

Лабораторна робота № 2

Тема: Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в біотехнологічних процесах

Мета роботи: сформувати загальне уявлення про мікроорганізми-продуценти, що використовуються в біотехнологічних процесах; ознайомитись з основними морфологічними формами бактерій, з типовими представниками різних морфологічних груп.

Матеріали, реактиви, обладнання: мікроскоп, імерсійна олія, тимчасові забарвлені мікропрепарати бактерій різних морфологічних груп.

Питання для актуалізації знань

1. Які мікроорганізми-продуценти використовуються в біотехнологічних виробництвах? До яких систематичних груп вони належать?
2. Які морфологічні групи бактерій Ви знаєте?
3. Назвіть особливості ультраструктури бактеріальних клітин.
4. Назвіть включення бактерійної клітини, що функціонують як структури, виконують роль запасних речовин, або належать до продуктів клітинного метаболізму.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів

Мікроорганізми, маючи широкий набір ферментних систем, здатні утворювати в процесі життєдіяльності різні продукти обміну, які є цінними для людини. Мікроорганізми здатні модифікувати природні та хімічно синтезовані сполуки в речовини, які потребує людина.

Особливого розвитку набули мікробіологічні виробництва в останні роки завдяки детальному вивченню фізіолого-біохімічних і генетичних властивостей мікроорганізмів. Серед бактерій промислове застосування мають прокаріоти різних таксономічних груп. Найширше використовують дріжджі, рідше інші одноклітинні гриби, а також анаеробні та аеробні бактерії. Загалом у виготовленні харчових продуктів використовують понад 70 видів мікроорганізмів-продуцентів.

Різні штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* використовують при виготовленні пива, вина, хліба, отримання етилового спирту. Як джерело білка і вітамінів на нехарчовій сировині використовують дріжджі роду *Candida*.

Плісєневі гриби використовують для отримання органічних кислот: лимонної (*Aspergillus niger*), глюконової (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*), ітаконової (*Aspergillus terreus*), фумарової (*Rhizopus nigricans*); антибіотиків – пеніциліну (*Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*), та цефалоспорино (*Cephalosporium sp.*); препарати вітаміну B₂ одержують за допомогою *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossypii*, а бета-каротин – *Blakeslea trispora*.

Деякі промислові продуценти і продукти, які вони утворюють, представлені в таблиці 2.1.

Для промислового використання штам-продуцент повинен відповідати таким вимогам:

- здатність рости в чистій культурі (зокрема бактерії – без фагів);
- бути генетично стабільними;
- відсутність патогенності й токсиноутворення;
- висока швидкість росту при масовому культивуванні та здатність синтезувати продукт у великій кількості за період не більше трьох діб;

- стійкість до забруднення (контамінації іншими культурами).

Деякі прокаріоти виявляють потребу в одній певній органічній сполуці із групи амінокислот, вітамінів чи азотистих основ, які самі не здатні синтезувати. Такі органічні речовини потрібні в дуже малих кількостях і називаються **факторами росту**, а організми які їх потребують – **ауксотрофами**, на відміну від **прототрофів**, що синтезують усі необхідні їм органічні сполуки. Більшість мікроорганізмів, що використовуються в мікробіологічних процесах, належать до прототрофів. Окремі мікроорганізми є ауксотрофами за кількома факторами росту. Зокрема, деякі молочнокислі бактерії потребують для росту всі амінокислоти, пурини, піримідини та вітаміни групи **В**. У деяких мікроорганізмів (молочнокислі бактерії, окремі штами *E. coli*, дріжджі) потреба у вітамінах є постійною і специфічною ознакою.

Мікробіологічне виробництво базується на використанні ростучих культур відповідних видів. Для отримання деяких продуктів також використовують суспензії відмерлих клітин та іммобілізовані клітини мікроорганізмів.

Таблиця .1

Продукти і продуценти, що їх утворюють

Продукти	Продуценти
Харчові продукти Соління та маринади Кисломолочні продукти Оцет	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> ; <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> ; <i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter aceti</i>
Харчові та кормові добавки Глутамат, лізин, інші амінокислоти Вітаміни	<i>Corynebacterium glutamaticum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> <i>p.Eremothecium</i> , <i>Ashbyii</i> ; <i>Propionibacterium</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>
Ферменти Протеази Амілази Глюкозоізомераза Пеніцилінацидаза	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>Actinoplanes missouriensis</i> , <i>Streptomyces sp.</i> <i>Escherichia coli</i> .
Розчинники Етанол Ацетон, <i>n</i> -бутанол Молочна кислота	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> ; <i>Lactobacillus sp.</i>
Полісахариди Ксантан Декстран Альгінати	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Leuconostoc mesenteroide</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i>
Бактерійні препарати Добрива Ентомопатогенні	<i>Rhizobium sp.</i> <i>Bacillus thuriangiensis</i>
Лікувальні засоби Стероїди Антибіотики Амінокислоти	Мікобактерії, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Streptomyces erythraeus</i> , Бактерії роду <i>Bacillus</i>

2. Морфологія бактерій

Порівняно з морфологічною різноманітністю багатоклітинних організмів, бактерії морфологічно відносно мало диференційовані. Взагалі розрізняють *чотири основні форми бактерій*:

- 1) кулясті (сферичні), або коковидні;
- 2) паличкоподібні (циліндричні);
- 3) спіралеподібні (звивисті);
- 4) ниткоподібні (трихобактерії).

Кокоподібні бактерії (від грец. *kokos* – зерно, кісточка) мають правильну кулясту форму діаметром 1,0–1,5 мкм. Деякі з них набувають бобоподібної, ланцетоподібної та еліпсоїдної форми. Кокові форми не утворюють спор, нерухомі, різноманітні за фізіологічними властивостями і досить поширені в природі.

За **способом поділу та взаємного розташування** всі коки поділяють на такі групи:

1. Мікрококи (від лат. *micros* – малий). Вони діляться в одній площині, розташовуються поодиночці й хаотично; серед них хвороботворних для людини немає.

2. Диплококи (від лат. *diplos* – подвійний). Ділення їх проходить в одній площині з утворенням подвійних парних клітин, які мають форму квасолі (*Neisseria meningitidis*), або вістря ланцета (*Diplococcus pneumoniae*).

3. Стрептококи (від грец. *streptos* – ланцюг, намисто). Після поділу в одній площині мікроби не розходяться, а формують різної довжини ланцюжки, що нагадують намисто. Частина з них є сапрофітами, представниками нормальної мікрофлори людини (*Streptococcus lactis*). Інші види (*Streptococcus pyogenes*) викликають такі тяжкі захворювання як сепсис, остеомієліт, скарлатину, ревматизм.

4. Тетракоки (від лат. *tetra* – чотири). Після поділу у двох взаємно перпендикулярних площинах клітини не розходяться, а розташовуються тетрадами. Вони, як правило, непатогенні для людини.

5. Сарцини (від лат. *sarcio* – зв'язую) – коки, які діляться в трьох взаємно перпендикулярних площинах і після поділу не розходяться, а розташовуються у вигляді паків з 8, 16, 32 клітин. Серед них є умовно-патогенні представники. Прикладом сарцин, які зустрічаються в повітрі, воді, у ґрунті є *Sarcina lutea*, *Sarcina flava*, *Sarcina ureae*.

6. Стафілококи (від лат. *staphyle* – гроно). Вони діляться в декількох площинах, а утворені клітини розташовуються у вигляді скупчень, що нагадують виноградні грона. Стафілококи спричиняють більше 100 різноманітних захворювань у людей і тварин, а один з типових видів *Staphylococcus aureus* є найчастішим збудником багатьох гнійно-септичних процесів.

Паличкоподібні бактерії. Найбільш багаточисленною і різноманітною групою є бактерії циліндричної (паличкоподібної) форми. Вони поділяються на *бактерії*, *бацили* і *кlostридії*. Власне **бактерії** (від гр. *bacteria* – паличка) – мікроорганізми, що не утворюють спор. **Бацили** (від лат. *bacillus* – паличка) мають спори, які не перебільшують діаметр мікробної клітини. **Кlostридії** (від лат. *clostridium* – веретеноподібний) утворюють спори, що перебільшують поперечний розмір клітини і дещо деформують її.

Форма паличкоподібних бактерій може бути овальна, циліндрична, еліпсоїдна, веретеноподібна, у вигляді барабанної палички або тенісної ракетки. Їх кінці бувають заокруглені, загострені, булавоподібні, рівні, нібито обрублені. Розміри найбільш поширених бактерій, що не утворюють спори, 0,8 x 3 мкм; розміри бацил – 1,2 x 3,2–11 мкм. Ширина клітини в межах від 0,5 до 1 мкм. Паличкоподібні бактерії ромнуються шляхом поперечного поділу.

За аналогією з коками, залежно від взаємного розташування, паличкоподібні мікроорганізми поділяються на такі групи:

1. Монобактерії при поділі розташовуються поодиночі (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas sp.*).

2. Монобацили – також розташовані поодинокі, але мають спори (*Bacillus subtilis*, *Clostridium tetani*).

3. Диплобактерії – розташовуються парно (*Klebsiella pneumoniae*).

4. Диплобацили – парне розташування споривих мікроорганізмів.

5. Стрептобактерії – безспорові палички, які розташовані у вигляді ланцюжків (*Haemophilus ducrey*).

6. Стрептобацили – спорові мікроби, що розташовуються ланцюжком (*Bacillus anthracis*).

Спіралеподібні (звивисті) бактерії. До звивистих форм відносять *вібріони*, *спірили*, *спірохети*. Вони відрізняються не тільки за діаметром клітини, але й за кількістю й характером завитків.

1. Вібріони (від грец. *vibrio* – звиваюсь) – мають одну характерну зігнутість, яка не перебільшує чверті витка спіралі. Грамнегативні, розміри 1–3 мкм, спори не утворюють. Деякі з них мають кінцевий джгутик (холерний вібріон). Багато вібріонів як патогенних, так і сапрофітів мешкають у воді. Прикладом хвороботворного виду є *Vibrio cholerae*.

2. Спірили (від грец. *speira* – завиток, спіраль) – товсті звивисті мікроорганізми, які мають різну кількість завитків (3–5), що надає їм форму штопора. Грамнегативні бактерії довжиною 5–10 мкм. Більшість з них сапрофіти, живуть у воді, ґрунті, у складі нормальної мікрофлори людини. До цієї групи мікробів належать кампілобактерії та гелікобактерії, які здатні спричиняти у людини захворювання шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи. Патогенна для людини *Spirillum minor* викликає содоку (хворобу укусу щурів).

3. Спірохети (від грец. *speira* – завиток, *haite* – волосся) – тонкі штопороподібні бактерії, які мають велику кількість (25–200) завитків. Протоплазма обмежена цитоплазматичною мембраною, клітинна оболонка складається з тонкого шару пептидоглікану. Між клітинною стінкою і цитоплазматичною мембраною знаходяться пучки фібрил, закручені навколо клітини спірохети. Вони надають клітинам гвинтовидної форми й обумовлюють їх рух. Розміри клітин коливаються в широких межах і залежать від виду (довжина до 80 мкм, діаметр 0,1–0,6 мкм). Серед них є хвороботворні види (*Treponema pallidum* – викликає сифіліс, *Borrelia recurrentis* – зворотний тиф, *Leptospira interrogans* – лептоспіроз).

Ниткоподібні бактерії. Належать до вільноіснуючих сапрофітних мікроорганізмів (залізо- і сіркобактерії). Для людини вони не патогенні. Окрім того, останнім часом виявлені мікроби, які мають трикутну, квадратну, зіркоподібну, тарілкоподібну форми. Вони беруть участь у процесах біодеградації різноманітних сполук.

Деякі бактерії при несприятливих умовах здатні утворювати **ендоспори**. При дослідженні препаратів із старих агаризованих культур спори виявляються у вигляді круглих, або овальних утворень, які сильно заломлюють світло, і виглядають пустотами. Вони погано забарвлюються аніліновими барвниками при звичайних методах фарбування. Розміри спор можуть не перебільшувати діаметр мікробної клітини (*Bacillus*) або бути більшими за нього (*Clostridium*). Спори в клітині можуть розміщуватись центрально (збудник сибірки), субтермінально (палички ботулізму, газової гангрені) або термінально (*Clostridium tetani*).

У деяких видів плаваючих бактерій є спеціальні органи руху – **джгутики**, розміри яких досягають 0,02–0,04 мкм у ширину і 6–80 мкм у довжину. Вони містять особливий скоротливий білок флагелін. За кількістю і розташуванням джгутиків рухливі бактерії поділяють на 4 групи:

1. **Монотрихи** – один полярно розташований джгутик (холерний вібріон).
2. **Лофотрихи** – пучок джгутиків на одному кінці (псевдомонади).
3. **Амфітрихи** – поодинокі або пучки джгутиків на обох кінцях бактерій (спірили).
4. **Перитрихи** – багато джгутиків, розташованих навколо клітин (кишкова паличка, збудник черевного тифу).

Число, спосіб розміщення і розміри джгутиків є постійними ознаками для певного виду бактерій, що враховують при проведенні їх систематики. Виявити джгутики можна за допомогою **прямих і непрямих методів**.

При **прямих методах** джгутики забарвлюють барвниками або солями важких металів. Обов'язково вживають протрави, які сприяють осіданню на джгутиках препаратів срібла або заліза, що призводить до штучного збільшення їх діаметра. Вони стають видимими під світловим мікроскопом. До прямих методів виявлення джгутиків відносяться також дослідження їх під електронним мікроскопом на ультратонких зрізах.

При **непрямих методах** спостерігають за рухом бактерій у висячій або роздавленій краплі за допомогою світлової, темнопільної, фазово-контрастної мікроскопії.

ІНСТРУКЦІЯ

Завдання 1. Вивчити морфологію бактерій на тимчасових препаратах

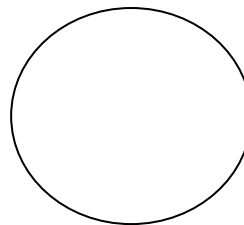
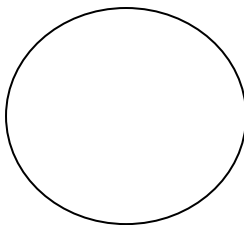
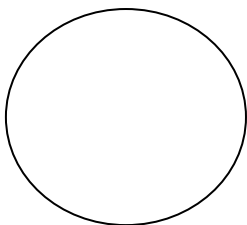
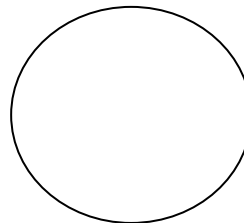
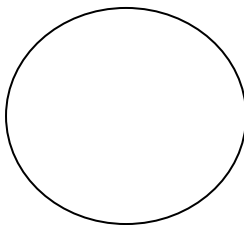
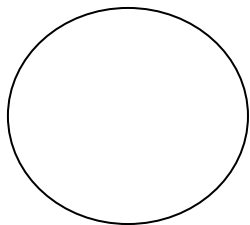
Необхідно провести мікроскопічне дослідження фіксованих забарвлених мікропрепаратів бактерій різних морфологічних груп:

паличкоподібні бактерії – *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*,
Achromobacter sp,

коки – представники родів *Micrococcus*, *Sarcina*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*;

звивисті – представники родів *Vibrio*, *Spirillum*..

Відмітити форму, розміри клітин, наявність спор. **Усі розглянуті препарати замальовати.**



? питання для самоконтролю

1. Назвіть основні морфологічні форми бактерій.
2. З якими представниками кулястих бактерій ви познайомились?
3. Дайте класифікацію за морфологією клітин паличкоподібних бактерій.
4. Чим за морфологією відрізняються бактерії і бацили?
5. Які особливості будови спірил, вібріонів та спірохет?
6. Назвіть типи розміщення спор у бактерій, їх роль.
7. Які органоїди руху можуть утворюватись у бактерій? Які особливості їх будови і призначення?