, зброджують **азотовмісні** циклічні сполуки – пурины й піримідини. Пурины (гуанін, гіпоксантин, ксантин і ін.) під впливом *C. acidurici* і *C. cylindrosporum* перетворюються на аміак, ацетат і CO_2 . *C. oroticum* зброжує піримідини, при цьому урацил розпадається до аланіну, CO_2 і NH_3 , а оротова кислота - до оцтової кислоти, CO_2 і NH_3 .

Четверта група включає всього один вид – *C. kluuyveri*, зброджує суміш етанолу з ацетатом до бутирата і капронової кислоти, а також невеликої кількості водню.

Маслянокислі клостридії – це досить великі, рухливі палички (1-2x10 мкм), **грам+**, утворюють спори, що перевищують діаметр клітини (при утворенні спор клітини набувають веретеноподібну форму, іноді форму барабанної палички), строгі анаероби, типовий вид *Clostridium butyricum*. Оптимальна температура розвитку – 35-40 °С, терmostійкість спор – 110-115 °С протягом 10-15 хв.

Рід включає психрофільні, мезофільні й термофільні види. Температурний оптимум для росту більшості мезофільних видів лежить

в діапазоні 30-40 °С. Для термофільних видів температурний оптимум становить 60-75 °С. Дуже чутливі до кислотності середовища, оптимум рН 6,9-7,3.

Маслянокисле бродіння часто приносить значний збиток, викликаючи масове псування овочів при зберіганні, спучування сиру, псування консервів, прогоркання молока.

За тиждень-півтора до заняття закладають дослід. Для цього неочищену промиту картоплю нарізують скибочками, якими заповнюють пробірку на 1/3 об'єму, додають трохи крейди (для створення нейтрального середовища, тому що маслянокислі бактерії належать до нейтралофілів) і заповнюють водою майже доверху. Щоб в цьому середовищі розвивалися переважно маслянокислі бактерії, слід створити в ньому строго анаеробні умови і піддати середовище пастеризації (прогрівання при температурі близько 80 °С протягом 10-15 хв). При нагріванні спори маслянокислих бактерій залишаються життєздатними, а неспорують бактерії, що потрапили з ґрунтом, гинуть. Після пастеризації слід вийняти ватяні пробки, швидко замінити їх гумовими, проводячи останні через полум'я спиртівки і обікаючи край пробірок. Потім пробірки закорковують і поміщають в термостат з температурою 35 °С на 2-3 дні. За цих умов в рідині виявляють бактерії маслянокислого бродіння.

Культура маслянокислих бактерій є при цьому елективною. Для їх переважного розвитку створені анаеробні умови, безспоріві форми інших видів, вбиті попереднім нагріванням, добавка крейди нейтралізує кислоти, що утворилися, і сприяє розвитку бактерій.

*Інший спосіб отримання накопичувальної культури маслянокислих бактерій: 5 г ячменю (солоду), 2 г крейди, 5 г цукру - заливають водою (100 мл) і кип'ятять протягом 5 хв. Гарячу рідину переливають у високу пробірку, на дно якої кидають шматочок ґрунту або насіння гороху. Пробірку тримають в термостаті при 30-35 °С сім днів. На наступному занятті виробляють мікроскопування рідини, в якій виявляють головним чином *Clostridium pasteurianum*, рухливі палички з закругленими кінцями, одиночні і парні. У старих культурах на одному з сторін клітини виявляють спору.*

5.1.4 Оцтовокисле бродіння

Збудники оцтовокислого бродіння широко поширені в природі. Вони зустрічаються в ґрунті, на поверхні зрілих ягід, в скислому пиві й вині.

Оцтовокисле бродіння викликається представниками рр. *Acetobacter*, *Gluconobacter*, які отримують енергію, здійснюючи неповне окислення органічних сполук.

Для мікроскопічного дослідження на глікоген і гранульозу в краплю розчину Люголя на предметному склі вносять шматочок плівки оцтовокислих бактерій, накривають препарат покривним склом і мікроскопують. У *A. pasteurianum* і *A. kutzianum* оболонка клітки синіє від дії йоду. Інші бактерії *A. rancens* і *A. aceti* посиніння не дають, а забарвлюються йодом на жовтий колір.

Якісною реакцією на оцтову кислоту є утворення грушевої есенції (оцтовоізоамілового естеру) при нагріванні 40 мл досліджуваного розчину з 2 мл 96 % ізоамілового спирту і 2 мл концентрованої сірчаної кислоти.

Закладка досліду: за тиждень-півтора до заняття в конічні колби наливають тонкий шар пива (1 см). Товщина шару пива має велике значення для результату досвіду, тому що подібно як для оцтовокислих бактерій повинні бути створені аеробні умови. До пива додають трохи (0,5 мл) спирту. Колби закривають ватяними тампонами і ставлять в термостат при температурі 30-35 °С на кілька діб. Через 5-7 діб на поверхні пива з'являється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій - *Acetobacter rancens*, *A. pasteurianum*. При більш низькій температурі 20-22 °С розвиваються представники інших видів - *A. aceti*, *A. Xylinum*.

Вміст колб аналізують, описують характер плівок, що утворилися, мікроскопують забарвлені мазки.

5.1.5 Пропіоновокисле бродіння. Хімізм процесу, збудники. Практичне використання пропіоновокислого бродіння

Пропіоновокисле бродіння викликається пропіоновокислими бактеріями, що відносяться до роду *Propionibacterium*.

Єдиним джерелом енергії для пропіоновокислих бактерій є процес зброджування різних речовин: моносахаридів (гексоз, пентоз), молочної, яблучної кислот, гліцерину та інших на пропіонову та оцтову кислоти, діоксид вуглецю і воду.

Хімізм пропіоновокислого бродіння:



Пропіоновокислі бактерії – невеликі, нерухомі грампозитивні палички, не утворюють спор, факультативні анаероби. Живуть в основному в кишковому тракті жуйних тварин і в молоці.

Практичне застосування пропіоновокислого бродіння.

Пропіоновокисле бродіння використовується в сироварінні. Летючі кислоти (пропіонова і оцтова) надають сирам кислувато-гострий смак, а виділяються у вигляді бульбашок, вуглекислий газ утворює «глазки» в сирі.

У пропіоновокислих бактерій виявлена здатність до активного синтезу вітаміну В12, тому вони використовуються в якості продуцента в мікробіологічній промисловості для отримання цього вітаміну.

5.1.6 Бродіння пектинових речовин

Пектини – це міжклітинні речовини рослинних тканин. Є три типи пектинових речовин: протопектину, пектин, пектинова кислота, які піддаються окисленню або збродженню різноманітними мікроорганізмами.

При анаеробіозі вони зброджуються маслянокислими бактеріями *Clostridium pectinovorum*, *C. felsineum* з утворенням масляної кислоти, оцтової кислоти, водню, вуглекислого газу.

Пектинове бродіння спостерігається при мочці лубоволокнистих рослин (льону, коноплі), яка необхідна для відділення від пектину целюлозних волокон цих рослин, що мають промислове значення. При водній (анаеробній) мочці після занурення стебел льону в воду вони набухають. При цьому екстрагуються водорозчинні речовини (цукру, глікозиди, пігменти) і починають розвиватися бактерії. Спочатку розмножуються аероби (вода містить кисень). Після поглинання ними кисню створюються анаеробні умови, і починають розвиватися факультативно-анаеробні безспорові бактерії, близькі до *E. coli*. Відділення волокон відбувається під час основної стадії бродіння. *C. pectinovorum* розщеплює пектин, при цьому накопичуються органічні кислоти, і його змінює більш кислотостійка *C. felsineum*.

У росяній (аеробній) мочці льону беруть участь в основному цвілеві гриби.

У лабораторних умовах анаеробне розкладання пектину можна відтворити таким чином: снопики льону або соломи виварюють 7-10 хв у киплячій воді для видалення екстрактивних речовин, які можуть перешкодити істинному пектиновому бродінню. Після чого снопики поміщають в пробірки з чистою водою та кип'ятять ще кілька хвилин. Потім пробірки заражають шматочком соломи. Посіви інкубують 7 днів при температурі 35 °С.

Щоб переконатися в присутності в тканинах рослини пектин-розкладаючих бактерій, слід приготувати препарат для мікроскопіювання. Для цього на предметне скло наносять краплю розчину Люголя на глікоген і гранульози, потім туди ж з вимоклі стебла рослини віджимають краплю рідини, що бродить або вносять невеликий відрізок луб'яної тканини. Препарат накривають покривним склом і проводять мікроскопію. Клітини пектин-розкладаючихся бактерій чітко видно завдяки темно-бурому або фіолетовому фарбуванню гранулези.

5.1.8 Амоніфікація або гниття білкових речовин

Гниття – процес глибокого розкладання білкових речовин. Одним з кінцевих продуктів розкладання білкових речовин є аміак, тому процес гниття називають Амоніфікація.

Білки – високомолекулярні сполуки, тому спочатку вони піддаються позаклітинному розщепленню протеолітичними ферментами мікроорганізмів, які є екзоферменти.

Розщеплення білків відбувається поступово:

білки → пептони → поліпептиди → амінокислоти.

Амінокислоти, що утворилися дифундують всередину клітин і можуть бути використані як в конструктивному, так і в енергетичному обміні. Проміжними продуктами білкового розпаду є летючі жирні кислоти, спирти, індол, скатол та ін. Кінцевими продуктами: аміак (NH_3), сірководень (H_2S), CO_2 , H_2O .

Розщеплення амінокислот починається шляхом їх дезамінування і декарбосилування. При дезамінуванні амінокислот відбувається відщеплення аміногрупи з утворенням аміаку, органічних кислот (масляної, оцтової, пропіонової, окси- і кетокислот) і високомолекулярних спиртів. Надалі утворення кінцевих продуктів залежить від умов протікання процесу і від виду мікроорганізму – збудника гниття.

Аеробне гниття. Протікає в присутності кисню повітря. Кінцевими продуктами аеробного гниття є, крім аміаку, діоксид вуглецю, сірководень і меркаптани (володіють запахом тухлих яєць). Сірководень і меркаптани утворюються при розкладанні сірковмісних амінокислот (цистину, цистеїну, метіоніну).

Анаеробне гниття. Протікає в анаеробних умовах. Кінцевими продуктами анаеробного гниття є продукти декарбосилування амінокислот (відібрання карбоксильної групи) з утворенням смердючих

речовин: індолу, скатол, фенолу, крезолу, діамінів (їх похідні є трупними отрутами і можуть викликати отруєння).

Збудники гнильних процесів.

Збудниками аеробного гниття є спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*: *Bacillus mycoides* (грушоподібна бацила); *Bacillus mega-terium* (капустяна бацила); *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка); *Bacillus subtilis* (сінна паличка), а також неспорообразуючі палички: *Serratia marcescens* (чудова паличка); *Proteus vulgaris* (паличка протей); *Escherichia coli* (кишкова паличка) та інші мікроорганізми.

Збудниками анаеробного гниття є анаеробні спорові палички роду *Clostridium* (протеолітичні клостридії): *Clostridium sporogenes*, *Clostridium subterminalis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*.

Практичне значення гнильних процесів.

Гнильні мікроорганізми завдають великої шкоди, викликаючи псування багатих білками продуктів харчування: м'яса і м'ясопродуктів, яєць, молока, риби і рибопродуктів тощо.

У природі (у воді, ґрунті) гнильні бактерії активно розкладають відмерлі тваринні і рослинні тканини, мінералізують білкові речовини і тим самим відіграють важливу роль у кругообігу вуглецю та азоту. Для культивування аммоніфікуючих бактерій можна користуватися різними середовищами, що містять білкові речовини, наприклад, МПБ.

Для аналізу беруть пробірку з 10 мл МПБ, заражають невеликою грудочкою ґрунту. Пробірки закривають ватяними пробками, під які підвішують змочену дистильованою водою червоний лакмусовий папірець (для виявлення аміаку, що виділяється) і смужку фільтрованого паперу змоченою розчином оцтовокислого свинцю (для виявлення сірководню). Пробірки покривають зверху пергаментним папером і поміщають в термостат при $t = 25 - 30$ °C на 2-3 доби.

При дослідженні результатів досліду виявляється:

а) проба на аміак – червоний лакмусовий папірець стає синім (підлужування середовища) в результаті виділення аміаку.

Накопичення аміаку в субстраті встановлюють також за допомогою реактиву Несслера. На порцелянові пластинки з лунками поміщають краплю реактиву, потім краплю субстрату. При великій кількості аміаку з'являється коричневий або бурий осад, при невеликому – помаранчева або жовте забарвлення.

б) проба на сірководень – білий фільтрувальний папірець змочений оцтовокислим свинцем чорніє в присутності H_2S (освіта сульфідів свинцю). Якщо папір покривається сріблястим нальотом, то виділяються ще і меркаптани.

При розгляданні препарату «роздавлена крапля» найбільш часто виявляються рухливі безспорові палички *Bacterium proteus*, і спороутворюючі клостридії типу *Clostridium putrificum* і ін.

Мікроскопію амоніфікаторів проводять, готуючи препарат «роздавлена крапля» з прижиттєвим забарвленням основним фуксином або без нього. Типовими амоніфікаторів є спорові (в основному представники роду *Bacillus*) і рухливі безспорові палички (р. *Pseudomonas*, *Proteus*).

5.2 Окислення

5.2.1 Окислення жирів і вищих жирних кислот мікроорганізмами. Мікроорганізми - збудники псування жирів

Жири являють собою складні ефіри гліцерину і вищих жирних кислот. Так як жири – високомолекулярні сполуки, то в незміненому вигляді всередину клітини вони потрапити не можуть. Тому спочатку відбувається гідроліз жиру за участю ферменту ліпази, яка є у багатьох мікроорганізмів. В результаті гідролізу утворюються гліцерин і вищі жирні кислоти. Цей процес не забезпечує клітини енергією, тому продукти гідролізу, що утворилися використовуються різними мікроорганізмами як енергетичний матеріал. Процес протікає тільки в аеробних умовах.

Гліцерин піддається окисленню оцетовоокислими бактеріями до діоксіацетон і далі мікроскопічними грибами до вуглекислого газу і води.

Вищі жирні кислоти окислюються важче і повільніше. В процесі окислення утворюються проміжні продукти: кетони, альдегіди, оксикислоти і інші, які надають окисленому жиру прогірклий смак.

Збудники.

Найбільш активними мікроорганізмами в процесі розкладання жиру є бактерії роду *Pseudomonas*, особливо флуоресцюючі (продукують пігменти) і міцеліальні гриби: *Oidium lactis*, багато видів *Aspergillus*, *Penicillium*.

Практичне значення процесу

Процес розкладання жирів відмерлих тварин і рослин відбувається постійно і має велике значення в природному кругообігу речовин. З іншого боку, в харчовій промисловості мікроорганізми, що окислюють жири, приносять шкоду, викликаючи псування харчових жирів і жиру, що містяться в різних харчових продуктах.

Слід враховувати, що багато жиророзщеплюючих мікроорганізмів є псіхрофіли, тому вони здатні розвиватися при зберіганні харчових продуктів в охолодженому стані.

Прогоркання жирів (наприклад, окислювальне псування під дією кисню повітря). Цей процес характерний для харчових жирів і жировмісних продуктів рослинного і коров'ячого масла, сала, маргарину, сиру і горіхів і ін. Окисленню піддаються в першу чергу жирні високонепредельні кислоти, провітаміни та вітаміни, при цьому накопичуються продукти окислення, в тому числі і токсичні. Вони надають жиру гіркий своєрідний смак, неприємний прогірклий запах, викликають першіння в горлі. На швидкість окислення впливають ступінь насиченості жирних кислот, що входять до їх складу, температура зберігання, присутність каталізаторів (металів, світла), наявність антиокислювачів та ін.

5.3 Взаємовідносини між мікроорганізмами

У природних умовах мікроорганізми утворюють складно взаємодіючі між собою популяції двох типів: автохтонні (місцеві) і алохтонні (зимогенні).

Автохтонні мікроорганізми зазвичай зустрічаються в даній екосистемі в значних кількостях, які відносно постійні в часі.

Алохтонні мікроорганізми – нетипові представники даної екосистеми. Їх чисельність схильна до значних коливань, залежить від наявності джерел живлення, або обмежена дією інших факторів, що лімітують. Біоценози, до складу яких входять тільки представники мікрофлори, називаються мікробіценозами.

Взаємини між мікроорганізмами можуть бути розділені на симбіотичні і конкурентні (антибіоз).

Симбіотичні взаємини, що виникають між мікроорганізмами, в яких хоча б один з них отримує вигоду, іноді називають кооперацією. Це більш рідкісна форма взаємовідносин, ніж конкуренція.

При найбільшій мірі зв'язків (кооперації) говорять про формування консорціуму – структурованої симбіотичної асоціації двох або більше видів, що передбачає тісну інтеграцію їх метаболізму, клітини об'єднані ніби в один організм. Прикладом може служити консорціум *Rhodospirillum rubrum*. У центрі консорціуму знаходиться відносна велика рухлива бактерія *Desulfotomaculum*. На її поверхні розташовуються клітини зеленої сіркобактерії *Chlorobium*. У світлій зоні водойми в анаеробних умовах сіркобактерії забезпечують надходження органічної речовини і окисленої сірки, а сульфатредуюча бактерія постачає відновник.

У результаті симбіотичних зв'язків набувається можливість виграшу в боротьбі за існування у одного або всіх його членів. Основою для виникнення симбіозів можуть бути трофічні, просторові, захисні або інші типи зв'язків. Межі між різними типами симбіозів важко помітні, а різні форми симбіотичних взаємин можуть переходити один в одного.

Типи симбіозів класифікують за кількома ознаками:

- по обов'язковості симбіотичного зв'язку виділяють факультативний і облігатний;
- по розташуванню партнерів розрізняють екзосимбіози і ендосимбіоз;
- за характером взаємин, що утворюються, виділяють власне симбіоз, метабіоз, сателітизм і синергізм.

Симбіоз – це тип взаємовідносин між мікроорганізмами, коли два або більше видів при спільному розвитку створюють взаємовигідні умови для розвитку один одного. Типовий приклад таких взаємин – спільний розвиток аеробних і анаеробних бактерій. У кефірних зернах одночасно розвиваються молочнокислі бактерії і дріжджі, при цьому молочнокислі бактерії, які відчують потребу в вітамінах, отримують їх в результаті розвитку дріжджів, останні отримують сприятливі умови для розвитку за рахунок підкислення середовища. Прикладом симбіозу також є взаємини ціанобактерій і мікроскопічних грибів, що спостерігаються в лишайнику. Користь, що отримується грибом від симбіозу в таких умовах, очевидна: він використовує продукти метаболізму ціанобактерій як джерело органічних поживних речовин. Крім того, ціанобактерії здатні фіксувати атмосферний азот, який використовується і грибом. Внесок гриба в асоціацію полягає в тому, що він полегшує поглинання води і мінеральних речовин, а також захищає фотосинтезуючого партнера від висихання і надлишкової інтенсивності світла.

Метабіоз – тип взаємин, при якому користь з них витягує тільки один партнер, не завдаючи шкоди іншому; найчастіше один організм розвивається за рахунок продуктів життєдіяльності іншого, як би продовжуючи розпочатий ним процес. Наприклад, аммоніфікуючі бактерії розкладають органічні азотовмісні сполуки з утворенням аміаку, який є субстратом для розвитку нітрифікаторів. Останні окислюють аміак до нітритів і нітратів, які виступають акцепторами електронів при нітратному диханні денітрифікуючих бактерій. Аналогічні взаємини виникають між групою целюлозоруйнівних бактерій і азотобактером, який не володіє здатністю використовувати клітковину, але прекрасно розвивається за рахунок глюкози і органічних кислот, що утворюються при її розкладанні целюлозоруйнівними бактеріями.

Сателітизм є різновидом метабіозу, при якому розвиток одного мікроорганізму стимулюється іншим за рахунок виділення останнім чинників зростання (вітаміни, амінокислоти, азотисті речовини). Так, сарцини, які продукують різні вітаміни і амінокислоти, сприяють зростанню і розмноженню оцтовокислих бактерій, які більш вимогливі до змісту і складу субстрату.

При **синергізмі** члени асоціації стимулюють розвиток один одного за рахунок виділення продуктів життєдіяльності. Прикладом синергізму можуть служити взаємини між молочнокислими бактеріями і дріжджами в кумисі, хлібному квасі, кислому житньому тісті. Бактерії утворюють молочну кислоту, яка створює кисле середовище, сприятливе для розвитку дріжджів. Крім того, молочна кислота служить гарним джерелом вуглецевого харчування. У свою чергу дріжджі стимулюють розвиток молочнокислих бактерій, усуваючи надлишок молочної кислоти і збагачуючи субстрат вітамінами. Відмирають клітини дріжджів містять багато білків, які є хорошим джерелом азоту для бактерій. Подібні взаємини можна спостерігати в чайному грибі, що складається з оцтовокислих бактерій і дріжджів: утворений дріжджами спирт бактерії використовують в якості енергетичного субстрату, окислюючи його до оцтової кислоти і створюючи тим самим сприятливе для дріжджів кисле середовище.

Конкурентні взаємини припускають неможливість співіснування двох видів мікроорганізмів, обумовлену боротьбою за джерела харчування або інші фактори середовища. Якщо організмам необхідні однакові ресурси або інші фактори середовища, їх конкуренція називається пасивною. У тому випадку, коли один з мікроорганізмів пригнічує розвиток іншого за рахунок утворення продуктів обміну, говорять про активну конкуренцію. Серед конкурентних взаємин виділяють антагонізм, хижацтво і паразитизм.

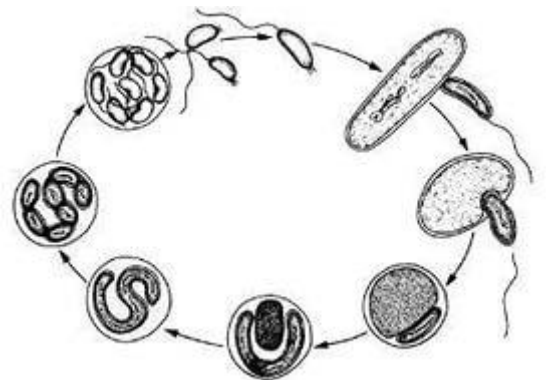
Антагонізм. Крім сприятливих взаємин між мікроорганізмами спостерігаються і такі, при яких один вид мікроорганізмів повністю або частково пригнічує ріст і розвиток інших видів, тобто між ними при їх розвитку спостерігається антагонізм. Причини, що призводять до антагонізму, різноманітні:

- при спільному розвитку мікроорганізмів різних видів, які мають потребу в одних і тих же поживних речовинах.
- утворенні мікроорганізмами речовин (органічні кислоти, спирти та ін.), які змінюють середовище, роблячи її непридатною для розвитку інших мікроорганізмів.
- продукуванні речовин, які мають бактерицидну або бактеріостатичну дію по відношенню до інших мікроорганізмів (антибіотики, бактеріоцини).

Хижацтво – форма взаємовідносин, при яких одна група мікроорганізмів використовує клітини інших в якості поживного субстрату. Прикладом можуть служити міксобактерії, лізуючі за допомогою виділених ними екзоферментів бактерії інших видів. Утворені при цьому поживні речовини використовуються ними для життєдіяльності. Приклади хижацтва найбільш часто спостерігаються між протистами і бактеріями, наприклад амеби поїдають бактерії *E. coli*.

Паразитизм, як форма взаємовідносин передбачає існування одного виду (паразита) в клітинах іншого (хазяїна) і використання його як джерела живлення і місця існування. Господар для паразита є місцем існування першого порядку, саме через господаря відбувається регуляція взаємовідносин паразита із зовнішнім середовищем. Облігатні паразити не можуть розвиватися за відсутності господаря. Бактерії – паразити втратили здатність синтезувати багато речовин; вони отримують їх у готовому вигляді за рахунок свого господаря. Прикладом таких взаємин в світі мікроорганізмів можуть служити бактеріофаги, які не здатні до активного існування поза бактерії-господаря.

У 1963 р Г. Стольпе і М. Старр описали бактерій-паразитів *Vdellovibrio bacteriovorus*. Це дуже дрібні грамнегативні бактерії з одним полярним джгутиком, покритим чохлом. Вони є облігатними аеробами і облігатними паразитами, що живуть в периплазматичному просторі інших грамнегативних бактерій (хоча, як рідкісні варіанти, можуть виникати і незалежні від господаря штами). Життєвий цикл бактерій роду *Vdellovibrio* незвичайний. Він починається з енергійного зіткнення паразита з клітиною господаря: швидкість руху клітин бделловібріонів така велика, що клітина господаря, яка у багато разів більша за розмірами, за інерцією проходить після поштовху значну відстань. Паразит відразу ж прикріплюється до клітинної стінки господаря безжгутиковим кінцем і починає обертатися навколо своєї довгої осі зі швидкістю, що перевищує 100 об/с. Незабаром після цього клітина господаря округляється. У клітинній стінці в місці прикріплення паразита з'являється отвір, і клітина бактерій роду *Vdellovibrio* проникає в периплазму. Проникнення відбувається за рахунок того, що клітина паразита синтезує ферменти протеази, ліпази і лізоцімоподібну мурамідазу. Крім того, активне обертання клітини бделловібріона вносить вклад в загальний процес проникнення паразита в клітку господаря в результаті ефекту механічного свердління. Бделловібріон, що втратив джгутик в процесі проникнення в клітину господаря, починає цикл розвитку в периплазматичному просторі. Цитоплазматична мембрана стає пористою і пропускає клітинні компоненти, які служать поживними речовинами для паразита. Бделловібріон перетворюється в нитку, довжина якої в кілька разів



перевищує початкову клітку. На завершальній стадії ця нитка фрагментується на клітини, що мають джгутики. Весь процес розмноження займає близько 4 год. До цього часу клітина господаря піддається подальшому руйнуванню, і потомство бделловібріона легко звільнюється. На поверхні твердого середовища, покритого газом клітин-господарів, клітини бделловібріона дають плями лізису, зовні схожі зі стерильними плямами або бляшками, які утворюються при фаговій інфекції. Бделловібріонів можна виявити в самих різних природних матеріалах. Вони знайдені в зразках ґрунту з багатьох географічних частин світу, в стічних водах, в прісноводних водоймах.

Для виділення мікробів-антагоністів з природних місць мешкання застосовують різноманітні методи. В основу більшості методів покладено принцип виділення чистої культури мікроорганізму – продуцента антибактеріальної речовини і безпосереднього його випробування по відношенню до використовуваних тест-організмів. Мікроорганізми-продуценти виділяють з субстратів, де активно розвиваються бактерії, дріжджі, міцеліальні гриби. Наприклад, на поверхню живильного середовища, попередньо засіяного тест-організмом, петлею наносять суспензію ґрунту. Через 48 – 72 години інкубування, формуються колонії і навколо деяких спостерігаються зони затримки росту тест-організму. Такі колонії відбирають і досліджують далі.

При визначенні антагоністичної активності даного штаму основний принцип полягає у створенні умов для спільного культивування антагоністів на щільних або в рідких поживних середовищах. Існує безліч методичних прийомів, які забезпечують вирішення даного завдання.

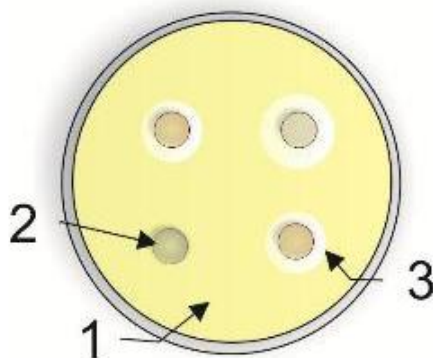


Рис.51 - Визначення антагоністичної активності методом агарових блоків:

1 – тест-культура; 2 – агаровий блок; 3 – зона затримки росту тест-культури)

При використанні методу перпендикулярних штрихів на поверхню агаризованого середовища в чашці Петрі засівають штрихом досліджуваний мікроб-антагоніст, який продукує антибактеріальну речовину. Посів роблять по діаметру чашки, яку потім поміщають в термостат при температурі, оптимальної для зростання.

Тривалість культивування визначається швидкістю росту антагоніста. Після завершення росту і дифузії виділяються речовини в щільну середу, перпендикулярно до зростлого штриху, підсівають штрихами тест-культури, починаючи від країв чашки. Чашки поміщають в термостат на 48 годин. Якщо досліджуваний мікроорганізм-антагоніст утворює в середу речовину, що дифундує та надає антимікробну дію відносно тест культур, то зростання останніх буде починатися на деякій відстані від зростання самого антагоніста. Чим більша ця відстань, тим більш чутлива тест-культура до антибіотичної речовини, що продукується. Нечутливі мікроорганізми будуть розвиватися в безпосередній близькості від штриха (рис. 52).

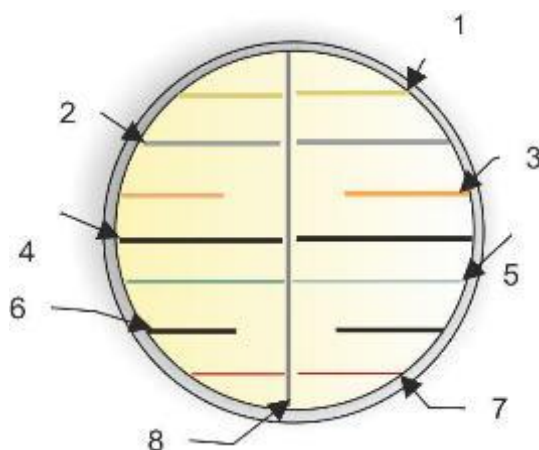


Рис. 52 - Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів методом перпендикулярних штрихів

(1, 2, 4, 5, 7 – ріст нечутливих тест-культур, 3, 6 – зростання тест-культур) чутливих до антибактеріальної речовини мікроорганізма-антагоніста (8)

Метод агарових блоків зручний тим, що вирощування штамів-антагоністів і тест-культур проводиться на різних поживних середовищах. Досліджуваний на антагоністичну активність мікроорганізм засівають на поверхню агаризованого середовища в чашці Петрі таким чином, щоб в процесі його росту сформувався «суцільний газон». Після того, як клітини мікроорганізму добре виростуть, стерильним пробковим свердлом (або колбою) вирізають агарові блоки, які переносять на попередньо засіяну тест-культурою поверхню середовища в іншій чашці Петрі. Тест-культура засівається шпателем, а агарові блоки накладають ростом вгору на рівній відстані один від одного і від країв чашки, щільно притискаючи до агарної

платівки. На одній чашці Петрі можна розмістити 4–5 агарових блоків з різними продуцентами антибіотичних речовин (рис. 51).

Чашки інкубують в термостаті при температурі, оптимальній для зростання тест-культури. У разі чутливості останніх до антибактеріальної речовини продуцента навколо агарових блоків утворюються зони відсутності росту. Чим більше виділяється антибактеріальної речовини, тим воно активніше і краще дифундує в середовищі, тим більше діаметр зони затримки росту тест-культури. Нечутливі до антибіотичні речовини даного продуцента мікроорганізми ростуть по всій поверхні середовища.

Вивчення антагоністичних взаємовідносин при спільному культивуванні в рідкому поживному середовищі засноване на підрахунку числа життєздатних особин після спільного культивування двох штамів мікро-організмів, клітини яких при цьому повинні відрізнятися один від одного ознаками, що легко визначаються (пігментація, зброджування вуглеводів, стійкість до антибіотиків, ауксотрофності та ін.). Крім того, необхідно, щоб обидва мікроорганізми однаково добре росли при використуваних умовах (температурі, складі середовища і т. д.). Культури досліджуваних бактерій, що знаходяться в стаціонарній стадії зростання, розводять свіжим живильним середовищем в 10 разів, змішують в рівних обсягах і інкубують в оптимальних для їх розвитку умовах. Паралельно в тих же умовах інкубують дані культури незалежно. Через певні проміжки часу відбирають проби по 1 мл усіх культур і після відповідних розведень по 0,1 мл висівають на селективні для кожного штаму середовища. Чашки поміщають в термостат і після інкубування підраховують кількість сформованих колоній. Визначають титр клітин і будують криві зростання бактерій при спільному і роздільному культивуванні. По осі абсцис відкладають час культивування бактерій, по осі ординат – кількість життєздатних клітин в 1 мл.

5.4 Можливі шляхи регулювання життєдіяльності мікроорганізмів при зберіганні харчових продуктів

У даний час все ширше вивчають і використовують різні способи впливу на мікроорганізми для підвищення термінів зберігання харчових продуктів.

При виборі способів впливу на мікроорганізми, враховують їх ефективність, сумісність з об'єктами, нешкідливість для людини, продукції і навколишнього середовища, прийнятність для промислових умов, автоматизації та механізації технологічних процесів.

Основними принципами зберігання харчових продуктів є:

Біоз (bios – життя). На цьому принципі засноване зберігання свіжих фруктів і овочів. При зберіганні цих продуктів створюються умови, що перешкоджають розвитку мікроорганізмів, шляхом зниження температури до 5 °С і підтримки певної вологості. При цьому зберігається природний імунітет плодів і овочів, що також запобігає мікробному псуванню. Зберігання свіжездоїного молока при низьких температурах збільшує тривалість бактерицидної фази.

Абіоз (abiosis – заперечення, знищення життя) досягається фізичними і хімічними способами. До них відносяться: використання високих температур (пастеризація, стерилізація), додавання антисептиків, опромінення різними формами променевої енергії, застосування антибіотиків, обробка ультразвуком, фільтрування рідин за допомогою стерилізуючих фільтрів. При абіозі гинуть, як правило, вегетативні і спорові форми бактерій, завдяки чому продукти можуть зберігатися в герметичній упаковці тривалий час.

Анабіоз (anabiosis – придушення життя). Методи зберігання, засновані на принципі анабіозу, спрямовані на призупинення життєдіяльності мікробів в продуктах. Створюються такі умови, при яких мікроорганізми можуть залишатися живими, але не життєдіяльними. До таких методів належать: використання низьких температур (охолодження і заморожування); видалення води з продукту нижче межі, необхідного для розвитку мікробів (сушка, в'ялення); додавання до продукту речовин (солі, цукру), що створюють високий осмотичний тиск; підвищення кислотності продукту шляхом додавання оцтової кислоти (маринування); створення анаеробних умов, що запобігають розвитку найбільш активних збудників псування – аеробних мікроорганізмів (зберігання продуктів в газонепроникаючому пакувальному матеріалі, вакуумній упаковці, в атмосфері азоту).

Ценоанабіоз – принцип зберігання, при якому консервуючу речовину виробляють самі мікроорганізми. Цей принцип заснований на антагоністичних взаєминах мікроорганізмів: створюються умови для розвитку корисних мікроорганізмів і тим самим пригнічується розвиток мікроорганізмів – збудників псування. При цьому корисні мікроорганізми не тільки не псують продукт, а навіть покращують його харчові та смакові переваги. На цьому принципі засноване квашення овочів, виробництво кисломолочних продуктів.

Ефективність всіх заходів, спрямованих на попередження псування харчових продуктів, багато в чому залежить від дотримання загальних санітарно-гігієнічних вимог і виконання встановленого режиму зберігання, товарної обробки і переробки.

5.5 Лабораторная работа № 5. Види бродіння і взаємини між мікроорганізмами. Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів

Мета роботи: познайомитися з видами і хімізмом бродіння, з якісними реакціями на спирт, оцтову, молочну та масляні кислоти.

5.5.1. Проведення якісних реакцій на спиртове, молочнокисле, оцтовокисле і маслянокисле бродіння

Якісні реакції на спиртове бродіння:

Реакція з кристалічним йодом

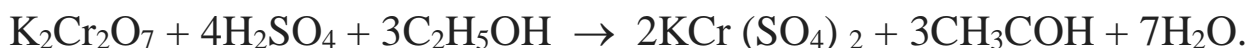
До 10 мл рідини, що бродить в пробірку додають 1-2 мл 10 % розчину лугу і підігрівають, не доводячи до кипіння (60 °С). Потім додають кілька кристаликів йоду і знову нагрівають. У присутності спирту випадає жовтий осад йодоформу, що має характерний запах.

Або до 10 мл рідини, що бродить додають 10 мл 20 % розчину Na_2CO_3 і близько 0,1 г металевого I_2 . Суміш нагрівають до повного розчинення йоду і його знебарвлення. При охолодженні випадають жовті кристали йодоформу з характерним запахом.



Реакція з двохромовокислим калієм

У пробірку з 2-3 мл досліджуваної рідини додають кристалик двухромовокислого калію і кілька крапель концентрованої сірчаної кислоти, суміш нагрівають. Колір змінюється до зеленого, внаслідок відновлення хрому:



Виділяється оцтовий альдегід, який відчувається по запаху, що нагадує запах свіжого яблука.

Якісні реакції на молочнокисле бродіння:

Матеріали та обладнання: свіже і кисле молоко, ряжанка, кислі вершки, сметана, кефір, вершкове масло, розсоли капусти, огірків, 0,1 н розчин NaOH , 10 % розчин сірчаної кислоти, насичений розчин CuSO_4 , 2 % спиртовий розчин тιοфена, 2 % розчин KMnO_4 , 0,5% аміачний розчин AgNO_3 , спиртовий 5 % розчин фенолу, концентрована H_2SO_4 , 5 % розчин FeCl_3 , розчин фенолфталеїну, водний розчин метиленового синього, рідина Никифорова, розчин генціанвіолету, розчин Люголя, 96

% етиловий спирт, розчин карболового фуксину, ізоаміловий спирт, дистильована вода, колби на 50 мл, піпетки на 10 мл, фільтрувальний папір, вата, предметні скельця, спиртівки, мікроскопи, настільні лампи, скляні штативи з кристалізаторами, промивалки.

Визначення оцтового альдегіду

Кисле молоко фільтрують через складчастий фільтр, до 10 мл фільтрату додають 1 мл 10 % розчину сірчаної кислоти, нагрівають в конічній колбі до кипіння, потім по краплях додають 2 мл 2 % розчину KMnO_4 . У цих умовах відбувається окислення молочної кислоти до оцтового альдегіду (CH_3COH). Потім покривають шийку колби фільтрувальною папером, змоченим аміачним розчином оксиду срібла (спочатку змочують папір 0,5 % розчином AgNO_3 , потім розчином NH_4OH). Папір темніє під впливом парів оцтового альдегіду:



Реакція Уффельмана (проба з фенолом)

У пробірку з 10 мл 5 % розчину фенолу додають кілька крапель 5 % розчину хлорного заліза (FeCl_3). Спостерігається утворення інтенсивно забарвленого синього розчину. Додаток однієї-двох крапель сироватки кислого молока, що містить молочну кислоту, робить розчин жовтуватим.

Реакція зі спиртовим розчином тиофена

Кисле молоко фільтрують через складчастий фільтр. До 2 мл фільтрату додають 5 мл концентрованої сірчаної кислоти і 10 крапель насиченого розчину мідного купоросу (CuSO_4). Нагрівають при струшуванні на водяній бані при 100°C протягом 5 хв. При охолодженні додають три-п'ять крапель 0,2 % розчину тиофена в спирті. У присутності молочної кислоти утворюється вишнево-червоне забарвлення.

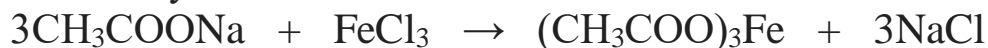
Проведення дослідження на наявність активності каталази.

Для виявлення активності каталази на предметне скло наносять краплю 5 % розчину перекису водню. У неї бактеріальною петлею поміщають краплю молочнокислого продукту і ретельно перемішують. При наявності у мікроорганізмів каталази відбувається розкладання перекису водню з виділенням бульбашок кисню.

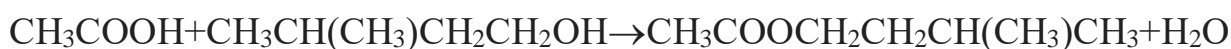
Якісні реакції на оцтовокисле бродіння:

Якісні реакції на CH₃COOH.

а) До 5 мл кислого пива в пробірку додають 2 мл 10% розчину соди і трохи хлорного заліза (III) тієї ж концентрації. Суміш нагрівають. При наявності оцтової кислоти з'являється червоне забарвлення внаслідок утворення ацетату заліза:

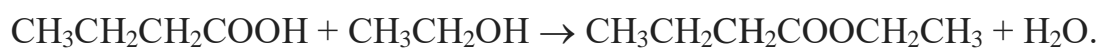


б) До 2-3 мл рідини додають таку ж кількість ізоамілового спирту і одну краплю концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки перемішують і нагрівають. У присутності оцтової кислоти з'являється запах «грушевої есенції», внаслідок утворення естеру – ізоамілацетату.

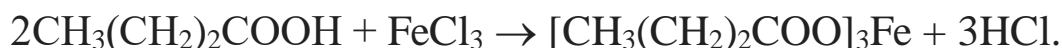


Якісні реакції на маслянокисле бродіння:

а) До 3-4 мл рідини в пробірку додають 0,5 мл 95-процентного спирту і одну-дві краплі концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки добре збовтують і нагрівають. У присутності масляної кислоти з'являється запах етилбутірата, що нагадує запах ананаса:



б) До 5 мл досліджуваної рідини додають 2 мл 5 % FeCl₃. При нагріванні утворюється маслянокисле залізо брунатного кольору:



5.5.2 Вивчення морфології оцтовокислих, молочнокислих і маслянокислих бактерій

Морфологія оцтовокислих бактерій

1. Розглянути плівку на поверхні пива, внести результати спостережень в зошит.

2. Приготувати препарат «роздавлена крапля» з забарвленням розчином Люголя шматочка плівки оцтовокислих бактерій. Промікроскопіювати і замалювати в зошиті.

Морфологія молочнокислих бактерій

2. Приготувати фіксовані препарати з заквасок або розсолу.

3. Провести знежирення їх сумішшю рівних обсягів етилового спирту і ефіру (суміш Никифорова), для чого залити сумішшю мазок і дати суміші випаруватися.

4. Препарати фарбувати метиленою синню протягом 5 хв, промити водою і мікроскопувати. Замалювати.

Морфологія маслянокислих бактерій

Матеріали та обладнання:

Бульби картоплі; крейда; великі пробірки, ватяні пробки, гумові пробки; піпетки; сірники; імерсійне масло; мікроскоп; мікробіологічна петля; спиртівка; предметні скельця; покривні скла; прилад для фарбування і промивання мазків; смужки фільтрувального паперу; реактиви для забарвлення мікробіологічних препаратів за методом Ауескі; 9.5 % розчин хлорного заліза; розчин Люголя.

1. Ознайомитися з основними видами мікроорганізмів, що здійснюють маслянокисле бродіння.

2. Створивши елективні умови отримати накопичувальну культуру бактерій роду *Clostridium*, які здійснюють маслянокисле бродіння.

3. Провести дослідження властивостей бактерій, які здійснюють маслянокисле бродіння.

Постановка досліду на маслянокисле бродіння (на картоплі)

Неочищену сиру картоплю нарізають дрібними шматочками, заповнюють ними 1/4 обсягу високої пробірки, заливають водопровідною водою на 2/3 об'єму пробірки, додають трохи крейди, для нейтралізації масляної кислоти, і ставлять у водяну баню з $t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 10-15 хв. (Пастеризація). Після цього пробірки охолоджують під краном і ставлять в термостат при $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 2-3 доби. При розвитку маслянокислого бродіння картопля спливає, на поверхні спостерігається рясне газоутворення.

Препарат готують безпосередньо з пробірки, для чого беруть петлею краплю рідини з дна пробірки, наносять на предметне скло, підфарбовують розчином Люголя і накривають покривним склом. Дивляться з імерсією. При мікроскопуванні спостерігається наявність великих рухомих паличок з потовщеними кінцями або з потовщенням в середині клітин (кlostридії). У місцях потовщення помітні овальні тільця, спори.

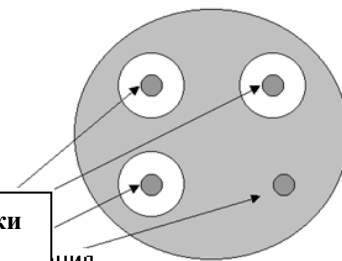
За допомогою піпетки взяти культуру з дна пробірки, приготувати препарат «роздавлена крапля» з додаванням розчину Люголя і препарат «висяча крапля». Культуру мікроскопувати, в ній можна знайти головним чином *Clostridium pasteurianum* – рухливі палички з закругленими кінцями, одиночні і парні. У старих культурах на одному з сторін клітини виявляється спора. Замалювати препарати і зробити висновки.

5.5.3 Вивчення типів взаємовідносин між мікроорганізмами

Матеріали та обладнання: середа МПА; піпетки; сірники; імерсійне масло; мікроскоп; мікробіологічна петля; спиртівка; предметні скельця; покривні скельця; шпатель Дригальського; стерильні чашки Петрі; свердло.

1. Ознайомитися з типами взаємин між мікроорганізмами.
2. Вивчити методи визначення антагоністичної активності.
3. Дослідити антагоністичну активність мікроорганізмів методом перпендикулярних штрихів (див. 5.2).
4. Визначити чутливість до антибіотиків методом паперових дисків.

Визначення ґрунтується на дифузії антибіотика в живильне середовище. Концентрація антибіотиків в дисках підібрана таким чином, щоб діаметри зон затримки росту стандартних тест-організмів були 28 - 32 мм. Бактерії досліджуваного штаму (0,1 мл суспензії, що знаходиться в стаціонарній стадії росту) висівають на поверхню агаризованого



Паперові диски

Рис. 5.3. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків
1 – Колонія навколо паперових дисків (темна зона – рост бактерій; 2 – світла зона – відсутність видимого росту)

середовища в чашці Петрі розподіляють шпателем. І стерильним пінцетом на засіяну поверхню однієї з чашок кладуть один від одного, від країв і центру чашки стандартні паперові диски, просочені розчинами різних антибіотиків, що випускаються промисловістю. Засіяні чашки витримують в термостаті при температурі, що оптимальна для зростання досліджуваних бактерій. Якщо бактерії чутливі до даної сполуки, то навколо дисків утворюється зона затримки росту. Діаметр зони затримки росту відповідає ступеню чутливості досліджуваного мікроорганізму до даного антибіотика.

Контрольні питання до лабораторної роботи № 5

1. Який хімізм спиртового бродіння?
2. Які умови нормального протікання спиртового бродіння?
3. Чим відрізняються дріжджі верхового бродіння від дріжджів низового бродіння?
4. Охарактеризуйте збудників молочнокислого бродіння, їх морфологічні та біохімічні властивості.
5. У чому відмінність гомоферментативного молочнокислого бродіння від гетероферментативного?
6. Які гомоферментативні молочнокислі бактерії ви знаєте?
7. Які гетероферментативні молочнокислі бактерії ви знаєте?

8. Де в природі зустрічаються молочнокислі бактерії?
9. Охарактеризуйте практичне значення молочнокислого бродіння в харчовій промисловості, в природі.
10. Яке практичне значення пропіоновокислого бродіння?
11. Які мікроорганізми є збудниками пропіоновокислого бродіння?
12. Охарактеризуйте збудників маслянокислого бродіння, їх морфологічні і біохімічні властивості.
13. Спороутворення у бактерій роду *Clostridium*.
14. На які групи діляться маслянокислі бактерії?
15. Яким чином відбувається отримання накопичувальної культури маслянокислих бактерій роду *Clostridium*.
16. Охарактеризуйте оцтовокисле бродіння.
17. Які мікроорганізми є збудниками оцтовокислого бродіння?
18. Яким чином мікроорганізми окиснюють жири і жирні кислоти?
19. У чому сутність гнильних процесів?
20. Які продукти утворюються при аеробному гнитті?
21. Вкажіть збудників анаеробного гниття.
22. Назвіть кінцеві продукти гетероферментативного молочнокислого бродіння.
23. Де живуть пропіоновокислі бактерії?
24. Які кінцеві продукти утворюються при анаеробному гнитті?
25. Яка роль маслянокислих бактерій в природі, в харчовій промисловості?
26. Назвіть кінцеві продукти пропіоновокислого бродіння.
27. Що утворюється в результаті окиснення мікроорганізмами жирів і вищих жирних кислот?
28. Як називається форма взаємовідносин, коли організми одного виду використовують особин іншого виду як середовища проживання і джерела їжі, завдаючи їм шкоди, але не викликаючи їх негайної загибелі?
29. Як називається форма взаємовідносин, коли кожен з двох взаємодіючих видів отримує користь від зв'язку з іншим видом?

6. СЛОВНИК МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ТЕРМІНІВ

Автоклавування	Найбільш надійний метод стерилізації, що забезпечує загибель вегетативних і спорових форм патогенних і непатогенних мікроорганізмів.
Абсорбція	Поглинання речовини з розчину або суміші газів твердим тілом або рідиною; на відміну від адсорбції відбувається у всьому обсязі поглинача.
Автоліз	Руйнування або саморуйнування клітин за рахунок власних (ендогенних) ферментів.
Автотрофи	Мікроорганізми, які синтезують всі вуглецьмістять компоненти клітини з CO ₂ , як єдине джерело вуглецю.
Автохтонна мікрофлора	Специфічні для даного біотопу види.
Агар (агар-агар)	Суміш полісахаридів, яку отримують з морських водоростей і використовують для ущільнення поживних середовищ.
Агрегація (Флокуляція)	Утворення грудок, пластівців з злиплих клітин при культивуванні мікроорганізмів (найчастіше грибів) в рідкому середовищі.
Адаптація	Складні фізіологічні та біохімічні процеси, які забезпечують пристосування організму до умов зовнішнього середовища (або окремим факторів: рН, температури і ін.).
Адсорбція	Поглинання речовини з розчину або газу поверхневим шаром рідини або твердого тіла (адсорбентом); відіграє важливу роль в біологічних системах, застосовується в біохімії для розділення і очищення речовин.
Азотфіксація (Діазотрофи)	Засвоєння молекулярного азоту повітря азотфіксуючими прокаріотними організмами з утворенням сполук азоту, доступних для використання іншими організмами.
Актиноміцети (Променисті грибки)	Розгалужені бактерії, аероби, органотрофи. Не містять в клітинній стінці хітину або целюлози, на відміну від грибів, мають будову граммпозитивних бактерій. Міцелій примітивний. Тонкі прямі або злегка зігнуті палички розміром 0,2-1,0x2,5 мкм, часто утворюють нитки завдовжки до 10-50 мкм. Багато з них здатні до синтезу антибіотиків.
Аліквота	Точно виміряна кратна частина зразка (об'єм розчину), узята для аналізу, яка зберігає властивості основного зразка.
Алкалофіли	Мікроорганізми, що розвиваються в лужних середовищах (рН 9,0-11,0). Облігатні алкалофіли ростуть в межах рН 8,5-11,0; факультативні - 5,0-11,0
Алохтонна мікрофлора	Мікроорганізми, наявність яких в певній екосистемі обумовлена випадковим підвищенням концентрації поживних речовин або появою нових.
Амоніфікація	Один з етапів кругообігу азоту в природі, на якому відбувається розкладання азотовмісних органічних речовин (білків) з виділенням аміаку і його солей під дією ферментів мікроорганізмів.

Амфітрихи	Бактерії з двома полярно розташованими джгутиками або мають по пучку джгутиків на кінцях клітини.
Анабіоз	Пристаосування організму до несприятливих зовнішніх умов, забезпечує стійкість мікроорганізмів до висушування, охолодження, нагрівання споруутворюючих бактерій і грибів.
Анаболізм (асиміляція)	Процес засвоєння поживних речовин і використання їх для синтезу клітинних структур.
Анаероби	Організми (в основному прокаріоти), здатні жити при відсутності в середовищі вільного кисню.
Антагонізм або конкуренція	Взаємовідносини мікроорганізмів в природі або в лабораторних умовах, при яких один вид затримує або повністю пригнічує ріст іншого. Антагоністами можуть бути представники всіх груп мікроорганізмів.
Антибіотики	Високоактивні, спадково закріплені метаболічні продукти мікроорганізмів, вибірково пригнічують ріст різних бактерій
Антисептика	Комплекс заходів з використанням механічних і фізичних методів впливу, активних хімічних речовин і біологічних факторів (антисептиків), які вбивають або пригнічують розмноження мікроорганізмів.
Антиоксиданти	Речовини, що затримують окиснення органічних речовин.
Апоптоз	Біологічний механізм загибелі клітин мікроорганізму.
Археї (Архебактерії)	Мікроорганізми з прокаріотним типом будови клітини: метаногени, сульфатредуктори, екстремальні галофіли, екстремальні термофіли.
Асептика	В мікробіології - комплекс заходів, спрямованих на попередження потрапляння мікроорганізмів з навколишнього середовища в матеріал для дослідження, поживні середовища та культури мікроорганізмів.
Аспергіли (Aspergillus)	Рід анаморфних грибів порядку <i>Eurotiales</i> класу плектоміцети (<i>Plectomycetes</i>). Сапротрофи, рідше паразити. Багато з них утворюють цвілі на харчових продуктах, викликають руйнування промислових виробів (тканини, шкіри, пластмаси). <i>A. fumigatus</i> - збудник хвороб людини і тварин (аспергільоз).
Ауксотрофи	Мікроорганізми, які втратили здатність синтезувати одну з речовин, необхідну для їх росту (амінокислоту, вітамін або ін.). Без додавання в живильне середовище цієї речовини ауксотрофи не ростуть.
Афлатоксини	Отруйні речовини, що виробляються пліснявими грибами. Викликають порушення синтезу білка у еукаріот, токсичні для різних видів ссавців, канцерогенні. Гранично допустима норма в їжі - 30 мкг на 1 кг продукту.
Ацидофіли	Мікроорганізми, що розвиваються на кислих середовищах (рН 2-4). Облігатні ацидофіли можуть рости при значеннях рН середовища 1,0-5,0; факультативні - 1,0-9,0. До ацидофілів відносяться дріжджі, молочнокислі бактерії, тіонові бактерії і деякі інші.
Аероби	Мікроорганізми, які отримують енергію, використовуючи

	кисень. Облігатні аероби розмножуються тільки в присутності кисню.
Аерація	Подача повітря при проведенні аеробного вирощування мікроорганізмів. Може здійснюватися шляхом вирощування мікроорганізмів на поверхні твердих, ущільнених, напіврідких середовищ, в тонкому шарі рідких поживних середовищ, в рідких середовищах з активним перемішуванням їх на гойдалках або шляхом продування повітря через живильні середовища.
Аеротаксіс	Пересування мікроорганізмів до джерела кисню (позитивний аеротаксіс) або від нього (негативний аеротаксіс). Позитивний аеротаксіс властивий аеробам, негативний - анаеробам
Базофілія	Здатність клітинних структур забарвлюватися основними (лужними) барвниками, що обумовлено кислотними властивостями компонентів клітини.
Бактерії	Одноклітинні мікроорганізми з прокаріотним типом будови.
Бактеріостаз	Повна затримка росту і розмноження бактерій, викликана несприятливими факторами середовища.
Бактерицидність	Здатність фізичних, хімічних і біологічних факторів викликати загибель бактерій.
Бацили	Рід грампозитивних паличковидних бактерій, що утворюють внутрішньоклітинні спори. Більшість бацил - ґрунтові сапрофіти. Бацили є аеробами або факультативними анаеробами, більшість представників – хемоорганогетеротрофи.
Біопшкодження матеріалів	Небажана зміна їх властивостей, викликане життєдіяльністю мікроорганізмів.
Біоциди	Хімічні засоби захисту матеріалів від біопшкоджень, що викликаються мікроорганізмами.
Біфідобактерії	Грампозитивні актиноміцети, нерухомі неспороутворюючі палички, анаероби, зброджують вуглеводи за типом гетероферментативного молочнокислого бродіння.
БПК (Біохімічне споживання кисню)	Показник забрудненості природних вод. Обумовлений життєдіяльністю аеробних мікроорганізмів, що використовують органічні речовини в якості субстратів. Виражається в міліграмах кисню, необхідного для окиснення органічних речовин в 1 л води за певний період часу.
Бродіння	Процес розщеплення органічних речовин, переважно вуглеводів, що відбувається під впливом мікроорганізмів або виділених з них ферментів.
Вібріони	Морфотип бактеріальних клітин, що мають вид вигнутих паличок з полярним згуглюванням.
Вірулентність	Ступінь (міра) патогенності - кількісне вираження хвороботворності даного мікроорганізму щодо певного виду тварин або рослин. Вимірюється в умовних величинах мінімальна летальна доза (LDM), 50% летальна доза (LD 50). Вірулентність не є постійною ознакою для даного мікроорганізму і під впливом умов зовнішнього середовища

	(дія світла, висушування) вона може бути підвищена, знижена і навіть втрачена.
Включення клітинні	Непостійні осмотично нейтральні (водонерозчинні) утворення (гранули, краплі) в цитоплазмі клітини. Є продуктами обміну або запасними конструктивними та енергетичними речовинами (крохмаль, глікоген, жир, сірка, волютин, з'єднання заліза, пігменти і ін.).
Водна активність (aw)	Показує відношення тиску водяної пари розчину (субстрату) P і чистого розчинника (води) P ₀ при одній і тій же температурі: $aw = P / P_0$, виражається величинами від 0 до 1 і характеризує відносну вологість субстрату (0 - aw абсолютно зневодненої речовини; 1 - aw дистильованої води). Зростання мікроорганізмів спостерігається при значеннях aw від близьких до 1,0 і приблизно до 0,65-0,61. Оптимальне значення aw - 0,99-0,98; приблизно в цих межах знаходиться aw швидкопсувних харчових продуктів (м'яса, риби, плодів). Більшість бактерій не розвивається при aw субстрату нижче 0,94-0,90.
Волютин (метахроматін)	Внутрішньоклітинні включення в клітинах бактерій (поліфосфати); тимчасовий резерв запасних поживних речовин, аналогічний жировим включенням і гранулам глікогену у тварин.
Газон	Метод посіву мікроорганізмів на тверде живильне середовище суцільним шаром.
Галофіли	Мікроорганізми, що ростуть в середовищах з високою концентрацією солей. Облігатні галофіли здатні рости на середовищах, що містять не менше 12 % NaCl, екстремальні (галобактерії) -ростуть при концентрації NaCl в середовищі 20-30 %.
Гетеротрофи	Організми, що використовують для харчування органічні речовини; у вузькому сенсі слова - організми, які використовують органічні сполуки як джерело вуглецю.
Гіфи	Мікроскопічні розгалужені нитки, що утворюють вегетативне тіло гриба - таллом. Вся сукупність гіфів грибного таллома називається міцелієм. Товщина гіфа від 2 до 30 мкм. Властивий верхівковий (апикальний) ріст. У «нижчих» грибів гіфи не мають поперечних перегородок і міцелій являє собою одну велику клітку. Серед прокаріотних організмів гіфи утворюють гіфомікроби і актиноміцети, у останніх формується субстратний або повітряний міцелій, подібний до грибного.
Глікоген	Розгалужений полісахарид, молекули якого побудовані із залишків α-D-глюкози. Глікоген - запасна речовина дріжджів, деяких водоростей, рідко бактерій. При обробці клітин розчином Люголя гранули глікогену забарвлюються на червонувато-коричневий колір.
Гліколіз	Процес анаеробного ферментативного розщеплення вуглеводів (головним чином глюкози) клітинами рослин,

	тварин і мікроорганізмів. Кінцевим продуктом у тварин є молочна кислота, у рослин і мікроорганізмів - пировиноградна кислота.
Гліцерин	Найпростіший трьохатомний спирт, структурний компонент жирів і інших ліпідів.
Глюкоза	Моносахарид групи гексоз, джерело енергії в живих клітинах. Існує в двох основних формах: α -D- і β -D-глюкопіраноз
Глюкозамін	Аміносахарид, похідне глюкози, входить до складу полісахаридів бактерій і грибів
Гниття	Процес глибокого розкладання білкових речовин мікроорганізмами: Білок \rightarrow пептони \rightarrow поліпептиди \rightarrow амінокислоти
Голозойний тип харчування	Тип харчування, при якому організм або клітина здатні заковтувати щільні частинки їжі, перетравлювати їх, перетворюючи в розчинні речовини. Серед мікроорганізмів характерний переважно для найпростіших.
Голофітний тип харчування (Осмотрофний)	«Рослинний» спосіб харчування, при якому організм поглинає розчинні поживні речовини. Даний тип харчування характерний для рослин, грибів і більшості мікроорганізмів (виняток становлять найпростіші). Використання мікроорганізмами нерозчинних високомолекулярних сполук (білки, целюлоза і ін.) Пов'язаний з процесом виділення в середу специфічних ферментів, що руйнують субстрат до низькомолекулярних розчинних сполук (амінокислоти, сахариди та ін.
Гранулеза	Крохмалооподобна запасна речовина мікроорганізмів, наприклад, клостридій. Відкладається в клітинах у вигляді чисельних дрібних гранул. Розчин Люголя забарвлює гранули гранулези на сіро-синій колір.
Гриби (<i>Fungi</i> , <i>Mycota</i>)	Велика група еукаріот, що включає до 250000 видів. Гриби відрізняються від рослин гетеротрофним (абсорбційним) способом харчування, наявністю хітинових оболонок клітин, характером вуглеводного та азотного обміну, синтезом специфічних метаболітів - глікогену, серотоніну, розмноженням спорами. Група включає 3 класи - Гіфоміцети (<i>Hyphomycetes</i>), Целоміцети (<i>Coelomycetes</i>), Агономіцети (<i>Agonomycetes</i>). Багато видів викликають псування кормів і продуктів харчування (<i>Fusarium</i> , <i>Trichothecium</i> і ін.).
Деаерація	Видалення з рідини розчинених у ній газів. У мікробіології проводять деаерацію поживних середовищ перед посівом облигатно анаеробних мікроорганізмів.
Дегідратація	Висушування або видалення води, використовується для збереження біологічного матеріалу, кормів, харчових продуктів.
Дезамінування	Відщеплення аміногрупи від молекули органічної сполуки. Відіграє важливу роль в катаболізмі амінокислот. Для мікроорганізмів характерні відновлювальне, гідролітичне та внутрішньомолекулярне дезамінування.

Дезінфекція	Сукупність хімічних, фізичних і механічних способів повного знищення вегетативних і спорових форм певних груп патогенних для людини організмів з метою розриву шляхів передачі збудників інфекційних захворювань від джерел інфекції до людей.
Дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК)	Нуклеїнові кислоти, що містять в якості вуглеводного компонента дезоксирибозу, а в якості азотистих основ аденін, гуанін, цитозин і тимін. Присутні в клітинах будь-якого організму. Послідовність нуклеотидів в нерозгалуженому полінуклеотидному ланцюгу строго індивідуальна і специфічна для кожної природної ДНК і представляє кодову форму запису біологічної інформації (генетичний код). ДНК зосереджена в ядрі клітин або в його аналогу - нуклеоїді бактеріальних клітин.
Декантація	Зливання рідини з відстояного осаду. Лабораторний і промисловий спосіб промивання осадів, в тому числі клітин, а також добування розчинних сполук з твердих речовин.
Денітрифікація	Мікробіологічний процес відновлення окиснених сполук азоту (нітратів, нітритів) до оксидів азоту або азоту.
Десорбція	Процес, зворотний адсорбції.
Дифузія	1. Проникнення молекул однієї речовини в іншу при їх зіткненні. Обумовлено тепловим рухом молекул. 2. Спосіб транспорту речовин в клітку, при якому спостерігається пасивне проникнення (проста дифузія) або проникнення речовини в клітину за градієнтом концентрації за участю пермеази (полегшена дифузія).
Диплококи	Морфотип бактерій кулястої форми, клітини яких розташовуються в культурі парами.
Дріжджі	Збірна група мікроскопічних грибів, які не мають типового міцелію. Гетеротрофи з окиснювальним або бродильним типом метаболізму.
Джгутик	Органели руху у прокаріотів і ряду водоростей, найпростіших.
Еврибіонт	Живий організм здатний переносити значні зміни факторів навколишнього середовища.
Екзоспори	Специфічні форми бактеріальних клітин, що знаходяться в стані спокою. Екзоспори утворюються шляхом брунькування вихідної вегетативної клітини. Наприклад, у актиноміцетів гіфи діляться перегородками (септами) на кілька структур, які перетворюються в спори. Стінка спори дуже товста. Екзоспори, як і ендоспори, дуже стійкі до несприятливих впливів ззовні: зневоднення, підвищеній температурі, радіації, хімічного впливу. Метаболізм в них майже повністю припинений, вони містять дуже мало вологи.
Екзотоксин	Білкові речовини, які виробляють і виділяють у зовнішнє середовище патогенні грампозитивні мікроорганізми.
Ендоспори	Спори, що утворюються в вегетативних клітинах бактерій: бацил, клостридій та ін. Мають високу стійкість до

	несприятливих факторів середовища (зневоднення, підвищення температури, неоптимальні значення рН та ін.). Утворення ендоспор – найважливіший фактор виживання в природі.
Ендотоксин	Ліпополісахаридна токсична субстанція (ЛПС) грамнегативних мікроорганізмів. Вивільняється після загибелі і руйнування клітини, термостабільна.
Ентеробактерії	Палички рухомі і нерухомі, грамнегативні, аероби і факультативні анаероби, гетеротрофи, спор не утворюють.
Епіфіти	Мікроорганізми, що живуть на поверхні епідермісу тварин і використовують в якості поживних речовин ороговілі лусочки епітелію.
Еукаріоти	Схожі з клітинами вищих рослин і тварин (ядро містить набір хромосом, має оболонку; у багатьох нормальний статевий цикл, клітини містять ендоплазматичну сітку і мітохондрії, у фото синтетиків – хлоропласти).
Живильні середовища	Середовища, що містять різні сполуки складного або простого складу, які застосовуються для розмноження бактерій або інших мікроорганізмів в лабораторних або промислових умовах.
Загальне мікробне число води (ЗМЧ)	Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, здатних утворювати колонії на поживному агарі при 37 °С протягом 24 годин.
Загальна бактеріальна забрудненість (КМАФАнМ)	Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів в 1 г або 1 см ³ продукту. У нормативній документації вказують граничний вміст цих мікроорганізмів в одиницях КУО (колонієутворюючих одиницях).
Запасні речовини	Осмотично інертні включення клітин мікроорганізмів (полісахариди, жири, поліфосфати та ін.).
Ідентифікація	Визначення таксонометричного положення мікроорганізму на підставі його морфологічних, культуральних, біохімічних та інших властивостей.
Ізотонічний розчин	Розчин, що має однакове осмотичний тиск з порівнюваним розчином.
Імерсійне масло	Кедрова олія з показником заломлення, близьким до скла (n = 1,5). Використовується в мікроскопії з метою збільшення числової апертури об'єктиву за рахунок зменшення втрат світла при заломленні та відображенні.
Імобілізація	Закріплення ферментів, клітин або їх фрагментів на твердому носії.
Інгібувати	Стримувати, придушувати, гнітити.
Індекс	Кількість санітарно-показових бактерій, що містяться в 1 л рідини, 1 г твердих речовин, 1см ³ повітря.
Індукувати	Порушувати, стимулювати.
Інкубація	Витримка мікробної культури при певних параметрах (температурних, кисневих та ін.) протягом фіксованого часу.
Інокулянт (Посівний)	Суспензія живих клітин, що вводиться в живильне середовище з метою отримання нової культури

матеріал)	мікроорганізмів (4-10 % від обсягу живильного середовища).
Інокуляція	Введення живих організмів в середовища; в мікробіологічній практиці також вживають термін посів.
Інтермедіат	Речовина, що є проміжною сполукою будь-якого метаболічного процесу.
Кандидоз	Одна з різновидів грибової інфекції, викликається мікроскопічними грибами роду <i>Candida</i> (<i>Candida albicans</i>). Всіх представників даного роду відносять до умовно-патогенних.
Капсула	Шар слизу навколо клітин мікроорганізмів.
Катаболізм (Дисиміляція)	Процес розкладання і окиснення поживних речовин з виділенням енергії, здійснюється в процесі дихання.
Клітка вегетативна	1. клітина, яка залишилася поза участю в статевому розмноженні; 2. активно зростаюча (ділиться) клітина мікробних культур, що знаходяться в оптимальних для даного виду умовах (клітина спочиваюча); 3. неспеціалізована клітина багатоклітинних мікроорганізмів (на відміну від гетероцисти ціанобактерій, спороутворюючі клітини міцеліальних грибів та ін.).
Клостридії	(<i>Clostridium</i>) - рід спороутворюючих паличковидних бактерій; зазвичай рухливі; грампозитивні; при спороутворенні клітина роздувається в місці знаходження спори. Анаероби. Зброджують вуглеводи (сахаролітичні клостридії - збудники маслянокислого і ацетонбутилового бродіння), азотисті речовини (пептолітичні клостридії). Мезофіли і термофіли.
Коки	Бактерії кулястої форми. Залежно від розташування клітин після поділу підрозділяються на мікрококи (розташовуються по одній), диплококи (парами), стрептококи (ланцюжками), тетракоки (по чотири), сарціни (пакетами, з 8 і більше клітин), стафілококи (гронами). Розміри варіюють від 0,2-0,4 мкм до 4-4,5 мкм. Нерухомі, не утворюють спор, грампозитивні, велика частина з них аероби і факультативні анаероби. Можуть бути вільно живучими сапрофітами, так і паразитуючими в організмі тварин і людини.
КОЛІ-ІНДЕКС	Кількість клітин <i>Escherichia coli</i> в літрі води або кілограмі твердого субстрату (наприклад, ґрунту). Показник забруднення водойм, ґрунтів господарсько-побутовими стічними водами. Зворотна величина Колі-індексу - колі-титр . За діючим стандартом на питну воду Колі-індекс повинен бути не більше 3, а колі-титр відповідно – не менше 300.
КОЛІ-ТИТР	Це найменша кількість досліджуваного матеріалу в мілілітрах (для твердих тіл – у грамах), в якому виявлена одна кишкова паличка. Для визначення колі-титру роздільно засівають на рідкі середовища десятикратно зменшуються обсяги досліджуваного матеріалу (наприклад, 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001мл).

	Для перекладу колі-титру в колі-індекс слід 1000 розділити на число, що виражає колі-титр; для перекладу колі-індексу колі-титр 1000 розділити на число, що виражає колі-індекс.
Колонія	Видиме ізольоване скупчення особин одного виду мікроорганізмів, що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини на щільному живильному середовищі.
Коменсалізм	Співтрапезництво. Форма взаємин між видами в природі, при якій один з учасників симбіозу отримує користь для себе, не завдаючи шкоди іншим членам спільноти. Метаболічні взаємодії і антагонізм між партнерами в такій системі зазвичай відсутні.
Консерванти	Антимікробні речовини, використовувані для запобігання від мікробного розкладання харчових продуктів, кормів, промислових виробів з деревини, текстилю, шкіри і ін. Харчові продукти консервують, застосовуючи цукор, сіль, кислоти (сорбінову, бензойну, оцтову та ін.). Консервацію деревини ведуть із застосуванням біхромату натрію, сульфату міді, фтористого калію або амонію та ін.
Копіотрофи	Мікроорганізми, що ростуть на середовищах, багатих поживними речовинами (концентрація вуглецевмісних сполук обчислюється грамами в літрі).
Кріопротектори	Речовини, що додаються до суспензії клітин перед заморожуванням з метою збереження їх у життєздатному стані (гліцерин, сахароза, диметилсульфоксид).
Ксенобіотики	Чужорідні для живих організмів, що не входять в кругообіг біогенів (пестициди, добрива, миючі засоби, препарати побутової хімії, лікарські засоби та ін.).
Культивування	Вирощування мікроорганізмів в штучних умовах (in vitro).
Культура мікроорганізмів	Вся сукупність мікроорганізмів одного виду, які виростили на щільному або рідкому поживному середовищі.
Культура накопичувальна	Початковий етап отримання чистої культури мікроорганізму з природних субстратів. Полягає в створенні елективних (виборчих) умов для росту організму певного виду або групи подібних видів, при яких він (вони) долає (ють) конкуренцію інших мікроорганізмів. Як елективні фактори можуть виступати - кисла реакція живильного середовища (для одержання культури ацидофілів), відсутність джерела азоту в середовищі (виділення азотфіксаторів), попереднє прогрівання культури (виділення спороутворюючих бактерій) і ін.
Лізис	Руйнування і розчинення клітин і мікроорганізмів під дією ферментів та інших агентів
Лізосоми	Невеликі овальні тільця. Лізосоми перетравлюють захоплені клітиною при ендоцитозі речовини або частки, знищують непотрібні структури клітини (аутофагія); виконує функцію автолізу - самопереварювання клітини.
Лікопін	Додатковий пігмент пурпурних бактерій. Разом з іншими

	каротиноїдами бере участь у фотосинтезі як світлозбиральний пігмент, а також охороняє бактеріохлорофіл від фотоокиснення.
Ліофілізація	Спосіб висушування вологовмісних матеріалів, продуктів, культур мікроорганізмів при низькій температурі (із замороженого стану) в вакуумі. Ліофілізовані матеріали, культури відновлюють свої початкові властивості при додаванні до них води.
Ліпіди	Жироподібні речовини, що входять до складу всіх живих клітин.
Ліпополісахариди (ЛПС)	Складні вуглецьмістячі сполуки, входять до складу зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, мають високу токсичність (обумовленої ліпідом А) і антигенними властивостями (О-антиген полісахаридної природи).
Лістерії	Рід бактерій, поліморфні палички, рухливі, грам +, факультативні аероби, спори і капсул не утворюють, ростуть на МПА, збудники лістеріозу.
Лістеріоз	Зоонозна бактеріальна інфекція, що характеризується ураженням системи мононуклеарних фагоцитів і протікає у людини як в хронічній безсимптомній, так і в гострій формі, що має тенденцію до генералізованої течії. Найбільш типовими для гострого перебігу є ангінозно-септичні і нервові форми захворювання.
Літотрофи	Мікроорганізми, що використовують неорганічні речовини в якості окислюваних субстратів (донорів електронів). Розрізняють фото- і хемолітотрофи.
Люголя розчин	Барвник, що містить 1 г металевого йоду і 2-5 г йодистого калію на 3 мл дистильованої води. Використовується для диференціального забарвлення бактерій за Грамом, для виявлення в клітинах мікроорганізмів запасних речовин (крохмалю, глікогену).
Люмінесценція	Світіння речовин (люмінофорів), викликане будь-яким джерелом енергії (напр., ультрафіолетовим випромінюванням).
Мезосоми	Складчасті мембранні структури, на поверхні яких знаходяться ферменти, необхідні для процесу дихання, при цьому відбувається синтез АТФ.
Мезофіли	Найбільш поширена група мікроорганізмів, до них відноситься більшість бактерій, цвілевих грибів і дріжджів. Найкраще розвиваються при температурі близько 30 °С (оптимум). Температурний мінімум становить 0-10 °С, а максимум доходить до + 50 °С.
Метабіоз	Тип взаємин між мікроорганізмами, при якому один вид створює сприятливі умови для життя іншого виду (аероби - анаероби).
Метаболізм (Обмін речовин)	Комплекс хімічних процесів, що протікають в цитоплазмі мікробної клітини і забезпечують життєдіяльність клітини. Обмін речовин у бактерій включає конструктивний

	метаболізм (анаболізм), при якому відбуваються реакції синтезу молекул клітини, і енергетичний (катаболізм), в процесі якого клітина отримує енергію.
Метаногени	Метаноутворюючі археї, які отримують енергію за рахунок відновлення вуглекислоти молекулярним воднем. При цьому CO ₂ , будучи термінальним акцептором водню, відновлюється до метану (звідси назва групи). Крім вуглекислоти, метаногени можуть відновлювати до CH ₄ мурашину кислоту, метанол, оцтову кислоту і деякі ін. З'єднання. Суворі анаероби. Морфологічно дуже різноманітні. Будучи хемолітоавтотрофами, здійснюють фіксацію вуглекислоти за допомогою ацетил КоА. Весь біогенний метан на Землі утворюється тільки метаногенами.
Мікобактерії	Грампозитивні бактерії-актиноміцети, кислотостійкі сапротрофи, окислюють воски, жири, парафін.
Мікози	Захворювання, що викликаються патогенними грибами.
Мікоплазми	Дуже дрібні мікроорганізми, які не мають клітинної стінки і обмежені плазматичною мембраною. Нерухомі. Сапрофіти або паразити, не утворюють спор, здатні проходити через бактеріальні фільтри. Факультативні або облигатні анаероби. Розмножуються шляхом ділення ниток на коковидної клітини. Багато патогенні.
Мікроаерофіли	Мікроорганізми, які потребують в незначній кількості молекулярного кисню, але не живуть в анаеробних умовах.
Мікробіологічна стійкість	Потенційні можливості збереження продукту без псування. До групи показників мікробіологічної стабільності продукту відносяться два показника: визначення кількості мікроскопічних грибів і визначення вмісту дріжджів.
Мікробіота (мікрофлора)	Сукупність різних видів мікроорганізмів, що населяють певне середовище проживання. За походженням розрізняють: автохтонну та алохтонні мікробіоти. За типом харчування: евтрофну, що представляє комплекс мікроорганізмів, які розкладають органічні речовини; оліготрофну мікробіоту, або мікробіоту розсіювання, яка завершує мінералізацію органічної речовини; літотрофну мікробіоту, що трансформує мінеральні сполуки гірських порід, газу. Мікроорганізми, що розвиваються на поверхні рослин (епіфітна мікробіота), метаболізують виділення з тканин. Шкіра, слизові оболонки, кишківник та ін. Органи людини і тварин мають постійну, так звану нормальну мікрофлору.
Мікробне число	Загальна кількість мікроорганізмів, що містяться в одиниці об'єму або маси досліджуваного об'єкта (1см ³ води, 1г ґрунту, 1 м ³ повітря).
Мітохондрія	Бувають сферичної і овальної форми. Стінка мітохондрії складається з двох мембран (зовнішньої - гладкої і внутрішньої - від неї відходять перегородки або кристи). Мітохондрія синтезує АТФ.
Міцелій	Вегетативне тіло - утворене скупченням гіфів грибів.

Монотрихі	Паличкоподібні бактерії з одним джгутиком.
Мутуалізм	Форма взаємокорисного співжиття, коли присутність партнера стає обов'язковою умовою існування кожного з них.
М'ясопептонний бульйон (МПБ)	Середовище для культивування гетеротрофних організмів.
Наявність бактерій групи кишкової палички (БГКП)	БГКП виконує функцію індикатора фекального забруднення і відноситься до санітарно-показових мікроорганізмів.
Нанометр	Одиниця довжини, що дорівнює 10^{-9} м, 10^{-3} мкм або 10 \AA .
Нативний	Природний, натуральний, неушкоджений.
Нейтралізм	Тип взаємин організмів, при якому партнери жодним чином не впливають один на одного.
Нейтрофіли	Мікроорганізми, для яких оптимальним для зростання є середовище близьке до нейтрального (рН від 4 до 9).
Нефелометр	Прилад для вимірювання ступеню каламутності суспензії клітин або зважених часток, в мікробіології використовується для кількісного обліку мікроорганізмів.
Нізін (харчова добавка E234)	Пептидний антибіотик, що утворюється мікроорганізмом <i>Streptococcus lactis</i> ., Має властивість пригнічувати грампозитивні бактерії (стафілококи, стрептококи та ін.), спороутворюючі й деякі кислотостійкі бактерії. Активно застосовується в сироварінні, при консервуванні м'ясних і молочних продуктів, зеленого горошку, квасолі, грибів, у виробництві масла, згущеного молока, кондитерських виробів.
Нітрифікація	Процес послідовного окиснення аміаку до азотистої і азотної кислот, відбувається в аеробних умовах, збудники - нітрифікуючі бактерії.
Нуклеїнові кислоти	Біополімери, що складаються із залишків фосфорної кислоти, сахаридів і азотистих основ (пуринів і піримідинів). Мають фундаментальне біологічне значення, оскільки містять в закодованому вигляді всю генетичну інформацію будь-якого живого організму, від людини до бактерій і вірусів, що передається від одного покоління іншому.
Нуклеоїд	Еквівалент ядра у бактерій, розташований в центральній зоні бактерій у вигляді дволанцюжкової ДНК, замкнутої в кільце і щільно укладеної як клубок. Ядро бактерій, на відміну від еукаріот, не має ядерної оболонки, ядерця і основних білків (гістонів). Зазвичай в бактеріальній клітці міститься одна хромосома, представлена замкнутою в кільце молекулою ДНК.
Облігатний	Стан або умова, обов'язкові для даного організму.
Оліготрофи	Мікроорганізми, що розвиваються на середовищах з низькою концентрацією поживних речовин.
Омилення	Лужний гідроліз ліпідів з утворенням гліцерину і солей вищих жирних кислот.
Органели	Постійні диференційовані ділянки клітин одноклітинних або

	багатоклітинних еукаріот, що виконують певні функції (ядро, мітохондрії, хлоропласти та ін.).
Орґаноїди	Специфічні надмолекулярні структури цитоплазми, що виконують специфічні функції, без яких неможлива нормальна діяльність клітини. За структурою орґаноїди підрозділяють на немембранні (що не містять мембранних компонентів) і мембранні (мають мембрани). Мембранні орґаноїди (ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі, лізосоми, пероксисоми, мітохондрії і пластиди) характерні тільки для еукаріотів.
Орґанотрофи	Мікроорґанізми, що використовують органічні речовини в якості донорів електронів (фотоорґанотрофи і хемоорґанотрофи).
Осмос	Перенесення розчинника через непроникну для розчинених речовин мембрану, розділяє два розчини різної концентрації. У мікроорґанізмів явище осмосу виникає внаслідок різниці концентрацій речовин всередині мікробної клітини і поза нею.
Осмофіли	Мікроорґанізми, що розвиваються в середовищах з високою концентрацією цукру.
Паразити	Орґанізми, які використовують господаря як джерело живлення і середовище проживання, при цьому вони знаходяться в антагоністичних відносинах з господарем.
Пастеризація	Спосіб знищення вегетативних форм мікроорґанізмів в рідких середовищах, харчових продуктах шляхом одноразового і нетривалого нагріву. Звичайний режим пастеризації: 60-70 °С протягом 15-30 хвилин. Застосовують для обробки молока, вин і пива. При пастеризації гине більшість бактерій і грибів, руйнуються ферменти, але зберігаються вітаміни і смакові якості продуктів.
Патогенність	Здатність мікроорґанізмів утворювати токсини, що призводить до виникнення захворювання (грец. <i>Pathos</i> – страждання, <i>genes</i> – породжує). Патогенність – видова властивість бактерій, тобто вона властива виду в цілому, але у різних представників даного виду може бути різною і проявляється в різному ступеню залежно від умов.
Патогенні мікроорґанізми	Мікроорґанізми, які можуть викликати захворювання.
Пептон	Продукт неповного гідролізу білків, що складається з амінокислот, дипептидів, трипептидів і водорозчинних поліпептидів.
Пермеази	Білки-переносники, які беруть участь в активному транспорті речовин через цитоплазматичну мембрану. Перенесення речовин пермеаз здійснюється проти градієнта їх концентрації.
Пілі (Фімбрії, ворсинки)	Ниткоподібні вирости цитоплазми на поверхні деяких бактерій. Виділяють секс-пили, які беруть участь в процесах кон'югації, і фімбрії (пілі) загального типу, функцією яких є адгезія (прилипання) до субстрату.

Піноцитоз	Поглинання рідких поживних речовин еукаріотичною клітиною.
Плазмід	Позахромосомні фактори спадковості, що представляють собою малі в порівнянні з хромосомою замкнуті в кільце дволанцюжкові ДНК (молекулярною масою 10^6 - 10^8 Да), здатні до автономної реплікації. Плазмід надають клітинам нові властивості – F-фактор (фактор фертильності) і надають клітинам здатність до передачі генів; Col-фактори (коліциногенні фактори) продукують бактеріоцини; наявність R-факторів (факторів резистентності) забезпечує стійкість бактерій до лікарських препаратів і т. д.
Плазмоліз	Процес відділення протопласту від оболонки клітини, зануреної в гіпертонічний розчин, тобто розчин, концентрація солей якого більша ніж в клітинному соці. Залежно від різниці концентрацій внутрішнього і зовнішнього розчинів і тривалості проявляються різні форми плазмолізу: кутовий, увігнутий, судорожний, опуклий. Кутовий плазмоліз проявляється у формі відходження протопласта від клітинної оболонки тільки по її кутах. При увігнутому плазмолізі протопласт залишається в зіткненні з клітинною оболонкою в деяких місцях; різко вираженою його формою є судомний плазмоліз. Найглибша стадія - опуклий плазмоліз - настає, коли протопласт відходить від оболонки повністю і набуває вигляду грудочки з опуклою поверхнею. Часто на останній стадії видно найтонші нитки протопласту («нитки Гехта»), що з'єднують останній зі стінками клітини.
Плазмоптіс	Набухання мікробних клітин і руйнування їх оболонок в гіпотонічному розчині. Внаслідок надмірно високого тургорного тиску спостерігається розрив клітинної оболонки. Плазмоптіс відбувається при зануренні клітин в дощову або дистильовану воду, активно входить в вакуоль і різко підвищує гідростатичний тиск на оболонки.
Поверхнево-активні речовини (ПАР), детергенти	Речовини, що знижують поверхневий натяг. За рахунок впливу на прикордонні шари клітин, порушують функції цитоплазматичної мембрани і внаслідок цього здатні затримувати ріст мікроорганізмів і навіть викликати їх загибель. Широко використовуються як миючі засоби, емульгатори; в мікробіології - як дезинфікуючі речовини, піногасники.
Продуценти	1) організми, здатні до фото- та хемосинтезу, що створюють первинну біомасу з неорганічних речовин (пор. Консументи); 2) у промисловій мікробіології - мікроорганізми, культивовані з метою отримання тих чи інших продуктів (напр., <i>Penicillium chrysogenum</i> - П. пеніциліну).
Прокаріоти або доядерні	Одноклітинні живі організми, що не мають (на відміну від еукаріот) оформлене клітинне ядро та інші внутрішні мембранні органоїди. Для клітин прокаріотів характерна відсутність ядерної оболонки, ДНК упакована без участі

	гістонів. Тип харчування осмотрофне і автотрофне (фотосинтез і хемосинтез). Єдина велика кільцева (у деяких видів - лінійна) дволанцюжкова молекула ДНК, в якій міститься основна частина генетичного матеріалу клітини (так званий нуклеоїд) не утворює комплексу з білками-гістонами. До прокаріотів відносяться бактерії, в тому числі ціанобактерії (синьо-зелені водорості) і археї. Нащадками прокаріотичних клітин є органели еукаріотичних клітин - мітохондрії і пластиди. Прокаріоти поділяють на два таксона в ранзі домену (надцарства): Бактерії (<i>Bacteria</i>) і Археї (<i>Archaea</i>).
Проміле	Одна тисячна частка, 1/10 відсотка; позначається (‰); використовується для позначення кількості тисячних часток чого-небудь в цілому. $1 ‰ = 1/1000 = 0,1\% = 0,001$ Величина в проміле від маси, вираженої в кілограмах, еквівалентна масі в грамах; від маси в тоннах – кілограмам.
Простекі	Цитоплазматичні вирости у деяких бактерій, обмежені клітинною стінкою і цитоплазматичної мембраною. Збільшують клітинну поверхню, прикріплюють клітини до субстрату, беруть участь в кон'югації бактерій.
Протопласти	Клітини мікроорганізмів, які повністю втратили клітинну стінку. Можуть утворюватися в результаті мутацій.
Прототрофи	Мікроорганізми, які здатні самі синтезувати необхідні для росту сполуки.
Психрофіли	Холодолюбиві мікроорганізми. Для них характерні: мінімум в межах від -10 до 0 °С, оптимум 10-15 °С і максимум близько 30° С.
Реакція середовища	Фізіологічно чинним початком в кислих і лужних субстратах є концентрація гідроксильних і водневих іонів (H ⁺ і OH ⁻).
Рибосоми	Про- і еукаріоти мають подібну будову, хоча і розрізняються за деякими характеристиками. Рибосоми – круглі тільця, що складаються з двох субодиниць. Виконують функцію біосинтезу білка з амінокислот.
РНК (рибонуклеїнова кислота)	Містить рибозу і азотисті основи: аденін, гуанін, цитозин і урацил. РНК зосереджена в цитоплазмі і в рибосомах. РНК рибосом бере участь в синтезі білка.
Сальмонели	Рід ентеробактерій. Рухливі прямі палички, грамнегативні, факультативні анаероби, гетеротофи. Тривалий час зберігаються у зовнішньому середовищі та харчових продуктах, синтезують ендотоксин.
Сапрофіти	Мікроорганізми, що харчуються органічними речовинами відмерлих організмів або виділеннями живих організмів, здійснюють кругообіг органічних речовин в природі. До них відносяться мікроорганізми, які розкладають органічні речовини в ґрунті і воді, і мікроорганізми, що викликають псування харчових продуктів або використовуються в процесах переробки рослинної і тваринної сировини.

	Сапрофітами є багато бактерій, цвілеві грибки і дріжджі.
Сапротрофи	Гетеротрофні організми, які використовують для харчування органічні сполуки мертвих тіл або виділення тварин. Беручи участь в мінералізації органічних сполук, сапротрофи є важливою ланкою в біологічному кругообігу речовин і енергії.
Седиментація	Осідання.
Симбіоз	Взаємне існування. Між симбіонтами відбувається частковий обмін продуктами життєдіяльності. Ступінь взаємозалежності симбіонтів варіює від слабкої (співробітництво) до повної (мутуалізм).
Синергізм	Посилення фізіологічних функцій існуючих разом видів в мікробній асоціації.
Середовище елективне, Середовище селективне	Середовище, яке забезпечує прискорене зростання одних організмів порівняно з іншими, використовують зазвичай для отримання накопичувальних культур мікроорганізмів.
Стафілокок	<i>(Staphylococcus</i> , від грец. <i>staphyle</i> — «кетяг винограду» і <i>coccus</i> — «гранула») — рід грам-позитивних бактерій. Під мікроскопом вони мають сферичну форму (коки) і формують виноградоподібні кластери. Рід <i>Staphylococcus</i> включає понад сто відомих видів. Більшість з них непатогенні та є компонентами нормальної флори шкіри і слизових оболонок людини та інших організмів або компонентами мікробної флори ґрунту. Представників роду знаходять у всьому світі. Одним із найбільш патогенних стафілококів є золотистий стафілокок, який викликає гнійні зараження у людини, а саме абсцес, пневмонію, бактеріємію, імпетиго, фурункульоз, карбункули — та багато інших гнійних захворювань.
Стенобіонти	Організми, здатні існувати лише при відносно постійних умовах навколишнього середовища (температури, солоності, вологості, наявності певної їжі і т. д.) Наприклад, всі внутрішні паразити.
Стерилізація	Сукупність фізичних та хімічних способів повного звільнення об'єктів зовнішнього середовища від вегетативних і покоючихся форм мікроорганізмів.
Сублимація	Перехід речовини з твердого стану в газоподібний, минаючи рідку фазу.
Таксис	Рухові реакції у відповідь на односторонньо діючий стимул, властиві організмам, які здатні вільно пересуватися, деяким клітинам і органоїдам. Фототаксис, хемотаксис, термотаксис. Розрізняють Таксис позитивний (рух до подразника) і негативний (рух від подразника).
Термофіли	Теплолюбні мікроорганізми, зона оптимального зростання дорівнює 50-60 °С. Термотолерантні види: ростуть при температурах від 10 до 55 °С, оптимум 35-40 °С. Факультативні термофіли: максимальна температура для

	росту в діапазоні 50-65 °С, але здатні рости при кімнатній температурі близько 20 °С. Облігатні термофіли ростуть при температурі близько 70 °С і не ростуть при температурах нижче 40 °С. Екстремальні термофіли: оптимум 80-105 °С, мінімальна межа зростання – 60 °С, максимальна – 110 °С.
Тиндалізація	Дробна стерилізація термолабільних матеріалів 3-4-кратним прогріванням текучою парою при 100 °С по 1 ч з перервами на добу, протягом яких матеріал містять в термостаті при 37 °С (для проростання спор).
Токсигенність	Здатність мікроорганізмів продукувати екзотоксини.
Тургор	Стан, що виникає при оптимальній концентрації речовин в живильному середовищі. Тургор характеризується внутрішнім гідростатичним тиском в клітці, викликає напругу в клітинній стінці. В результаті цитоплазма клітини щільно притискається до цитоплазматичної мембрани, розтягуючи її. У стані тургору клітини мікроорганізмів нормально здійснюють процеси життєдіяльності.
Ультрамікроби	Мікроорганізми, невидимі в звичайний світловий мікроскоп, проходять через бактеріальні фільтри. До них відносять рикетсії і деякі інші бактерії; на відміну від вірусів вони здатні розвиватися на штучних поживних середовищах.
Факультативний	Можливий, необов'язковий. Наприклад, факультативні анаероби можуть рости і в присутності кисню.
Ферменти	Речовини білкової природи, що виробляються живою клітиною. Вони є біологічними каталізаторами і грають важливу роль в обміні речовин мікроорганізмів.
Фімбрії	Ниткоподібні і трубчасті придатки, розташовані на полюсах, латерально або по всій поверхні деяких видів бактерій. Від джгутиків відрізняються меншими розмірами, прямою або слабовигнутою формою, хімічним складом. Трубчасті фімбрії беруть участь, в передачі генетичного матеріалу з однієї клітини в іншу. Ниткоподібні (F-пили) – в прикріпленні клітин до твердих субстратів.
Фітонциди	Антибіотичні речовини рослинного походження.
Фітофтора	Мікроскопічні гриби, що паразитують на культурних рослинах і викликають у них захворювання (фітофтороз).
Фототаксис	Рухова реакція рухливих мікроорганізмів у відповідь на світловий стимул.
Фототрофи	Мікроорганізми, здатні використовувати сонячну енергію для біосинтезу компонентів клітини.
Фунгіциди	Хімічні або біологічні агенти для боротьби з патогенними грибами.
Хемолітоавтотрофи	Бактерії, які отримують енергію за рахунок окислення неорганічних сполук (H_2 , S^0 , S^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, NH^3 , Fe^{2+}) і асиміляційні вуглекислоту в якості єдиного джерела вуглецю.
Хемогетеротрофи	Бактерії, які отримують енергію за рахунок окислення неорганічних сполук. Використовують як джерело вуглецю органічні сполуки.

Хемосинтез	Тип метаболізму бактерій, заснований на засвоєнні організмами CO ₂ за рахунок енергії, одержуваної при окисленні неорганічних сполук (на відміну від фотосинтезу). Водневі, нітрифікуючі, тіонові і ін. Бактерії здійснюють хемосинтез в аеробних умовах, відновлюють вуглекислоту в циклі Кальвіна. Ряд прокариот, які здійснюють хемосинтез, можуть використовувати в якості термінального акцептора електронів не киснем, а сполуки сірки, CO ₂ . Хемосинтезуючі бактерії відіграють виняткову роль в біогеохімічних циклах хімічних елементів в біосфері.
Хемотаксис	Рух рухливих організмів під впливом одностороннього роздратування хімічними речовинами.
Хемотрофи	Мікроорганізми, які отримують енергію за рахунок окислювально-відновлювальних реакцій, в яких вони окислюють хімічні сполуки (як неорганічні – наприклад, молекулярний водень, сірку, так і органічні – вуглеводи, жири, білки, парафіни).
Хижацтво	Вид взаємин, коли одна популяція використовує іншу популяцію в якості джерела живлення.
Хромосома бактеріальна	Молекула ДНК у бактерій, що має вигляд замкнутої в кільце нитки. Функціонально відповідає ядру еукаріотних клітин.
Циста	Форма яка покоїться у деяких мікроорганізмів, що утворюється як особлива стадія життєвого циклу або у відповідь на несприятливі умови.
Цитоплазма	Внутрішній вміст клітини.
Цитоплазматична мембрана	До складу мембрани входять два шари фосфоліпідів з вкрапленнями білка, головки фосфоліпідів звернені у внутрішню і зовнішню сторону, а хвостики всередину. <u>Властивості і функції мембрани:</u> відокремлює внутрішнє середовище від зовнішньої; виконує захисну функцію; регулює обмін речовин між клітиною і середовищем.
Чиста культура (штам)	Культура бактерій одного виду, виділена з певного джерела (організм людини, тварини, навколишнє середовище) в певний час і на певній фазі зростання.
Штрих	Метод посіву мікроорганізмів на поверхню твердої живильного середовища, наприклад, для визначення спектру дії антибіотиків.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Асонов Н.Р. Микробиология. 3 изд., перераб. и доп.– М.: Колос, 1997. – 352 с.
2. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
3. Готтшалк Г. А. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982.- 310 с.
4. Градова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова, В.С. Бабусенко. М.: Изд. центр РХТУ, 1998. - 216 с.
5. Громов Б. В. Строение бактерий / Б.В. Громов – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985. - 192 с.
6. Громов Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов Б. В., Г. В. Павленко – Л: Изд-во Ленингр.ун-та, 1989. - 248 с.
7. Громов Б. В. Строение бактерий. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985. - 192 с.
8. Гусев, М. В. Микробиология / М. В Гусев., Л. А. Минеева - М.:Изд-во МГУ, 1992. - 448 с.
9. Джей Дж. М. Современная пищевая микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лесснер, Д.А. Гольден; пер. 7-ого англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 886 с.
10. Жарикова Г.Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена: учебник для ВУзов / Г.Г. Жарикова. – 3-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 304 с.
11. Жарикова Г.Г., Козьмина А.О. Микробиология санитария и гигиена пищевых продуктов. Гелан, Москва, 2001. - 247 с.
12. Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. Микробиология в пищевой промышленности. М. Пищевая промышленность, 1975. - 501 с.
10. Емцов В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. – М. Колос,1993. - 383 с.
11. Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. М.: Изд-во МГУ, 1983. - 172 с.
12. Кондратьева Е. Н., Максимова И. В., Самуйлов В. Д. Фототрофные микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1989. - 376 с.
13. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985. - 272 с.
14. Лысак, В.В. Микробиология: учебное пособие / В.В. Лысак – Минск: Изд. БГУ, 2007. - 426 с.
15. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности. М.: ИРПО, изд.центр «Академия», 2000. - 136 с.
16. Методы общей микробиологии. В 3 т. Т.1. : пер. с англ. / под ред. Ф. Герхардта. – М. : Мир, 1983. –563 с.

17. Мудрецова-Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. Микробиология, санитария и гигиена – Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. – 312 с.
18. Нетрусов А.И. Микробиология: учебник для студ. высш. Учеб.заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 3-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2009. – 352 с.
19. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
20. Никитина Е.В. Микробиология: Учебник / Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с.
21. Общая микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: Медицина, 2004.
22. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Под ред. Хоулта Дж. и др. М.: Мир, 1997.
23. Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. - 231 с.
24. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М. МГУ, 1983. – 221 с.
25. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. М: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 1995. - 96 с.
26. Сидоренко О.Д. Микробиология ./ О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Л.И. Войно. – М.: ИНФРА-М, 2005. – 287 с.
27. Смирнова Т.А., Кострова Е.И. Микробиология зерна и продуктов его переработки. М.: ВО Агропромиздат, 1989. - 157 с.
28. Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов: В 3 т. М.: Мир, 1979.
29. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М. Колос, 1993. – 175 с.
30. Техническая микробиология рыбных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1976, 266с.
31. Чурбанова И.Н. Микробиология. – М.: Высшая школа, 1987.
32. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель - М.: Мир, 1987, 567с.

8. ДОДАТКИ

8.1. Рецепти приготування деяких барвників і розчинів

1. Фуксін основний, насичений спиртовий розчин: фуксин основний – 10 г, спирт етиловий 96 % - 100 мл.

Спочатку готують насичений розчин фарби (фуксин Ціля). Для цього 1 г основного фуксину, 10 куб. см етилового ректифікованого спирту і 5 г фенолу розтирають у ступці, додаючи поступово 100 куб. см дистильованої води. Після 2 діб відстоювання даний розчин фільтрують. Для забарвлення препаратів до 1 куб. см насиченого розчину додають 9 куб. см дистильованої води (фуксин Пфейфера).

2. Фуксин основний карболовий (Ціля): 5 % водний розчин щойноперегнаного фенолу – 100 мл, насичений спиртовий розчин фуксину основного – 10 мл.

До спиртового розчину основного фуксину доливають 5 %-ний розчин фенолу (воду для його приготування підігрівають до 50 °С), додають кілька крапель гліцерину. Наполягають в термостаті 48 год і фільтрують через паперовий фільтр. Розчин може зберігатися довгий час в пляшці з темного скла.

Або розтерти в ступці 1 г фуксину з 5 г фенолу і декількома краплями гліцерину, під час розтирання додавати маленькими порціями 10 мл спирту, потім додати 100 мл дистильованої води і профільтрувати.

3. Фуксін основний, водний розчин (Фуксин Пфейфера): карболовий фуксин Ціля – 1 мл, вода дистильована – 9 мл. Водний фуксин готують безпосередньо перед вживанням, не стійкий (не більше 10 днів.).

4. Метиленовий синій, насичений розчин: метиленовий синій – 10 г, 96 % етанол – 100 мл. Розчин залишають на 2-3 дня, кілька разів перемішують (збовтують), потім фільтрують. Розчин стійкий.

5. Метиленовий синій (по Леффлеру): насичений спиртовий розчин метиленового синього – 30 мл; – вода дистильована – 100 мл; 1% -ний водний розчин КОН – 1 мл. розчин стійкий.

6. Генціановий фіолетовий карболовий розчин: 1 – генціановий фіолетовий – 1 г, спирт етиловий 96 % – 10 мл; 2-5 % водний розчин свіжоприготованого фенолу – 100 мл. Після повного розчинення генціановий фіолетового розчини змішують.

7. Кристалліолет (метиловий фіолетовий), водний розчин: метиловий фіолетовий кристалічний – 7 г, етиловий спирт 96 ° – 100 мл, вода дистильована – 900 мл. Розчин стійкий.

8. Розчин Люголя (для забарвлення по Граму): йод кристалічний – 1 г, калій йодистий – 2 г, вода дистильована – 300 мл. У ступку поміщають навішення йоду і йодистого калію, розтирають суміш товкачиком, додають 1 мл дистильованої води і, продовжуючи розтирати кристали, додають ще 5 мл води. Йод розчиняється в йодистому калії. Розчин кількісно переносять в склянку і доводять загальний обсяг до 300 мл. Розчин зберігати в темному посуді не більше 30 днів.

9. Розчин Люголя водний: 2 г йодистого калію розчиняють в 10 куб. см дистильованої води, додають 1 г кристалічного йоду і залишають на декілька годин до повного розчинення йоду. Потім приливають 290 мл дистильованої води. Зберігають розчин у флаконі з темного скла.

10. Розчин Люголя для визначення глікогену і гранульози: йод кристалічний – 7 г, калій йодистий – 20 г, вода дистильована – 100 мл. Розчин готують також, як попередній.

11. Приготування туші для негативного забарвлення: туш чорна – 10 мл, вода дистильована – 30 мл. Розведену туш центрифугують, надосадовий шар розливають в пробірки і стерилізують при 0,5 атм.

12. Реактиви для йод-крохмальної проби: крохмаль – 0,4 г, хлористий цинк – 2,0 г, вода – 100 мл. Хлористий цинк розчиняють в 10 мл води, кип'ятять і додають крохмаль (0,4 г крохмалю в 10 мл води). Доводять об'єм до 100 мл і залишають стояти тиждень. Потім розчин фільтрують і додають 100 мл 0,2 % розчину йодистого калію (0,2 г КJ в 100 мл води) або йодистого цинку.

13. Оцтовокислий синій Нейссера: готують два розчини.

1. Метиленовий синій кристалічний – 0,1 г, спирт етиловий 96% - ний – 2 мл, оцтова кислота льодяна – 5 мл, вода дистильована – 100 мл.

2. Металевий фіолетовий кристалічний – 0,1 г, спирт етиловий 96% - ний – 1 мл, вода дистильована – 30 мл.

Перед вживанням змішують дві частини першого розчину з однією частиною другого. Розчин нестійкий.

14. Розчин хрізоїдіна: хрізоїдін кристалічний – 1,0 г, вода дистильована гаряча – 300 мл. Гарячий розчин фільтрують через паперовий фільтр, після охолодження готовий до вживання.

15. Еритрозин карболовий: еритрозин кристалічний – 3 г, фенол (карболова кислота) – 5 г, вода дистильована – 100 мл. Фенол розчиняють у воді, нагрітій до 50 °С, додають еритрозин, відстоюють і фільтрують через паперовий складчастий фільтр.

16. Реактив Несслера: КJ – 7 г, HgJ₂ – 10 г, КОН – 10 г. Готують два розчини.

1. Наважку КJ і HgJ₂ розчиняють в 40 мл дистильованої води.

2. Наважку КОН розчиняють в 40 мл дистильованої води. Розчини 1 і 2 змішують і доводять загальний обсяг до 100 мл. Зберігають в темному скляному посуді. У продажу є готовий реактив Несслера.

17. Дифеніламін: 1 г дифеніламіна ($C_6H_5-NH-C_6H_5$) розчиняють в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти, отриманий розчин доливають до 20 мл дистильованої води.

18. Уксуснокислий свинець: 10 г оцтовокислого свинцю $Pb(CH_3COO)_2$ розчиняють в 100 мл води і доливають 10% -ний розчин NaOH (10 г луку на 100 мл води) до зникнення осаду.

19. Папірці Синьова: смуги фільтрувального паперу шириною близько двох см занурюють в розчин барвника, висушують при кімнатній температурі або в термостаті при температурі 37-50 °С. Розрізають на шматочки розміром 2x2 см, зберігають в захищеному від світла місці.

Прописи барвників для паперу:

1. Метілфіолетовий для забарвлення по Граму: 1 г барвника, 100 мл спирту, 5 мл гліцерину.

2. Фуксин (основний): 2 г барвника, 100 мл спирту, 1 мл гліцерину.

3. Фуксин карболовий Циля: до 100 мл стандартного розчину додати 1-2 мл гліцерину.

4. Метіленовий синій: 1 г барвника, 100 мл спирту, 1 мл гліцерину.

5. Малахітовий зелений: 5 г барвника, 100 мл гарячої дистильованої води, 5 мл гліцерину.

6. Генціан-віолет: 1 г фарби в 10 мл етилового спирту, 5 г фенолу розтирають в ступці, додаючи 100 мл дистильованої води)

20. Підготовка предметних і покривних скельць для препаратів. Нові скельця кип'ятять в 1 % розчині соди, потім промивають дистильованою водою, слабким розчином соляної кислоти і знову дистильованою водою. Скельця, що були у вжитку, кип'ятять в мильній воді і потім не менше доби витримують в розчині хромової суміші. Від біхромату скла відмивають в дистильованій воді. Чисті скельця зберігають в 96 % етанолі.

21. Хромова суміш.

а) хромокисле калій розчиняють у воді, потім в розчин обережно додають сірчану кислоту. Суміш готують з розрахунку вода – 100 мл, діохромат калій – 6 г, сірчана кислота (щільність 1,84) – 100 мл.

б) У колбу об'ємом 200 мл вліть 150 мл концентрованої сірчаної кислоти, додати 25 г розтертого біхромату калію, збовтати і залишити до розчинення. Перед вживанням підігріти до 40-50 °С. Зміна темно-оранжевого кольору хромової суміші на темно-зелений свідчить про її непридатність.

(!) Хромова суміш сильно руйнує тканини тваринного і рослинного походження, тому працювати з нею необхідно дуже обережно. Якщо суміш потрапила на руку або одяг, то уражене місце негайно слід обмити великою кількістю води, а потім розведеним розчином аміаку або соди і знову водою.

22. Ізотонічний розчин. 8,5 г хлористого натрію розчинити в 1 л дистильованої води, довести до кипіння і стерилізувати в автоклаві при 1,5 атм протягом 20 хвилин.

8.2. Живильні середовища

Використовуються при дослідженні мікрофлори сировини, напівфабрикатів, готової продукції, а також інших об'єктів, пов'язаних з виробництвом харчових продуктів.

М'ясопептонний бульйон (МПБ)

500 г м'ясного фаршу без жиру і сухожилля заливають 1 л водопровідної води і екстрагують при кімнатній температурі 12 год або в термостаті при температурі 37 °С – 2 год, а при температурі 50 °С – одну годину. Потім м'ясо віджимають через марлю, отриманий настій кип'ятять 30 хв. При цьому згортаються білки. Масу, що охолола, фільтрують через ватяний фільтр і доливають водою до початкового об'єму. Далі до 1 л м'ясного бульйону додають від 5 до 10 г пептона і 5 г кухонної солі. Середовище нагрівають до розчинення пептона, постійно помішуючи. МПБ стерилізують при тиску 2 атм 20 хвилин.

М'ясопептонний агар (МПА)

До 1 л МПБ додають 20 г агару. Середовище нагрівають до розчинення агару, потім встановлюють слаболужну реакцію середовища 20 % розчином Na_2CO_3 і через лійку розливають в колби. Колби закривають ватяними пробками і стерилізують при тиску 2 атм протягом 20 хв.

М'ясопептонний желатин (МПЖ)

В 1 л МПБ поміщають від 100 до 150 г желатину. Після розчинення желатину при обережному нагріванні (25 °С) встановлюють слаболужну реакцію середовища (як для МПА), кип'ятять 5 хв, потім охолоджують до температури 40 °С. Збитий з невеликою кількістю води яєчний білок вливають в охоложене желатинове середовище, добре збовтують і знову нагрівають. Середу після випадання білків в осад стає прозорою. Її фільтрують в гарячому вигляді через паперовий фільтр, розливають в колби і стерилізують при тиску 1 атм. 20 хв.

Середовища для бактерій. Середовища для визначення кишкової палички.

Середа Буліра. На 1 л. м'ясопептонного бульйону з нейтральною або слаболужною реакцією (рН 7,0 – 7,2) додають 10 г маніту або молочного цукру, бульйон нагрівають до повного розчинення внесених вуглеводів, фільтрують, додають до фільтрату 6 мл 1 % розчину нейтральрота, розливають по пробірках, в які кидають догори дном маленькі пробірочки (поплавки) стерилізують при 1 атм. 10 хвилин. (Вишнево-червоний колір).

Середовище Кесслера (модифіковано). До 1 л водопровідної води додають 50 мл свіжої бичої жовчі або жовчі інших сільськогосподарських тварин і 10г пептона, суміш кип'ятять 20-30 хв на водяній бані при помішуванні. Коли пептони розчиняться, фільтрують через вату, потім прибавляють 2,5 г глюкози. По розчиненню встановлюють лужну реакцію по лакмусу або слаболужну за допомогою фенолфталеїну (рН 7,6) і додають 2 мл 1 % водного розчину генціанвіолета. Середовище розливають по пробірках з бродильними трубочками і стерилізують при 1 атм. 15 хв.

Складові	М049 грам/літр	М049А грам/літр	М458 грам/літр
Пептичний перевар тваринної тканини	7,00	7,00	7,00
Дріжджовий екстракт	3,00	3,00	3,00
Лактоза	10,00	10,00	10,00
Суміш жовчних кислот	1,50	1,50	1,50
Хлорид натрію	5,00	5,00	5,00
Нейтральний червоний	0,03	0,03	0,03
Кристалічний фіолетовий	0,002	0,002	0,002
Агар-агар	15,00	12,00	–
Кінцеве значення рН (при 25 °С) $7,4 \pm 0,2$			

Агар з крейдою (для молочнокислих бактерій). Для кращого розпізнавання колоній молочнокислих бактерій до поживного агару (сироваткового, з гідролізованого молока і т.п.) перед стерилізацією додають крейду (від 2-3 %). Колонії молочнокислих бактерій, що виростили, встановлюють по прозорих зонах навколо них.

Накопичувальні культури аеробних спороутворюючих бактерій

1. Отримати накопичувальну культуру картопляної палички (*Bac. Subtilis var. mesentericus*).

а) Нарізають бульбу картоплі на дрібні шматочки, поміщають їх в колбу, додають на кінчику шпателя крейду, заливають невеликою кількістю води, закривають ватним корком і прогрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Вегетативні клітини і спори більшості бактерій, що знаходяться на поверхні бульб картоплі гинуть. Життєздатними залишаються тільки спори бактерій *Bacillus*. Температура культивування 30 °С.

б) Промиті бульби картоплі, не очищаючи, нарізають кружечками. Як і поверхню їх натирають крейдою для нейтралізації середовища і поміщають в стерильні чашки Петрі на подвійний шар фільтрувального паперу, що змочений дистильованою водою. Чашки з картопляним середовищем витримують в автоклаві при 0,5 атм протягом 10 хв і ставлять в термостат з температурою 27-30 °С на 3-4 доби.

На поверхні скибочок картоплі утворюється щільна зморшкувата плівка культури картопляної палички. Забарвлення плівки може бути різною: білувато-сірою, рожевою, жовто-бурою, чорною, що залежить від різновиду культури.

2. Отримати накопичувальну культуру сінної палички (*Bacillus subtilis*).

Сіно дрібно нарізають і поміщають в колбу об'ємом 500 мл, заповнюючи її на одну чверть обсягу, додають щіпку крейди і кип'ятять 15-20 хв, поки середовище не придбає колір настою міцного чаю. Сінний відвар розливають в стерильні конічні колби на 100-150 мл шаром 1,0-1,5 см, закривають ватними пробками і поміщають в термостат при температурі 22-25 °С.

Через дві доби на поверхні середовища розвивається білувата плівка *Bac. subtilis*, яка при старінні, на 3-4-у добу, стає сірувато-зеленуватою. Інші мікроорганізми при цьому виростають рідко і в невеликих кількостях.

Середовища для дріжджів

Глюкозо-амонійне середовище для культивування дріжджів. У колбі на 100 мл приготувати середу наступного складу, г: глюкоза – 2,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5, KH_2PO_4 – 0,08, K_2HPO_4 – 0,02, MgSO_4 – 0,05, NaCl – 0,01, CaCl_2 – 0,01, вода водопроводна – 100 мл.

Середовище Виноградського (для анаеробів). Склад середовища, г: глюкоза – 0,2, K_2HPO_4 – 0,1, MgSO_4 – 0,05, NaCl – 0,05, MnSO_4 , FeSO_4 – сліди, CaCO_3 – 2,0, вода – 100 мл. Середовище налити в пробірки, закрити ватними пробками, внести невелику кількість ґрунту і пастеризувати 10 хвилин при температурі 80 °С. Потім поставити пробірки в термостат при температурі культивування 30 °С.

Агар Ендо – слабоселективне диференційно-діагностичне середовище для виділення ентеробактерій. Середовище Ендо відноситься до щільних середовищ для виділення чистих культур. Готове середовище прозоре і має блідо-рожевий колір. Принцип дії:

Основним реактивом, важливим для диференціації, є основний фуксин, який знебарвлюється в середовищі при додаванні сульфїту натрію (Na_2SO_3). Крім того, присутність в середовищі цих реагентів робить інгібіруючу дію на грам позитивну мікрофлору.

Бактерії, здатні ферментувати лактозу, змінюють рН середовища в кислий бік внаслідок утворення кінцевого продукту розщеплення – ацетилальдегіда. Останній, реагуючи з сульфїтом натрію, сприяє появі червоного фарбування. Тому лактозопозитивні бактерії виростають у вигляді яскраво-рожевих і червоних колоній, часто з металевим зеленуватим блиском. Колонії бактерій, що не зброжують лактозу, безбарвні або слабо-пофарбовані.

Середовища для анаеробів

Середовище Кітта-Тароцці. У високу пробірку з нейтральним МПБ вносять шматочки звареної і промитої окропом на ситі печінки (3-5 г на пробірку) або м'ясний фарш. Заливають на 2/3 рівня пробірки. Зверху середу покривають тонким шаром вазелінової олії і стерилізують при 120 °С протягом 30 хв. Перед посівом пробірки прогривають в киплячій водянній бані протягом 15-20 хв. (Для видалення повітря) і швидко охолоджують.

Для стафілококів (*Staphylococcus aureus*). Кров'яний МПА. До розплавленого і охолодженого до 50 °С м'ясопептонного агару стерильно додають 5-10 % дефібринованої крові, перемішують і розливають по чашкам Петрі. Чашки з агаром ставлять в термостат при $t = 37$ °С на добу для перевірки стерильності середовища.

Жовтково-сольовий агар. 40 г сухого МПА, NaCl – 90 г на 1000 мл води варити 3 хвилини, після чого охолодити до кімнатної температури. 2 яєчних жовтки розмішати в 100 мл фізіологічного розчину. Все змішують і використовують для виявлення токсигенних стафілококів.

Середовище для виявлення термофілів. Глюкозопептонний агар з бромкрезол пурпуром. Склад: пептони - 10 г, глюкозо - 5 г, агар - 15 г, бромкрезол пурпур - 0,04 г, вода - 1000 мл. Стерилізують атм. 0,5 протягом 30 хв. Посіви вирощують при 55-60 °С протягом 48 годин. При розвитку на середовищі колоній термофілів – збудників плоского скисання, навколо кожної утворюється на пурпурному тлі жовтий ореол, внаслідок взаємодії кислоти, що утворюється, з індикатором.

Середовище для виділення слизеутворюючих бактерій.
Приготувати МПА + 10 % сахарози.

Глюкозо-пептонна середа. До 1 л водопровідної води додають 5 г глюкози, 100 г пептона і 5 г хлористого натрію. Розливають у пробірки з поплавками чи грудочками вати і стерилізують при 120 °С 10 хв, рН 7,0 – 7,2.

Середовища для виявлення грибів

Сусловий агар. Неохмелене пивне сусло розбавляють водопровідною водою в співвідношенні 1: 1. До 1 л розведеного пивного сусла (щільність в середньому 8° за Баллінгом) додають 15 - 20 г агару і розплавляють на електричній плитці або в автоклаві без тиску, потім фільтрують через вату, встановлюють рН 4,5, розливають по колбам і стерилізують при 112 °С 20 хв.

Середовище Сабуро. До 1 л стерилізованої дріжджової води додають 10 г пептона, 40 г глюкози або мальтози, встановлюють рН 5,6 – 6,6, потім додають 15 – 20 г агару. Середовище стерилізують при 112 °С 20 хв.

Агар Чапека (ЧА). Для культивування міцеліальних грибів крім сусло-агару в практиці широко використовуються синтетичні середовища, зокрема агар Чапека в складі: азотнокислого натрію (NaNO₃) – 3 г, фосфорнокислого калію (K₂HPO₄) – 1 г, сірчанокислого магнію (MgSO₄) – 0,5 г, хлористого калію (KCl) – 0,5 г, сірчанокислого заліза (FeS) – 0,01 г, сахарози – 30 г, води дистильованої – 1000 мл. Після розчинення вказаних речовин додають в розчин 2,5 % агару для отримання густого середовища і стерилізують в автоклаві при 0,5 атм. протягом 20 хв або дробової стерилізацією.

Дріжджова вода. 80 г пресованих дріжджів розводять в 1 л водопровідної води. Кип'ять 20 хв, потім фільтрують через паперовий фільтр, розливають в посуд і стерилізують 20 хв при 1 атм. (Пересовані дріжджі можна замінити сухими з розрахунку 20 г на 1 л). При приготування дріжджової води з цукром до готового середовища додають 2 % глюкози або сахарози і стерилізують 20 хв при 0,5 атм.

8.3. Склади дезінфікуючих розчинів

Найменування мікроорганізмів	Температура робочого розчину, °С	Вміст у розчині, %		Співвідношення компонентів для приготування 10 дм розчину		
		Перекису водню	Миючого засобу	Перекису водню,	води, мл ³	Миючого засобу,

				%, см		Г
Спорові форми	20	6	0,5	2400	7550	50
	30-40	3	0,5	1200	8750	50
Плесневі гриби	20	4	0,5	1600	8350	50
	30-40	2	0,5	800	9150	50
Вегетативні форми	20	3	0,5	1200	8750	50
	30-40	1	0,5	400	9550	50

Навчальне видання

ЄВЛАШ Вікторія Владленівна
ГАЗЗАВІ-РОГОЗІНА Людмила Вікторівна
БИКОВА Аліса Саліховна
ЦИГАНКОВ Олександр Валерійович

ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Практикум

Комп'ютерна верстка Супрун А. О.
Дизайн обкладинки Супрун А.О
Коректор Менткевич О.М

Формат _____.
Папір офсетний. Друк цифровий. Гарнітура
Times New Roman. Умовн. друк. аркушів –
Тираж 200 шт.

Видавництво «Світ Книг»
Свідоцтво № ДК 4088 від 06.06.2011 г.
62370, Харківська обл., Дергачівський р-н, Солоницівка,
вул. Незалежності, 1, к.163
тел/факс (057) 784-10-28