

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ДНІПРОВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»**



МІКРОБІОЛОГІЯ

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Дніпро
НТУ «ДП»
2020

Мікробіологія. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти [Текст]/ І.І. Клімкіна, В.В. Федотов. НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро: НТУ «ДП», 2020. – 57 с.

Автори:

І.І. Клімкіна, канд. біол. наук, доц.

В.В. Федотов, ас.

Затверджено методичною комісією зі спеціальності 091 «Біологія» (протокол № 6 від 05.10.2020 р.) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 1 від 08.09.2020 р.).

Методичні рекомендації призначені для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія» студентами освітньо-професійної програми «Біологія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 091 «Біологія».

Відповідальний за випуск: завідувач кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища, д-р. техн. наук, проф. А.В. Павличенко

Клімкіна І.І., Федотов В.В.
НТУ «Дніпровська політехніка», 2020

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лабораторні заняття з мікробіології є одним із найважливіших видів підготовки біологів. Вони сприяють закріпленню теоретичних знань, розвивають навички самостійної практичної роботи, формують вміння грамотне аналізувати отримані результати та дають можливість спостерігати за життєдіяльністю мікроорганізмів. Лабораторний практикум з мікробіології є посібником, мета якого допомогти студентам самостійно підготуватися до виконання практичних занять із мікробіології.

Лабораторні заняття описані за єдиною схемою. Наводяться назва теми лабораторної роботи, мета, матеріали та обладнання, коротка теоретична частина, завдання та методика їх виконання.

У теоретичній частині стисло викладаються основні питання та відомості, необхідні для виконання практичної роботи, найбільш важливі питання доповнюються допоміжними ілюстраціями. Більш детальна інформація за теоретичними розділами надається у конспекті лекцій з даної дисципліни (доступний на платформах Moodle і Teams).

Наприкінці кожної лабораторної роботи приводяться питання для самопідготовки до заняття та закріплення пройденого матеріалу.

Керуючись методичними вказівками, кожний студент зобов'язаний завчасно до лабораторних занять вивчити принцип здійснюваної роботи та переписати тему, ціль та порядок виконання роботи в свій робочий зошит. Після виконання роботи студенти повинні скласти протокол роботи, зробити необхідні записи, рисунки, розрахунки, вміти відповісти на теоретичні питання стосовно даної роботи та підписати її у викладача.

На першому занятті, перед виконанням лабораторних робіт студенти повинні повторити правила безпечної роботи в мікробіологічній лабораторії, техніку безпеки при роботі з електроприладами та устаткуванням та першу медичну допомогу при нещасних випадках.

ПРАВИЛА З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

При роботі в лабораторії мікробіології студент повинен дотримуватися наступних правил:

1. При роботі в лабораторії з бактеріологічним матеріалом необхідно ретельно дотримуватись правил особистої та суспільної безпеки при її виконанні.
2. Кожен студент має працювати на постійному місці.
3. Робоче місце має бути вільним від зайвих предметів (сумок, портфелів).
4. Під час роботи з пальником або спиртівкою поруч не повинно бути легкозаймистих матеріалів.
5. Робота виконується у чистому халаті. Довге волосся має бути зібране, щоб уникнути попадання в полум'я спиртівки.

6. На кожному занятті призначаються чергові, які стежать за порядком та за виконанням кожним студентом правил роботи та поведінки в лабораторії;

7. Посуд, в якому проводиться посів та культивування мікроорганізмів, має бути підписаний (дата посіву, культура, група або студент, який виробляв посів).

8. Предмети, які використовувалися для роботи з живими культурами, повинні бути знезаражені або випалюванням в полум'ї пальника, або витримуванням у дезінфікуючому розчині (піпетки, шпателі, мікробіологічні голки та петлі, накривні та предметні скельця).

9. Усі засіяні чашки Петрі, пробірки розміщуються в термостат або здаються лаборанту.

10. Оброблений матеріал міститься в автоклав для знезараження.

11. У лабораторії суворо забороняється люба їжа, напої, жувальна гумка.

12. Після закінчення заняття студент повинен:

а) упорядкувати робоче місце;

б) здати черговому весь матеріал та мікроскоп;

в) вимити руки з милом, при необхідності з дезінфікуючим розчином.

Лабораторна робота № 1

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В НАВЧАЛЬНІЙ МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ОБЛАДНАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета роботи: ознайомитись з правилами безпеки при роботі з мікроорганізмами, обладнанням робочого місця в навчальній мікробіологічній лабораторії, методами стерилізації лабораторного посуду та поживних середовищ.

Матеріали й обладнання: інструкція з техніки безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії з культурами мікроорганізмів, журнал з техніки безпеки, автоклав, термостат, сушильна шафа, чашки Петрі, мікробіологічні пробірки, аналітичні ваги, електроплитка, спиртівка, маркер по склу, сірники, дистильована вода, скляні палички, скляні піпетки, хімічна склянка.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

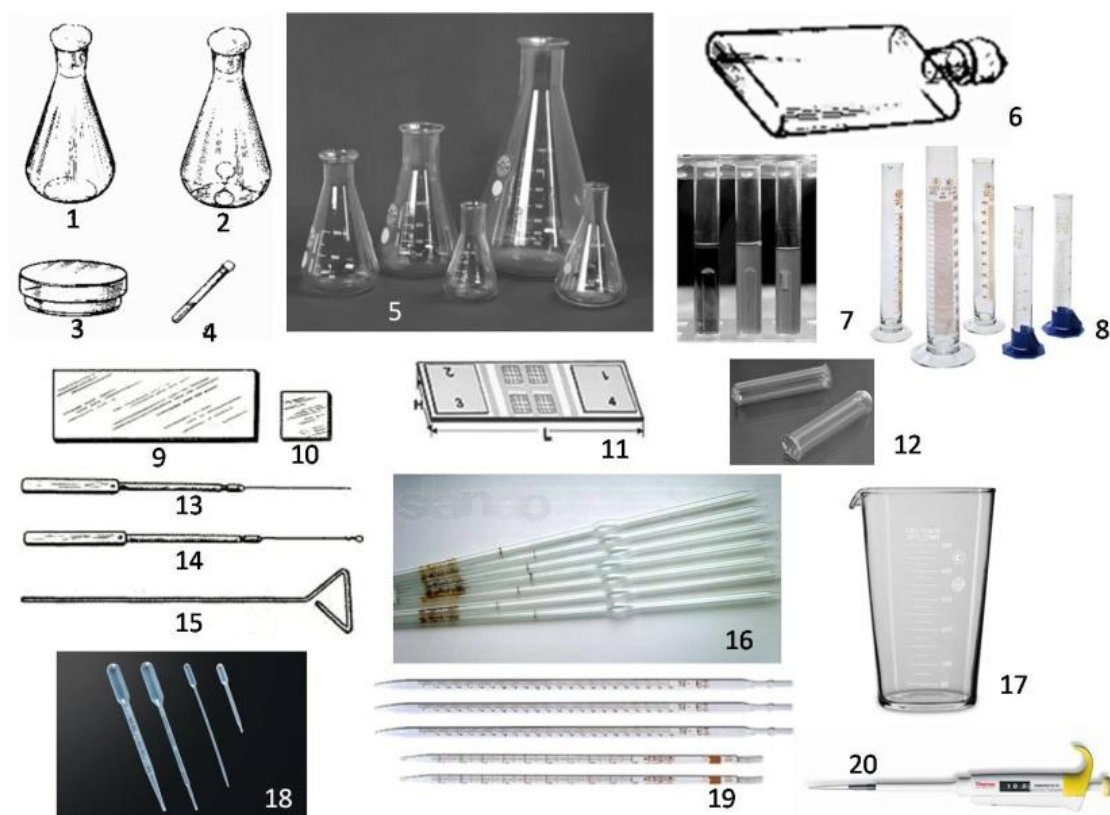
Сучасна мікробіологічна лабораторія є комплексом приміщень, обладнання та приладів, що дозволяють використовувати різні прийоми для вирощування мікроорганізмів, виділення їх *чистих культур* (тобто, культур, які містять мікроорганізми одного виду), вивчення морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей.

Мікробіологічна професійна лабораторія має включати низку приміщень. Основна лабораторна кімната має бути просторою та світлою. Природне освітлення має становити щонайменше 110 лк. Підлога і поверхня всіх робочих столів повинна бути покритою матеріалом, що легко миється. Стіни на висоту не менше 170 см забарвлюють у світлі тони або облицьовують плиткою. Така обробка дозволяє проводити вологе прибирання із застосуванням розчинів дезінфікуючих речовин. Лабораторні столи повинні мати підведення електроенергії, забезпечені газовими пальниками. Приміщення має бути обладнане шафами та полицями для зберігання апаратури, посуду та реактивів. Крім основного робочого приміщення лабораторія повинна мати стерилізаційну, термостатну кімнату, холодильну кімнату, мийну та ін. У стерилізаційній розміщують автоклави та сушильні шафи. У термостатній кімнаті вирощують мікроорганізми. У деяких лабораторіях через нестачу площ використовують термостати різного типу для культивування мікроорганізмів за постійної температури. Замість холодної кімнати використовують холодильник та морозильну камеру.

Роботу з мікроорганізмами та культурами клітин здійснюють у боксах різних конструкцій від ізольованих приміщень до настільних камер (ламінарів). Бокс – спеціальне ізольоване приміщення, розділене на дві частини: робоче приміщення та передбоксік, що виключає різку циркуляцію повітря та занесення мікроорганізмів ззовні. У боксі встановлюють стіл, стільці, на стіни підвішують бактерицидні лампи на висоті 2 м від підлоги. Перед роботою

приміщення боксу миють і дезінфікують, а після вологого прибирання протягом 30-60 хв проводять стерилізацію повітря бактерицидними лампами.

Посуд та інвентар для проведення мікробіологічних досліджень. Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд (рис. 1.1).



1 – гойдалкова колба, 2 – гойдалкова колба з відбійниками, 3 – чашка Петрі, 4 – пробірка біологічна, 5 – колби плоскодонні конічні Ейлермейєра, 6 – матрац, 7 – пробірки з поплавцями, 8 – мірні циліндри, 9 – предметне скло; 10 – накривне скло, 11 – камера Гаряєва, 12 – поплавки (пробірки Уленгута), 13 – мікробіологічна голка, 14 – мікробіологічна петля, 15 – шпатель Дригальського, 16 – піпетки Мора, 17 – мензурка, 18 – піпетки Пастера, 20 – піпетка автоматична

Рис. 1.1 – Інструменти та посуд, що використовуються в мікробіологічній лабораторії

Чашки Петрі (діаметр 10 см, висота 1,5 см) застосовують для виділення чистих культур, кількісного обліку мікроорганізмів, аналізу якісного складу мікрофлори на щільних живильних середовищах та інших досліджень; *скляні поплавці* – для вивчення процесів бродіння; *пробірки біологічні* – для зберігання чистих культур та проведення мікробіологічних досліджень; *пастерівські піпетки* з відтягнутим капіляром.

Крім спеціального посуду широко використовують звичайний *хімічний посуд*: колби плоскодонні конічні Ейлермейєра, круглodonні, мірні, градуйовані піпетки, піпетки Мора, мензурки, мірні циліндри, бюкси, склянки та ін.

Колби та пробірки, що використовуються для приготування та стерилізації живильних середовищ і вирощування мікроорганізмів, закривають ватно-марлевими пробками, які виготовляють вручну або за допомогою спеціальної

машини. Правильно виготовлена пробка для пробірок повинна мати довжину 3-4 см, помірно туго входити в пробірку, бути щільною і не змінювати свою форму при багаторазовому застосуванні.

У мікробіологічній практиці застосовують петлі, голки, пінцети, ножиці, пластмасові та металеві штативи для пробірок, металеві лотки та ін. Петлі та голки виготовляють із платинового, нікелевого або хромонікелевого дроту і закріплюють у металевому петлетримачі.

Підготовка мікробіологічної лабораторії до роботи. Для того щоб знизити кількість мікроорганізмів у повітрі та на різних поверхнях, у лабораторних приміщеннях застосовують різні способи дезінфекції. Слово «дезінфекція» означає знезараження, тобто знищення збудників інфекційних хвороб на об'єктах зовнішнього середовища.

Підлога, стіни та меблі в мікробіологічній лабораторії протирають розчинами різних дезінфікуючих речовин, серед яких найчастіше використовують 2-3%-ний розчин соди (бікарбонату натрію), 3-5% розчин фенолу (карболової кислоти) або лізола (препарат фенолу з додаванням зеленого мила), 0,5-3%-ний водний розчин хлораміну та деякі інші дезінфектанти.

Повітря в лабораторії найбільш доступно дезінфікувати провітрюванням. Тривала вентиляція приміщення через форточку (не менше 30-60 хв) призводить до різкого зниження кількості мікроорганізмів у повітрі, особливо за значної різниці у температурі між зовнішнім повітрям та повітрям приміщення. Більш ефективний і найбільш часто застосовуваний спосіб дезінфекції повітря – опромінення ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі від 200-400 нм.

Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, потребує особливо ретельної обробки. Робочій стіл слід дезінфікувати не тільки до початку роботи, але і після її закінчення. Для протирання поверхні столу можна використовувати розчини лізола і хлораміну, а також 70%-ні (за об'ємом) розчини ізопропілового чи етилового спиртів.

Для дезінфекції та стерилізації лабораторного посуду, а також суміщення з достерилізаційним очищенням виробів медичного призначення при вірусних, бактеріальних (включаючи туберкульоз) і грибкових (кандидози, дерматофітії) інфекціях, можна використовувати дезінфікуючі засоби «Деланол», «Гуасепт» та інші.

1.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Ознайомитись з правилами роботи в навчальній мікробіологічній лабораторії. Законспектувати основні положення техніки безпеки у зошиті. Відзначитись у журналі інструктажу з техніки безпеки у лабораторії.

2. Ознайомитись з основним обладнанням лабораторії, зробити опис у лабораторному зошиті.

Заповнити таблицю 1.1:

Таблиця 1.1 – Обладнання навчальної мікробіологічної лабораторії

Основне обладнання навчальної мікробіологічної лабораторії	Призначення, схематичне зображення

3. Самостійно знайомитись з методичними вказівками (надаються окремо):
 - «Інструкція щодо застосування засобу «Гуасепт (Guasept)» з метою дезінфекції», розробленої Державною установою «Інститут медицини праці ім. Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» за участю ТОВ «Бланідас» (Україна), 2019, 32 с.;

- «Інструкція щодо застосування засобу «Деланол» з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації», розробленої ТОВ «Делана» за участю ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», 2019, 37 с.

4. Зробити стислий конспект із зазначенням призначення засобів, спектру антимікробної дії та їхньої токсичності (або безпечності). В лабораторії приготувати робочий розчин Деланолу у концентрації 0,1 % (за препаратом).

Контрольні питання

1. У чому полягає основний принцип будь-якого мікробіологічного процесу?

2. Що визначає специфіку облаштування мікробіологічної лабораторії та правила роботи мікробіолога?

3. Які приміщення має містити мікробіологічна лабораторія?

4. Які вимоги висувують до основної лабораторії?

5. Що розміщують і для чого призначені холодна, термостатна та стерилізаційна кімнати?

6. Що таке ламінарний бокс?

7. Яким специфічним посудом користуються мікробіологи?

8. Перерахуйте основні правила роботи у лабораторії мікробіології.

9. Як приготувати 1 % робочий розчин дезінфікуючого засобу?

10. Якими є оптимальна концентрація і режим достерилізаційного очищення медичних інструментів робочим розчином деланолу.

Лабораторна робота № 2 СТЕРИЛІЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНОГО ПОСУДУ І КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Мета роботи: ознайомитись з методами стерилізації лабораторного посуду і поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.

Матеріали й обладнання: автоклав, сушильна шафа, термостат, аналітичні ваги, електроплитка, спиртівка, чашки Петрі, маркер по склу, сірники, дистильована вода, скляні палички, хімічна склянка, вата, марля, біологічні індикатори BT20 Bionova.

2.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Стерилізація (від латів. *sterilis* – знешкодження) – комплекс методів, які застосовуються для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів, що стерилізуються. Стерилізують живильні середовища, посуд, різні інструменти та інші необхідні предмети з метою недопущення розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах. Якщо стерильне середовище або мікробна культура забруднюються мікроорганізмами, що випадково потрапили до них, говорять про контамінацію, або забруднення.

Способи стерилізації залежать від особливостей матеріалу, який підлягає стерилізації, та меті дослідження. Виділяють наступні способи стерилізації середовищ, посуду та інструментів:

2.1.1 Термічна стерилізація

1) Стерилізація в полум'ї пальника

Дрібні металеві інструменти: петлі, голки, пінцети, ножиці, шпатель – стерилізують прожарюванням в полум'ї (нагріванням до почервоніння) безпосередньо перед використанням. На полум'ї короткочасно обпалюють предметні та накривні скла, скляні шпатель та палички, фарфорові ступки та маточки, шийки колб, пробірок, пляшок, а також ватяні пробки при пересіваннях культур та розливах середовищ. У полум'ї гинуть і вегетативні клітини, і спори мікроорганізмів.

Петлі роблять із ніхромового або платинового дроту, щоб при прожарюванні на них не з'являлася окалина. Якщо петля суха, то її у вертикальному положенні вносять у верхню, гарячу частину полум'я і прожарюють до почервоніння спочатку її нижню, а потім верхню частину. Якщо на петлі знаходиться який-небудь матеріал, то петлю в горизонтальному положенні вносять у нижню, найхолоднішу частину полум'я (якщо внести в гарячу частину, то може статися розбризкування матеріалу), і тільки після того, як матеріал повністю згорить, продовжують прожарювання у верхній – гарячій частині полум'я (рис. 2.1).

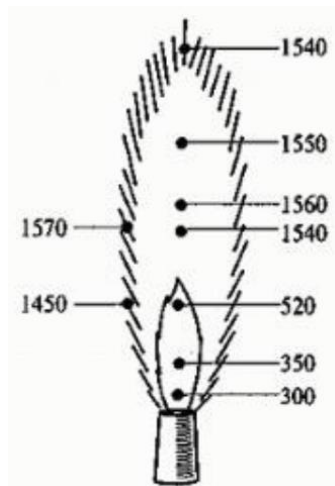


Рис. 2.1 – Значення температури (в °С) в різних частинах полум'я газової горілки

2) Стерилізація сухим жаром

Обробка сухим гарячим повітрям проводиться у спеціальних сухоповітряних (сухожарових) стерилізаторах та сушильних шафах, пристосованих для стерилізації. Стерилізують скляний посуд: чашки Петрі, колби, пробірки, піпетки тощо, які попередньо загортають у папір для збереження стерильності після прогрівання. Посуд розгортають безпосередньо перед вживанням. За даними обставинами гинуть і вегетативні клітини, і спори мікроорганізмів. Температурні режими стерилізації сухим жаром представлені таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Умови стерилізації скляного посуду сухим жаром

Температура, °С	Час, мін.
140	180
150	150
160	120
170	60

При нагріванні вище 180°C папір та пробки починають обвуглюватися. Посуд виймають, попередньо охолодивши її до 50-70°C, оскільки нагріте скло може розтріскатися.

3) Стерилізація автоклавуванням

Це найбільш надійний і найчастіше застосовуваний спосіб стерилізації поживних середовищ. Заснований на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску вище атмосферного. Стерилізацію здійснюють у спеціальних товстостінних апаратах, що герметично закриваються, – автоклавах. Спільна дія високої температури та пари забезпечують ефективність процесу стерилізації. При цьому гинуть і вегетативні клітини, і спори мікроорганізмів. Встановлено, що спори більшості мікроорганізмів не витримують і 5-хвилинної експозиції в

насиченій парі при 121°C і лише спори деяких ґрунтових бактерій гинуть за цієї температури лише через 30 хв. Температурні режими автоклавування представлені таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Температура насиченої пари за різних тисків

Тиск		Температура, °C
атм.	кПа	
1,0	101,32	100
1,5	151,98	111
2,0	202,65	121
2,5	251,20	128
3,0	299,75	134

Автоклав являє собою металевий двостінний котел, здатний витримувати високий тиск (рис. 2.2). Внутрішня частина котла – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується (живильні середовища, посуд, робочий одяг і т.п., не дуже щільно). Вона оточена водопаровою камерою, яка має кран для виходу повітря та пари. Пара в стерилізаційну камеру подається через спеціальні отвори у водопаровій камері. Тиск регулюється за допомогою манометра. У водопарову камеру через спеціальну воронку наливають дистильовану воду до необхідного рівня. Кришку закривають герметично за допомогою спеціальних гвинтів.

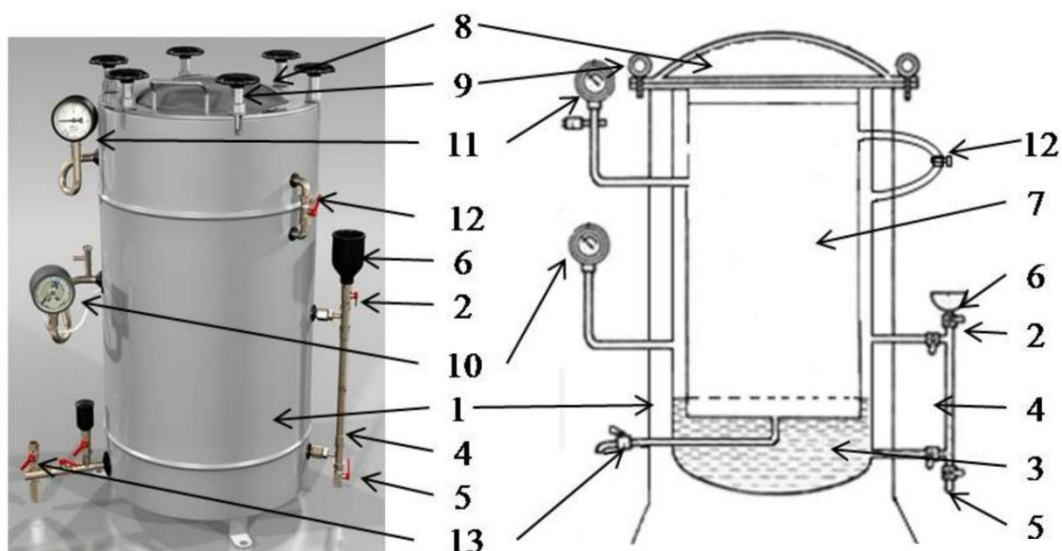


Схема автоклава: 1 – кожух, 2 – вентиль для заповнення автоклава водою, 3 – камера водопарова, 4 – колонка водовказівна для заповнення автоклава водою, 5 – вентиль для зливу води з автоклава, 6 – воронка для заповнення автоклава водою, 7 – камера стерилізаційна, 8 – кришка, 9 – затискач, 10 – манометр електроконтактний, що вимірює тиск у водопаровій камері, 11 – манометр, що вимірює тиск у стерилізаційній камері, 12 – вентиль для надходження пари в стерилізаційну камеру, 13 – вентиль для видалення пари зі стерилізаційної камери

Рис. 2.2 – Стерилізатор паровий ВК-75-01

Середовища, що містять цукри, вітаміни, дріжджовий автолізат та середовища з желатином стерилізують при тиску 1,5 атм протягом 15-30 хв. Середовища, що містять агар, стерилізуються складніше, тому їх стерилізують при 2,0 атм 20 хв.

4) Пастеризація

Пастеризація – це одноразове прогрівання матеріалу при температурі нижче за 100°C. Метод був запропонований Л. Пастером і призначений для знищення лише неспорівих форм мікроорганізмів. Проводиться нагріванням до 50-60°C протягом 15-30 хв. або до 70-80°C протягом 5-10 хв з подальшим охолодженням до 10-11°C. Далі продукти зберігають у холодильнику, оскільки спори за такого способу стерилізації виживають. Метод використовують у харчовій промисловості для обробки молока, фруктових соків, вина, пива та ін.

5) Тиндалізація (дробова стерилізація)

Дробова стерилізація була запропонована Джоном Тіндалем. Застосовується для середовищ, що не витримують температури вище за 100°C. Її здійснюють текучою парою в автоклаві з незагвинченої кришкою при відкритому крані для випуску пари або спеціальному апараті. Стерилізація проводиться дрібно: по 20-30 хв. протягом декількох днів для знищення вегетативних клітин, що проросли із спор. У проміжках між стерилізацією середовища ставлять в термостат при температурі 30°C на 8-12 год для проростання життєздатних спор.

6) Кип'ятіння

Деякі предмети (металеві інструменти, дрібні скляні деталі, мембранні фільтри) можна стерилізувати тривалим (20-30 хв) кип'ятінням у дистильованій воді. Для цього використовують спеціальні закриті судини – стерилізатори. Надійність стерилізації при кип'ятінні можна збільшити внесенням у воду бактерицидного засобу (2% формальдегіду та ін.).

2.1.2 Холодна стерилізація

1) Стерилізація фільтруванням

Стерилізують синтетичні середовища строго певного складу, які містять компоненти, що легко руйнуються або леткі – вітаміни, амінокислоти, білки, ароматичні вуглеводні, антибіотики та ін. Фільтрування рідин здійснюють через дрібнопористі матеріали, легко адсорбуючі клітини мікроорганізмів: азбест, целюлозу, фарфор, каолін та ін.

Широко використовуються мембранні фільтри – диски різного розміру, діаметра, що нагадують паперові. Їх виготовляють з урахуванням нітроцелюлози. Середній діаметр пори фільтрів становить 0,35-1,2 мкм. Для стерилізації, як правило, використовують фільтр з діаметром пори 0,35 -0,45 мкм. Фільтри Зейтца – щільні диски, виготовлені із суміші азбесту з целюлозою (середній діаметр пори 0,8-1,8 мкм).

Мембранні фільтри стерилізують автоклавуванням при 2 атм 15 хв.

2) Стерилізація газоподібними речовинами

Стерилізують апаратуру, що має дзеркальне, оптичне обладнання, вироби із термолабільних пластмас. Для цього застосовують сполуки, які мають спороцидні властивості – оксид етилену, метилбромід, формальдегід, озон та ін.

Газову стерилізацію проводять у спеціальних герметичних апаратах. При стерилізації суворо контролюють концентрацію газу, тиск, вологість, температуру та тривалість експозиції. Часто процес проводять у поєднанні з деяким підвищенням температури (до 45-70°C). Після закінчення стерилізації видаляють гази з апарату, а використання предметів, простерилізованих газами, можна не раніше ніж через 24 години (для повного видалення з них газів).

3) Стерилізація опроміненням

Для стерилізації приміщень, обладнання, деякого медичного приладдя, харчових продуктів використовують різні види випромінювань: інфрачервоне, УФ, рентгенівські промені, α -, β -, γ -промені радіоактивних елементів. Найчастіше в мікробіологічній практиці використовують УФ опромінення.

В даний час все більшого поширення набувають посуд та інструменти одноразового використання.

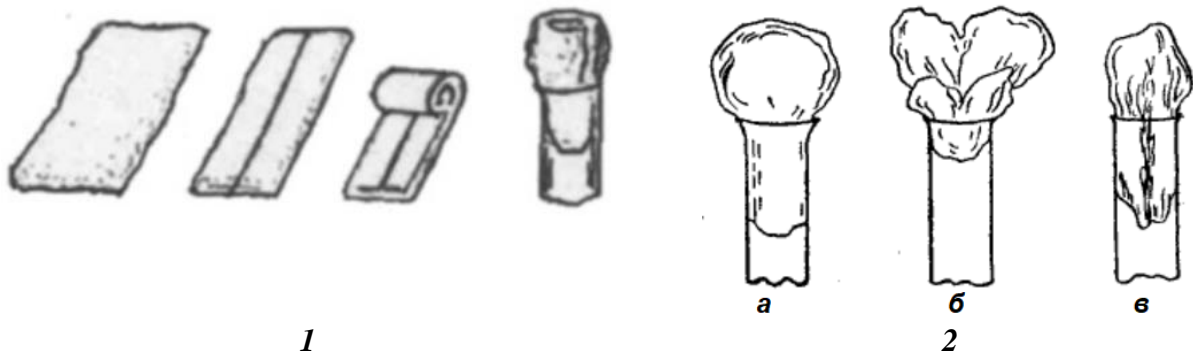
4) Хімічний метод стерилізації

Знищення (дезінфекція) мікроорганізмів за допомогою сильнодіючих хімічних речовин (антисептиків). Антисептики можуть бути неорганічної та органічної природи. До першої групи відносяться кислоти, луги та солі (0,1-0,2% розчин сулеми), хлорне вапно, йод. До другої групи – етиловий та бутиловий спирт, альдегіди, органічні розчинники (0,5-3 % розчин хлораміну, 1-4 % розчин формаліну) та органічні кислоти. Цей метод найчастіше застосовується для дезінфекції робочих поверхонь, рук, боксів.

2.1.3 Приготування ватних пробок

Їх готують із гігроскопічної вати, оскільки вона добре забезпечує стерильність субстрату і не сильно тліє. Для виготовлення пробки беруть прямокутний шматочок вати, загинають краї і згортають щільним валиком, приміряючи його до шийки пробірки або колби (рис. 2.3). Бавовна в момент відкривання пробірки повинна бути дуже твердою на дотик.

Валик щільно обертають марлею так, щоб вся вата була під нею, і зав'язують нитками. Зайві кінці марлі обрізають. Пробка для пробірок повинна мати довжину не більше 3 см, бути досить щільною, добре зберігати свою форму та вільно входити до неї. Поверх пробки на колбу надягають паперові ковпачки, які оберігають від пилу.



а – правильно виготовлена пробка, *б* та *в* – не правильно виготовлена пробка

Рисунок 2.3 – Виготовлення ватних пробок (1) та види пробок (2)

Не використовувати пробки, виготовлені лише з вати – вони легко спалахують при обпалюванні!

2.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Ознайомитись з основними методами стерилізації. Провести стерилізацію скляного посуду (чашки Петрі, піпетки, колби, пробірки) сухим жаром.

2. Виготовити ватно-марлеві корки для пробірок та колб.

3. Освоїти метод стерилізації в полум'ї спиртівки, використовуючи металеві та скляні інструменти (мікробіологічні петлі, пінцети, ножиці, шпатель).

3. Оцінити якість стерилізації поживного середовища в залежності від методів обробки (автоклавування та кип'ятіння).

4. Визначити ефективність процесу парової стерилізації із застосуванням біологічних індикаторів BT20 Bionova. Результати спостережень записати у зошит, зробити відповідні висновки.

Хід виконання роботи

1. Для стерилізації скляного посуду сухим жаром попередньо посуд заверніть у папір і помістіть у шафу. Режим стерилізації: 170°C, час – 60 хв.

2. Для виготовлення ватно-марлевих пробок для пробірок та колб див. рис. 2.3. В піпетки вставити ватні фільтри і загорнути їх в паперову обгортку. Надіти паперові ковпачки на колби із ватно-марлевими корками. Десять пробірок із корками та чашки Петрі загорнути у паперові пакети. Посуд покласти до сушильної шафи та стерилізувати 2 години при температурі 160°C.

3. Свіжовиготовлений м'ясний бульйон розлити у 12 стерильних пробірок. Чотири пробірки кип'ятити 30 хв. Інші чотири – простерилізувати в автоклаві 15 хв. при 1 атмосфері. Останні чотири пробірки залишити без обробки. Після цього

всі пробірки помістити у термостат при температурі 28-30°C і спостерігати за ними протягом 4-5 діб, відмічаючи зміни, які відбуваються в пробірках. Результати досліджень свідчать, що тільки після автоклавування поживне середовище надовго залишається стерильним. При інших методах обробки у пробірках спостерігається утворення плівок та каламуті внаслідок розмноження бактерій.

Оцінити якість стерилізації поживного середовища в залежності від методів обробки і оформити у вигляді наступної таблиці:

Тип стерилізації	Наявність мікробного росту
Автоклавування (1 атм., 15 хв.)	
Кип'ятіння (30 хв.)	
Контроль (без обробки)	

4. Ефективність процесу парової стерилізації із застосуванням біологічних індикаторів BT20 Bionova, які містять спори *Geobacillus stearothermophilus*.

G. stearothermophilus (раніше – *Bacillus stearothermophilus*) – це дрімлючі непатогенні ендоспори, здатні витримувати високі температури парової обробки, а також сухий жар. У зв'язку з високою стійкістю спори цих бактерій, як правило, використовують у якості «золотого стандарту» для перевірки ефективності процесів автоклавування та інактивації спор *G. stearothermophilus*.

Біологічний індикатор розміщують в автоклав разом з матеріалами, що підлягають стерилізації. Якщо процес стерилізації виявиться неефективним, то індикаторне середовище після наступної інкубації при температурі 55-62°C протягом 24-48 годин перетвориться з пурпурового на жовте, що вказує на наявність живих спор *G. stearothermophilus*. Якщо процес стерилізації був ефективним, то індикаторне середовище після інкубації залишиться фіолетовим.

Результати спостережень запишіть у зошит. Зробіть висновки.

Контрольні питання

1. Чим стерилізація відрізняється від дезінфекції?
2. Якими способами можна проводити стерилізацію?
3. Що і за яких умов стерилізують в автоклаві, в сушильній шафі та кип'ятінням?
4. Чим відрізняється тиндалізація від пастеризації?
5. Які хімічні речовини використовують для холодної стерилізації?
6. У чому суть процесу визначення ефективності парової стерилізації із застосуванням біологічних індикаторів?

Лабораторна робота № 3

СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитись з класифікацією та призначенням основних середовищ для культивування мікроорганізмів, опанувати навички приготування різних поживних середовищ.

Матеріали й обладнання: скляні колби різного об'єму, чашки Петрі, маркер по склу, сірники, ваги технічні та аналітичні, плитка, спиртівка, дистильована вода, скляні палички, автоклав, агар мікробіологічний, пептон ферментативний, натрію хлорид, дріжджовий екстракт, рН-метр.

3.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

У мікробіології культивування мікроорганізмів відбувається з використанням живильних середовищ різних за складом. Склад живильного середовища визначається поживними потребами мікроорганізму або завданнями експерименту.

Поживне середовище має містити:

- доступне для клітини джерело енергії (для фототрофів – світло, для інших – органічний або неорганічний субстрат);
- усі необхідні компоненти для реалізації конструктивних процесів.

Необхідні компоненти:

- 1) джерело вуглецю (CO₂, вуглеводи, кислоти, спирти);
- 2) джерело азоту (молекулярний азот повітря, неорганічні солі азоту, амінокислоти);
- 3) фактори зростання (пурини, піримідини, амінокислоти, вітаміни);
- 4) макроелементи – калій, натрій, магній, кальцій, залізо та ін;
- 5) мікроелементи – молібден, цинк, мідь, кобальт та ін.

Розчини мікроелементів, амінокислот та вітаміни стерилізують окремо та вносять у середу безпосередньо перед посівом.

Класифікація живильних середовищ

За **складом** всі живильні середовища поділяються на **натуральні** (природні), **синтетичні** та **напівсинтетичні**.

Натуральні (природні) – складаються з продуктів тваринного та (або) рослинного походження (м'ясо, молоко, розведена кров, картопля, морква тощо). Дані середовища багаті на органічні речовини, проте мають складний і непостійний склад, тому малоприсадибні для дослідження обміну речовин мікроорганізмів.

До *природних* поживних середовищ відносяться:

- м'ясопептонний бульйон (МПБ) – складається з екстракту м'яса (500 г м'яса на 1 л води, екстракція 12 год при кімнатній температурі), 0,5% NaCl і 1% пептону (продуктів неповного розкладання білка). Для приготування

м'ясопептонного агару (МПА) до бульйону додають агар-агар (1,5-2%), стерилізують при 2 атм. 20-30 хв;

- неохмелене пивне сусло, що готується на основі солоду (пророслого ячменю), гідролізованого до цукрів; стерилізують при 1,5 атм. 20-30 хв;

- дріжджове середовище: екстракт дріжджів (7-10 г на 1 л води), 1-2 % розчин сахарози (глюкози або фруктози), 0,1 % K_2HPO_4 , 0,5 % NaCl; стерилізують при 1,5 атм. 20-30 хв ;

- картопляний агар (відвар 200 г картоплі на 1 л води з додаванням агар-агару), стерилізують при 2 атм. 40-45 хв.

На натуральних середовищах добре розвиваються мікроорганізми, оскільки дані середовища містять усі необхідні для зростання компоненти, проте їх склад хімічно непостійний і залежить від властивостей біологічного об'єкта, з якого вони виготовлені.

Напівсинтетичні – поряд із компонентами природного походження містять хімічні речовини, отримані синтетичним шляхом. До таких середовищ відноситься МПА з додаванням глюкози та K_2HPO_4 , штучні середовища з додаванням факторів зростання (дріжджового автолізату, кукурудзяного екстракту тощо).

Середовище LB (Лурія – Бертрані): триптон – 10 г, дріжджовий екстракт – 5 г, NaCl – 5 г, вода – 1 л; стерилізують при 1,5 атм. 20-30 хв.

Синтетичні – це комплекс певних хімічно чистих сполук, які додаються у точно зазначених концентраціях. Вони найзручніші вивчення метаболізму мікроорганізмів.

До *синтетичних* поживних середовищ відносяться:

- середовище Чапека (для культивування грибів): глюкоза – 30 г, $NaNO_3$ – 2 г, K_2HPO_4 – 1 г, $MgSO_4$ – 0,5 г; KCl – 0,5 г; $FeSO_4$ – 0,01 г; вода – 1 л; стерилізують при 1,5 атм. 20-30 хв;

- середовище Канеда (для культивування метилотрофів): KH_2PO_4 – 2 г, $(NH_4)_2SO_4$ – 2 г, NaCl 0,5 г, $MgSO_4$ – 0,025 г, $FeSO_4$ – 0,01 г, вода – 1 л; стерилізують при 2 атм. 20-30 хв; після стерилізації в середу вносять 0,3% стерильного метанолу (стерилізують фільтруванням);

- середовище Евансу (для культивування псевдомонад): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 8,71 г розчинити в 800 мл води, довести рН до 7,00. Додати по 1 мл наступних розчинів:

- 5 М р-р NH_4Cl (можна замінити NH_4NO_3);
- 0,1 М розчин Na_2SO_4 ;
- 62 мМ розчин $MgCl_2$;
- 1 мМ розчин $CaCl_2$;
- 0,005 мМ розчин $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$;
- мікроелементи (10 мл HCl + 990 мл H_2O дист. + 0,41 г ZnO + 5,4 г $FeCl_3 \times 6H_2O$ + 2,0 г $MnCl_2 \times 4H_2O$ + 0,17 г $CuCl_2 \times 2H_2O$ + 0,48 г $CoCl_2 \times 6H_2O$ + 0,06 г H_3BO_3).

Довести об'єм середовища до 1л дистильованою водою.

За **призначенням** живильні середовища поділяються на:

Елективні середовища – забезпечують переважний розвиток одного виду чи групи мікроорганізмів і малоприсадибні (неприсадибні) для культивування інших. Зазвичай їх застосовують на першому етапі виділення мікроорганізмів із природних субстратів для одержання накопичувальних культур (наприклад, середовище Ешбі для роду *Azotobacter*).

Диференціально-діагностичні (індикаторні) – призначені для того, щоб швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших (наприклад, середовище Ендо для бактерій групи кишкової палички):

- середовище Ендо: пептон – 10 г/л, лактоза – 10 г/л, K_2HPO_4 – 2,5 г/л, фуксин – 0,3 г/л, Na_2SO_3 – 0,5 г/л, агар – 12 г/л.

Універсальні – середовища, на яких добре ростуть багато патогенних та непатогенних видів мікроорганізмів (наприклад, середовище Лурія-Бертрані).

За **фізичним станом** середовища ділять на *щільні, рідкі, напіврідкі та сипучі*.

Щільні середовища (на основі агару, желатину або силікагелю) – призначені для виділення чистих культур мікроорганізмів, діагностичних цілей, зберігання культур, кількісного обліку мікроорганізмів, визначення антагоністичних властивостей.

Агар-агар являє собою полісахарид, до складу якого входять агарозу та агаропектин. Одержують із морських бурих або червоних водоростей. Більшість мікроорганізмів не використовують його як субстрат. У воді агар-агар утворює гель, що плавиться при $100^\circ C$; твердий стан має при температурі $40-45^\circ C$. У кількісному співвідношенні агар, зазвичай, становить 1,5-2% від складу середовища (15-20 г/л). Його можна вносити в готові середовища і нагрівати до розплавлення.

Желатин – білок тваринного походження, що отримується при виварюванні кісток та хрящів тварин. Він плавиться за нормальної температури $23-26^\circ C$. У складі середовищ желатин становить 10-15% (100-150 г/л).

Кремнистий гель (силікагель) – речовина неорганічного походження, що використовується як основа для щільних синтетичних середовищ. Його використовують у випадках, коли потрібні щільні середовища, які не містять органічних компонентів (для хемолітотрофів). Силікагелем називають двоокис кремнію (SiO_2). Його стерильний золь готують з розчину силікату натрію або калію (Na_2SiO_3 , K_2SiO_3) і перед використанням, щоб викликати утворення гелю, до нього додають живильне середовище, що містить електроліти. Середовища на основі силікагелю (1,5-2,0%) використовують для одержання культур автотрофних бактерій, тому що при цьому в середовищі відсутні органічні речовини. При додаванні в такі мінеральні середовища різних органічних речовин можна досліджувати можливість їх використання як єдиних джерел вуглецю гетеротрофними бактеріями. За допомогою силікагелієвих середовищ також можна визначати потреби бактерій у вітамінах.

Рідкі середовища – призначені для виявлення фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів, накопичення біомаси та продуктів метаболізму,

підтримки та зберігання мікроорганізмів, що погано розвиваються на щільних середовищах.

Напіврідкі середовища – отримують додаванням до рідких середовищ 0,5% агару. Використовують для спеціальних цілей, наприклад, для культивування анаеробів.

Сипучі середовища – застосовуються у промисловій мікробіології (розварене пшоно, висівки, пісок, просочені поживним розчином).

Найпоширенішим **універсальним** поживним середовищем в мікробіологічних дослідженнях є **м'ясо-пептонний агар (МПА)**. Зазвичай він містить (за масою або об'ємом):

- ферментативний пептон (0,5%) – забезпечує органічним азотом;
- екстракт м'яса 1:2 (0,3%) – екстракт яловичини або дріжджовий екстракт; містить водорозчинні вітаміни, вуглеводи, азот і солі;
- натрію хлорид (0,5%) – надає ізотонічні властивості розчину, тобто дає суміші пропорції, подібні до тих, що знаходяться в цитоплазмі більшості організмів;
- агар (1,5%) – надає суміші твердість;
- дистильована вода;
- рН доводять до нейтрального ($7,0 \pm 0,2$) при 25°C .

3.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Вивчити склад нижче наведених поживних середовищ, записати в робочий зошит назва середовищ та їх складу. Охарактеризувати кожну їх відповідно до класифікації: за складом, призначенню, консистенції; вказати умови культивування мікроорганізмів на кожному із середовищ:

- *середовище 1*, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, рН – 7,2;
- *середовище 2*, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, цистеїн – 0,01, агар – 15, рН – 7,2;
- *середовище 3*. Середовище М 9 (основа для культивування ґрунтових бактерій), (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, рН – 7,2;
- *середовище 4*, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гідролізат казеїну – 10, дріжджовий екстракт – 5, рН – 7,2;
- *середовище 5*, (г/л): пептон – 5, м'ясний екстракт – 5, бромкрезоловий пурпурний 1,6 % розчину – 0,625 мл, крезоловий червоний 0,2 % розчину – 2,5 мл, глюкоза – 0,5 г, піридоксаль – 0,5, рН – 6,0;
- *середовище 6*. Середовище Ешбі (концентроване) для культивування азотфіксуючих мікроорганізмів, (г/л): KH_2PO_4 – 2, NaCl – 2, K_2SO_4 – 1, MgSO_4 – 2, CaCO_3 (крейда) – 50, манніт – 200, рН – 7,2;

- *середовище 7.* М'ясопептонний бульйон (для культивування широкого кола мікроорганізмів), (г/л): м'ясна вода, NaCl – 0,5 %;
- *середовище 8.* Картопляне середовище (в основному, для культивування спороутворюючих бактерій), (г/л): картопля, крейда – на кінчику ножа;
- *середовище 9.* Середовище (для виділення актиноміцетів), (г/л): крохмаль розчинний – 20, KNO₃ – 1, K₂HPO₄ – 0,5, MgSO₄ x 7H₂O – 0,5, NaCl – 0,5, FeSO₄ – сліди, вода водопровідна, рН 7,2-7,3;
- *середовище 10.* Для виділення культур *Clostridium*, (г/л): KH₂PO₄ – 0,5, K₂HPO₄ – 0,5, MgSO₄ – 0,5, NaCl – 0,5, вода водопровідна, глюкоза – 20, пептон – 5, CaCO₃ – 10, рН – 7,0;
- *середовище 11.* Для виділення мікроорганізмів, які розчиняють фосфати кальцію, (г/л): глюкоза – 10, аспарагін – 1, K₂SO₄ – 0,2, MgSO₄ x 7H₂O – 0,2, дріжджовий екстракт – 0,02, агар – 15, вода водопровідна;
- *середовище 12.* Виділення культур мікобактерій, (г/л): NH₄Cl – 0,5, K₂HPO₄ – 0,5, MgSO₄ – 0,2, CaCO₃ – 0,2, вода водопровідна.

Результати аналізу записати у таблицю:

Номер середовища	Склад середовища	Визначення згідно класифікації

2. Приготувати м'ясопептонний агар. Колби із середовищем закрити фольгою та папером, зафіксувати їх гумкою, підписати (назва середовища, номер групи, дата приготування) та здати на стерилізацію

3. Перевірити стерильність умов виконання роботи (виконується на наступному занятті шляхом виявлення появи колоній мікроорганізмів – якщо з'явилися колонії, то стерильність приготування середовищ була порушена; описати можливі причини).

Хід виконання роботи

Для приготування МПА у хімічну склянку об'ємом 1 л необхідно додати наступні інгредієнти:

- пептон ферментативний – 4 г;
- дріжджовий екстракт – 1,6 г;
- натрію хлорид – 4 г;
- агар агар – 12 г;
- 800 мл дист. води.

рН доводять до нейтрального лугом або кислотою.

Кожен студент готує 500 мл поживного середовища. Наважки речовин поміщають у хімічну склянку, розмішують за допомогою магнітної мішалки з підігрівом. Склянку з розчином маркують стрічкою-індикатором і стерилізують в автоклаві при 121°C протягом 15 хв. (для автоклавування **ніколи не закручуй кришки щільно!!**)

Після охолодження до 50-55°C (температура, яку може витримати рука) поживне середовище у витяжній шафі та поблизу полум'я горілки розливають у стерильні чашки Петрі (попередньо на боковій стінці маркером вказують дату, назву поживного середовища, прізвище дослідника).

Після остудження чашки Петрі перевернутими поміщають в інкубатор-термостат. Інкубацію проводять у термостаті при 37 °С протягом 48 годин. У разі відсутності колоній чашки можна використовувати для культивування мікроорганізмів води, ґрунту, повітря.

Контрольні питання

1. Дайте визначення поняттю «живильні середовища». Які основні компоненти має містити живильне середовище?
2. На які групи поділяють живильні середовища за складом? Наведіть приклади.
3. На які групи ділять живильні середовища за призначенням? Наведіть приклади.
4. У чому різниця елективних середовищ від диференціально-діагностичних?
5. На які групи поділяють живильні середовища за фізичним станом? Наведіть приклади.
6. Які речовини використовують для приготування щільного живильного середовища? Дайте характеристику цих речовин. Чому агар є найбільш використовуваним ущільнювачем при приготуванні щільних середовищ?
7. Якими є основні складові МПА і яку роль вони відіграють при культивуванні мікроорганізмів?

Лабораторна робота № 4 КІЛЬКІСНИЙ ОБЛІК МІКРООРГАНІЗМІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА НА МПА

Мета роботи: ознайомитись з методами кількісного обліку мікроорганізмів навколишнього середовища і поверхні рук.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі з поживним середовищем, отримані за попередньою лабораторною роботою, спиртівка, маркер по склу, дистильована вода, термостат, зразки природної води та водна витяжка з ґрунту, що досліджується.

4.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Культивування мікроорганізмів, окрім складу поживного середовища, сильно залежить від фізичних та хімічних факторів (температури, кислотності, аерації, світла тощо). При цьому кількісні показники кожного з них неоднакові та визначаються особливостями метаболізму кожної групи мікробів.

Внесення мікроорганізмів у стерильне середовище називається посівом, або *інокуляцією*.

Посів мікроорганізмів вимагає дотримання певних правил, які необхідно виконувати, щоб захистити досліджувану культуру від забруднення сторонніми мікроорганізмами. Перед посівом слід зробити підписи на посуді. Клітини мікроорганізмів для посіву або приготування препаратів беруть бактеріологічною петлею або голкою, якщо мікроорганізми вирощували на щільному середовищі.

У випадку, коли мікроорганізми вирощені в рідкому середовищі, краще користуватися піпеткою.

Після пересіву пробірки або інші судини з мікроорганізмами поміщають у термостати з певною температурою.

Після закінчення роботи посуд з культурами мікроорганізмів, які вже не потрібні, слід автоклавувати, щоб вбити клітини, і лише після цього мити. Допускається заливати дезінфікуючим розчином поверхню щільних середовищ. Через добу середовища можна викидати та посуд мити. Неакуратне поводження з культурами мікроорганізмів призводить до виникнення бактеріального аерозолі.

4.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. На підготовлені чашки Петрі з МПА посіяти мікрофлору повітря у різних варіантах експерименту. Визначити кількість бактерій у повітрі (мікробне число повітря).
2. Зробити посів та кількісний облік мікрофлори рук.
3. Провести кількісний облік бактерій у питній воді (мікробне число води).
4. Посіяти мікрофлору ґрунту та визначити кількість бактерій у ґрунті (мікробне число ґрунту).

Хід виконання роботи

Усі маніпуляції проводять біля полум'я горілки по можливості швидко, щоб не забруднювати культуру сторонніми мікроорганізмами. Не рекомендується робити різкі рухи, ходити біля того, хто проводить посів мікроорганізмів, тому що рух повітря збільшує імовірність випадкового забруднення культури.

УВАГА!!! Отримані колонії з проб навколишнього середовища можуть містити потенційно патогенні мікроорганізми. Чашки Петрі повинні залишатися закритими під час оцінювання!

1. Посів мікрофлори повітря

У навколишньому середовищі, в атмосфері містяться як сапрофітні мікроорганізми ґрунту, що потрапляють із землі, так і мікроорганізми, що живуть на слизових оболонках дихальних шляхів людини у закритих приміщеннях. Можуть зустрічатися і патогенні форми, які здатні висіятись у повітрі у закритих приміщеннях.

Найпростіший метод, який дає уяву про мікрофлору повітря називається методом Коха. Посів проводиться наступним чином: чашки Петрі зі стерильним МПА відкривають у приміщенні на 5, 10, 15, 20, або 30 хв. (зазвичай, на одну годину – на дуже чистому повітрі – морське повітря; на 10 хв. – на забрудненому повітрі), закривають кришку і перевертають, підписують, ставлять у термостат. Інкубацію проводять у термостаті при 25-28°C протягом тижня (або при 30-40°C протягом 24 годин). Чашки Петрі поміщають у термостат кришками донизу, щоб волога, що конденсується, не змочувала посіви. Через два-три дні на поверхні спостерігають розвиток колоній мікроорганізмів. Їх підрахунок та аналіз проводять на шостий-сьомий день після посіву.

Гриби розвиваються переважно на кислих середовищах; бактерії – на нейтральних. Серед сапрофітів повітря на МПА постійно розвиваються різні кокові форми (зокрема, жовта сарцина, білий та рожевий мікрокок, спорові палички, цвілі). Необхідно роздивитися морфологічну різноманітність мікрофлори повітря. Описати мікроорганізми повітря, звертаючи увагу на співвідношення грибів та бактерій.

За правилом Омелянського визначають кількість бактерій 1 м³ повітря. *Правило Омелянського.* На 100 см² протягом 5 хв осідає стільки мікробів, скільки їх міститься в 10 л повітря.

Наявність мікроорганізмів в 1 м³ повітря для закритих приміщень:

- взимку: чисте повітря – 4,5 тис., забруднене – 7,5 тис.;
- влітку: чисте повітря – 1,5 тис., забруднене – 2,5 тис.

Приклад. На поверхні МПА у чашці діаметром 10 см утворилося 20 колоній, чашка була відкрита на 10 хв. Визначити, скільки мікроорганізмів міститься в 1 м³ повітря?

Рішення. Визначаємо площу чашки Петрі за формулою:

$$S = \pi R^2 = 3,14 \cdot 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$$

Знаходимо кількість мікроорганізмів повітря. Оскільки колонія утворюється з однієї клітини шляхом багаторазового поділу, знаходимо:

$$78,5 \text{ см}^2 - 20 \text{ колоній}$$

$$100 \text{ см}^2 - x$$

$$x = 25,5 \text{ клітин мікроорганізмів}$$

За правилом Омелянського на площу у 100 см² осідає певна кількість мікроорганізмів з 10 л повітря, тоді для 1000 л (1 м³) кількість клітин:

$$25,5 \times 100 = 2500 \text{ клітин}$$

Перераховуємо на 5 хв: $2500 : 2 = 1250$ клітин.

Таким чином, в 1 м³ повітря міститься 1250 клітин мікроорганізмів, що дає змогу віднести його до категорії «чисте».

2. Посів мікрофлори рук

Дно чашки з NB-агаром розділити маркером на чотири зони.

1. Притиснути палець 1 немитої руки на зону 1.
2. Вимити палець 1 з милом і висушити його на повітрі. Притиснути вимитий палець 1 на зону 2.
3. Вимити палець 2 з милом і висушити його свіжим паперовим рушником. Щільно потерти палець 2 папіром і натиснути їм на зону 3.
4. Вимити палець 3 з милом. Витерти його багаторазово використаним рушником або, як альтернатива, брудним лабораторним халатом і натиснути на зону 4.
5. Переконайтеся, що застосовуєте однаковий тиск пальцями на всі чотири зони для інокуляції на тверде середовище.
6. NB-планшети герметизують за допомогою параплівки та інкубують догори дном при 30°C протягом кількох днів.
7. Необхідно порівняти кількість колоній або площу всіх чотирьох зон (увага: чашки Петрі мають бути закритими).
8. Контролюється та реєструється кількісний розвиток колоній у кожній зоні на наступні дні.

3. Посів мікрофлори води

Для знайомства з мікрофлорою води використовують пробу води з водойми (краще із закритої водойми) і дають відстоятися при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

Відбирають 1 см³ досліджуваної води (дозатором або за допомогою шприца на 1см³) і поміщають у флакон зі стерильною водопровідною водою (9 см³). Таким чином, отримують перше розведення (10⁻¹). Отримане розведення ретельно перемішують. Потім новим шприцем відбирають 1 см³ суспензії з розведення 10⁻¹ і переносять у другий флакон зі стерильною водою, одержуючи друге розведення (10⁻²). Таким же чином готують наступні розведення до 10⁻⁶ (рис. 4.1), щоразу використовуючи новий флакон зі стерильною водою (9 см³) та новий одноразовий шприц. Усі розведення проводяться у витяжній шафі з дотриманням правил техніки безпеки.

Після ретельного збовтування вмісту флаконів з кожного беруть за допомогою шприца суспензію об'ємом 1 см³ з розведень 10⁻²–10⁻⁶, додають в окремі чашки Петрі і рівномірно розподіляють за допомогою шпательів Дригальського. Через 3-5 діб ведеться підрахунок окремих колоній, які виростили на чашці та перераховується кількість бактерій на 1 л води.

Результати аналізу мікрофлори води записують у вигляді наступної таблиці:

Розведення	Кількість колоній на поверхні МПА	Кількість гетеротрофних бактерій в 1 л води
1 : 10 ³		
1 : 10 ⁴		
1 : 10 ⁵		

4. Посів мікрофлори ґрунту

Для посіву мікрофлори ґрунту спочатку необхідно зробити водно-ґрунтову витяжку у співвідношенні 1:10 або 1:100. Потім слідують за процедурою розведень, описаною вище для посіву мікрофлори води. Паралельно наважку ґрунту ставлять на 2 год. на висушування до сушильної шафи на 105°C до постійної ваги. Потім ґрунтова суспензія з останньої пробірки об'ємом 0,1 мл наноситься на поверхню чашки Петрі і розтирається шпателем Дригальського по всій поверхні чашки (рис. 4.2). Через 3-5 діб ведеться підрахунок окремих колоній, які виростили на чашці та перераховується кількість бактерій на 1 г сухого ґрунту.

Результати аналізу мікрофлори ґрунту записують у вигляді наступної таблиці:

Розведення	Кількість колоній на поверхні МПА	Кількість гетеротрофних бактерій в 1 г ґрунту
1 : 10 ³		
1 : 10 ⁴		
1 : 10 ⁵		

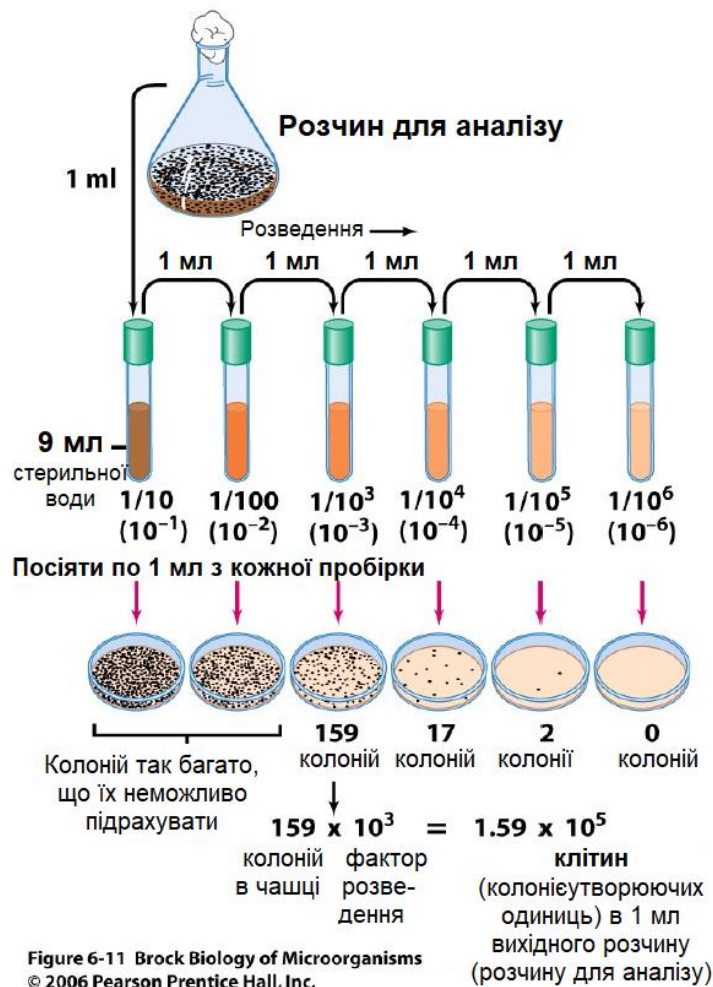


Рис. 4.1 – Схема розведення для підрахунку кількості мікроорганізмів у зразку, що досліджується

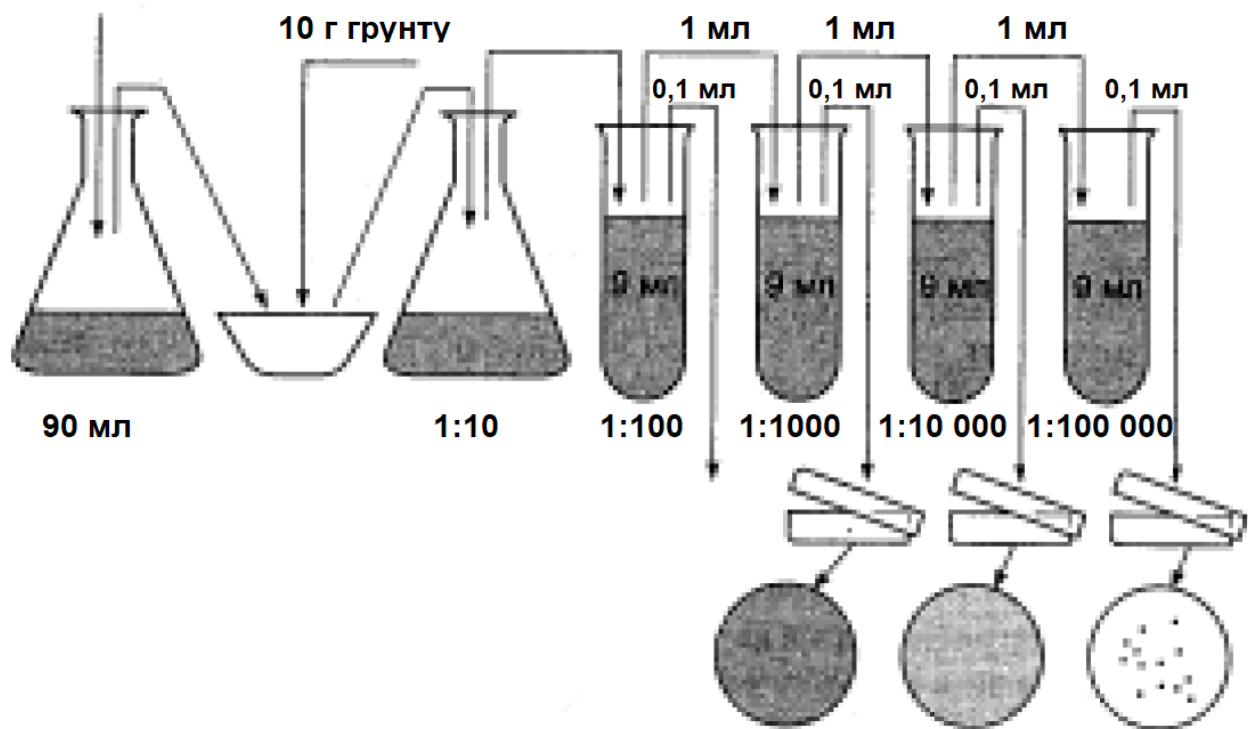


Рис. 4.2 – Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової витяжки у чашки Петрі

Контрольні питання

1. Наскільки точним є облік мікрофлори повітря методом «осідання» на агарові чашки Петрі?
2. Які фактори впливають на кількість мікроорганізмів у повітрі приміщень?
3. Які мікроорганізми зазвичай становлять мікрофлору повітря приміщень?
4. Яким є санітарне значення вивчення складу мікрофлори повітря приміщень?
5. Охарактеризуйте седиментаційний метод кількісного обліку мікрофлори повітря.
6. Яким чином проводиться методика розрахунку кількості мікроорганізмів на 1 м^3 повітря?
7. З якою метою застосовують метод розведення зразків води або ґрунтової витяжки при мікробіологічному дослідженні?

Лабораторна робота № 5 ВІЯВЛЕННЯ ОСНОВНИХ МОРФОЛОГІЧНИХ І ФІЗІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитись з основними морфологічними і фізіологічними властивостями мікроорганізмів.

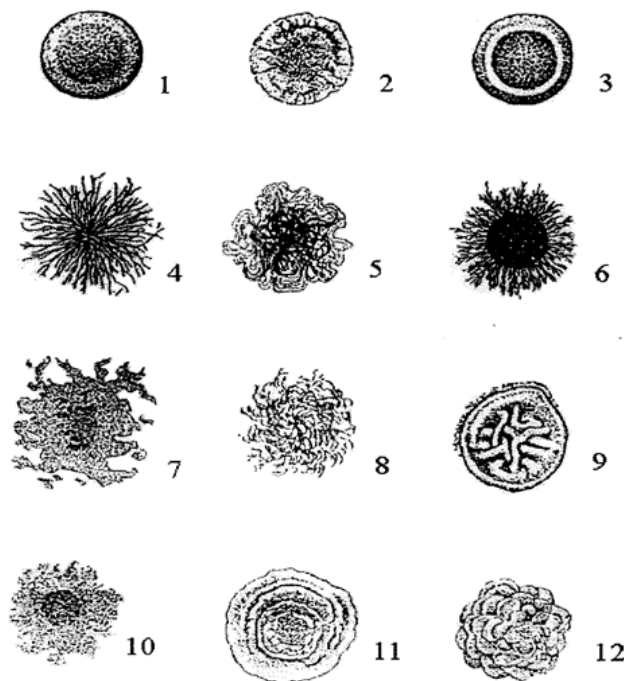
Матеріали й обладнання: чашки Петрі з колоніями мікроорганізмів, отримані за попередніми лабораторними роботами, спиртівка, мікробіологічна петля, мікроскоп, маркер по склу, предметні та накривні скельця, дистильована вода, термостат, фізіологічний розчин (0,9% розчин NaCl), 3% KOH, 3% H₂O₂.

5.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікроорганізми, розвиваючись на поверхні твердих середовищ, утворюють характерні для даного виду скупчення клітин – **колонії**. Кожна колонія утворюється, в більшості випадків, в результаті розмноження однієї клітини. Розміри, структура колоній і швидкість росту відрізняються великою різноманітністю. Це залежить від особливостей даного мікроорганізму, складу поживного середовища, методу посіву й умов культивування. Тому опис колоній – один з ознак, що, насамперед, необхідний для ідентифікації досліджуваного мікроорганізму.

При описі **колоній мікроорганізмів** враховують наступні **морфологічні ознаки**:

Форма колонії – округла, амебоподібна, ризоїдна і т.п. (рис. 5.1).



1 – кругла; 2 – кругла з фестончатим краєм; 3 – кругла з валиком по краю; 4 і 5 – ризоїдні; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – нитковидна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна

Рис. 5.1 – Форма колоній

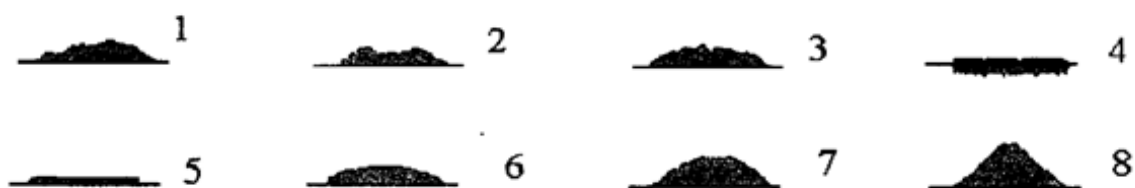
Розмір (діаметр) колонії вимірюють у мм; якщо розміри колоній не перевищують 1 мм, то їх називають **крапковими**.

Оптичні властивості (блиск і прозорість) колонії – блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора, напівпрозора, непрозора, флуоресціююча.

Колір колонії – безбарвна (грязно-білі колонії відносять до безбарвних) чи пігментована – біла, жовта, золотава, жовтогаряча, бузкова, червона, чорна і т.д. При описі колоній актиноміцетів відзначають пігментацію повітряного та субстратного міцелію. Особливо відзначають виділення пігменту в субстрат.

Поверхня колонії – гладка, шорсткувата, борозниста (горбиста), складчаста, зморшкувата, з концентричними колами чи радіально покреслена.

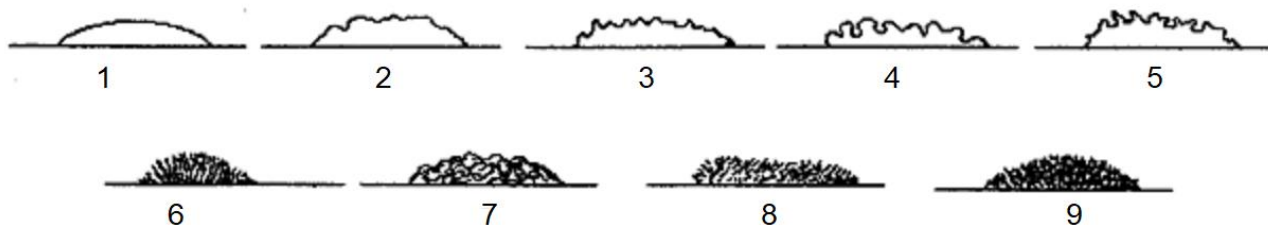
Профіль колонії – вигнутий, плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний, що вростає в агар та ін. (рис. 5.2).



1 – вигнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбистий; 4 – вростаючий у субстрат;
5 – плоский; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний

Рис. 5.2 – Профіль колонії

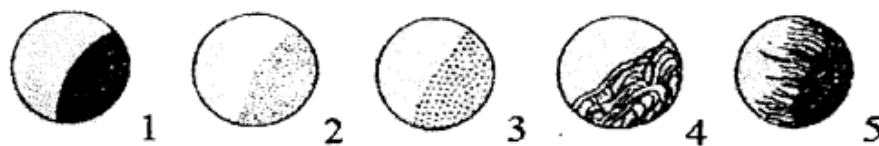
Край колонії – рівний, хвилястий, зубцюватий і т.д. (рис. 5.3).



1 – гладкий; 2 – хвилястий; 3 – зубцюватий; 4 – лопатоподібний; 5 – неправильний;
6 – віподібний; 7 – ниткоподібний; 8 – ворсинчастий; 9 – гіллястий

Рис. 5.3 – Край колонії

Структура колонії – однорідна, дрібно- чи грубозерниста, струйчаста і т.п. (рис. 5.4).



1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – грубозерниста; 4 – струйчаста; 5 – волокниста

Рис. 5.4 – Структура колонії

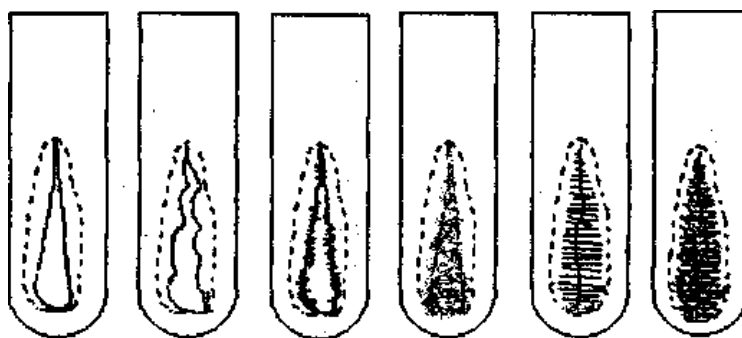
Консистенцію колоній визначають, доторкаючись до її поверхні петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути твердою, м'якою чи вростаючою в агар, слизуватою (прилипати до петлі), тягучою, плівчатою (знімається цілком), тендітною (легко ламається при дотику петлею).

Здатність до емульгування – рівномірна чи зерниста суспензія у воді, слабо чи зовсім не суспендується у воді.

Край та структуру колонії визначають при малому збільшенні мікроскопу. Для цього чашку поміщають на столик мікроскопа кришкою вниз. Консистенцію визначають при відсіванні колоній, доторкаючись до поверхні петлею.

Розміри і деякі інші особливості колонії змінюються з віком і залежать від складу середовища, тому при їхньому описі указують вік культури, склад середовища і температуру культивування.

При описі колонії і росту мікроорганізмів **по штриху** (рис. 5.5) обов'язково вказують склад середовища і вік культури, тому що колонії одного і того ж організму на різних середовищах можуть відрізнятися рядом ознак.



1 – суцільний з рівним краєм; 2 – суцільний із хвилястим краєм; 3 – чітко видний;
4 – дифузійний; 5 – перистий; 6 – ризоїдний

Рис. 5.5 – Ріст мікроорганізмів по штриху

Зростання мікроорганізмів у рідких поживних середовищах за стаціонарних умов культивування характеризується великою одноманітністю у порівнянні із зростанням на щільних середовищах. Він супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки чи осаду. Характеризуючи зростання в рідкому середовищі, зазначають:

- **ступінь помутніння** – слабка, помірна чи сильна;
- **особливості плівки** – тонка, щільна або пухка, гладка або складчаста;
- при **утворенні осаду** вказують – він або рясний, щільний, пухкий, слизовий, пластівцеподібний;
- нерідко зростання мікроорганізмів супроводжується появою **запаху**, **пігментацією** середовища, **виділенням газу** (останнє виявляють по утворенню піни, бульбашок).

Для опису характеру зростання в рідких середовищах хемоорганогетеротрофні мікроорганізми вирощують на МПБ (м'ясопептонному бульйоні) або на іншому середовищі, що забезпечує гарне зростання цього організму. Найчастіше використовують 4-7-добові культури.

5.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання:

1. Провести морфологічний аналіз колоній на чашках Петрі, що виростили на твердому поживному середовищі.
2. Визначити фізіологічні показники бактеріальних клітин.
3. Дані спостережень занести у таблицю; усно відповісти на контрольні запитання та захистити роботу викладачеві.

Хід виконання роботи

1. Морфологічний аналіз колоній на чашках Петрі, що виростили на твердому поживному середовищі, проводять спочатку неозброєним оком або через лупу. Потім можна помістити чашки на столик мікроскопа догори дном і вивчати колонії в минаючому світлі з об'єктивом 8x. Відзначте, опишіть і замалюйте переважні форми (3-5 видів), вибираючи ізольовані колонії (рисунки Д1-Д5 додатку 3). Ознаки колоній занести у таблицю (приведена нижче).

2. Для визначення фізіологічних показників бактеріальних клітин проводять диференціювання клітин за Грамом за допомогою експрес-тесту КОН, тест на каталазу, та цитохромоксидазний тест.

Диференціювання клітин за Грамом за допомогою експрес-тесту КОН

- Нанести піпеткою 20 мкл 3% КОН на предметне скло.
- Набрати якомога більше клітинної маси з агарової культури за допомогою стерильної дерев'яної зубочистки, круговими рухами розтирати з КОН (5-10 с) і спостерігати за змінами в консистенції.
- Коли протягом 1 хвилини суміш стає слизкою, це вказує на грамнегативну поведінку. Клітини бактерій піддаються лізису і високомолекулярна ДНК вивільнюється. Лізис грамположитивних бактерій потребує більш тривалого впливу.

Тест на каталазу

- Нанесіть піпеткою 50 мкл 3% H_2O_2 на предметне скло.
- Набрати біомасу клітин стерильною дерев'яною зубочисткою і додати до краплі перекису.
- Ненадовго потріть і спостерігайте за виділенням газів (за потреби використовуйте збільшувальне скло)
- Утворення бульбашок (O_2) свідчить про наявність каталази.

Цитохромоксидазний тест

- 50 мкл детекторного реагенту (свіжоприготовлена суміш 1% 1-нафтолу в етанолі та 1% N,N-диметил-p-фенілендіамонію дихлориду у воді у співвідношенні 2:3) додають по краплях на шматок фільтрувального паперу.

- За допомогою інокуляційної петлі натирають невелику кількість клітинної маси на зволоженій реагентом поверхні паперу приблизно 10 с.
- Чіткий синій колір протягом 30 с вказує на активність цитохромоксидази.

Важливо: одночасно приготувати «холостий» зразок (культура з явно негативною реакцією), а також використовувати по можливості біомасу молодшої культури. Після тривалої інкубації навіть оксидазонегативні мікроорганізми часто також дають блакитне забарвлення.

Результати спостережень занести у таблицю:

<i>Колонія №</i>	
<i>Морфологічні ознаки</i>	Форма (описати і замалювати)
	Діаметр, мм
	Блиск
	Прозорість
	Колір
	Поверхня
	Профіль
	Край
	Структура
	Консистенція
	Флуоресценція
	Здатність до емульгування
<i>Фізіологічні показники</i>	<i>Записати власні спостереження:</i>
	Диференціювання клітин за Грамом
	Тест на каталазу
	Цитохромоксидазний тест
Висновки за колонією №	

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте основні ознаки колоній, що виростили на поверхні щільного середовища у чашці Петрі.
2. Які фактори впливають на розміри та особливості зростання колоній?
3. Охарактеризуйте особливості зростання мікроорганізмів у рідких поживних середовищах.
4. Які біохімічні показники клітин мікроорганізмів дозволяє встановити експрес-тест із застосуванням КОН?
5. Які особливості бактеріальних клітин дозволяє встановити тест із застосуванням H_2O_2 ?
6. Які відмінності у структурі клітинних мембран грампозитивних та грамотрикативних бактерій?

Лабораторна робота № 6 ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР. НАКОПИЧУВАЛЬНІ КУЛЬТУРИ

Мета роботи: Опанувати метод отримання чистих культур мікроорганізмів.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі з колоніями мікроорганізмів, отримані за попередніми лабораторними роботами, спиртівка, мікробіологічна петля, шпатель Дригальського, автоматична піпетка, мікроскоп, маркер по склу, предметні та накривні скельця, дистильована вода, термостат.

6.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Чистою (аксенічною), називають культуру, що містить мікроорганізми одного виду. Уміння виділити мікроорганізми одного виду із змішаної популяції, що існує в природі, та підтримувати чистоту культури – необхідні умови роботи з мікроорганізмами.

Виділення чистої культури включає такі етапи:

- 1) отримання накопичувальної культури;
- 2) виділення чистої культури;
- 3) визначення чистоти виділеної культури.

Накопичувальна культура – культура, у якій переважають представники однієї фізіологічної групи і навіть одного виду мікроорганізмів. Для її отримання необхідно створити виборчі (елективні) умови, що забезпечують переважне розвиток бажаних мікроорганізмів із змішаної популяції.

Чисту культуру можна отримати з окремої колонії або однієї клітини.

Отримання ізольованих колоній на твердому поживному середовищі досягається або шляхом розсівання суспензії мікроорганізмів шпателем (**метод Коха**), або за допомогою бактеріологічної петлі (**метод виснажливого штриху**). Внаслідок механічного роз'єднання клітин мікроорганізмів кожна з них може дати початок ізольованій колонії одного виду мікробів.

6.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

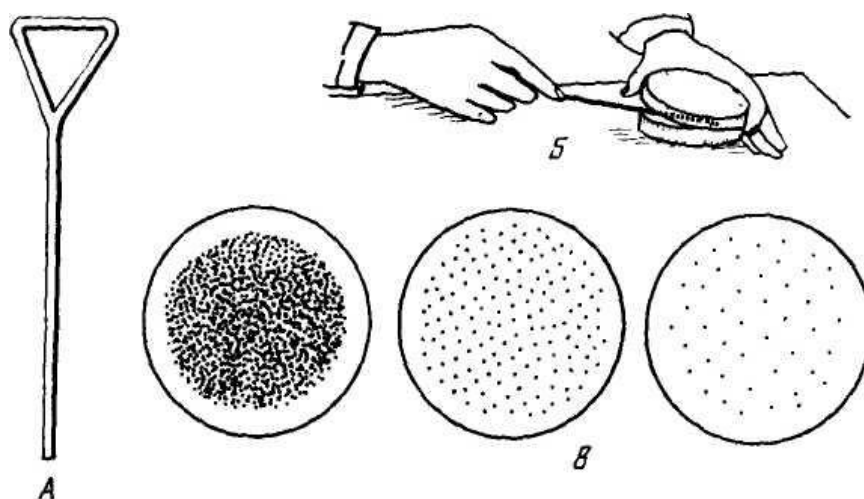
Завдання

1. Виділити чисту культуру з накопичувальної методом Р. Коха.
2. Виділити чисту культуру із окремої колонії методом виснажливого штриху.
3. Проаналізувати отримані результати, замалювати, усно відповісти на контрольні питання, захистити роботу викладачу.

Хід виконання роботи

1. Виділення чистих культур із окремої колонії методом Р. Коха

Накопичувальну культуру аеробів наносять піпеткою на поверхню щільного середовища і стерильним скляним шпателем Дригальського розподіляють краплю по поверхні середовища. Далі цим же шпателем, не стерилізуючи його, протирають поверхню середовища послідовно у другій, третій та четвертій чашках. Зазвичай, у перших двох чашках після інкубації спостерігається суцільне зростання мікроорганізмів, у наступних – зростання ізольованих колоній (рис. 6.1).



A – шпатель Дригальського; *B* – посів мікроорганізмів за допомогою шпателя Дригальського; *B* – зростання мікроорганізмів після розсіву

Рисунок 6.1 – Метод Р. Коха

2. Виділення чистих культур із окремої колонії методом виснажливого штриху

Розсівання петлею (метод виснажливого штриха) передбачає висів бактеріологічною петлею з накопичувальної культури на поверхню агаризованого середовища в чашках Петрі. На першому етапі петлею з культурою наносять ряд паралельних штрихів на агаризованому середовищі (рис. 6.3, А). Петлю стерилізують, остуджують шляхом торкання до незасіяної частини агаризованого середовища та проводять серію штрихів у напрямку, перпендикулярному першому (рис. 6.3, Б). Потім петлю знову стерилізують, остуджують і штрихи наносять у напрямку, який показано на рис. 6.3, В, а після чергової стерилізації – у напрямку Г (рис. 6.3).

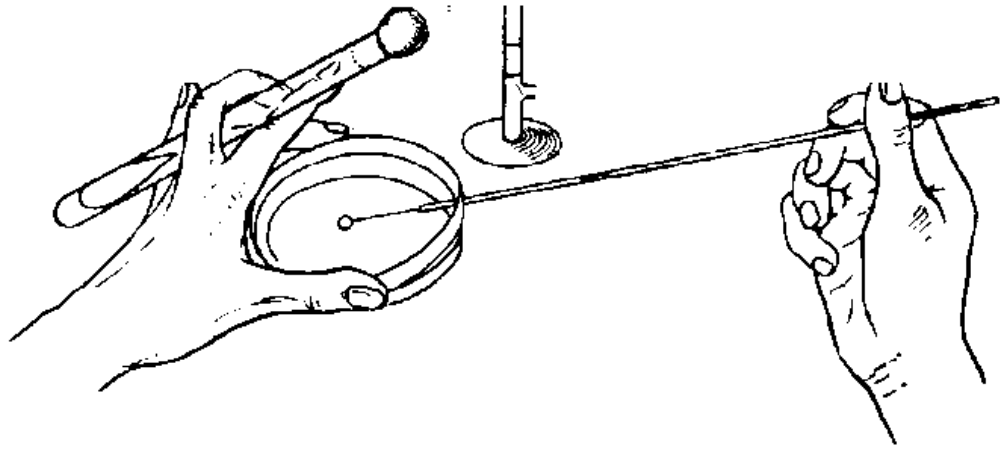


Рисунок 6.2 – Посів мікроорганізмів на щільні поживні середовища за допомогою мікробіологічної петлі

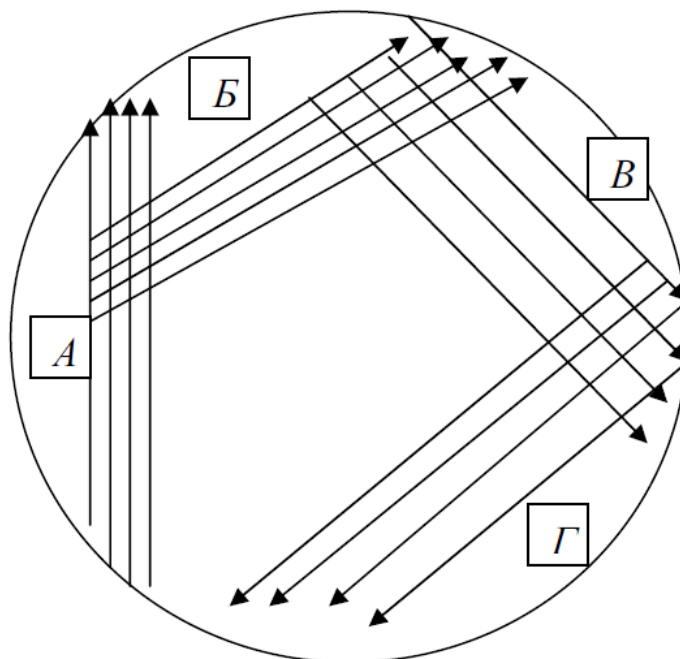


Рисунок 6.3 – Схема послідовності розсіву культури мікроорганізмів на поверхню твердого поживного середовища

Чашки поміщають у термостат і через певний час враховують результати. Зазвичай на штрихах А і Б зростає велика кількість колоній (іноді суцільне зростання), тоді як на штрихах В і Г формуються ізольовані (окремі) колонії.

Контрольні питання

1. Поясніть поняття «чисті культури мікроорганізмів»
2. Охарактеризуйте основні методи отримання накопичувальної культури.
3. Які основні методи виділення чистої культури?
4. Чим відрізняються підходи до отримання чистих культур методами Коха і виснажливого штриху?

Лабораторна робота № 7

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРОБІВ ДО АНТИБІОТИКІВ МЕТОДОМ ДИФУЗІЇ В АГАР ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ДИСКІВ

Мета роботи: ознайомитися з методом визначення чутливості мікробів до антибіотиків методом дифузії в агар із застосуванням дисків.

Матеріали й обладнання: чашки Петрі зі стерильним МПА; спиртівка; мікробіологічна петля; шпатель Дригальського; автоматична піпетка; маркер по склу; пінцет; диски антибіотиків: оксацилін 1 мкг, ампіцилін 10 мкг, ванкоміцин 30 мкг і гатифлоксацин 5 мкг; лінійка; бактеріальні культури; культури мікроскопічних грибів; термостат.

7.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вивчення явищ антагонізму призвело до відкриття специфічних антибактеріальних речовин, що продукуються бактеріями та грибами у навколишнє середовище – антибіотиків.

Антибіотики – хіміотерапевтичні препарати біологічного походження, або їх напівсинтетичні похідні та синтетичні аналоги, які здатні у низьких концентраціях вибірково гальмувати або знешкоджувати зростання та розмноження мікроорганізми.

Класифікація антибіотиків.

1. За типом продуцента:

а) антибіотики, що синтезуються грибами (бензилпеніцилін, гризеофульвін, цефалоспорини);

б) антибіотики, що синтезуються актиноміцетами (стрептоміцин, еритроміцин);

в) антибіотики, що синтезуються бактеріями (поліміксини).

2. За способом отримання:

а) біосинтетичні (природні);

б) напівсинтетичні (хімічна сполука ядра природного антибіотика з різними хімічними радикалами);

в) синтетичні.

3. За механізмом дії:

а) вплив на синтез компонентів клітинної стінки (інгібування синтезу пептидоглікану) – β -лактамі антибіотики (пеніциліни, цефалоспорини, монобактами, карбапенеми), бацитрацин, ванкоміцин та циклосерин;

б) вплив на функції цитоплазматичної мембрани мікробних клітин, що призводить до виходу із клітини білків, пуринових та піримідинових нуклеотидів, іонів з подальшою загибеллю клітини – поліміксини, полієнові антибіотики, граміцидини;

в) вплив на синтез білка (шляхом порушення функціональних властивостей рибосом) – аміноглікозиди (стрептоміцин, гентаміцин, тобраміцин, амікацин), тетрацикліни, хлорамфенікол, макроліди, азаліди, лінкозаміди;

г) вплив на транскрипцію та синтез нуклеїнових кислот – на практиці застосовують анзаміцини (рифаміцини) – найбільш відомий рифампіцин, який інгібує ДНК-залежну РНК-полімеразу, що призводить до гальмування синтезу бактеріальної РНК, а також пізніх стадій самоскладання поксвірусів.

4. За ефектом, що чиниться на бактерії (гриби):

а) бактеріостатичні (фунгіостатичні)

б) бактерицидні (фунгіцидні).

За ступенем чутливості до антибіотиків патогенні мікроорганізми поділяються на 4 групи:

1. Чутливі – терапевтичні дози антибіотиків достатні задля досягнення лікувального ефекту при загальних захворюваннях.

2. Середньочутливі – лікувальний ефект при загальних захворюваннях досягається лише за призначенням підвищених доз антибіотиків.

3. Помірно стійкі – лікувальний ефект лише в місці, де відбувається концентрація антибіотика, або коли антибіотик вводять безпосередньо в осередок інфекції;

4. Стійкі – лікувальний ефект відсутній.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків визначається методом дифузії в агар із застосуванням паперових дисків або методом розведення в рідких та щільних живильних середовищах.

7.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Посіяти мікроорганізми на чашки Петрі з МПА. Матеріал для посіву: 18-20 годинні (при інтенсивному зростанні 4-5 годинні, при уповільненому – 2-3 добові) бульйонні або агарові чисті культури.

2. Визначити вплив антибіотиків на культуру мікроорганізмів.

Хід виконання роботи

На поверхню МПА в чашках Петрі наносять 1 мл досліджуваної культури, розподіляють за допомогою шпателью Дригальського. Засіяні чашки підсушують за кімнатної температури, потім стерильним пінцетом на поверхню середовища кладуть диски, просочені різними антибіотиками. Диски повинні бути на рівній відстані один від одного і на відстані 2-2,5 см від краю чашки (рис. 7.1). Засіяні чашки на 18 годин поміщають термостат при 37°C.

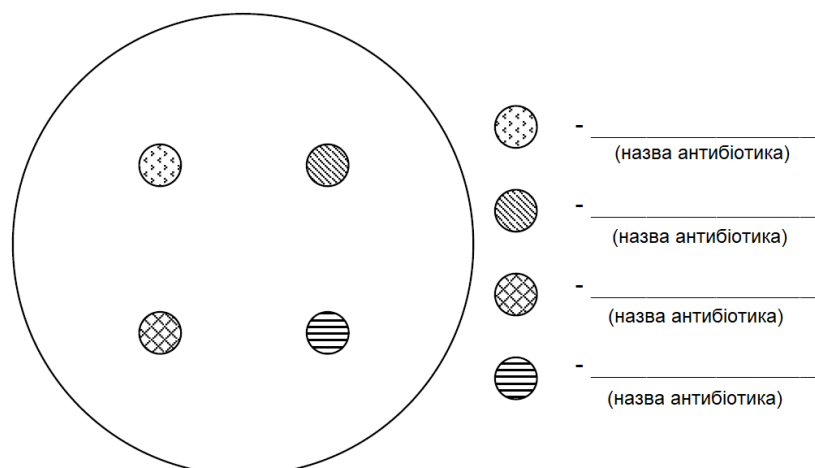


Рис . 7.1 – Схема розташування дисків з антибіотиками на поживному середовищі в чашках Петрі зі свіжепосіяною культурою мікроорганізмів

Антибіотик дифундує в агар, формуючи навколо диска зону затримки зростання чутливих до нього бактерій. Найбільша концентрація антибіотика відзначається у місці розташування диска; у напрямку периферії вміст його знижується.

Вимірювання зони затримки росту виробляють за допомогою циркуля чи міліметрової лінійки. Діаметр зони, що вимірюється, повинен проходити через центр диска.

При зоні затримки зростання діаметром до 10 мм штам розцінюється як малочутливий, зона затримки зростання понад 10 мм свідчить про чутливість штаму до досліджуваного матеріалу.

Результати спостережень занести у таблицю:

Антибіотик	Діаметр зони затримки зростання, мм	Чутливість штаму до антибіотика
1.		
2.		
3.		
4.		

Зробити висновки.

Контрольні питання

1. За якими ознаками класифікують антибіотики?
2. Чому інгібування синтезу пептидоглікану може привести до загибелі бактерії?
3. В чому суть методу визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків?

Лабораторна робота № 8 МОРФОЛОГІЧНІ ФОРМИ БАКТЕРІЙ. ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитися з морфологічними формами бактерій; опанувати методи мікроскопії живих та фіксованих препаратів мікроорганізмів.

Матеріали й обладнання: мікроскопи; предметні та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; штатив для фарбування предметних скелець; імерсійна олія; бактеріальні культури; культури мікроскопічних грибів, спирт, барвники: метиленовий синій та фуксин нейтральний, генціан фіолетовий, розчин Люголя.

8.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

До морфологічних властивостей відносяться не лише форма, але і розмір клітин, розташування клітин у просторі, наявність спор і капсул, рухливість та характер забарвлення бактерій за Грамом. Морфологія бактерій залежить від умов вирощування на поживних середовищах, температури та інших факторів. Найбільш типова морфологія бактерій у молодих культурах. Серед основних морфологічних форм бактерій розрізняють:

- **кулясті (кокові)**, які за характером взаєморозташування поділяються на: *мікрококи* (окреме розташування); *диплококи* (зчеплені попарно); *тетракоки* (зчеплені по чотири); *стрептококи* (зчеплені в ланцюжок); *сарцини* (зчеплені у пакети по 8, 12, 16 тощо); *стафілококи* (зчеплені безладно у вигляді виноградного грона);

- **паличкоподібні**, які різняться за формою: *правильна* (ентеробактерії, псевдомонади); *неправильна* (коринебактерія);

- за **розміром**: *дрібні* (бруцелли, бордетелли); *середні* (бактероїди, кишкова паличка); *великі* (бацили, клостридії);

- за **формою** кінців: *обрубані* (бацили); *закруглені* (сальмонели, псевдомонади); *загострені* (фузобактерії); *потовщені* (коринебактерії);

- за **характером взаєморозташування** всі палички поділяються на: розташовані *поодинокі*; *диплобактерії* або *диплобацили* (зчеплені попарно); *стрептобактерії* або *стрептобацили* (зчеплені у ланцюжок);

- **звивисті** форми – за характером та кількістю завитків вони діляться на: *вібріони* (злегка вигнуті палички або неповні завитки); *спірили* (один або кілька завитків); *спірохети*, які у свою чергу діляться на: *лептоспіри* (завитки із загнутими гачкоподібними кінцями – S-подібна форма); *боррелії* (4-12 неправильних завитків); *трепонеми* (14-17 рівномірних дрібних завитків).

Розміри бактерій загалом становлять 0,5-5 мкм. *Escherichia coli*, наприклад, має розміри 0,3-1 на 1-6 мкм, *Staphylococcus aureus* – діаметр 0,5-1 мкм, *Bacillus subtilis* – 0,75 на 2-3 мкм. Найкрупнішими з відомих бактерій є *Thiomargarita namibiensis*, яка досягає розміру 750 мкм (0,75 мм). Спірохети можуть вирости у довжину до 250 мкм при товщині 0,7 мкм. У той же час до

бактерій відносяться найдрібніші з клітин, що мають клітинну будову – *Mycoplasma mycoides* з розмірами 0,1-0,25 мкм.

Дослідження мікроорганізмів проводять у живому або фіксованому (забарвленому) стані. Живі препарати використовуються для вивчення розмірів, форми, структури, рухливості, характеру розмноження, відношення клітин до різноманітних подразників (хімічних, фізичних і т.п.).

Для того, щоб добре роздивитись форму багатьох (особливо мілких та слабо забарвлених) мікроорганізмів, їх необхідно пофарбувати. Для цього використовують фіксовані забарвлені препарати. Такі препарати готують у декілька етапів: виготовлення мазка, висушування, фіксація та забарвлення.

Виготовлення фіксованого забарвленого препарату

- приготування мазка. При приготуванні мазка з культури мікроорганізмів, що виросла на поверхні щільного поживного середовища, на знежирене предметне скло наносять петлею невелику краплю фізіологічного розчину, розташовуючи її в центрі кола, намальованого на звороті олівцем по склу. При роботі спиртівка повинна бути прямо перед вами, на зручній для роботи відстані.

Предметне скло має бути в чашці Петрі або лотку: *категорично забороняється готувати мазки на предметному склі, що лежить на столі!*

У праву руку беруть бактеріологічну петлю, у ліву – пробірку з культурою. Петлю стерилізують, вносячи її в полум'я пальника у вертикальному положенні. Після того як петля розжариться до червоного, проводять кінець петлетримача через полум'я. Після цього з пробірки виймають пробку, утримуючи її мізинцем правої руки. Після випалювання на спиртівці краю пробірки до неї вносять петлю, яку охолоджують, торкаючись стінок пробірки. Потім петлею з поверхні середовища знімають невелику кількість культури.

Не торкаючись стін пробірки, виймають петлю і закривають пробірку пробкою над спиртівкою. Після цього пробірку з культурою поміщають у штатив, а культуру на петлі вносять у заздалегідь приготовлену краплю фізіологічного розчину, добре розмішують і рівномірно розподіляють по склу у вигляді невеликого кола або овалу 1-1,5 см у діаметрі. Після закінчення приготування мазка петлю знову стерилізують в полум'ї спиртівки. Для приготування мазка з бульйонної культури на предметне скло наносять 1-2 петлі досліджуваного матеріалу, стерилізуючи петлю перед кожним зануренням у бульйонну культуру мікроорганізму, як описано вище, і рівномірно розподіляють по склу (у цьому випадку не потрібно попереднього нанесення на скло фізіологічного розчину).

- висушування мазка. Висушування мазка проводиться на повітрі. Для прискорення висушування предметне скло з мазком, зверненим догори, можна потримати в струмені теплого повітря високо над полум'ям спиртівки, не вносячи препарат у полум'я.

- фіксація мазка. Для цього використовують фізичний та хімічний методи. Фізичний метод полягає у фіксації мазка над полум'ям спиртівки (пальника) протягом декількох секунд мазком вгору (тричі по 1 секунді). Цю операцію

проводять досить швидко, намагаючись не перегріти мазок, тому що при перегріванні можуть відбутися незворотні зміни у клітині.

Хімічний метод фіксації є більш м'яким, порівняно з фіксацією на полум'ї. Як фіксатори використовують етанол, ацетон, суміш Нікіфорова (еквівалентне співвідношення етанолу та ефіру), метанол, формалін. Після фіксації мазків можна фарбувати.

- **фарбування мазка.** Для фарбування мазка слідують розпорядженням для кожної методики фарбування. При фарбуванні простим способом на мазок наносять кілька крапель розчину барвника так, щоб весь мазок був покритий ним. Барвник залишають на певний час. Потім препарат промивають водою та просушують фільтрувальним папером.

Для фарбування мікроорганізмів використовують **анілінові барвники**, які є, головним чином, похідними органічних сполук (аніліну та інших). Це порошки, які не розчиняються у воді, але добре розчиняються в органічних розчинниках (спирт, ацетон). Для фарбування мікроорганізмів використовують спиртово-водні розчини.

Анілінові барвники бувають: основні, кислі та нейтральні. Для забарвлення бактерій використовують основні барвники. Методи фарбування мікроорганізмів поділяються на прості та складні. Прості методи використовують один барвник. Складні (або диференційовані) використовують 2 і більше барвників, або 1 барвник та речовини, які не фарбують мікроби, але беруть участь у процесі фарбування.

До диференційованих методів відносять метод забарвлення клітин мікроорганізмів **за Грамом**. Метод заснований на відмінності у хімічному складі клітинних стінок мікробних клітин. *Суть методу:* у клітинах одних видів мікроорганізмів утворюються нерозчинні у спирті з'єднання йоду з основним барвником, а в інших видів ця сполука утворюється тимчасово і після обробки спиртом розчиняється. Мікроорганізми першої групи – грамнопозитивні; другої – грамнегативні. Тому всі бактерії за своїм відношенням до цього методу поділяються на дві групи: забарвлюються за Грамом (грамнопозитивні) і не фарбуються (грамнегативні). Дана ознака є важливою у діагностиці бактерій, тому обов'язково вказується при їх характеристиці.

Для приготування **живих** мікробіологічних препаратів використовуються методи **роздавленої** та **висячої краплі**.

- **виготовлення живого препарату «роздавлена крапля».** Цей метод використовують для виявлення рухливості клітин, спостереження за розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо. У цьому випадку можна проводити «вітальне» (прижиттєве) фарбування. Можливі барвники – метиленовий синій, нейтральний червоний (0,001-0,0001%). Характерною ознакою живих клітин є те, що барвники не зафарбовують внутрішній вміст клітини.

- **метод «висяча крапля».** Потрібне спеціальне предметне скло з лункою посередині. На знежирене накривне скло наносять краплю досліджуваного матеріалу. Накривне скло накривають предметним, щоб крапля була у центрі лунки предметного скла. Предметне скло швидко повертають краплею вниз.

Крапля повинна вільно звисати у поглиблення, не стикаючись з його дном та краями. Краї виїмки на предметному склі попередньо змащують вазеліном. Таким чином, крапля виявляється герметично закритою у вологій камері та захищеною від висихання.

8.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Зробити препарат «роздавлена крапля» культур мікроорганізмів, вирощених на попередніх заняттях. Провести аналіз окремих клітин під мікроскопом. Визначити форму і розмір окремої клітини, наявність джгутиків, ендоспор. Замалювати.

2. Зробити препарат «висяча крапля» тих самих культур мікроорганізмів. Розглянути морфологію клітин мікроорганізмів. Замалювати у зошиті.

3. Розглянути морфологію забарвлених метиленовим синім та фуксином фіксованих препаратів клітин мікроорганізмів. Зробити відповідні малюнки.

4. Приготувати та зафіксувати мазок культури. Провести фарбування мазка за Грамом та розглянути клітини під мікроскопом. Визначити відношення досліджуваної культури до забарвлення за Грамом. Замалювати препарати з клітинами у робочому зошиті. Зробити висновки щодо роботи.

Хід виконання роботи

1. Виготовлення препарату «роздавлена крапля»:

- на чисте предметне скло нанесіть 25 мкл стерильного фізіологічного розчину (0,9% розчин NaCl) за допомогою піпетки. Додайте невелику кількість біомаси з чашки, взятої за допомогою попередньо стерилізованої інокуляційної петлі або стерильної зубочистки, до краплі і перемішайте. Дотику до колонії зазвичай достатньо для перенесення достатньої кількості клітин. На краплю суспензії покладіть чисте накривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. При необхідності, надлишок рідини видаляється за допомогою фільтрувального паперу. Розгляньте препарат при збільшенні 40×. Якщо ви розрізняєте потік, це означає, що ви знайшли потрібний план об'єкту. Після мікроскопії предметні та накривні скельця поміщають в ванну для дезінфекції та повторного використання.

2. Виготовлення препарату «висяча крапля»:

- культуру мікроорганізмів наносять бактеріологічною петлею на накривне скло, а до нього прикладають предметне скло з поглибленням (лункою). Краї лунки попередньо змащують вазеліном, щоб прикріпити накривне скло. Для аналізу під мікроскопом препарат поміщають на предметний столик накривним склом нагору, тобто до об'єктиву. Крапля вільно висить у ямочці і довго не висихає, що дозволяє тривалий час спостерігати за рухливістю мікробних клітин.

3. Виготовлення фіксованого препарату.

- чисте знежирене предметне скло провести через верхню частину полум'я пальника. На середину скла за допомогою скляної палички нанести краплю води. Профламованою петлею чи піпеткою внести в неї досліджувану культуру мікроорганізмів і розподілити рівномірно на площі 1-4 см². Препарат висушити, тримаючи скло високо над полум'ям. Зафіксувати препарат, тобто вбити мікроорганізми і забезпечити їх прилипання до поверхні скла. Для цього скло з препаратом провести тричі через верхню частину полум'я пальника (термічна фіксація). Можна фіксувати висушені на повітрі препарати, обробляючи їх метиловим чи етиловим спиртом, сумішшю Нікіфорова, ацетоном (хімічна фіксація). Фіксований препарат залити кількома краплями барвника (фуксин, метиловий синій). Розподілити барвник по всій поверхні мазка. Фарбувати препарат фуксином протягом 1-2 хв, метиленою синькою – 3-5 хв. Потім фарбу злити, препарат добре промити дистильованою водою. Скло з країв протерти серветкою, препарат висушити. Нанести на сухий препарат краплю імерсійної олії і розглядати препарат під мікроскопом (об'єктив 90×).

Замалуйте клітини мікроорганізмів, які ви спостерігали під мікроскопом, у вітальному та фіксованому стані.

4. Підготувати, висушити та зафіксувати мазок над полум'ям спиртівки.

Далі:

- забарвити протягом 1-2 хв розчином генціану фіолетового (основний барвник), барвник злити в лоток (препарат водою не промивають!);

- нанести на мазок 1 краплю розчину Люголя (до повного почорніння мазка) на 1-2 хв;

- нанести краплю спирту на 15-20 с, безперервно похитуючи скло (при перевищенні зазначеного терміну знебарвлюються і грампозитивні клітини);

- препарат промити водою;

- забарвити протягом 2-3 хв фуксином (додатковий барвник);

- препарат промити водою (барвник змивають слабким струменем до знебарвлення змивної води, при цьому скло тримають у похилому положенні над лотком), акуратно промокнути фільтрувальним папером та досліджувати під мікроскопом з імерсійною системою.

При мікроскопуванні грампозитивні мікроорганізми набувають темно-фіолетового кольору, а грамнегативні – забарвлюються в колір додаткового барвника – фуксину.

Контрольні питання

1. Яка техніка приготування препаратів застосовується для вивчення живих культур мікроорганізмів?

2. Як виготовити препарат «висяча» крапля?

3. У чому суть методики приготування препаратів «роздавлена» крапля?

4. Що дозволяють вивчати препарати фіксованих клітин мікроорганізмів?

5. Якими є основні морфологічні форми бактерій?

6. Використання яких морфологічних характеристик є у нагоді ідентифікації мікроорганізмів? Як виглядає система класифікації мікроорганізмів по Берджі?

7. Чим відрізняються прості методи забарвлення фіксованих препаратів від складних (диференційованих)?

8. На чому заснований метод фарбування за Грамом? Як ділять мікроорганізми внаслідок фарбування за Грамом?

9. Які етапи виділяють при фарбуванні за Грамом? На що звертають особливу увагу за даною технікою?

Лабораторна робота № 9 ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОФЛОРИ ЗУБНОГО НАЛЬОТУ ЛЮДИНИ

Мета роботи: ознайомитися з мікрофлорою порожнини рота людини.

Матеріали й обладнання: мікроскопи; предметні та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; штатив для фарбування предметних скелець; імерсійна олія; бактеріальні культури; культури мікроскопічних грибів, барвники: метиленовий синій та фуксин нейтральний.

9.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вся нормальна мікрофлора людини поділяється на *резидентну (постійну – автохтонну)* (облігатну), що становить до 90% присутніх в організмі мікробоорганізмів, *аллохтонну (факультативну)* – менше 9,5 % та *транзиторну (випадкову)* – до 0,5%.

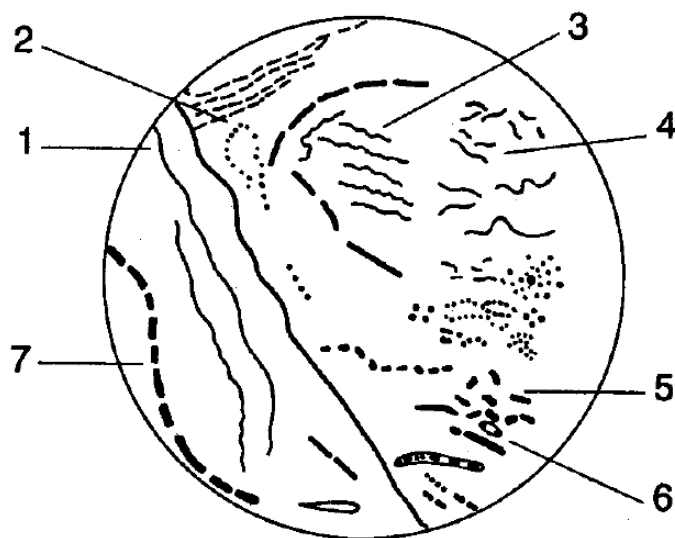
Близько 20% мікроорганізмів від загальної кількості мікроорганізмів людини мешкає в ротовій порожнині (більше 200 видів), 18-20 % припадає на шкірні покриви, 15-16% – на горло, а найбільше мікроорганізмів (до 40%) – у шлунково-кишковому тракті.

Нормальна мікрофлора організму починає формуватися при народженні дитини. У порожнині рота новонародженого вона представлена лактобацилами, негемолітичними стрептококами та непатогенними стафілококами. Протягом 6-7 днів ці мікроорганізми змінюються мікробами, характерними для дорослої людини.

Головними мешканцями порожнини рота у дорослої людини є бактерії переважно анаеробного типу дихання (3/4 всіх мікробних видів), інші види представлені факультативними анаеробами. У ротовій порожнині найбільшу групу бактерій становлять коки (рис. 9.1, табл. 9.1).

Таблиця 9.1 – Якісний склад мікрофлори ротової порожнини людини

Мікроорганізми	У слині		Частота виявлення в зубодесневій ямці
	Частота виявлення	Кількість в 1 мл	
РЕЗИДЕНТНА ФЛОРА			
<i>Аероби і факультативні анаероби</i>			
<i>Streptococcus mutans</i>	100	$1,5 \times 10^5$	100
<i>S. salivarius</i>	100	10^7	100
<i>S. mitis</i>	100	10^6-10^8	100
Сапрофітні нейссерії	100	10^5-10^7	++
Лактобактерії	90	10^3-10^4	+
Стафілококи	80	10^3-10^4	++
Дифтероїди	80	не визначено	+
Гемофіли	60	не визначено	0
Пневмококи	60	не визначено	не визначено
Інші коки	30	10^2-10^4	++
Сапрофітні мікобактерії	++	не визначено	++
Тетракоки	++	не визначено	++
Дріжджоподібні гриби	50	10^2-10^3	+
Мікоплазми	50	10^2-10^3	не визначено
<i>Облігатні анаероби</i>			
Вейллонелли	100	10^6-10^8	100
Анаеробні стрептококи	100	не визначено	100
Бактероїди	100	не визначено	100
Фузобактерії	75	10^2-10^3	100
Ниткоподібні бактерії	100	10^2-10^4	100
Актиноміцети і дифтероїди	100	не визначено	++
Спірили і вібріони	++	не визначено	++
Спірохети (сапрофітні боррелії, трепонеми та лептоспіри)	+	не визначено	100
НЕПОСТІЙНА (ТРАНЗИТОРНА) ФЛОРА			
<i>Аероби і факультативні анаероби: Грамнегативні палички</i>			
<i>Klebsiella</i>	15	$10-10^2$	0
<i>Escherichia</i>	2	$10-10^2$	±
<i>Aerobacter</i>	3	$10-10^2$	0
<i>Pseudomonas</i>	±	не визначено	0
<i>Proteus</i>	±	не визначено	0
<i>Alkaligenes</i>	±	не визначено	0
Бацили	±	не визначено	0
<i>Облігатні анаероби</i>			
Клостридії: <i>Clostridium putridium</i>	±	не визначено	0



1 – *Leptothrix*; 2 – *Diplostreptococcus*; 3 – *Borrelia buccalis*; 4 – *Treponema microdentinum*;
5 – *Diplococcus*; 6 – *B. fasiforme*; 7 – *B. macsimum buccalis*

Рис. 9.1 – Мікрофлора зубного нальоту (за Зіковим та співавт., 1997)

Під *Staphylococcus*. Стафілококи в порожнині рота здорової людини зустрічаються у середньому 30 % випадків. У зубному нальоті та на яснах здорових людей присутні в основному *Staphylococcus epidermidis*. У деяких людей у ротовій порожнині можуть виявлятися *Staphylococcus aureus*.

Стафілококи мають значну ферментативну активність, тому беруть активну участь у розщепленні залишків їжі в порожнині рота. Патогенні стафілококи, що зустрічаються на слизовій оболонці глотки та в порожнині рота, є частою причиною ендогенних інфекцій, викликаючи різні гнійно-запальні процеси порожнини рота.

Під *Streptococcus*. Стрептококи є основними мешканцями порожнини рота (в 1 мл слини до 10^8 - 10^{11} стрептококів). В забарвлених мазках стрептококи розташовуються у вигляді ланцюжків, грампозитивні. Більшість із них є факультативними анаеробами або мікроаерофілами, але зустрічаються і строгі анаероби (наприклад, пептострептококи). Володіючи значною ферментативною активністю, стрептококи зброджують вуглеводи з утворенням молочної кислоти, (викликають молочнокисле бродіння). Кислоти, що з'являються в результаті бродіння, пригнічують ріст ряду гнильних мікробів. Колонізація оральними стрептококами різних ділянок ротової порожнини має якісні та кількісні варіації залежно від умов життя. *S. salivarius* і *S. mitis* у 100% випадків присутні у порожнині рота. *S. mutans* і *S. sanguis* виявляються у великій кількості на зубах, а *S. salivarius* – головним чином поверхні язика. *S. mutans* і *S. sanguis* виявлялися в ротовій порожнині лише після пошкодження зубів.

Під *Veillonella*. Вейлонели – це дрібні грамнегативні коки, розташовуються купками, парами або короткими ланцюжками.

Під *Neisseria*. Нейсерії – грамнегативні диплококи. Строгі аероби. Нейсерії завжди у великій кількості зустрічаються у порожнині рота здорових людей (до 1-3 млн на 1 мл слини).

У порожнині рота, крім коків, мешкають різноманітні *паличкоподібні* форми бактерій. **Під *Fusobacterium*** включає понад 10 видів, ізольовані з ротової порожнини людини і тварин. Фузобактерії – грамнегативні анаеробні палички, неоднакові за розмірами і формою, особливо у патологічному матеріалі, де вони можуть виглядати як коки, палички, довгі нитки. У культурі виглядають як прямі або викривлені палички, короткі нитки із загостреними кінцями, що нагадують веретено.

Лептотрихії (*pid Leptotrichia*) мають вигляд довгих ниток різної товщини з загостреними або здутими кінцями, дають густі сплетіння, можуть розташовуватися попарно у вигляді зернистих паличок.

Актиноміцети (*Actinomyces*) відносяться до порядку *Actinomycetales*. Клітини актиноміцетів зазвичай мають вигляд довгих і розгалужених ниток, що нагадують у ряді випадків міцелій одноклітинних грибів, але зустрічаються також паличкоподібні та коккоподібні форми. Нитки міцелію мають довжину 100-600 мкм і товщину 0,2-1,2 мкм. Актиноміцети розмножуються спорами, поперечним розподілом і брунькуванням. Вони не мають вираженої капсули, спор та ворсинок. Забарвлення за Грамом – позитивне.

9.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля», взявши мазки з зубодесневої ямки та язика.

2. Замалуйте мікрофлору ротової порожнини. Знайдіть бактеріальні та епітеліальні клітини. Відзначте їх відмінності.

3. Зробити висновки про морфологічні форми вивчених мікроорганізмів, про якісний склад мікрофлори ротової порожнини.

Хід виконання роботи

1. Для аналізу мікрофлори ротової порожнини на предметні скельця за допомогою стерильної палички нанесіть невелику кількість нальоту з зубної ямки та язика. Після підсушування мазків забарвите їх метиленовим синім і розгляньте під мікроскопом (імерсійний 90×) епітеліальні та бактеріальні клітини. Заповніть наступну таблицю:

Таблиця – Морфологія бактеріальних клітин ротової порожнини людини

Мазок	Морфологічний опис мікроорганізмів/клітин, що спостерігаються	Схематичне зображення (рисунок)
- з зубодесневої ямки		
- з язика		

Контрольні питання

1. Яке значення для організму має мікрофлора людини?
2. Чим автохтонні мікроорганізми відрізняються від алохтонних?
3. Чим може бути представлена транзиторна мікрофлора ротової порожнини людини?
4. Як розрізнити епітеліальні та бактеріальні клітини у мазку мікрофлори ротової порожнини людини?

Лабораторна робота № 10 ПІДРАХУНОК КІЛЬКОСТІ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: Опанувати методику підрахунку клітин мікроорганізмів за допомогою камери Горяєва.

Матеріали й обладнання: мікроскопи; камера Горяєва; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; імерсійна олія; бактеріальні культури; культури мікроскопічних грибів або мікроводоростей, зокрема *Chlorella vulgaris*.

10.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Існують декілька способів оцінки біомаси клітин мікроорганізмів:

- підрахунок клітин в лічильній камері під мікроскопом;
- вагове визначення біомаси;
- вимір оптичної щільності суспензії.

Для підрахунку клітин в заданому об'єму рідини використовують спеціальні лічильні пристрої, які можуть називатися камерою Горяєва, Тома, Фукса-Розенталя, Бюркера та ін. (рис 10.1).

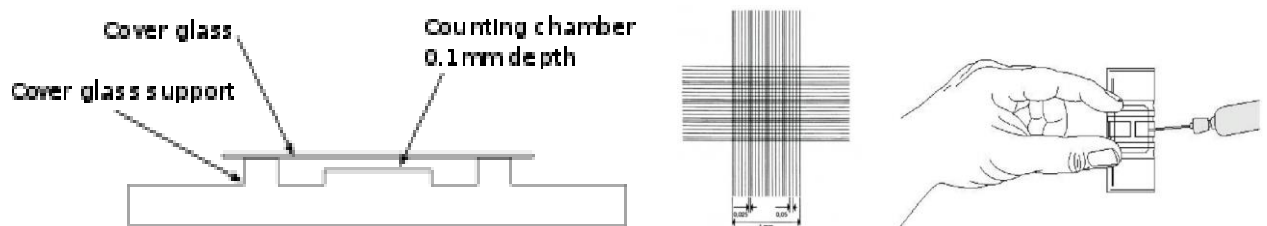


Рис. 10.1 – Схема лічильної камери Горяєва

Мікроскопічна сітка камери Горяєва розкреслена на великі і маленькі квадрати, згруповані різними способами. Сітка містить 225 великих квадратів (15 рядів по 15 великих квадратів в кожному), розграфлених вертикально, горизонтально, хрест-навхрест і без розграфлення. При цьому розміри малих поділок клітини сітки становлять 0,05 мм, а великих – 0,2 мм (рис 10.2.).

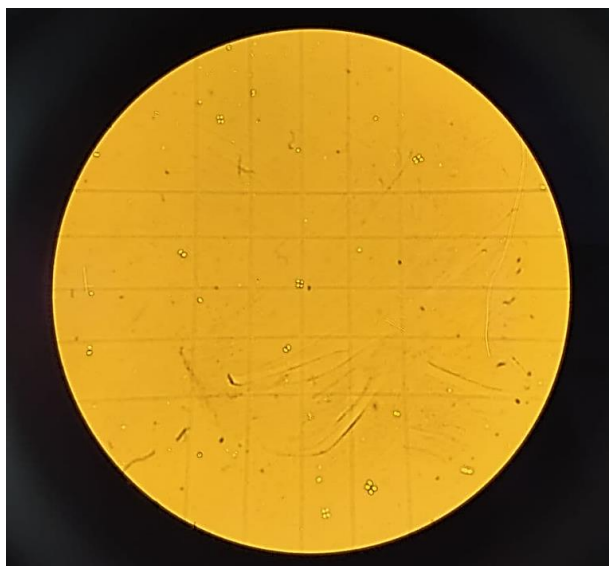


Рис. 10.2 – Мікроскопічна сітка камери Горяєва з клітинами *Chlorella vulgaris* (під мікроскопом Olympus CX1 із застосуванням окуляра 10х та об'єктиву 40х)

Таким чином, площа малого квадрата дорівнює $0,0025 \text{ мм}^2$, а великого квадрата – $0,04 \text{ мм}^2$, обсяг рідини над квадратом, утвореним великими розподілами сітки Горяєва, становить $0,004 \text{ мкл}$. Підрахувавши кількість клітин над великим квадратом, можна підрахувати щільність даного типу клітин в суспензії за формулою 9.1:

$$X = N \cdot 2,5 \cdot 10^5 \quad (10.1)$$

де X – кількість клітин в 1 мл, N – кількість клітин над великим квадратом.

Середнє число клітин мікроорганізмів в одному квадраті множать на розведення. Підрахунок проводять в трьох повтореннях, і за кінцевий результат приймають середнє число підрахованих клітин.

10.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Визначити врожайність клітин мікроорганізмів методом прямого підрахунку клітин в камері Горяєва. Число клітин записують за формою, представленою в наступній таблиці:

Таблиця – Середнє число клітин мікроорганізмів в пробі

Номер проби	Повторність	Число клітин в квадратах за номером										Середня кількість клітин в одному квадраті	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1												
	2												
	3												

2. Зробити висновки.

Хід виконання роботи

Мікроскопування культури водорості *Chlorella vulgaris* для підрахунку клітин проводять під збільшенням ок. 7 x об. 20 (40), використовуючи спеціальну лічильну камеру Горяєва. При щільному зростанні суспензію розбавляють в 10-15 разів дистильованою водою.

При роботі з камерою Горяєва важливо стежити, щоб її робочі поверхні залишалися сухими і чистими. Крім того, при підрахунку клітин не можна допускати наявності повітряних бульбашок на сітці камери, так як вони можуть заважати точності підрахунку.

Контрольні питання

1. Які існують способи оцінки «врожайності» мікрводоростей?
2. У чому полягає сутність методу прямого підрахунку клітин водоростей?
3. Якими є особливості мікроскопування культури водорості за допомогою камери Горяєва.
4. Як проводиться визначення біомаси за оптичною щільністю суспензії?
5. Як здійснюється ваговий метод визначення біомаси мікрводоростей?

Лабораторна робота № 11

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЗРОСТАННЯ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ ПЕРІОДИЧНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ

Мета роботи: Вивчити методику визначення кінетичних характеристик зростання культур мікроорганізмів при періодичному культивуванні

Матеріали й обладнання: бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; імерсійна олія; бактеріальні культури.

11.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Періодичним називають такий метод культивування, коли клітини мікроорганізмів вносять у живильне середовище і далі компоненти середовища не надходять до судини і не видаляються з неї.

Періодичне культивування мікроорганізмів представляє собою найпростіший метод культивування. Під культивуванням мікроорганізмів розуміють їхнє вирощування в найбільш сприятливих (оптимальних) умовах.

Збільшення кількості клітин і клітинної маси в процесі розвитку організму називають зростанням. Це унікальні характеристики всіх організмів.

На ріст організму впливають як фізичні, так і фактори поживного середовища. Фізичні фактори включають рН, температуру, осмотичний тиск, гідростатичний тиск і вологість середовища, в якій росте організм. Фактори

поживного середовища включають кількість вуглецю, азоту, сірки, фосфору та інших мікроелементів, що містяться в середовищі для росту.

Ріст мікробів зазвичай вивчається на популяційному рівні, не на індивідуальному. Окремі клітини діляться бінарним поділом, і тоді з однієї клітини виникають дві дочірні клітини, з двох – чотири і т.п. Кількість мікроорганізмів у культурі буде зростати в геометричній прогресії, доки не буде вичерпано необхідну поживну речовину.

Час генерації – час, необхідний для подвоєння маси клітин. Через це час генерації також називають часом подвоєння (*td*). Популяція подвоюється з кожним поколінням, що являє собою експоненційне зростання (рис. 11.1).

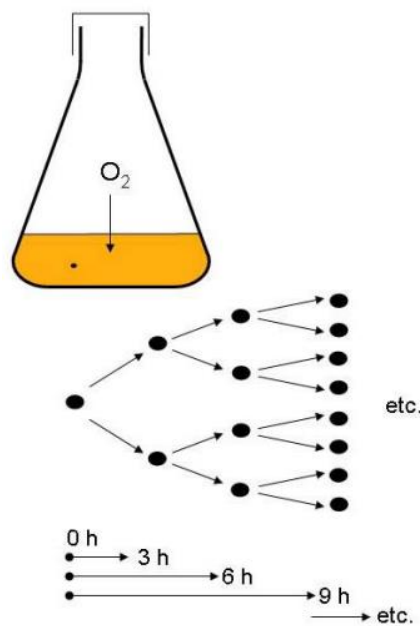


Рис. 11.1 – Схематичне зображення процесу зростання кількості клітин, що почався з однієї клітини

Збільшення кількості клітин в експоненційно зростаючій бактеріальній культурі наближається до геометричної прогресії числа 2. Оскільки одна клітина ділиться, щоб перетворитися на дві клітини, ми виразимо це як $2^0 \rightarrow 2^1$. Оскільки дві клітини стають чотирма, ми виражаємо це як $2^1 \rightarrow 2^2$ і т.д. (рис. 11.1, де час генерації *td* дорівнює 3 год.).

Математика експоненціального зростання. Існує фіксована залежність між початковою та кінцевою кількістю клітин у культурі, і ця залежність може бути виражена математично наступним чином (формула 11.1):

$$X = X_0 2^n \quad (11.1)$$

де *X* – кінцева кількість клітинки (або кінцева оптична густина OD), *X*₀ – початкова кількість клітин (або початкова оптична густина), *n* – кількість поколінь протягом періоду експоненціального зростання.

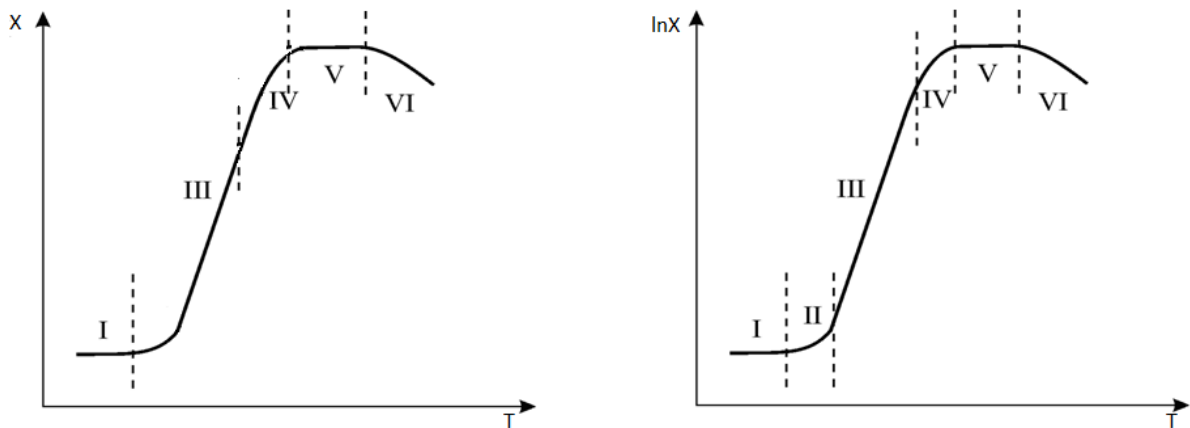
Знаючи початкову і кінцеву кількість клітин в експоненційно зростаючій популяції клітин, можна обчислити *n*, а з *n* та часу *t* – час генерації *td* (формула 11.2):

$$t_d = \frac{t}{n} \quad (11.2)$$

де t – тривалість (час) експоненціального зростання, виражена в днях, годинах або хвилинах.

Для опису зростання мікроорганізмів у *періодичному режимі* зазвичай використовують криву зростання (рис. 11.2). Вона має S-подібний характер. Різні фази зростання такої культури відображають зміни в біомасі та навколишньому середовищі. Тривалість кожного періоду залежить від виду культури, кількості та якості посівного матеріалу, складу живильного середовища та умов культивування.

Періодична культура починається з *лаг-фази*, яка є абсолютно необов'язковою фазою зростання (рис. 11.2, I). У цей період культура адаптується до нового середовища проживання. Тривалість цієї фази залежить від фізіологічних особливостей мікроорганізму, складу поживного середовища та умов культивування.



I – лаг-фаза; II – фаза прискорення зростання; III – фаза експоненційного зростання; IV – фаза уповільнення зростання; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання

Рисунок 11.2 – Фази на кривій зростання періодичної культури

II фаза називається фазою *прискорення зростання*, вона характеризується початком поділу клітин, збільшенням загальної маси популяції та постійним збільшення швидкості зростання культури; зазвичай вона нетривала.

Далі слідує *експоненційна фаза (лог-фаза)*, що найбільшою мірою характеризує і виражає здатність культури до розмноження. Зростання йде з максимально можливою швидкістю, генетично закладеною у клітині, інтервали між появою попереднього та наступного поколінь постійні. Логарифм числа клітин лінійно залежить від часу.

Фаза *уповільнення зростання* може бути дуже різноманітною та найскладнішою. Вона може бути повністю відсутня на простих синтетичних середовищах, коли зростання відразу зупиняється через відсутність одного елемента харчування, особливо – джерела вуглецю та енергії.

Зростання клітин припиняється, і настає **стаціонарна фаза**. Кількість клітин, що знову утворилися, дорівнює кількості клітин, що відмерли.

У якийсь момент ця рівновага порушується, і кількість відмерлих клітин стає більше новостворених, настає VI фаза – фаза **відмирання**. На цій стадії маса живих клітин значно зменшується, оскільки запасні речовини клітини вичерпуються.

11.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання

1. Використовуючи дані таблиці 11.1, побудуйте криву росту мікробної культури за її оптичною густиною.
2. Для оцінки параметрів росту періодичної культури визначте:
 - а) тривалість лаг-фази (графічно);
 - б) питому швидкість росту μ ;
 - в) час генерації t_d ;
3. За даними таблиці 11.2 визначте вихід мікробної біомаси Y .

Хід виконання роботи

З формули 11.2 можна визначити кількість поколінь протягом періоду експоненціального зростання (n):

$$n = \frac{t}{t_d} \quad (11.3)$$

Тому замість рівняння 11.1 можна записати:

$$X = X_o \cdot 2^{t/t_d} \quad (11.4)$$

Позначимо величину $1/t_d$ як v , тоді рівняння буде мати вигляд:

$$\frac{1}{t_d} = v \quad (11.5)$$

Таким чином,

$$X = X_o \cdot 2^{vt} \quad (11.6)$$

За визначенням натурального логарифма число 2 можна записати так:

$$2 = e^{\ln 2} \quad (11.7)$$

Це перетворює рівняння 11.4 у:

$$X = X_o (e^{\ln 2})^{t/t_d} = X_o \cdot e^{(\ln 2/t_d)t} \quad (11.8)$$

- з $\ln 2 = 0,6931\dots$

Для певного виду бактерій час подвоєння (t_d) є своєрідною видоспецифічною, незмінною характеристикою: кожен вид бактерій має певний, генетично фіксований час подвоєння за оптимальних умов росту. Таким чином, час подвоєння при оптимальному зростанні даного виду бактерій можна розглядати як фіксовану величину. Отже, можна визначити нову константу μ :

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0.693}{t_d} \quad (11.9)$$

Або

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (11.10)$$

Нова константа μ називається питомою швидкістю росту або часто просто швидкістю зростання (одиниці: день⁻¹, год.⁻¹ або хв.⁻¹). Тоді рівняння 11.4 буде мати вигляд:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (11.11)$$

Таким чином, швидкість росту – це зміна кількості або маси клітин за одиницю часу.

Взявши натуральний логарифм (а саме \ln), рівняння 11.11 буде мати вигляд:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (11.12)$$

Таким чином, графік залежності $\ln X$ від t дає пряму лінію в експоненційній фазі, нахил якої $= \mu$, що дорівнює:

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (11.13)$$

Таблиця 11.1 – Залежність біомаси X (виражена в одиницях оптичної густини OD) від часу росту мікробів (t) на вуглецевому субстраті

Варіант	Культура	Субстрат	Час росту бактерій, год.											
			0	2	4	6	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>Candida utilis</i>	глюкоза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,20	0,30	0,55	0,60	0,62	0,63	0,64	0,64
2	<i>Rhococcus sp.</i>	фенол	0,05	0,05	0,07	0,08	0,09	0,13	0,20	0,25	0,32	0,34	0,34	0,33
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	метанол	0,07	0,07	0,08	0,10	0,12	0,17	0,22	0,33	0,40	0,43	0,43	0,42
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	сахароза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,18	0,25	0,31	0,38	0,44	0,47	0,48
5	<i>Methylococcus sp.</i>	пропіонат	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08	0,11	0,20	0,30	0,38	0,44	0,44
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	манітол	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09	0,15	0,19	0,28	0,35	0,36	0,36	0,36
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	ацетат	0,05	0,05	0,07	0,08	0,12	0,19	0,24	0,38	0,48	0,49	0,49	0,49
8	<i>Bacillus turing.</i>	глюкоза	0,05	0,05	0,06	0,10	0,20	0,40	0,63	0,80	0,86	0,88	0,88	0,88
9	<i>Candida scotti</i>	мальтоза	0,07	0,07	0,08	0,11	0,15	0,29	0,51	0,78	0,88	0,90	0,90	0,90
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	каприлова кислота	0,06	0,06	0,06	0,07	0,09	0,14	0,18	0,25	0,30	0,33	0,33	0,33

Для розрахунку загального виходу біомаси (Y) залежно від споживання субстрату використовується рівняння:

$$Y = \frac{X}{S - S_0} \cdot 100 \quad (11.14)$$

де X – кінцева концентрація біомаси, S – початкова концентрація субстрату в середовищі (мг/л), S_0 – залишкова (кінцева) концентрація субстрату в культуральному середовищі.

Таблиця 11.2. Кінцева біомаса (X), початкова концентрація субстрату в середовищі (S) і залишкова (кінцева) концентрація субстрату в середовищі (S_0)

Варіант	Культура	Субстрат	Біомаса (X , OD)	C , мг/л	S_0 , мг/л
1	<i>Candida utilis</i>	глюкоза	500	1000	100
2	<i>Rhococcus sp.</i>	фенол	200	500	50
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	метанол	100	250	20
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	сахароза	500	2000	1000
5	<i>Methylococcus sp.</i>	пропіонат	300	2000	900
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	манітол	550	1000	150
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	ацетат	480	2000	800
8	<i>Bacillus turing.</i>	глюкоза	540	1000	80
9	<i>Candida scotti</i>	мальтоза	400	1000	100
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	Каприлова кислота	200	1000	500

Розрахунки записати у зошит, зробити відповідні висновки.

Контрольні питання

1. Чим періодична культура відрізняється від безперервної?
2. Які фактори впливають на зростання культури?
3. Що таке час генерації?
4. У чому суть експоненційного зростання?
5. Який вигляд має криву зростання мікроорганізмів у періодичному режимі і чому?
6. Чим лаг-фаза відрізняється від лог-фази?
7. Що означає стаціонарна фаза у періодичному режимі зростання культури мікроорганізмів?
8. Чим обумовлена поява фази відмирання при періодичному режимі зростання культури мікроорганізмів?

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ СТУДЕНТА

Оцінювання результатів лабораторних робіт студентів проводиться за 100-бальною шкалою.

Робота і звіт з виконання кожної лабораторної роботи оцінюється на **відмінно** (90–100), якщо студент виявив підвищений рівень засвоєння обсягу знань і набуття вмінь, якісно та в повному обсязі виконав завдання. До того ж було підтверджено залучення ним навчального матеріалу на рівні творчого використання; причому завдання виконано ретельно й самостійно, матеріал викладено в логічній послідовності, відсутність мовних помилок, а власні висновки студента відповідають темі лабораторного завдання.

Робота заслуговує на оцінку **добре** (74–89) в тому разі, коли студент показав оволодіння достатнім обсягом знань і вмінь під час виконання завдання; продемонстрував самостійність в отриманні результатів лабораторних робіт, точність і чіткість мови, при цьому в роботі не було зафіксовано помилок, а власні висновки студента відповідають темі лабораторного завдання.

Робота оцінюється на **задовільно** (60–73), коли в поданому студентом матеріалі виявлено змістові й лексичні помилки, зміст роботи викладено не завжди чітко й логічно, але студент виконав лабораторні завдання та виявив знання й уміння в межах навчальної програми.

Робота заслуговує на оцінку **незадовільно** (0–59) з можливістю її повторного виконання, якщо поданий студентом матеріал не відповідає темі завдання, у ньому допущено принципові змістові й лексичні помилки, завдання не виконано, тобто студент не виявив певних знань і вмінь.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
2. Гудзь С.П. Мікробіологія: Підручник: [для студ. вищ. навч. закл.] / С.П. Гудзь, С.О. Гнатюш, І.С. Білінська. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. – 360 с.
3. Технічна мікробіологія / Капрельянц Л.В., Пилипенко Л.М., Єгором Л.В. та ін.; за заг. ред. Л.В. Капрельянца. – Одеса: Друк, 2006. – 308 с.
4. Мікробіологія та фізіологія харчування / Малигіна В.Д., Ракша-Слюсарєва О.А., Ракова В.П. та ін. – К.: Кондор, 2009. - 242 с.
5. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р., Поводзинський В.М., Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв / За ред. Т. П. Пирог. Навчальний посібник. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 464 с.
6. Іутинская Г.О. Ґрунтова мікробіологія: Навчальний посібник. – К.: Арістей, 2006. – 284 с.
7. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу “Основи мікробіології” для напряму підготовки: 6.040106 “Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування”/ С.С. Ставська, В.В. Вембер. Київ: НТУ України «Київський політехнічний інститут», 2012. – 44 с.

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ.....	3
ПРАВИЛА З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.....	3
Лабораторна робота № 1. Правила техніки безпеки при роботі в навчальній мікробіологічній лабораторії. Обладнання мікробіологічної лабораторії.....	5
Лабораторна робота № 2. Стерилізація лабораторного посуду і культуральних середовищ.....	9
Лабораторна робота № 3. Середовища для культивування мікроорганізмів.....	16
Лабораторна робота № 4. Кількісний облік мікроорганізмів навколишнього середовища на МПА.....	21
Лабораторна робота № 5. Виявлення основних морфологічних і фізіологічних властивостей мікроорганізмів.....	27
Лабораторна робота № 6. Виділення чистих культур. Накопичувальні культури.....	32
Лабораторна робота № 7. Визначення чутливості мікробів до антибіотиків методом дифузії в агар із застосуванням дисків.....	35
Лабораторна робота № 8. Морфологічні форми бактерій. Виготовлення препаратів мікроорганізмів.....	38
Лабораторна робота № 9. Дослідження мікрофлори зубного нальоту людини.....	43
Лабораторна робота № 10. Підрахунок кількості клітин мікроорганізмів... 47	47
Лабораторна робота № 11. Визначення кінетичних характеристик зростання культур мікроорганізмів при періодичному культивуванні.....	49
КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ СТУДЕНТА.....	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	55

КЛИМКІНА Ірина Іванівна
ФЕДОТОВ Вячеслав Вікторович

МІКРОБІОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Друкується в редакційній обробці авторів

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка»
49005, м. Дніпро, просп. Д. Яворницького, 19