

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



НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

О.І. Сідашенко, В.В. Федотов

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія»
Частина I «Мікробіологія»**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
спеціальності 091 Біологія та біохімія
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Дніпро
НТУ «ДП»
2023

Сідашенко О.І.

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія». Частина I «Мікробіологія» для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» спеціальності 091 Біологія та біохімія / О.І. Сідашенко, В.В. Федотов; М-во освіти і науки України, НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2023. – 73 с.

Автори:

О.І. Сідашенко, канд.біол. наук, доц.

В.В. Федотов, зав. лабораторією

Затверджено науково-методичною комісією зі спеціальності 091 Біологія та біохімія (протокол № 7 від 17.11.2023 р.) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 4 від 17.11.2023 р.).

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

Відповідальна за випуск завідувачка кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища Борисовська О.О., канд. техн. наук, доц.

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лабораторні заняття з мікробіології та вірусології є одним із найважливіших видів підготовки біологів. Вони сприяють закріпленню теоретичних знань, набуттю навичок лабораторної роботи з мікроорганізмами та біологічними зразками, сприяють засвоєнню специфічних мікробіологічних та вірусологічних прийомів і методів, розвивають навички самостійної практичної роботи, формують вміння грамотно аналізувати отримані результати та дають можливість спостерігати за життєдіяльністю мікроорганізмів.

Лабораторні заняття описані за єдиною схемою: назва теми лабораторної роботи, мета, матеріали та обладнання, коротка теоретична частина, порядок виконання роботи, контрольні запитання.

Керуючись методичними вказівками, кожний студент запов'язаний завчасно до лабораторних занять вивчити принцип проведення роботи і переписати тему, мету та порядок виконання роботи у 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 мають повторити правила техніки безпеки у мікробіологічній та вірусологічній лабораторіях та згадати першу медичну допомогу при нещасних випадках.

Виконання лабораторних робіт спрямовано на досягнення таких дисциплінарних результатів навчання.

❖ Знати та застосовувати методи проведення відбору проб і зразків з метою ідентифікації мікроорганізмів різних систематичних груп. Застосовувати сучасні методи мікроскопічних досліджень;

❖ Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії;

❖ Аналізувати кольоровий ряд Гісса з метою ідентифікації та вивчення властивостей мікроорганізмів;

❖ Знати основні форми взаємовідносин між мікро- та макроорганізмами;

❖ Знати та проводити аналіз антагоністичних взаємодій мікроорганізмів, визначати стійкість до антибіотиків у бактерій, мікробний синтез;

❖ Знати та розуміти особливості структурної організації прокариотичної та еукариотичної клітини.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні правила роботи у мікробіологічній лабораторії

1. У лабораторії повинна дотримуватися ідеальна чистота.
2. Забороняється входити у верхньому одязі та класти на робочі столи сторонні предмети (сумки та інші особисті речі).
3. У мікробіологічній та/або вірусологічній лабораторії дозволяється працювати тільки у спеціальному одязі – халатах, що захищає та попереджує розповсюдженню біооб'єктів поза лабораторного приміщення. Додатково (за необхідністю) – мають бути рукавички, маска для обличчя, захисні окуляри.
4. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.
5. Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельного дотримання правил стерильності. Стіл перед початком роботи варто дезінфікувати.
6. Під час виконання робіт з мікроорганізмами, зберігати тишу, зайвого ходіння, відкривання та закривання дверей, що посилює рух повітря.
7. Дотримуватись правил особистої гігієни та профілактики.
8. На всіх пробірках, колбах, планшетах і чашках Петрі обов'язково пишеться назва мікроорганізмів або вказано матеріал, що міститься, дата, прізвище студента, номер групи.
9. Не можна виносити за межі лабораторії/кафедри будь-які матеріали (пробірки, фарби та ін.).
10. **УВАГА!!!** У лабораторії забороняється вживати їжу, пити воду, тощо.
11. Металеві предмети (бактеріологічні петлі, голки, металеві шпателя після кожного використання пропалюють у полум'ї спиртівки (пальника).
12. Забруднені патологічним матеріалом чи культурою мікробів градуйовані та пастерівські піпетки, скляні шпатели й металеві інструменти після використання опускають у ємкості з дезінфікуючим розчином.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У НАВЧАЛЬНІЙ МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета роботи: ознайомитись з правилами техніки безпеки при роботі у мікробіологічній лабораторії.

Матеріали та обладнання: інструкція з техніки безпеки при роботі у мікробіологічній лабораторії, біобезпека при роботі з культурами мікроорганізмів, журнал з техніки безпеки, мікробіологічний посуд: чашки Петрі, спиртівки, шпателя, мікробіологічні петлі, предметні та покривні скельця, колби різного призначення, мікробіологічні піпетки, планшети, дозатори тощо.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії

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.

Посуд та інвентар для проведення мікробіологічних досліджень. Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд (рис. 1.1, 1.2).

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

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

Колби та пробірки, що використовуються для приготування та стерилізації поживних 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.

Мікробіологічні (бактеріологічні) петлі та голки виготовляють із платиного, нікелевого або хромонікелевого дроту та закріплюють у металевому петлетримачі. Є також петлі для одноразового використання, які не підлягають обробці полум'ям, так як виготовлені із пластикового матеріалу.

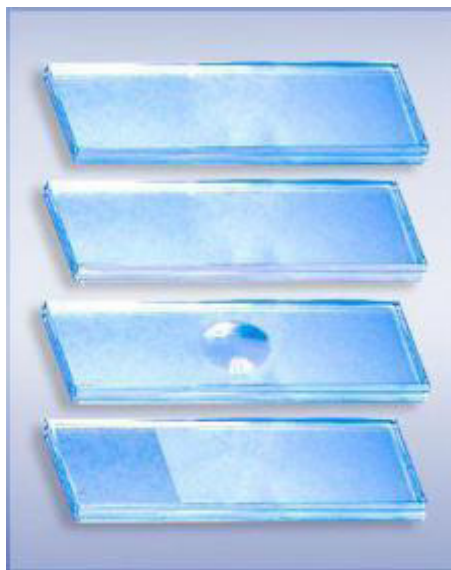


Рис. 1.1. Скельця, що використовують для приготування мікробіологічних препаратів різного призначення

Підготовка мікробіологічної лабораторії до роботи. Проведення дезінфекції. Мікробіолог у більшості випадків має справу з чистими культурами мікроорганізмів, що являють собою потомство однієї клітини. У повітрі та на поверхні предметів лабораторії (робочих столах, інструментах, одязі), а також на руках, волоссі тощо, завжди є велика кількість різноманітної мікрофлори, тому для збереження чистоти досліджуваних культур потрібно дотримуватися правил стерильності. Для цього поживні середовища, посуд, інструменти та все, що має застосовуватися під час виконання лабораторної роботи стерилізують, лабораторію та робочі місця утримують у чистоті й періодично піддають спеціальному обробленню.

У зв'язку з цим, правила роботи у мікробіологічній лабораторії є загальними з будь-якою бактеріологічною лабораторією.

Забезпечити повну стерилізацію лабораторії важко, і це не завжди необхідно. Для знищення мікроорганізмів у повітрі та на різних поверхнях лабораторних приміщень широко застосовують різні способи дезінфекції. Під час дезінфекційного оброблення можуть знищуватися не тільки патогенні, але і сапрофітні форми.

Дезінфекція **повітря** лабораторій найбільш просто здійснюється **прівітрюванням**. Тривала вентиляція приміщення через кватирку (не менше ніж 30-60 хвилин) призводить до різкого зниження кількості мікроорганізмів у повітрі, особливо за умов значної різниці температур між зовнішнім та повітрям приміщення.

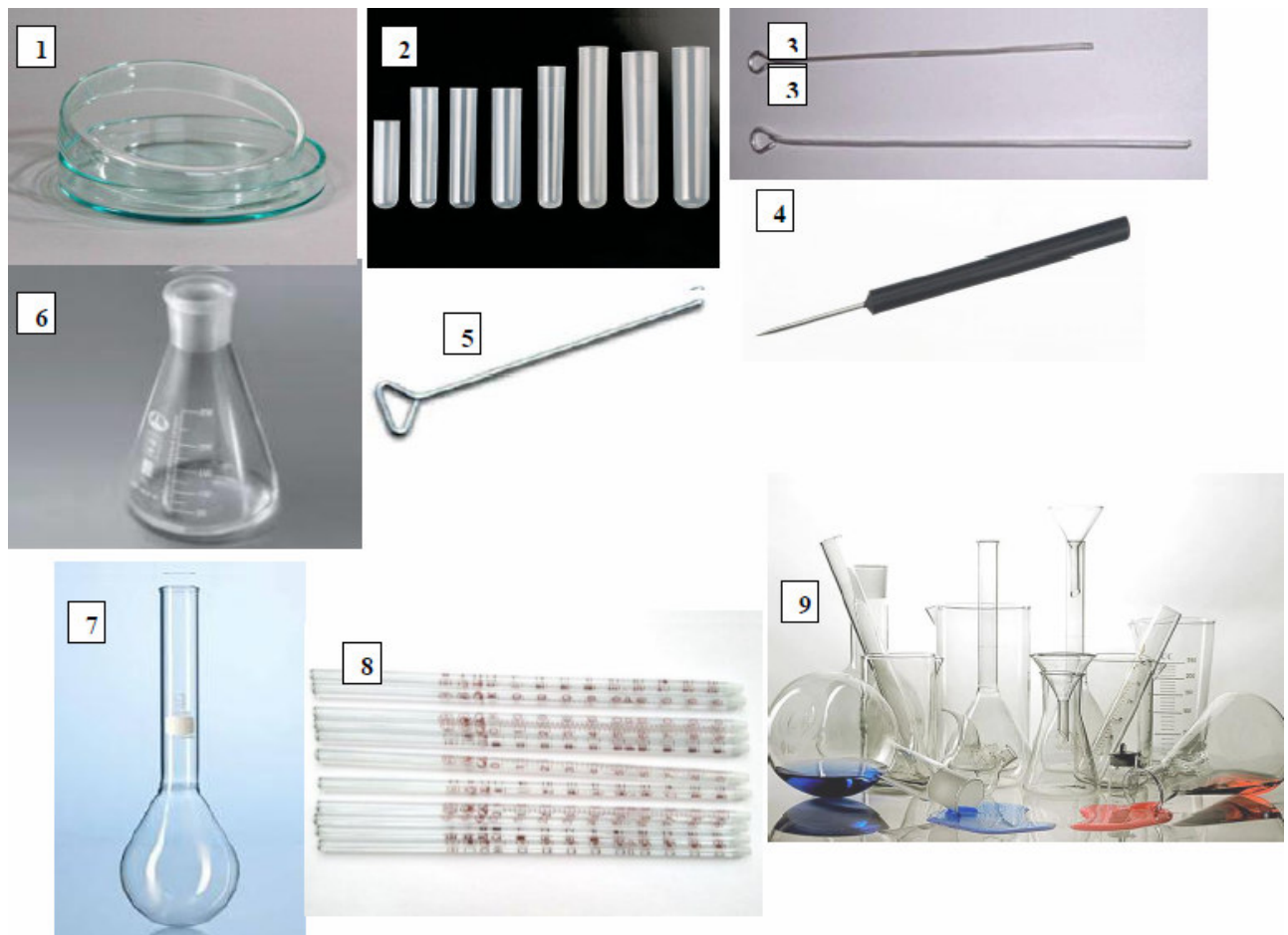


Рис. 1.2. Мікробіологічний посуд:

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

Найефективніший та найчастіше застосовуваний спосіб дезінфекції повітря – *опромінення УФ-променями* протягом 30 хвилин до декількох годин залежно від ступеня забруднення повітря. Як джерело УФ-випромінення використовуються бактерицидні лампи.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Ознайомитись з лабораторними приміщеннями та правилами техніки безпеки під час роботи у навчальній мікробіологічній лабораторії. Законспектувати основні положення техніки безпеки у зошиті.

Основні правила устаткування мікробіологічної лабораторії:

1) Мікробіологічна професійна лабораторія має включати низку приміщень. Основна лабораторна кімната має бути просторою та світлою, мати комбіноване освітлення. Природне освітлення повинно становити щонайменше 110 лк.

2) Підлога і поверхня всіх робочих столів повинна бути покритою матеріалом, що легко миється/дезінфікується та знезаражується.

3) 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.

4) Підлогу можна покривати лінолеумом, кахлем чи фарбувати олійною фарбою.

5) Лабораторні столи повинні мати підведення електроенергії.

6) Приміщення має бути обладнане шафами та полицями для зберігання обладнання, посуду та реактивів.

7) Крім основного робочого приміщення до складу лабораторії входять наступні кімнати: обов'язково – стерилізаційне приміщення та мийна кімната, приміщення для приготування поживних середовищ та реактивів. За потреби – термостатна кімната, холодильне приміщення, віварій тощо. 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.

8) Лабораторія має бути забезпечена холодною та гарячою проточною водою, а також пристрієм для отримання дистильованої води та бідистилату (за потреби).

9) Роботу з мікроорганізмами, вірусами та культурами клітин здійснюють у боксах різних конструкцій – від ізольованих приміщень до настільних камер (ламінарів).

Бокс – це ізольована кімната, розділена перегородкою на дві частини. Вхід у основне, робоче приміщення боксу, здійснюється через тамбур із рухливими дверима, що перешкоджає різкому переміщенню повітря і, отже, занесенню сторонньої мікрофлори. 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 (рис. 1.3).

Правила безпечної роботи із відкритим полум'ям

1. Перед запалюванням спиртівки треба переконатися, що корпус її вирівняний, гніт випущений на необхідну висоту і розгорнутий.

2. Запалену спиртівку не можна переносити з місця на місце; не можна запалювати одну спиртівку від іншої.

3. Гасити спиртівку необхідно, накриваючи полум'я ковпачком.
Задувати полум'я забороняється!!!!

4. У спиртівках використовується тільки етиловий спирт; користуватися іншими рідинами не можна.

5. Брикети (таблетки) сухого пального потрібно запалювати на керамічних пластинках, гасити – ковпачками для спиртівок чи керамічними тиглями. Брикети, що не догоріли, після закінчення роботи потрібно помістити у витяжну шафу.



А



Б

Рис. 1.3. Лабораторні бокси: А – кабінет з вертикальним ламінарним потоком; Б – бокс стерильний лабораторний

Правила та техніка безпеки при роботі з мікроорганізмами:

1) Перед початком роботи предмети на столі необхідно розмістити так, щоб середина стола була не зайнятою. Дезінфекційні розчини для оброблення рук, ємність для піпеток, банка для відходів повинні знаходитися справа від студента на відстані, що дозволяє, не встаючи з робочого місця, обробляти руки, занурювати у дезінфекційний розчин піпетки та інший відпрацьований матеріал;

2) Пальник або спиртівка повинні знаходитись у центрі стола, на відстані 30 см від його краю з боку студента. Об'єкти з посівами, незасіяні живильні середовища розміщують з лівого боку на одному рівні з пальником.

3) Культуру з поверхні агару збирають петлею, металевим, скляним або пластиковим шпателем.

4) Для знезараження бактеріологічну петлю повільно вводять у полум'я (починаючи з петлеутримувача), підсушують залишок матеріалу на ній, потім уводять її у полум'я, прожарюючи до «почервоніння» по всій довжині. *Якщо петлю із залишками матеріалу швидко ввести у полум'я, то він зовні обвуглиться, може відскочити від петлі та впасти на стіл. У середині такого шматочка мікроорганізми залишаються живими. У таких випадках необхідно знайти цей шматочок та обробити його дезінфекційним розчином.*

5) Засіяні чашки виймають із термостата у положенні паралельно поверхні стола або підлоги. Перевертати їх не можна через ризик витікання конденсату.

Робоче місце, де безпосередньо здійснюється робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельного оброблення. Стіл потрібно дезінфікувати не тільки перед початком роботи, але й після її закінчення. Спирти можуть використовуватися для дезінфекції рук. Поверхню робочого столу можна дезінфікувати також УФ-променями після вологого прибирання.

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 різні сучасні дезінфікуючі засоби.

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

3. Самостійно ознайомитись 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). У лабораторії приготувати робочий розчин «Деланолу» у концентрації 0,1 % (за препаратом).

Контрольні питання

1. Що визначає специфіку облаштування мікробіологічної лабораторії та правила роботи мікробіолога? Що таке правила дотримання стерильності?

2. Які приміщення мають входити до складу мікробіологічної лабораторії? Які вимоги висувають до основної лабораторії?

3. Опишіть призначення основних приміщень, що входять до складу лабораторії: автоклавна, термостатна та стерилізаційна кімнати.

4. Що таке ламінарний бокс?

5. Назвіть лабораторний посуд та основне обладнання, що потрібне для проведення мікробіологічних досліджень.

6. Перерахуйте основні правила роботи у мікробіологічній лабораторії.

7. Що таке дезінфекція, для чого вона проводиться? Як приготувати 1 % робочий розчин дезінфікуючого засобу?

8. Назвіть основні дезінфікуючі способи та засоби, що застосовують у лабораторії.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

СУЧАСНІ МЕТОДИ МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. ПРОСТЕ ЗАБАРВЛЕННЯ

Мета роботи: оволодіти простими способами мікроскопії, правилами роботи з імерсійною системою мікроскопа та приготуванням тимчасових і фіксованих пофарбованих препаратів.

Матеріали та обладнання: природні субстрати (кефір, йогурт, біогумус, розсіл квашеної капусти тощо), чисті культури мікроорганізмів, мікроскопи, стерильні піпетки на 1-2 мл, бактеріологічні петлі, пінцети, тонкі предметні та покривні скельця, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, розчини метиленового синього (1:40), фуксину основного, генціанвіолета, імерсійна олія, серветки, фільтрувальний папір, дистильована вода.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати та застосовувати методи проведення відбору проб і зразків з метою ідентифікації мікроорганізмів різних систематичних груп. Застосовувати сучасні методи мікроскопічних досліджень.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1.1.1 Будова мікроскопа

Будова оптичного мікроскопа. Мікроскоп – це оптичний прилад, що збільшує предмети у 40-1500 разів; складається з механічної, оптичної та освітлювальної систем (рис. 2.1).

До *механічної частини* мікроскопа відноситься: штатив з предметним столиком, тубус, револьвер, механізм наведення різкості (макрометричний і мікрометричний гвинти).

Оптична частина мікроскопа складається з освітлювальної системи, об'єктива та окуляра.

Освітлювальна система містить дзеркало з двома поверхнями (увігнутою та плоскою) або джерело світла і конденсор.

Об'єктив складається із системи лінз, укладених у металеву оправу. Сухі об'єктиви збільшують у 10 та 40 разів (між об'єктивами і препаратом знаходиться шар повітря), імерсійні – у 90-100 разів. На оправу кожного об'єктива нанесена цифра, яка вказує збільшення. Збільшення об'єктива залежить від фокусної відстані головної – фронтальної лінзи. Чим більше кривизна фронтальної лінзи, тим коротше фокусна відстань, тобто тим нижче треба опускати об'єктив над площиною препарата. Інші лінзи називаються корекційними, вони необхідні для усунення сферичної і хроматичної аберацій. Чіткість одержуваного зображення характеризується роздільною здатністю мікроскопа.

Замінюючи повітряне середовище між лінзою об'єктива та об'єктом мікроскопічного дослідження на імерсійну речовину (імерсійна олія), можна підвищити роздільну здатність, оскільки показник заломлення світла для імерсійної олії, дорівнює 1,515, а для повітря – 1,0. Окрім того, показники заломлення імерсійної олії та скла (1,52) майже однакові, що зумовлює відсутність заломлення променів і потрапляння їх в об'єктив без зміни напрямку. У зв'язку з дуже малими розмірами мікроорганізмів для їх вивчення головним чином використовують імерсійні об'єктиви.

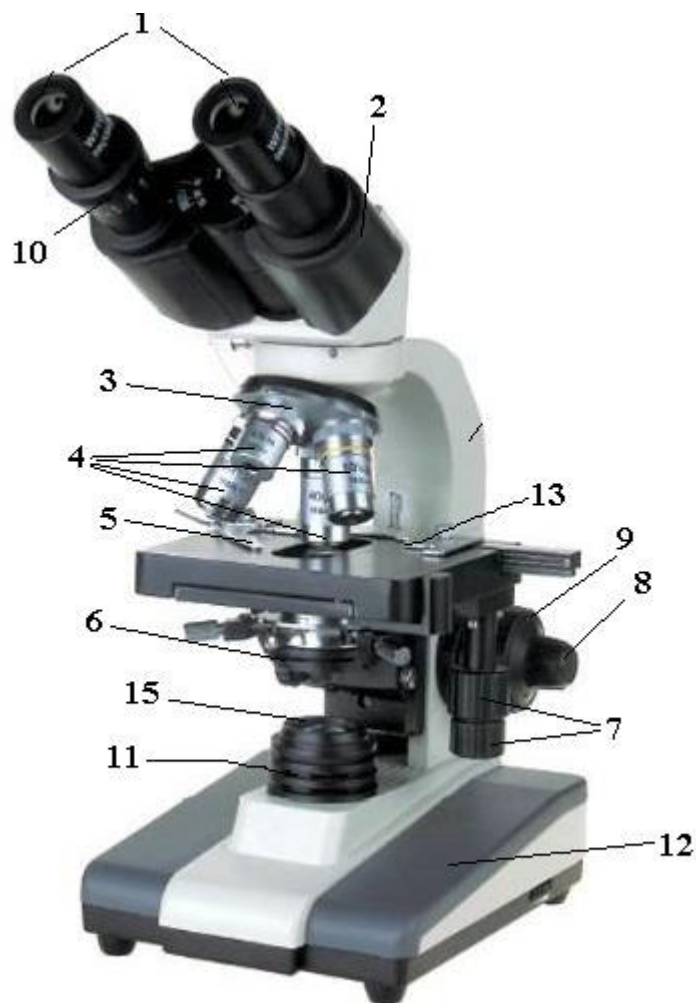


Рис. 2.1. Мікроскоп з бінокулярною насадкою і вбудованим у підставку освітлювачем з галогенною лампою і блоком живлення: 1 – окуляри; 2 – бінокулярна насадка; 3 – револьверний пристрій; 4 – об'єктиви; 5 – предметний столик; 6 – конденсор; 7 – рукоятка переміщення предметного столика у двох взаємо-перпендикулярних напрямленнях; 8 – рукоятка тонкого фокусування; 9 – рукоятка грубого фокусування; 10 – тубус; 11 – рукоятка регулювання яскравості горіння лампи; 12 – основа мікроскопа; 13 – препаратолодій; 14 – гвинтовий упор (обмежувач переміщення предметного столика при фокусуванні); 15 – джерело світла

1.1.2. Види мікроскопії:

1. Фазово-контрастна мікроскопія. Більшість препаратів живих мікроорганізмів слабконтрастні, тобто клітини мало відрізняються за забарвленням і прозорістю від навколишнього середовища.

Спеціальний фазово-контрастний пристрій дозволяє оптичним шляхом перетворювати розходження за фазою у зміни амплітуди, у результаті чого живі прозорі об'єкти стають *контрастними*, їх можна побачити оком. Головна цінність методу фазового контрасту полягає у можливості спостерігати за живими мікроскопічними об'єктами без фіксації та фарбування. Метод дозволяє бачити прозорі об'єкти чіткіше та виявляти деякі структури бактерій без збільшення роздільної здатності мікроскопа.

2. Мікроскопія у темному полі. Для дослідження об'єктів малої величини використовують темнопольну мікроскопію. Мікроскопія у темному полі ґрунтується на освітленні об'єкта непрямими променями світла. Ці промені не потрапляють в об'єктив, тому поле зору темне на вигляд. Якщо у препараті є клітини мікроорганізмів, то косе проміння, проходячи крізь нього, значною мірою відбивається від поверхні клітин і настільки відхиляється від свого початкового напрямку, що потрапляє в об'єктив. Тоді дослідник бачить на чорному фоні об'єкти, які інтенсивно світяться, навіть якщо їх діаметр у 10 разів менший, ніж межа розділення об'єктива. Такого освітлення препарату можна досягнути, використовуючи спеціальний конденсор.

3. Конфокально-лазерна скануюча мікроскопія (рис. 2.2) дозволяє створювати тривимірне (або чотиривимірне з урахуванням часу) зображення зразка з елементами об'ємної реконструкції, анімації та кількісного аналізу. Один із найбільш сучасних методів мікроскопії.



А



Б

Рис 2.2. Сучасне обладнання для проведення мікроскопії: А – лазерний скануючий мікроскоп; Б – цифровий мікроскоп

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

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Розрізняють два типи мікробіологічних препаратів: тимчасові та фіксовані.

1. Приготувати та провести мікроскопічне дослідження прижиттєвих (тимчасових) препаратів мікроорганізмів:

Метод «роздавленої краплі»

1. На чисте знежирене предметне скло (рис. 2.3) мікробіологічною петлею наносять краплю суспензії мікроорганізмів. Якщо бактеріальна суспензія «густа», тобто у культурі розвинулося дуже багато бактерій, її розводять ізотонічним розчином (0,9 % NaCl).

2. Покривне скло ставлять на ребро з краю краплі та поступово опускають на неї. Між предметним та покривним скельцями не повинно залишатися пухирців повітря, які заважатимуть мікроскопії. У якісно приготованому препараті, крапля повинна бути невеликою, щоб після «роздавлення» рідина не виступала за краї покривного скла.

3. Препарат розглядають із сухою системою.

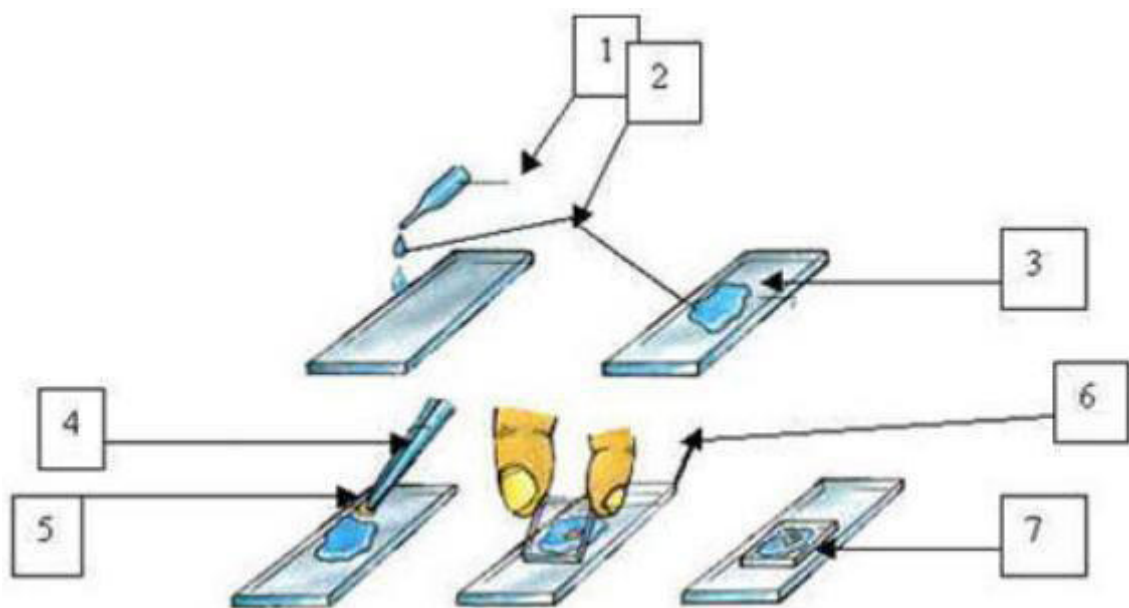


Рис. 2.3. Виготовлення препарату «роздавлена крапля»:

За допомогою піпетки (1) крапля води (2) наноситься на середину чистого знежиреного скла (3), у неї за допомогою бактеріологічної петлі (4) вносять культуру мікроорганізмів (5), не допускаючи розтікання рідини (6) краплю обережно накривають покривним склом (7).

Метод «вісячої краплі»

Препарат «вісяча крапля» використовують для виявлення рухливості мікроорганізмів. Крім того, можна довгостроково спостерігати за їх процесами життєдіяльності: розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо.

1. На чисте покривне скло наносять краплю ізотонічного розчину (0,9 % NaCl) та за допомогою бактеріологічної петлі вносять культуру мікроорганізмів.

3. Знежирюють предметне скло з лункою, при цьому краї лунки змащують тонким шаром вазеліну за допомогою зубочистки або скляної палички.

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

5. Охайно перевертають мазок покривним склом догори та поміщають препарат на предметний столик. Крапля має вільно висіти у луночці, вона довго не висихає, що дозволяє тривалий час спостерігати за рухливістю мікробних клітин (рис. 2.4).

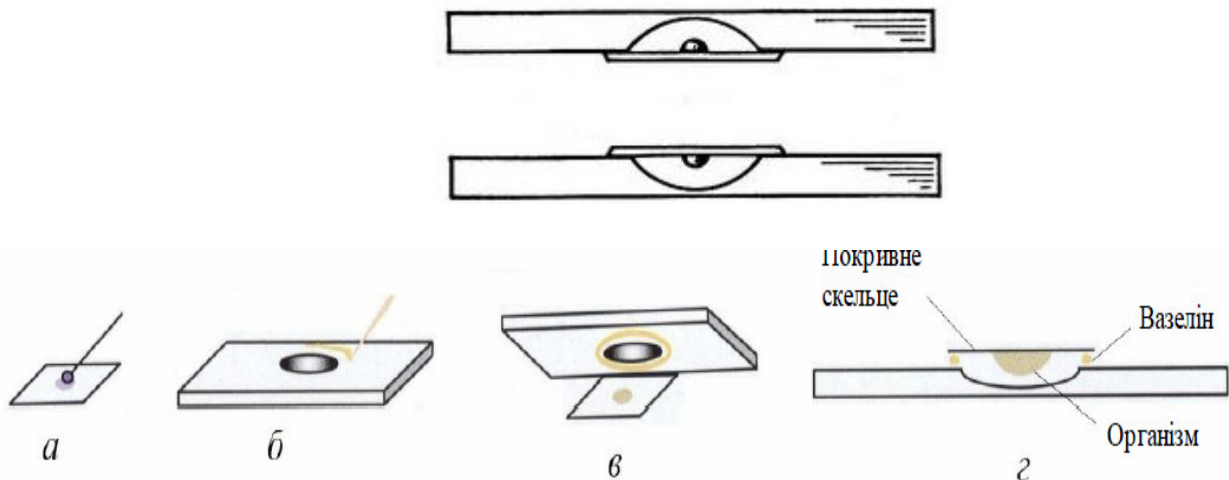


Рис. 2.4 Препарат «висяча крапля»: а – крапля отриманої бактеріальної суспензії; б – предметне скло з лункою; в – з'єднання покривного та предметного скельців; г – готовий мікробіологічний препарат

При цьому методі, фарбування об'єкта проводять «прижиттєвими» барвниками – вітальне забарвлення. До таких барвників відносять: метиленовий синій, нейтральний червоний у концентраціях від 0,001 до 0,0001 %.

Препарат «відбиток»

Ці препарати є зручними для вивчення природного розташування клітин у колонії мікроорганізмів та, особливо, для дослідження форми спор і спорноспів актиноміцетів та грибів.

З агаризованої пластинки, на якій мікроорганізми вирости суцільним газоном, вирізають скальпелем невеликий блок і переносять на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмом була повернута догори. Потім до газону прикладають чисте покривне скло і негайно знімають. Отриманий препарат поміщають відбитком до низу у краплю води (можна у краплю метиленового синього) на предметне скло і розглядають під мікроскопом із сухою системою. Такий відбиток можна одержати і на предметному склі, якщо торкнутися поверхні колонії предметним склом. Отримані препарати можна фіксувати та забарвлювати будь-яким способом.

4. Приготувати для мікроскопічного дослідження препарати фіксованих забарвлених клітин мікроорганізмів *простим способом* (рис. 2.5).

Фіксовані забарвлені препарати використовуються для кількісного обліку мікроорганізмів, перевірки чистоти культури, визначення морфології тощо. Ці препарати можуть зберігатися довгий час.

Розрізняють прості та диференційні способи фарбування мікроорганізмів. У разі *простого забарвлення* змінює колір уся клітина і стають добре помітні її форма та розміри. За *диференційного забарвлення* змінюється колір не всієї клітини, а певних її структур. За допомогою диференційного забТаким способом виявляють певні клітинні структури, запасні речовини та включення.

Для *простого забарвлення* клітин мікроорганізмів найчастіше використовують фуксин, генціановий фіолетовий, метиленовий синій. Приготування препарату передбачає такі етапи: приготування мазка, висушування, фіксацію та фарбування. Фіксовані забарвлені препарати розглядають за допомогою імерсійного об'єктива.

Приготування мазка

1. За допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки нанести на *знежирене* предметне скло краплю суспензії мікроорганізмів.

Матеріал із густого поживного середовища узяти бактеріологічною петлею і внести його у краплю стерильного ізотонічного розчину (0,9% NaCl). Матеріал рівномірно тонким шаром розподілити на площі 1-2 см².

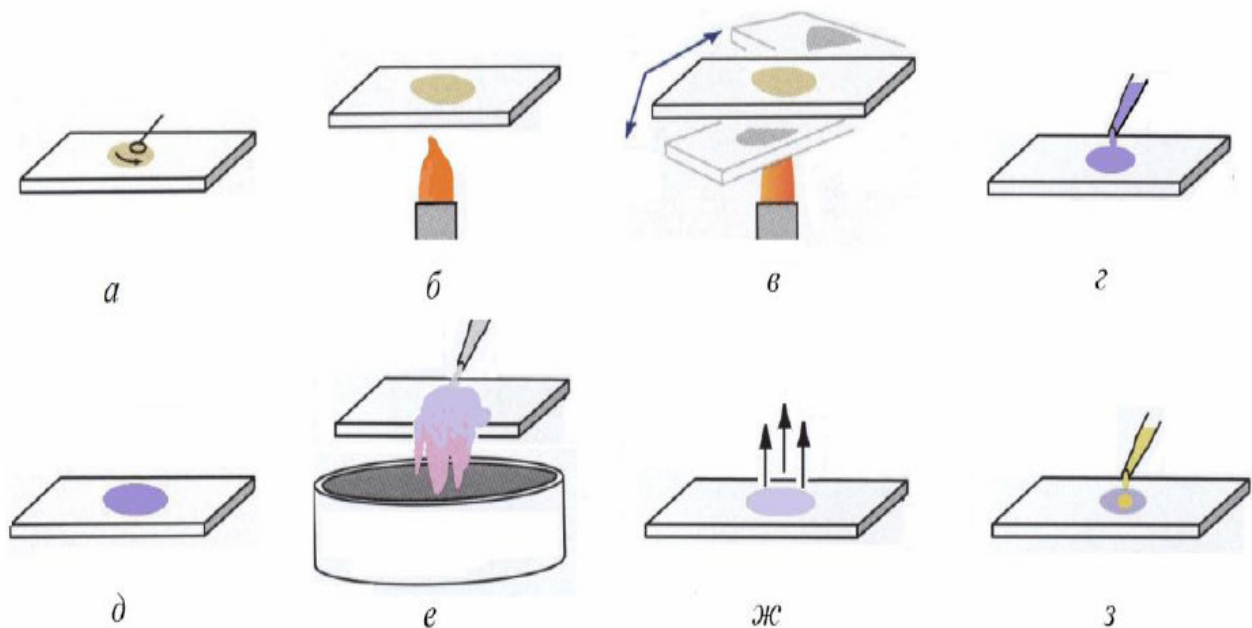


Рис. 2.5. Приготування фіксованого забарвленого препарату: а – нанесення бактеріальної суспензії; б – підсушування мазка; в – фіксація ; г – нанесення барвника; д – забарвлення мазка; е – змивання барвника з мазка; ж – висушування за кімнатної температури; з – отримання готового препарату та нанесення на нього імерсійної олії

Висушування мазка

Висушити приготовлений мазок при кімнатній температурі. Тонкий мазок висихає дуже швидко. Якщо висушування мазка повільне, препарат можна злегка нагріти у струмені теплого повітря, тримаючи предметне скло високо над полум'ям спиртівки. Цю операцію виконують дуже обережно, не перегріваючи мазка, інакше клітини мікроорганізмів деформуються.

Фіксація

Фіксація забезпечує прикріплення клітин до скла; робить мазок більш сприйнятливим до забарвлення, оскільки мертві клітини забарвлюються краще, ніж живі; забезпечує безпечність препарату. Найпростіший та розповсюджений спосіб фіксації – **термічне оброблення**. Після висушування мазок фіксують у полум'ї пальника: тримаючи скло мазком догори, тричі провести його через гарячу частину полум'я пальника. Щоб уникнути перегрівання, час прямого впливу полум'я не має перевищувати 3-4 с. Фіксацію також можна виконувати хімічними речовинами, для цього використовують 96%-ний етиловий спирт (час фіксації 5-10 хвилин), суміш Нікіфорова (спирт: ефір – 1:1; час фіксації 10-15 хвилин); ацетон (5 хвилин) та ін.

Забарвлення

Фіксований препарат помістити мазком догори на місток із двох паралельних скляних паличок, з'єднаних гумовими трубками, що знаходяться на стінках кювети чи кристалізатора. Нанести на нього 2-3 краплі барвника (**кінець піпетки не має торкатися мазка!**) на 2-3 хв. Для одержання більш чистих препаратів барвник наливають на мазок, покритий фільтрувальним папером. Після закінчення фарбування, препарат промивають водою доки вода стане безбарвною. Потім препарат висушують та промокають фільтрувальним папером.

5. Виконати мікроскопію з імерсією фіксованого та забарвленого препарату мікроорганізму.

Правила роботи з імерсійним об'єктивом.

Після установаження освітлення приготовлений сухий пофарбований препарат спочатку розглядають із невеликим збільшенням під об'єктивом сухої системи (8x, 40x). Знайшовши найбільш вдале місце на ньому, препарат закріплюють затискачами на столику мікроскопа. Тубус мікроскопа піднімають і, повертаючи револьвер, установажують імерсійний об'єктив. Потім у центр препарату на мазок, не знімаючи зі столика мікроскопа, наносять краплю імерсійної олії і, дивлячись збоку, обережно опускають тубус мікроскопа до занурення об'єктива в олію. Після цього, дивлячись в окуляр, макрометричним гвинтом повільно піднімають об'єктив до появи у полі зору досліджуваного об'єкта. Фокус уточнюють за допомогою мікрометричного гвинта.

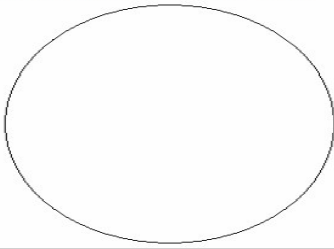
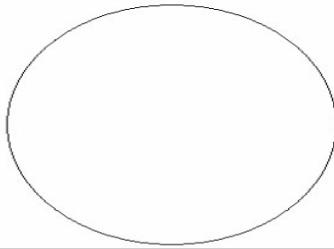
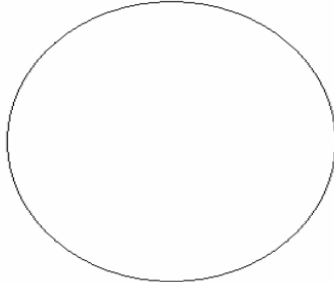
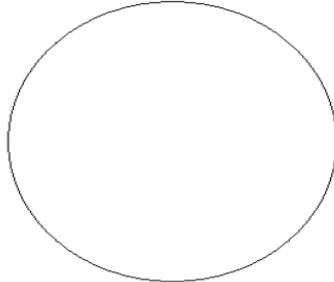
Після роботи імерсійну олію негайно видаляють з об'єктива серветкою, змоченою спеціальним розчином.

У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а пофарбованими є лише клітини мікроорганізмів.

Препарати, перш ніж вимити, поміщають у посудину з дезінфікуючим розчином.

6. Вивчити приготовані тимчасові та фіксовані препарати. Результати занести до протоколу у вигляді рисунків як наведено у приладі оформлення.

Зробити висновки.

Рисунок дослідженого прижиттєвого препарату _____ (назва препарату, мікроорганізму латинською мовою)	
«Висяча крапля», збільшення $\times 40$ 	«Роздавлена крапля», збільшення $\times 90$ 
Рисунок дослідженого фіксованого препарату _____ (назва препарату, мікроорганізму латинською мовою)	
Рисунок дослідженого фіксованого препарату _____ (назва препарату, мікроорганізму латинською мовою)	
Барвник _____ Збільшення \times 	Барвник _____ Збільшення \times 

Контрольні питання:

1. Назвіть правила роботи з мікроскопами та особливості імерсійної системи. Наведіть будову мікроскопа.
2. Опишіть сучасні види мікроскопії.
3. Які види мікробіологічних препаратів існують, яка їх головна відмінність.
4. Які барвники можна застосовувати для прижиттєвого забарвлення мікроорганізмів?
5. Опишіть процес приготування тимчасових препаратів: «роздавлена» та «висяча» краплі, препарат відбиток.
6. З якою метою виготовляють тимчасові та фіксовані препарати?
7. Назвіть основні стадії приготування фіксованого препарату.
8. Які способи фіксації препаратів існують.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ФОРМ БАКТЕРІЙ

Мета роботи: вивчити морфологічні форми бактерій

Матеріали та обладнання: природні субстрати (кефір, йогурт, настій сіна, біогумусу, розсіл квашеної капусти або огірків тощо), чисті культури мікроорганізмів та постійні препарати з культур мікроорганізмів різних морфологічних груп (*Streptococcus lactis*, *Micrococcus lisodeikticus*, *Lactobacillus acidophylum*, *Streptomyces recifensis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacterium plantarum*, *Bacillus subtilis* тощо), культури актиноміцетів, що виростили на чашках Петрі, мікроскопи, стерильні піпетки на 1-2 мл, бактеріологічні петлі,

пінцет, тонкі предметні скельця, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, крапельниці з барвниками: метиленовий синій (1:40), водний розчин фуксину основного, генціанвіолет, імерсійна олія, серветки, фільтрувальний папір, дистильована вода.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання**:

- Знати та розуміти особливості структурної організації прокариотичної та еукаріотичної клітини.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Морфологія бактерій.

Бактерії за формою поділяють на: сферичні або шароподібні, циліндричні або паличкоподібні, спіральні, нитчасті та незвичайної форми (рис. 3.1).

Сферичні бактерії або шароподібні (рис. 3.1, 3.2) – коки мають форму правильної кулі. Їх розміри знаходяться у межах 1,2-5,0 мкм. Переважно це нерухомі клітини, які не утворюють ендоспор. Виділяють наступні групи.

Мікрококи (лат. *micro* – маленький) – у природі зустрічаються у вигляді поодиноких клітин (*Micrococcus agilis*).

Диплококи (лат. *diploos* – подвійний) – коки, що розташовані по парно (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Azotobacter chroococcum*).

Тетракоки (лат. *tetra* – чотири) – угруповання коків, що розташовуються по чотири (*Tetracoccus casei*, *Tetracoccus mycodermais*, *Pediococcus acidilactici*).

Стрептококи (лат. *streptos* – ланцюжок) – бактерії, які внаслідок поділу клітин у одній площині утворюють різної довжини ланцюжки (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus mutans*).

Стафілококи (лат. *staphylo* – гроно) – скупчення коків у вигляді грон винограду (*Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*).

Сарцини (лат. *sarceo* – з'єдную) – коки, які діляться у трьох взаємоперпендикулярних площинах, внаслідок чого утворюються пакети з 8, 16, 32 і т.д. клітин (*Sarcina ureae*, *Sarcina ventriculi*, *Sarcina flava*).

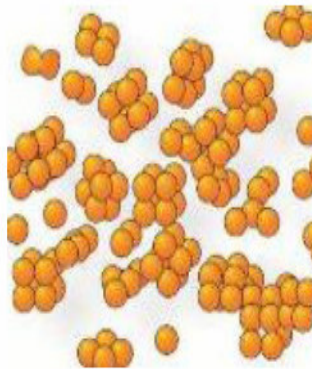
Всі коки за винятком *Streptococcus lactis* зручно мікроскопіювати за допомогою фіксованих та забарвлених фуксином препаратів.

Найрізноманітнішою та найчисельнішою групою бактерій є **паличкоподібні (циліндричні)** форми (рис. 3.3. Д, Е, Є; 3.4). Їх поділяють на дві групи: бактерії – нездатні до спороутворення палички (*Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*, *Acetobacter aceti*) і бацили – палички, які утворюють спори (*Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tetani*).

Паличкоподібні бактерії розрізняють за розміром клітини, їх розташуванням, обрисом кінців клітини, за наявністю чи відсутністю джгутиків.



Streptococcus mutans



Sarcina lutea

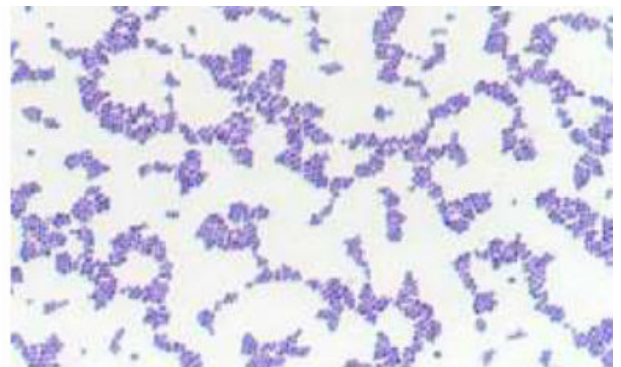


Staphylococcus aureus

Рис. 3.1 Кокові форми бактерій



А



Б



В



Г

Рис. 3.2. Різноманітні представники кокових форм мікроорганізмів: А – *Streptococcus mutans*; Б – *Staphylococcus aureus*, В – *Neisseria gonorrhoeae*; Г – *Micrococcus lutea*.

Довжина клітин паличкоподібних бактерій коливається від десятих частин мкм до 10-15 мкм і більше, діаметр клітин від 0,5 до 1,0 мкм. Розташовуються поодинокі, чи попарно з'єднуються у ланцюжки, в останньому випадку їх називають відповідно *стрептобактерії* та *стрептобацили*. Спори різних бактерій відрізняються за формою, розмірам і розташуванням у клітині.

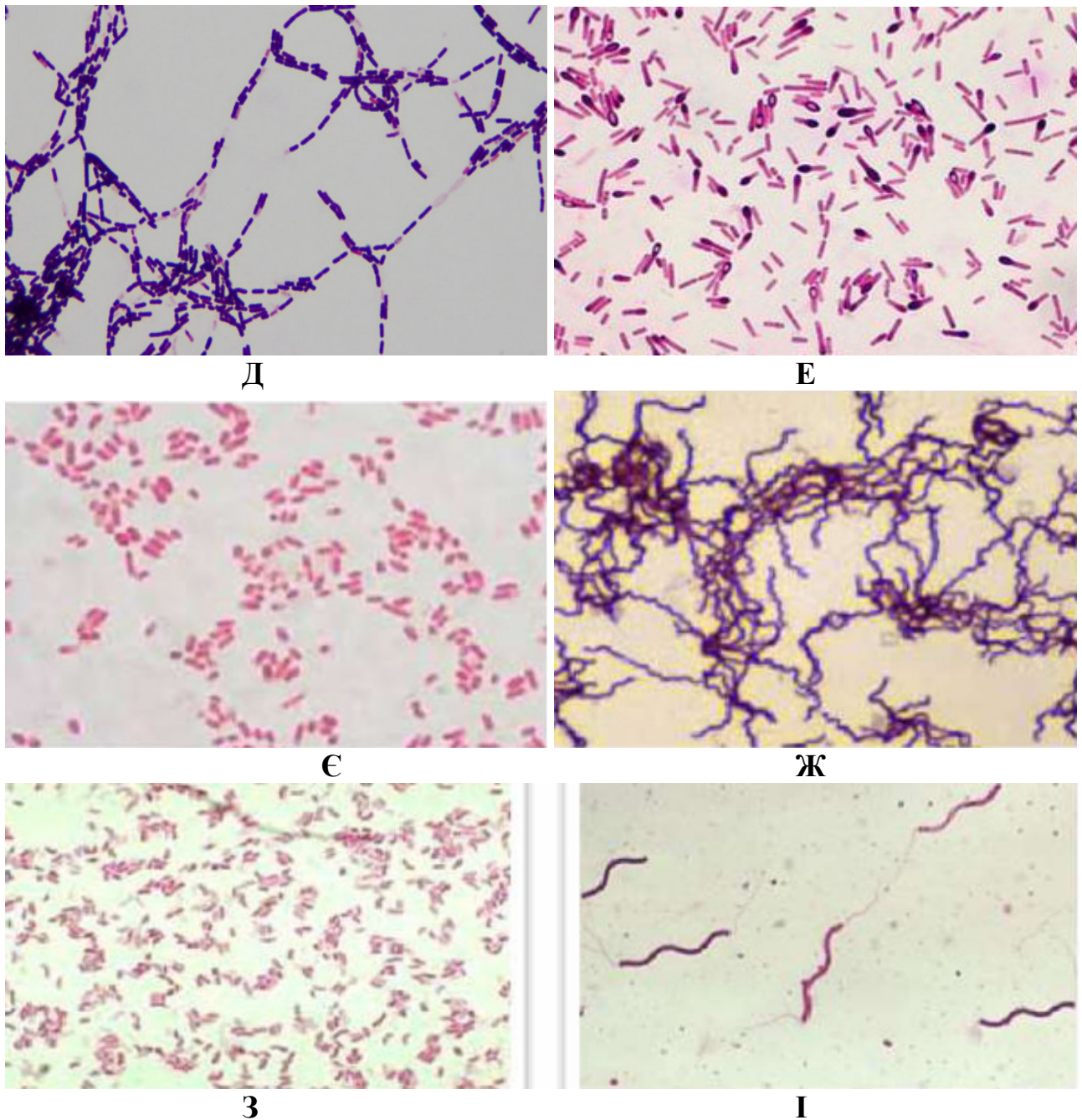
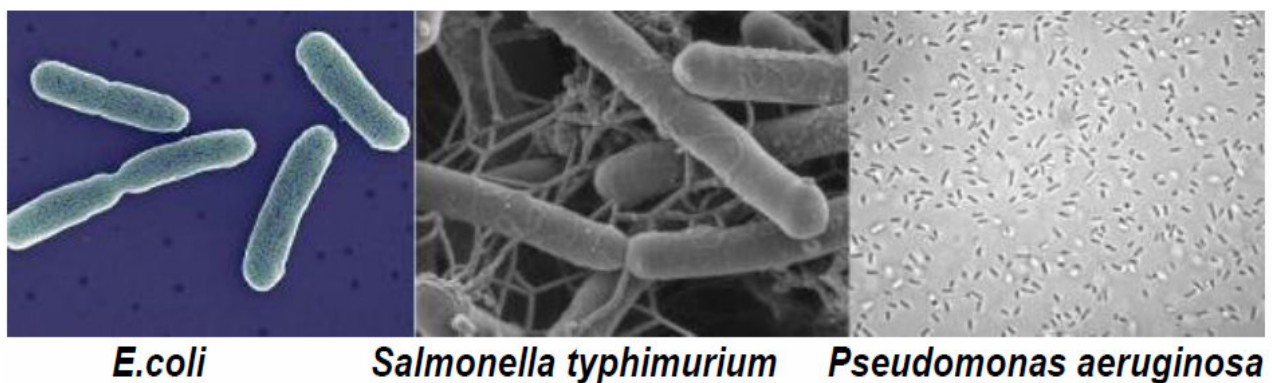


Рис. 3.3. Паличкоподібні та спіральні форми бактерій: Д – *Bacillus subtilis*; Е – *Clostridium botulinum*; Є – *Escherichia coli*; Ж – *Treponema pallidum*; З – *Vibrio cholerae*; І – *Spirillum volutans*

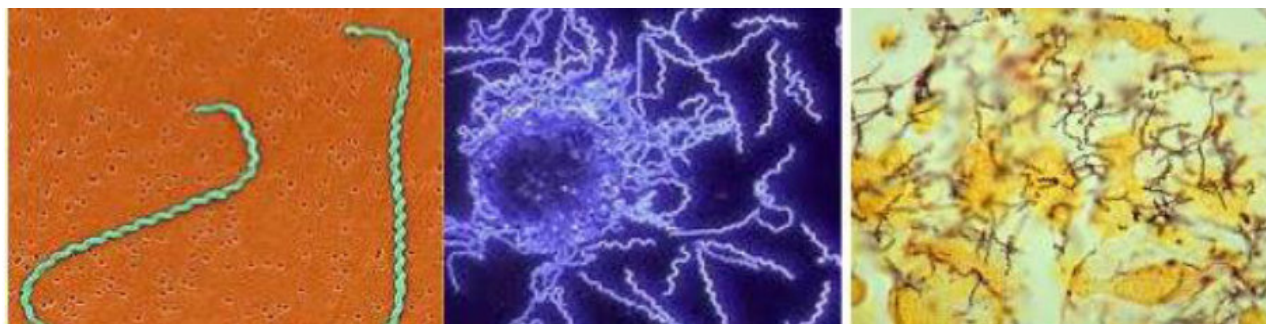


E.coli

Salmonella typhimurium

Pseudomonas aeruginosa

Рис. 3.4 Паличководні форми бактерій



Leptospira interrogans *Borrelia burgdorferi* *Treponema pallidum*

Рис. 3.5. Спіральні форми бактерій

Звивисті або спіральні форми – залежно від кількості завитків, розрізняють вібріони, спірили і спірохети (рис. 3.3 Ж, 3, І; 3.5).

Спірили – на відміну від вібріонів їх клітини довші, товстіші, звивистіші. Спірили можуть утворювати один або кілька завитків – у вигляді літер С, S або спіралі (*Rhodospirillum rubrum*, *Spirillum volutans*, *Thiospira winogradskyi*).

Вібріони – злегка вигнуті палички у вигляді коми (*Vibrio cholerae*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Desulfovibrio desulfuricans*).

Спірохети – довгі та тонкі клітини з великою кількістю малих, але крутих завитків, що зумовлене відсутністю твердої клітинної стінки та специфічним характером руху. Довжина спірохет перевищує товщину у 5-200 раз (*Treponema pallidum*, *Leptospira dentium*).

Нитчасті форми (рис. 3.6), до яких відносять актиноміцети (*Actinomycetales*) – це група мікроорганізмів, що займає проміжне положення між бактеріями і грибами. Вони одноклітинні та мають прокаріотичну будову клітини, як бактерії, але утворюють міцелій, як гриби; діаметр ниток у них дуже малий, як у бактерій (не більше 0,5 – 0,8 мкм), але гіфи міцелію довгі та гіллясті, як у грибів.

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

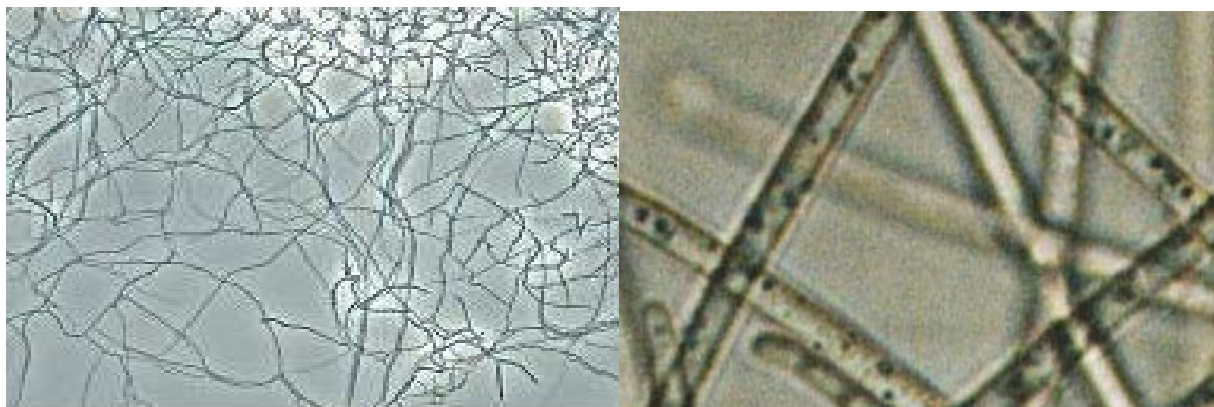


Рис. 3.6. Нитчасті форми бактерій

У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин можуть бути вкриті спільною оболонкою (піхвою) і утворювати трихом (*Thiothrix nivea*, *Beggiatoa alba*, *Beggiatoa gigantea*). Нитчасті форми розповсюджені у мулі, ґрунті та водоймах, особливо з високим вмістом заліза. У водоймах найчастіше зустрічається залізобактерії роду *Leptothrix*, які окислюють закисні форми заліза в окисні. При цьому накопичується гідроксид заліза, який надає бактеріям жовтувато-бурого забарвлення.

Бактерії незвичайної форми морфологічно різноманітні – тороїдальні (замкнені та незамкнені кільця), зіркоподібні, тубероїдальні (паличкоподібні бактерії зі сферичним роздуттям), червоподібні із загостреними кінцями, стеблові, плоскі у вигляді квадратних пластинок або інших геометричних форм.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Для вивчення морфології бактерій заздалегідь приготувати настої різних природних субстратів: м'яса, риби, білка яйця, сіна, борошна, овочів, фруктів та ін. Для цього невелику кількість матеріалу подрібнюють, поміщають у склянку, на кінчику скальпеля додають трохи крейди і заливають водопровідною водою на 2/3 об'єму склянки, витримують у термостаті при температурі 25-28°C. За цей час у середовищі накопичуються різноманітні мікроорганізми.

2. Приготувати та дослідити препарати живих клітин мікроорганізмів із природних субстратів та чистих культур мікроорганізмів:

- за методом «роздавленої краплі» – із кисломолочних продуктів;
- «висяча крапля» – із гнилого м'яса, риби, настою біогумусу;
- «препарат-відбиток» одного з представників актиноміцетів.

У якості прижиттєвих барвників можна використовувати метиленовий синій, нейтральний червоний у концентраціях від 0,001 до 0,0001%.

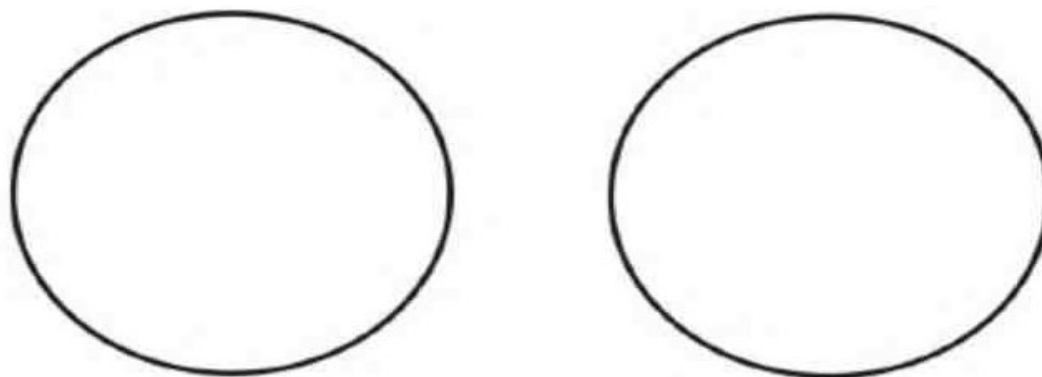
Оскільки міцелій актиноміцетів дуже тонкий і довгий, то для вивчення природного розташування клітин цих організмів варто приготувати препарати-відбитки. *Покривне скло покласти на поверхню колонії, злегка притиснути до одержання чіткого відбитка, зняти за допомогою пінцета і помістити на предметне скло у краплю води відбитком вниз.* Паралельно приготовлений таким способом відбиток бактерій висушують, фіксують у полум'ї спиртівки, забарвлюють і виконують мікроскопію, використовуючи об'єктив 90x з імерсією.

3. Паралельно з рідини настоїв приготувати фіксовані та забарвлені (простим способом) препарати мікроорганізмів. Зробити мікроскопію спочатку із сухим об'єктивом 40x, потім переглянути, використовуючи імерсійну систему (об'єктив 90x).

4. Для вивчення морфології бактерій приготувати препарати з використанням колекції чистих культур різних морфологічних груп. Препарати розглянути з імерсією, відзначити форму та розташування клітин різних мікроорганізмів.

5. Усі переглянуті під мікроскопом препарати замалювати. Під кожним малюнком вказати назву об'єкта, відзначити морфологічні особливості

мікроорганізмів, зазначити збільшення мікроскопа, із яким розглядався препарат.



фарбування

збільшення

морфологія

Контрольні питання:

1. Назвати основні морфологічні форми бактерій.
2. Охарактеризувати коккові форми бактерій.
3. Навести особливості паличковидних бактерій.
4. Описати спіральні форми бактерій.
5. Яка особливість нитчастих мікроорганізмів та бактерій незвичної форми?
6. Які види розташування джгутиків виділяють у бактерій?
7. Опишіть розташування спор у спороутворюючих мікроорганізмів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4
МОРФОЛОГІЯ ДРІЖДЖІВ, ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ ТА
НАЙПРОСТІШИХ

Мета роботи: вивчити морфологію дріжджів, цвілевих грибів та одноклітинних тварин.

Матеріали та обладнання: добові культури дріжджових грибів, що вирощені на чашках Петрі (*Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*), 5-7 добові культури цвілевих грибів (*Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium cyclopium*, *Oidium lactis* тощо), мікроскопи, бактеріологічні петлі, пінцет, тонкі предметні та покривні скельця, суміш спирт + гліцерин (1:1) із додаванням метиленового синього, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, крапельниці з фарбами: метиленовий синій (1:40), водяний розчин фуксину основного, імерсійна олія, серветки, фільтрувальний папір, дистильована вода.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати та розуміти особливості структурної організації прокаріотичної та еукаріотичної клітини.

1.1. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Гриби – одне з найбільших царств еукаріотичних гетеротрофних організмів (рис. 4.1, 4.2), різноманітних за будовою та способом життя. Мікроскопічні міцеліальні гриби складають велику групу еукаріотичних мікроорганізмів, які характеризуються відсутністю фотосинтетичних процесів, наявністю чітко оформленого ядра, мають жорстку клітинну стінку з хітину. Мікоміцети здатні до утворення вегетативної структури – міцелію; трубчасті структури, що утворюють міцелій, називаються гіфами. Гіфи або розподілені перегородками на окремі клітини (септований міцелій), або практично не мають перегородок (несептований міцелій). В останньому випадку міцелій називається ценоцитним.

Дріжджові клітини морфологічно досить різноманітні (рис. 4.1): бувають округлими, овальними, подовженими та лимоноподібними, нерухомі. Клітини дріжджів значно крупніші бактеріальних та досягають у діаметрі 4-10 мкм.

На твердих живильних середовищах дріжджі ростуть у вигляді різних опуклих безбарвних, жовтуватих, помаранчевих, рожевих, коричневих, бежевих колоній м'якої консистенції, що не врастають у субстрат, розмножуються брунькуванням. Форма та колір колоній мають значення для діагностики. До дріжджів, що брунькуються, відносяться представники р. *Saccharomyces*, розмножується поділом р. *Shizosaccharomyces*. Дріжджі, у яких спостерігається статевий процес, пов'язаний зі спороутворенням, називаються справжніми та належать до аскоміцетів. Аспорогенні дріжджоподібні організми відносяться до недосконалих грибів (*Candida*, *Torulopsis*, *Endomyces*, *Oidium* і ін.)

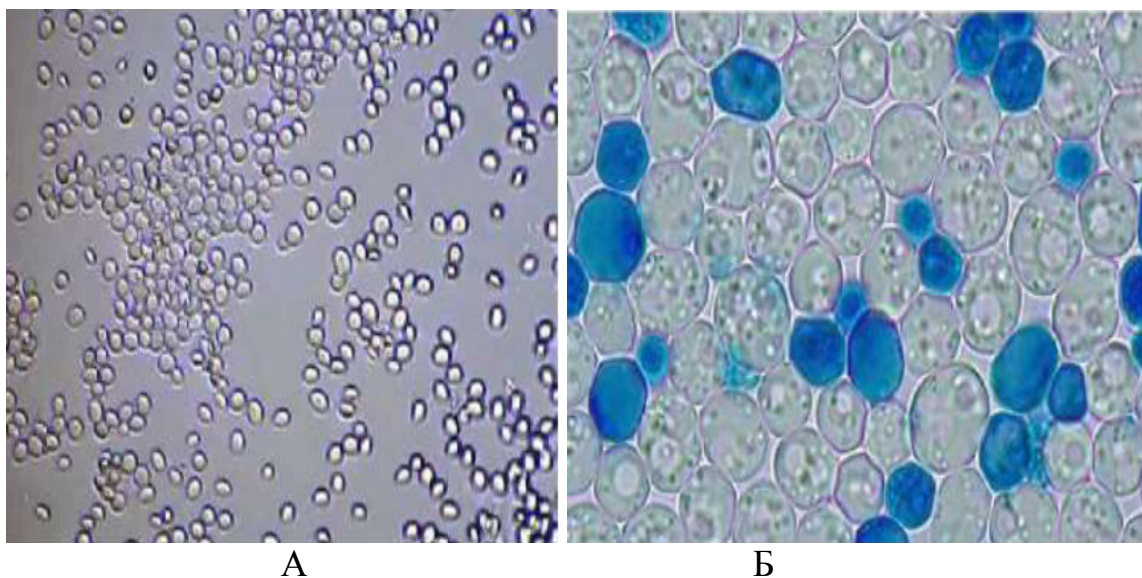


Рис. 4.1. Препарат живих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*: А – незабарвлений препарат; Б – препарат забарлено метиленовим синім

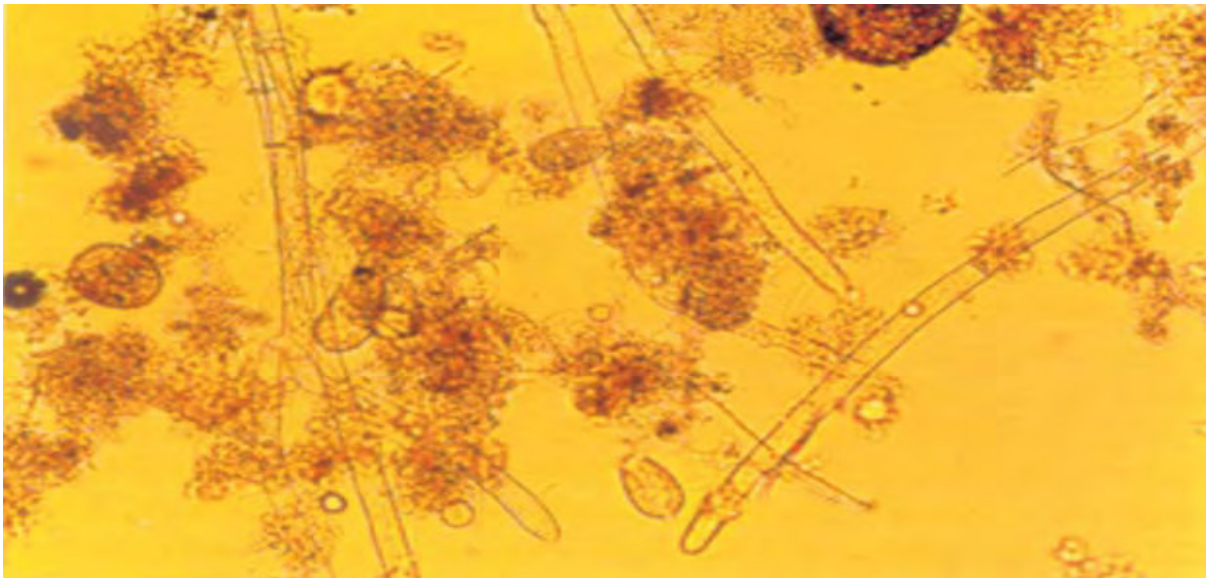


Рис. 4.2. Сапрофітні гриби активного мулу

Цвілеві гриби поширено повсюди (рис. 4.3–4.7). Особливо багато їх у ґрунті та у місцях із підвищеною вологістю. Вони відіграють велике значення як продуценти багатьох цінних речовин – ферментів, антибіотиків, органічних кислот та інших продуктів. Під назвою «цвілеві гриби» об'єднують представників зигоміцетів, недосконалих і сумчастих грибів. На твердих субстратах цвілі утворюють округлі пухнасті, нитковидні, павутиноподібні та порошкоподібні колонії зеленого, жовтуватого, чорного чи білого кольору. Колонії складаються з великої кількості гіллястих ниток – гіфів. Велика частина гіфів розвивається у повітрі, а частина – у товщі субстрату. Система гіфів у цілому утворює міцелій.

Завдяки високій біохімічній активності мікроскопічні міцеліальні гриби набули широкого використання у промисловості, в основному це гриби родів *Mucor* (рис. 4.3), *Rhizopus*, *Penicillium* (рис. 4.4, 4.6), *Aspergillus* (рис. 4.5).

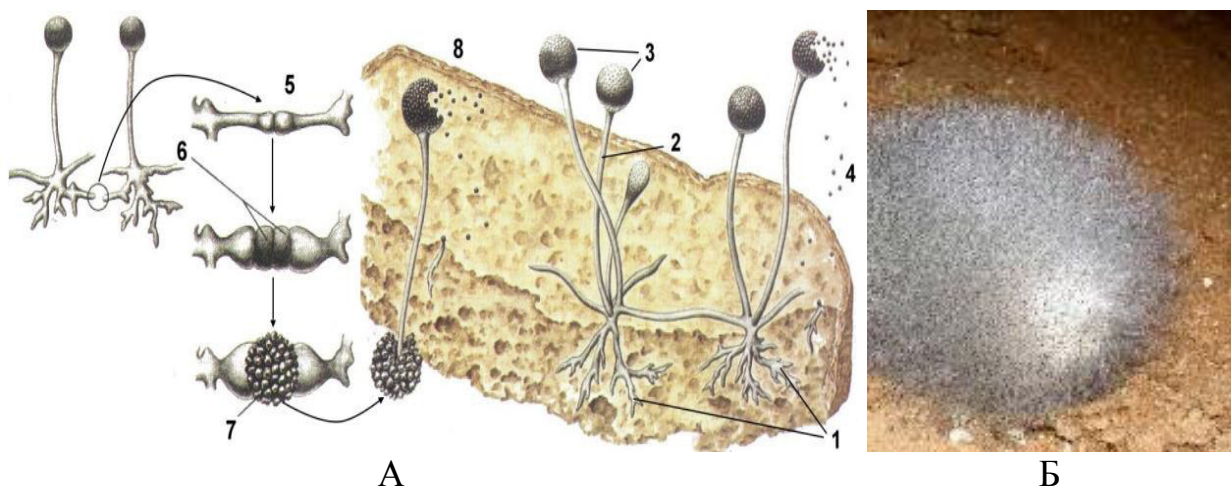


Рис. 4.3. р. *Mucor*: А – схема розмноження: 1 – міцелій гриба; 2 – спорангієносці; 3 – спорангії; 4 – спори безстатевого спороношення; 5 – утворення гаметангіїв; 6 – відокремлення гаметангії мукора; 7 – багатоядерна зигота; 8 – спори статевого спороношення; Б – зовнішній вигляд



А

Б

Рис. 4.4. Культура *Penicillium* sp.: А – ріст на живильному середовищі; Б – кондієносець



А

Б

В

Рис. 4.5. Культура р. *Aspergillus*: А, Б – ріст на живильному середовищі; В – кондієносець



А

Б

Рис. 4.6. Практичне значення р. *Penicillium*: А – лимон вражений пеніцилом; Б – сир з благородною пліснявою



А

Б

Рис. 4.7. Культура *Alternaria alternata*: А – ріст на живильному середовищі; Б – конідії

Найпростіші (Protozoa) – це одноклітинні організми, що є найбільш просто організованими представниками Царства Тварин (4.8). Морфологічно дуже різноманітні.



Рис. 4.8. Сисна інфузорія

Розміри клітин коливаються у широких межах залежно від видової приналежності та фізіологічного стану. До найпростіших відноситься до 15 тисяч видів. З них близько 12 тисяч – є сапрофітними формами, що живуть у ґрунті та воді, інші є паразитами людини та тварин. Наприклад, збудниками різних захворювань людини є дизентерійна амеба, малярійний плазмодій, трипаносоми, токсоплазми, лейшманії, лямбляї тощо.

1.2. ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Приготувати та провести мікроскопію клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та дріжджоподібних грибів *Candida tropicalis* у препараті «роздавлена

крапля» та виконати їх прижиттєве забарвлення метиленовим синім у розведенні 1:40. Розглянути клітини дріжджів, що брунькуються та діляться .

Виявлення живих і мертвих клітин грибів здійснюють на вітальних (прижиттєвих) препаратах за допомогою метиленового синього. Для цього на предметне скло у краплю мікробної суспензії вносять краплю барвника метиленового синього, витримують не більш однієї хвилини, накривають покривним склом, забирають надлишок рідини фільтрувальним папером і виконують мікроскопію. *Живі клітини, що не пропускають барвник, не забарвлюються, мертві клітини набувають синього кольору.*

2. Розглянути колонії грибів р. *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus niger*. Колонії грибів розглядають у мікроскоп з об'єктивом 8x безпосередньо у відкритій чашці Петрі.

3. Приготувати препарат «відбиток» одного з представників цвілевих грибів (рис. 4.9).

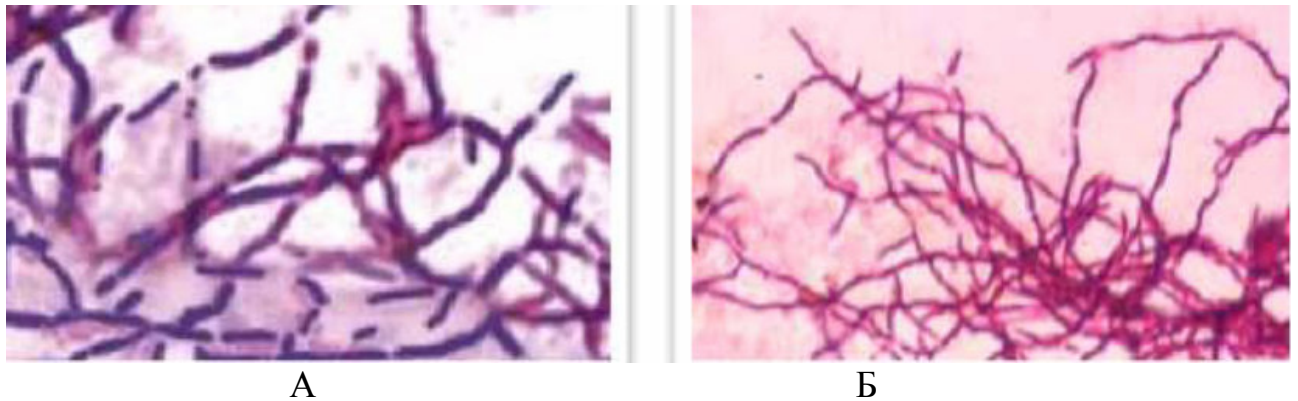


Рис. 4.9. Препарати-відбитки актиноміцетів: А – нижчий актиноміцет (р. *Nocardia*), Б – вищий актиноміцет (р. *Streptomyces*)

4. Приготувати препарат «роздавлена крапля» цвілевих грибів р. *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* та вивчити будову їх спорангіїв, конідій та конідієносців. Міцелій грибів погано змочується водою, тому препарат готують у суміші спирту з гліцерином (1:1) чи води з оцтовою кислотою (1:1).

Для дослідження грибів на добре знежирене предметне скло наносять краплю суміші. За допомогою двох препарувальних голок у цю краплю обережно переносять шматочок міцелію цвілевого гриба, обережно, не порушуючи структури міцелію, розправляють гіфи та органи, що плодоносять.

Потім краплю накривають покривним склом і злегка придавлюють. Дослідження проводять з використанням об'єктивів 8x і 40x у затемненому полі зору, для цього звужують діафрагму чи опускають конденсор. Для кращої видимості будови міцелію у краплю під покривне скло можна додати невелику кількість барвника (одну краплю фуксину чи метиленової сині).

При дослідженні культури мукорової цвілі звернути увагу на наявність *несептованого міцелію*, від якого відходять несептовані спорангієносці з кулястим розширенням угорі (спорангієм), що наповнений *ендоспорами*.

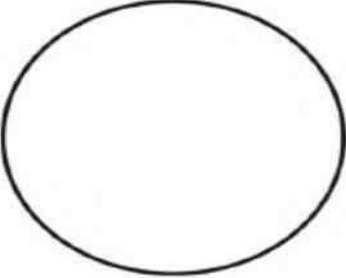
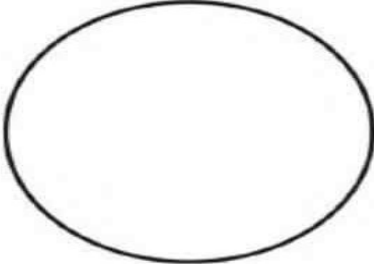
В аспергілових плісень гіфи *септованого міцелію*, переплітаючись один з одним, утворюють густу грибницю, від якої відходять одноклітинні конідієносії, що закінчуються віялоподібним розширенням (стерігми зі спорами – конідіі).

У пеніцилових плісень від грибниці відходять септовані конідієносії, що закінчуються пензликами стеригм і конідій (спори).

5. Використовуючи демонстраційний матеріал, ілюстрації й плакати, вивчити та замалювати деяких представників сапрофітних та паразитарних форм найпростіших (трипаносоми, лямблії, лейшманії, малярійний плазмодій, токсоплазми).

6. По закінченню роботи предметні та покривні скельця із препаратами продезінфікувати.

7. Результати спостережень відобразити у вигляді малюнків. Вказати назву об'єкта, відзначити морфологічні особливості організмів.

	
фарбування _____	фарбування _____
збільшення _____	збільшення _____
морфологія _____	морфологія _____

Контрольні питання:

1. Навести загальну характеристику грибів та особливості їх розмноження.
2. Опишіть основні відмінності між дріжджовими та цвілевими грибами, що застосовують у мікробіології. Назвіть представників.
3. Охарактеризуйте найпростіших як одноклітинних тварин. Назвіть представників.
4. Назвіть основні методи вивчення міцеліальних грибів.
5. Від чого залежить здатність клітини зафарбовуватися різними барвниками?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

БУДОВА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. ДИФЕРЕНЦІЙНІ МЕТОДИ ЗАБАРВЛЕННЯ

Мета: оволодіти методом забарвлення за Грамом.

Матеріали та устаткування: культури мікроорганізмів, що вирощені на агаризованому середовищі, мікроскопи, стерильні піпетки, бактеріологічні

петлі, спиртівка (брикети сухого пального), кювета з містком для фіксованих препаратів, крапельниці з фарбами, 96% етиловий спирт, імерсійна олія, серветки, фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, дистильована вода.

Барвники для забарвлення за Грамом:

1. Феноловий розчин генціана фіолетового: генціан фіолетовий – 1 г, спирт 96%-вий – 10 мл, фенол кристалічний – 2 г, вода дистильована – 100 мл.

2. Розчин Люголя: йодид калію – 2 г, йод кристалічний – 1 г, вода дистильована – 300 мл. Спочатку готують концентрований розчин йодиду калію у 5 мл води, у ньому розчиняють йод, потім додають воду до 300 мл.

3. Фуксин Пфейфера: 1 мл карболового фуксину Циля та 9 мл дистильованої води.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання**:

- Знати та розуміти особливості структурної організації прокариотичної та еукариотичної клітини.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Для вивчення внутрішньої будови клітин застосовують спеціальні методи забарвлення – цитохімічні методи дослідження. Їх використовують з діагностичною метою.

Однією із унікальних особливостей бактеріальних клітин є будова клітинної стінки, а саме наявність у її складі *муреїну* або *пептидоглікану*. Винятки становлять мікоплазми, архебактерії та L-форми. **Муреїн** – гетерополісахарид, що складається із залишків N-ацетилглюкозаміну (похідна глюкози, у якій ОН-група при другому атомі вуглецю замінена на аміногрупу) та N-ацетилмурамової кислоти (ефір залишків N-ацетилглюкозаміну і молочної кислоти). Залишки з'єднані β -1,4-глікозидним зв'язком. До карбоксильної групи лактату N-ацетилмурамової кислоти приєднується “пептидний хвіст”, який складається з 4–5 амінокислот, переважно у D-формі. Він відіграє велику роль у просторовій конфігурації пептидоглікану і, зв'язуючи субодиниці, надає йому структури сітки.

За молекулярною будовою клітинної стінки всі бактерії поділяються на 2 групи, що має велике діагностичне значення, – грам-позитивні (Gr^+) і грамнегативні (Gr^-).

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Вивчити ультраструктуру бактеріальної клітини, її складові частини.

Замалювати схематичну будову клітинної стінки Грам-позитивних та Грам-негативних бактерій (рис. 5.1, 5.2).

2. Виконати приготування фіксованих препаратів бактерій та пофарбувати їх за Грамом.

Забарвлення за Грамом є найбільш універсальним із диференціальних методів зафарбовування мікробних клітин. Він заснований на різниці хімічного складу клітинних стінок бактерій та має важливе діагностичне значення у визначенні видів бактерій. Усі бактерії щодо цього методу фарбування

поділяються на **Грам-позитивні** та **Грам-негативні**. Метод забарвлення за Грамом оснований на здатності Грам-позитивних бактерій утримувати комплекс генціанового фіолетового з йодом під час оброблення препарату спиртом і тому їх клітини забарвлюються у синьо-фіолетовий колір.

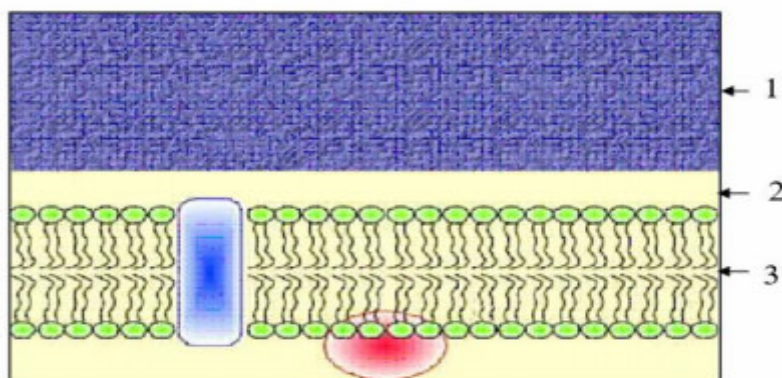


Рис. 5.1. Схематичне зображення клітинної стінки Грам-позитивних бактерій: 1 – муреїн; 2 – периплазматичний простір; 3 – цитоплазматична мембрана

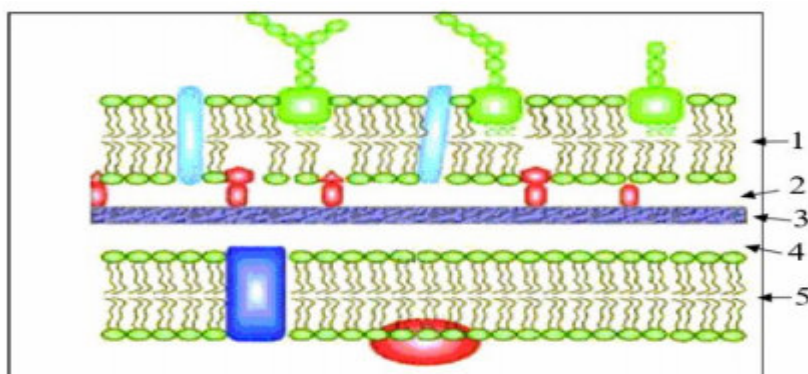


Рис. 5.2. Схематичне зображення клітинної стінки Грам-негативних бактерій: 1 – зовнішня мембрана; 2 – периплазматичний простір; 3 – муреїн; 4 – периплазматичний простір; 5 – цитоплазматична мембрана

У Грам-негативних бактерій це сполучення з'являється тимчасово і знебарвлюється після оброблення мікробіологічного препарату спиртом. У наступному фарбуванні фуксином вони набувають рожевого кольору.

Здатність клітин забарвлюватися за Грамом залежить від віку культури: у старій культурі мертві клітини завжди забарвлюються Грам-негативно. Деякі бактерії (коринебактерії, протеї) можуть забарвлюватися *варіабельно*.

Фарбувати за Грамом необхідно клітини молодих (частіше одnodобових) культур. Доцільно також фарбувати клітини контрольних мікроорганізмів, відношення яких до забарвлення за Грамом заздалегідь відомо. Мазок для фарбування за Грамом повинний бути тонким, щоб клітини рівномірно розподілялися на поверхні скла і не утворювали скупчень (рис. 5.3).

Техніка фарбування за Грамом

На добре знежиреному предметному склі готують **три тонких фіксовані препарати** різних культур мікроорганізмів:

- у **центрі** наносять мазок досліджуваного мікроорганізму (чи суміші Грам-негативних і Грам-позитивних бактерій),

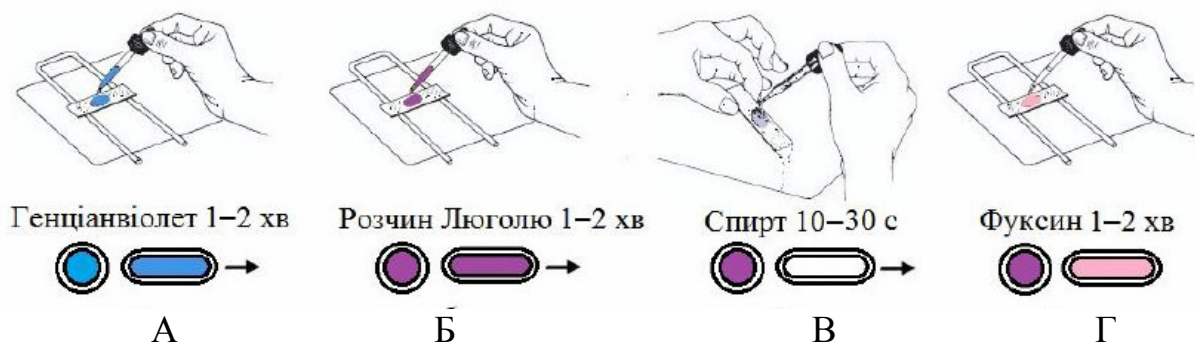


Рис. 5.3. Техніка забарвлення за Грамом: А – нанесення барвника генціанфіолетовий (1-2 хв); Б – розчин Люголю; В – нанесення 96% етилового спирту; Г – нанесення фуксину (1-2 хв).

- **по краях** – контрольні культури. Клітини однієї контрольної культури повинні бути Грам-позитивними (наприклад, *Streptococcus lactis*, *Micrococcus roseus*), іншої – Грам-негативними (наприклад, *Pseudomonas putida*, р. *Erwinia*).

- на фіксований мазок наливають розчин карболового генціанового чи кристалічного фіолетового, забарвлюють протягом 1хв.

- барвник зливають і, не промиваючи препарат водою, обробляють його розчином Люголя протягом 1 хв до повного почорніння.

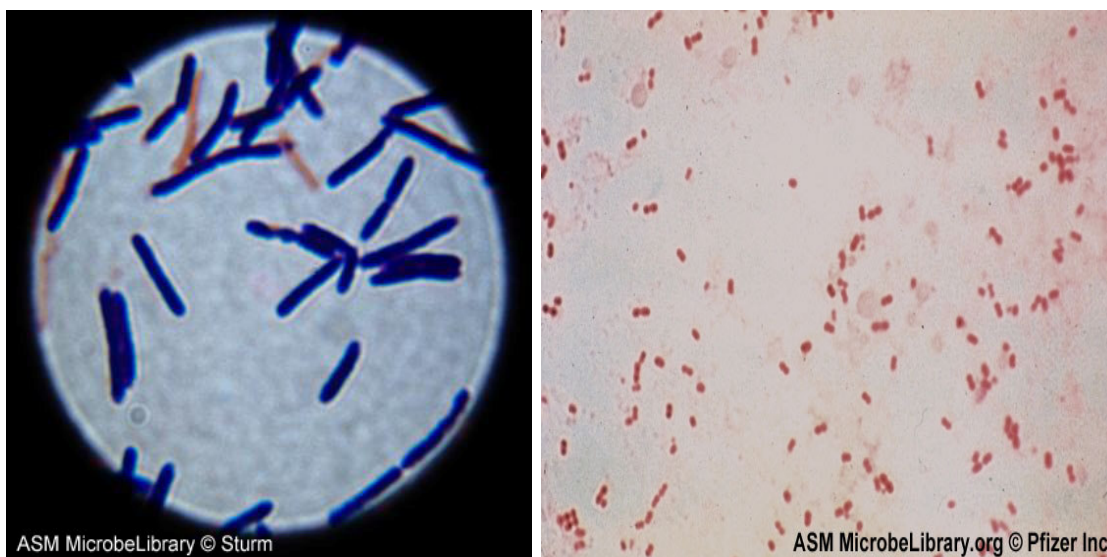


Рис. 5.4. Мікроорганізми, забарвлені за Грамом: А – грам-позитивні; Б – грам-негативні

- зливають розчин Люголя і препарат, не промиваючи водою, обробляють із безперервним погодюванням 96%-ним етиловим спиртом протягом 15-20 с. **УВАГА!** Час знебарвлення важливий: за умов перебільшення

зазначеного терміну знебарвлюються і Грам-позитивні клітини, якщо термін оброблення скорочений – препарат виявиться перефарбованим.

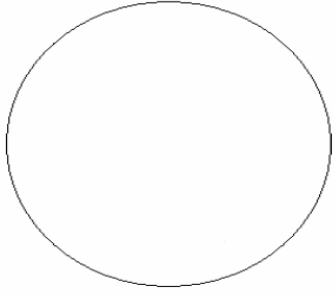
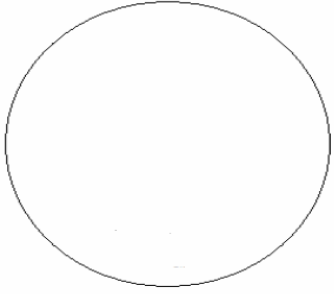
- далі промивають препарат водою та наносять водний фуксин Пфейфера на 1 хв.

- барвник зливають, препарат знову промивають водою, висушують і проводять мікроскопію з імерсійною системою.

Грам-позитивні бактерії за умов правильного фарбування набувають синьо-фіолетовий колір, Грам-негативні – червоно-рожевий колір фуксину (рис. 5.4).

3. Препарати, після дослідження поміщають у дезінфікуючий розчин.

4. Результати проведених досліджень оформити у наступному вигляді:

Назва бактерій _____ (латинською мовою)	Назва бактерій _____ (латинською мовою)
	
Грамприналежність: _____ Форма клітин: _____ Розташування клітин: _____	Грамприналежність: _____ Форма клітин: _____ Розташування клітин: _____

Контрольні питання:

1. Наведіть основні відмінності у будові прокариотичної та еукаріотичної клітини.
2. Назвіть основні особливості у будові прокариотів.
3. Охарактеризуйте будову клітинної стінки бактерій.
4. Чим відрізняються клітинні стінки Грам-позитивних та Грам-негативних бактерій?
5. На чому засновано забарвлення за Грамом? У який колір забарвлюються Грам-позитивні та Грам-негативні бактерії? Наведіть приклади.
6. Опишіть метод забарвлення за Грамом.
7. Які складні методи забарвлення ви знаєте? З якою метою їх застосовують?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ. ПІДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНОГО ПОСУДУ ТА ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДО СТЕРИЛІЗАЦІЇ

Мета: ознайомитися з методами стерилізації і засвоїти правила підготовки лабораторного посуду та інструментів до стерилізації.

Матеріали та устаткування: вата гігроскопічна, марля (бинт), нитки, ножиці, скляні палички, піпетки градуйовані, колби конічні та круглі плоскодонні, чашки Петрі, пробірки, металеві пінцети, папір для загорання, спиртівки (сухе пальне), бактеріологічні петлі, шпателі Дригальського, автоклав, сушильна шафа.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Стерилізація (від латів. *sterilis* – знешкодження) – комплекс методів, які застосовуються для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів, що стерилізуються. Окремо виділяють дезінфекцію та поняття асептики.

Існують різні методи стерилізації: фізичний, механічний і хімічний.

Фізичні методи стерилізації:

- прожарювання у полум'ї;
- стерилізація сухим жаром (гарячим повітрям у сушильній шафі);
- стерилізація кип'ятінням;
- стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування);
- дробова стерилізація (тиндалізація).
- стерилізація ультрафіолетовим опроміненням (УФ-опромінення).

Хімічні методи стерилізації: дезінфекція антисептиками;

Механічні методи стерилізації: фільтрування за допомогою мембранних та інших сучасних видів фільтрів.

Можливість та доцільність застосування того чи іншого способу визначається особливостями матеріалу, що підлягає стерилізації, його фізичними та хімічними властивостями, а також метою дослідження. Найчастіше у мікробіологічній практиці застосовується термічна стерилізація.

Стерилізація випалюванням у полум'ї пальника

Невеликі скляні та металеві предмети (голки, петлі, пінцети, скальпель, палички, шпателя тощо) стерилізують прожарюванням у полум'ї безпосередньо перед використанням. Стерилізація досягається обвуглюванням мікроорганізмів, що знаходяться на їх поверхнях (рис. 6.1).

Випалюванням у полум'ї користуються для стерилізації поверхні ватяних пробок, горла посуду.



Рис. 6.1. Розподіл температури у полум'ї пальника (спиртівки)

Стерилізація в автоклаві парою під тиском

Найбільш надійний та універсальний метод стерилізації поживних середовищ і матеріалів – стерилізація їх насиченою парою під тиском вище атмосферного (рис. 6.2). Підвищений тиск пари створюється у спеціальних герметично закритих товстостінних апаратах (автоклавах). Предмети, що підлягають стерилізації в автоклаві, загортають у папір або поміщають у спеціальні бікси. Повна стерилізація поживних середовищ забезпечується нагріванням протягом 20 хвилин при 120°C і надлишкового тиску 1 атм.

Стерилізація кип'ятінням

Стерилізацію металевих інструментів і гумових трубок виконують кип'ятінням. Спори деяких бактерій зберігають життєздатність під час кип'ятіння у дистильованій воді протягом декількох годин, тому рекомендується стерилізацію кип'ятінням виконувати у 2%-ному розчині карбонату натрію протягом 10 хв. У цих умовах спори гинуть.

Стерилізація сухим жаром

Сухим жаром стерилізують в основному скляний посуд. Щоб уникнути зараження стерильних предметів мікрофлорою повітря, їх перед стерилізацією загортають в обгортковий папір і виймають із нього тільки перед роботою.

Пастеризація – це одноразове прогрівання матеріалу при температурі нижче за 100°C. Метод призначений для знищення лише неспорних 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.

Тиндалізація (дробова стерилізація) – застосовується для середовищ, компоненти яких руйнуються за температури вище +100°C. Її здійснюють текучою парою в автоклаві з незавинченною кришкою при відкритому крані для випуску пари або спеціальному апараті. Стерилізація проводиться по 20-30 хв.

протягом декількох днів для знищення вегетативних клітин, що проростають із спор. У проміжках між стерилізацією поживне середовище ставлять у термостат при температурі 30°C на 8-12 год для проростання життєздатних спор.

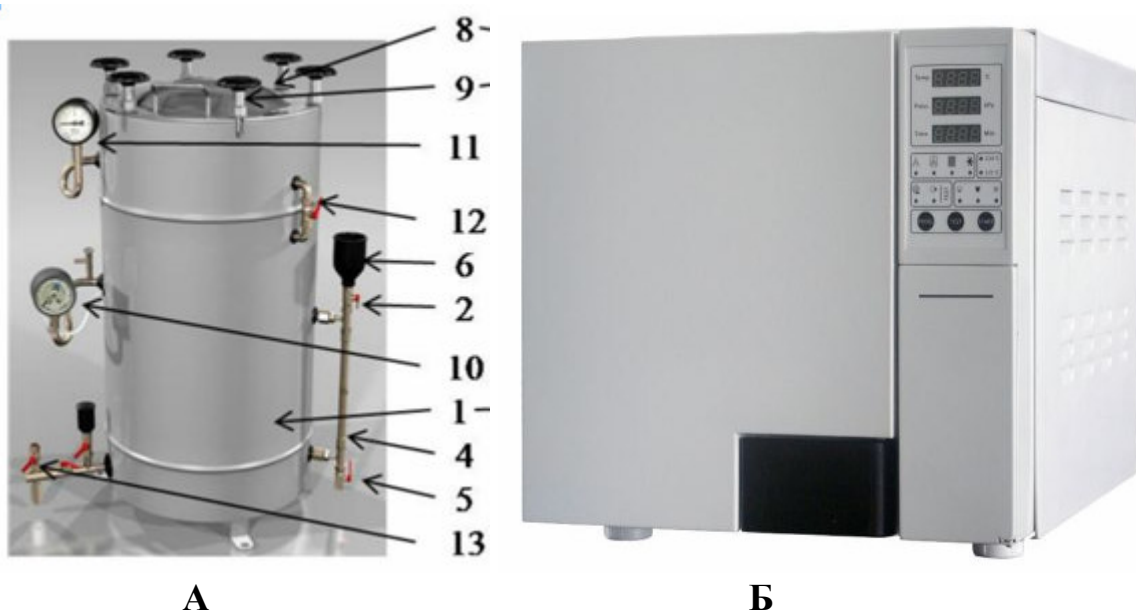


Рис. 6.2. Автоклави лабораторні: А – стерилізатор паровий: 1 – кожух, 2 – вентиль для заповнення автоклава водою, 3 – камера водопарова, 4 – колонка водовказівна для заповнення автоклава водою, 5 – вентиль для зливу води з автоклава, 6 – воронка для заповнення автоклава водою, 7 – камера стерилізаційна, 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 у стерилізаційну камеру, 13 – вентиль для видалення пари зі стерилізаційної камери; Б – сучасний автоклав горизонтального завантаження

Холодна стерилізація

Органічні рідини, що не виносять нагрівання, стерилізують шляхом фільтрування, пропускаючи їх через стерильні дрібнопористі фільтри (бактеріальні фільтри). Бактеріальні фільтри мають різні розміри пор. Більшість сучасних фільтрів, що використовується у мікробіології, одноразового використання.

Предмети, що виготовлено з термолабільних пластмас, наприклад, центрифужні пробірки, стерилізують УФ-променями. Час опромінення встановлюють експериментально. Воно залежить від потужності бактерицидної лампи й відстані між лампою та об'єктом.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Ознайомитися з режимами стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду та інструментів.

Поживні середовища стерилізують автоклавуванням, що здійснюють у різних режимах. Коли вказують режим стерилізації у одиницях тиску, мають на увазі додатковий тиск.

Температура та тривалість автоклавування визначається насамперед складом поживного середовища. Субстрати, що містять речовини, які не витримують нагрівання до 120°C, стерилізують із тиском 0,5 атм.

Наприклад: молоко, дріжджовий автолізат, середовища із желатиною стерилізують з тиском 0,5 атм протягом 15 хв. Середовища, що містять цукри та вітаміни, наприклад, пивне сусло, соки, стерилізують із тиском 0,5 атм 20-30 хв.

Універсальними поживними середовищами, що застосовуються у лабораторній практиці, є м'ясо-пептонний агар (МПА) – тверде (щільне) поживне середовище та м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) – рідке поживне середовище; автоклавують із тиском 1 атм. 20-30 хвилин, картопляне середовище і ґрунтову витяжку – 1,5 атм. 30 хв.

2. Виготовити ватно-марлеві пробки для пробірок і колб різної ємкості.

Ватно-марлеві пробки забезпечують збереження стерильності рідин та посуду після стерилізації від контамінації мікрофлорою навколишнього середовища.

Кращою ватою для виготовлення пробок є гігроскопічна вата. Правильно виготовлена пробка повинна легко входити у пробірку (колбу) і щільно прилягати до її стінок, не порушуючи газообміну між вмістом ємності та зовнішнім середовищем. Після того, як пробку витягнули з колби/пробірки, її форма не повинна змінюватися (рис. 6.3).

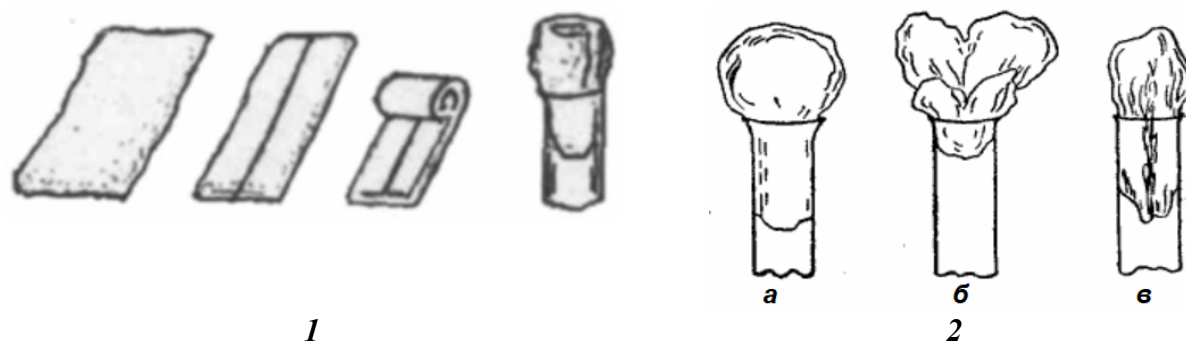


Рис. 6.3. Виготовлення ватних пробок (1) та види пробок (2): а – правильно виготовлена пробка, б та в – не правильно виготовлена пробка

Для виготовлення пробки плоский шматок вати скачують валиком. Щоб додати пробці міцність, її прокочують між долонями, або між долонями і чистим склом, що лежить на столі. Довжина пробки для звичайної пробірки повинна бути близько 4 см. Пробка повинна входити у пробірку на 1,5-2 см. Зручно обгорнути пробку чистою марлевою серветкою.

3. Підготувати до стерилізації мікробіологічні пробірки, піпетки, чашки Петрі, скляні шпатель Дригальського.

Основним способом стерилізації скляного посуду є його оброблення гарячим повітрям у сушильних шафах та автоклавування. Посуд перед стерилізацією ретельно миють, сушать і загортають у папір для збереження стерильності після стерилізації.

- Пробірки, колби попередньо закривають ватно-марлевими пробками. Пробірки поєднують по 15-20 штук і загортають у папір.

- Кожну піпетку загортають окремо у довгі смужки паперу шириною 3-4 см. Попередньо у кінець піпетки, на який одягають грушу під час роботи, вкладають ватний тампон. Обмотку починають із протилежного кінця. Капілярний кінець піпетки кладуть на смужку паперу під кутом 45° і загортають за спіраллю. Загорнені піпетки для запобігання від забруднення й розривів загортають кілька штук разом.

- Шпателі обгортають окремо, а потім, як і піпетки, поєднують.

- Чашки Петрі загортають у папір у формі квадрата. Для цього чашку Петрі поміщають на середину листа, загинають його з двох протилежних сторін догори, край двічі загинають швом. Два вільних кінці загинають униз. Таке обгортання чашок дає можливість легко розрізнити верх і низ. Дві-чотири чашки Петрі загортають разом.

Підготовлений таким способом посуд поміщають у сушильну шафу і прогрівають при температурі 160-170°C упродовж 2 годин.

Простерилізований посуд зберігають у закритому, захищеному місці. Розгортають його безпосередньо перед використанням.

Також чашки Петрі (не загортаючи їх у папір) можна помістити у спеціальні металеві бікси та саме у них проводити стерилізацію автоклавуванням.

4. Підготувати до стерилізації бактеріологічні петлі, голки, гачки.

Узяти бактеріологічну петлю у праву руку та у горизонтальному положенні внести її у нижню, найбільш холодну частину полум'я, а потім перевести у положення, близьке до вертикального, і нагріти до почервоніння у верхній частині полум'я пальника спочатку нижню, потім верхню частину дроту і пропалити петлеутримувач. Прожарювати протягом 5-7 с.

5. Перевірити ефективність процесу парової стерилізації із застосуванням біологічних індикаторів BT20 Bionova, які містять спори *Geobacillus stearothermophilus*.

G. stearothermophilus (раніше – *Bacillus stearothermophilus*) – це непатогенні ендоспори, що 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.

6. Результати спостережень запишіть у зошит. Зробіть висновки.

Контрольні питання:

1. Чим стерилізація відрізняється від дезінфекції? Що таке асептика?
2. Якими способами можна проводити стерилізацію?
3. Що і за яких умов стерилізують в автоклаві, у 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?
7. Який спосіб стерилізації є найефективнішим та чому?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

ФІЗІОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. ОДЕРЖАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР

Мета: ознайомитися з потребами мікроорганізмів у живильних речовинах і принципами складання поживних середовищ для їх вирощування, засвоїти методи одержання накопичувальних культур різноманітних фізіологічних груп мікроорганізмів із подальшим виділенням чистих культур.

Матеріали та устаткування: несхмелене пивне сусло, пептон, агар-агар, картопля, вівсяні пластівці, молоко, сіно, пиво, розсіл капусти або огірків, конічні колби, мікробіологічні пробірки, циліндри, ваги, електроплитка, скляні палички, піпетки, крейда, NaCl, лійки, водяна баня, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для накопичення, виділення, культивування та збереження мікроорганізмів використовують поживні середовища, які мають задовольняти усі їх потреби у мікро- та макроелементах. Це – біогенні (С, О, Н, N); зольні елементи (P, S, K, Mg, Ca, Fe) та мікроелементи, що стимулюють ріст клітинної маси (у малих дозах) – Zn, Mn, B, Cu, Mo, Co та ін.

За складом поживні середовища поділяють на природні, або натуральні, напівсинтетичні та синтетичні середовища.

Натуральні середовища складаються з продуктів рослинного та/або тваринного походження – м'яса, молока, картоплі, моркви, овочевих і фруктових соків, сироватки, відварів, екстрактів, отриманих із природних субстратів тощо.

Напівсинтетичні середовища:

- МПБ із 2 %-ним розчином глюкози;
- дріжджовий автолізат із солями амонію та вуглеводами у визначеному співвідношенні. Ці середовища широко використовують для одержання вітамінів, антибіотиків, амінокислот та інших продуктів.

Синтетичні середовища – складаються з хімічно чистих речовин, у точно зазначених концентраціях: середовище Виноградського для нітрофіксуючих бактерій, глюкозомінеральне середовище для *Achromobacter*.

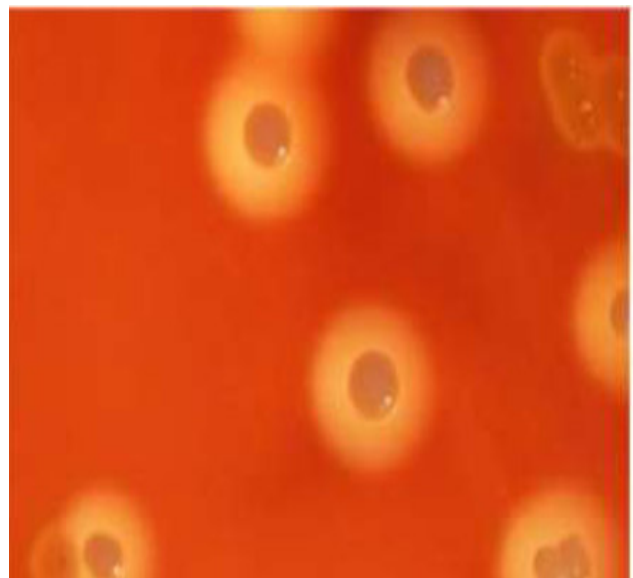
За призначенням розрізняють:

Елективні (виборчі) середовища, що забезпечують переважний розвиток одного виду чи групи мікроорганізмів: середовище Чапека (для актиноміцетів), Кітта-Тароци (для анаеробів), МПА з новобіоцином (для сапрофітних стафілококів, стійких до новобіоцину).

Диференційно-діагностичні (індикаторні) середовища – дозволяють відрізнити одні види мікроорганізмів від інших: середовище Ендо (для кишкових бактерій), вуглеводні середовища, до складу яких входять різні вуглеводи з індикатором (рис. 7.1).



А



Б

Рис. 7.1. Ріст культури на різних диференційно-діагностичних середовищах: А – Ріст *E. coli* на середовищі Ендо; Б – ріст *Streptococcus pyogenes* на кров'яному агарі

З фізичним станом (консистенцією) розділяють: рідкі (МПБ), щільні або тверді (МПА), сипучі (розварене пшоно, висівки, що просочені живильним розчином тощо).

Для з'ясування фізико-біологічних особливостей мікроорганізмів, а також для накопичення їх біомаси чи продуктів обміну найзручніше застосовувати рідкі середовища.

Напіврідкі середовища готують, додаючи 0,1-0,2 % агар-агару. Агар-агар – рослинний колоїд, що одержують із деяких морських водоростей (складається з полісахаридів, включає азотисті речовини).

Сипучі середовища застосовують у промисловій мікробіології.

Густі (тверді) середовища використовують для виділення чистих культур (одержання ізольованих колоній) та з діагностичною метою: опис колоній, встановлення характеру росту на скошеному МПА та ін., для збереження культур, для кількісного обліку мікроорганізмів, визначення їх антагоністичних властивостей тощо. Щільні середовища готують із рідких, додаючи для згущення агар-агар (1,5-2,5%), желатину (10-15%).

Для вирощування мікроорганізмів, що використовують органічні форми азоту, найчастіше використовують м'ясо-пептонні середовища: МПБ, МПА та м'ясопептонну желатину (МПЖ).

Перед стерилізацією, поживні середовища, за потреби, фільтрують та розливають у колби. Наливати треба не вище 2/3 висоти колби. Скошене агаризоване середовище не повинно доходити до ватяної пробки на 4-6 см. Середовище, що призначено для культивування бактерій у чашках Петрі, розливають по 15-20 мл у пробірки більшого об'єму, ніж для скошеного агаризованого середовища чи стерилізують у колбах. В останньому випадку до стерилізації агар не розплавляють.

Найпоширенішим **універсальним** поживним середовищем в мікробіологічних дослідженнях є **м'ясо-пептонний агар (МПА)**.

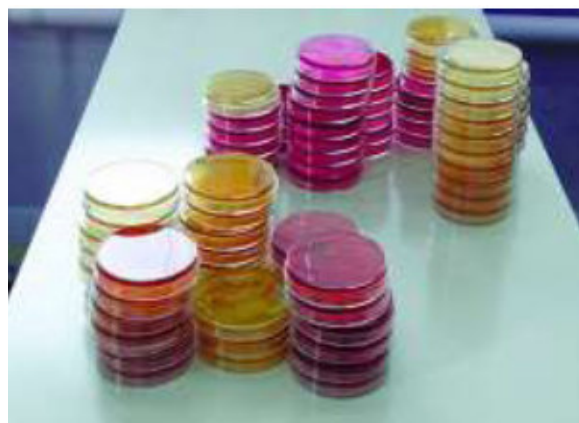
Культивування мікроорганізмів.

Вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах називається **культивуванням** (рис. 7.2), а розвинені мікроорганізми, отримані від тварини, людини, чи рослини, субстрату зовнішнього середовища, – **культурою**. Розвиток культури мікроорганізмів у рідкому середовищі приводить до утворення суспензії або осаду, плівки, на твердому середовищі формуються **колонії** – потомство однієї клітини.

Для вивчення фізіолого-біологічних особливостей розвитку бактерій, а також для встановлення їх видової приналежності необхідно виділяти **чисті культури**, що складаються з мікроорганізмів одного виду.

Чиста культура мікроорганізмів одного виду, що виділена з певного джерела та відрізняється від інших представників виду незначними властивостями, називається **штамом**.

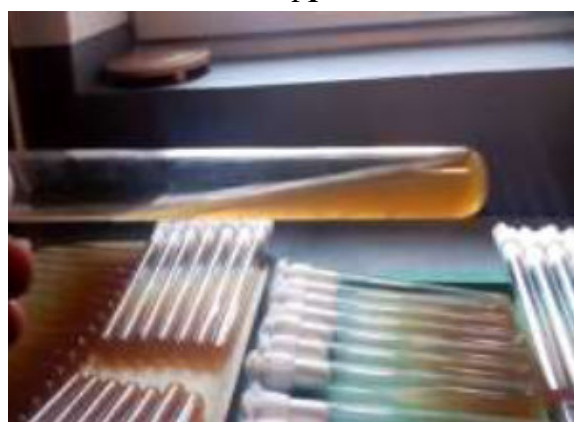
Накопичувальними культурами називаються культури, які складаються переважно з клітин одного виду.



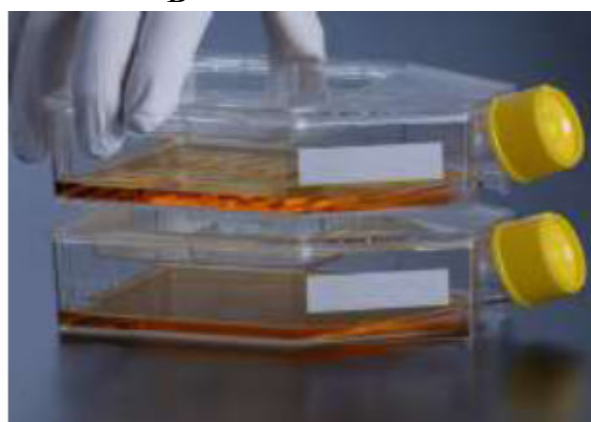
А



Б



В



Г

Рис. 7.2. Культивування мікроорганізмів: А – на агаризованих поживних середовищах у чашках Петрі; Б – у товщі або на межі розподілу фаз на рідких; В – у пробірках; Г – на матрацах з агаром

Для одержання мікроорганізмів визначених фізіологічних груп застосовується техніка «накопичувальних культур», заснована на використанні елективних (виборчих) середовищ, що забезпечують переважний розвиток певних бактерій. Інші організми у цих умовах не можуть розмножуватися чи їх ріст буде незначний. Для одержання накопичувальних культур кращим матеріалом для інокуляції слугують субстрати, у яких відбувається їх природне «збагачення».

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Ознайомитися зі складом різних натуральних, напівсинтетичних та синтетичних поживних середовищ, ознайомитися з індикаторними та диференційно-діагностичними комерційними середовищами.

2. Приготувати щільне поживне середовище на основі сусла.

Сусло-агар (СА) – середовищем для молочнокислих бактерій та дріжджів. Для його приготування до пивного сусла додають 2% агару, середовище стає однорідним безпосередньо у процесі стерилізації в автоклаві. Якщо необхідно

приготоване середовище відразу розлити у пробірки, його попередньо перед стерилізацією розплавляють на водяній бані.

3. Приготувати щільне поживне середовище на основі пептонної води (додати до пептону агар-агар із розрахунку 2%).

4. Приготувати м'ясо-пептонний агар (МПА).

5. Приготувати середовища для актиноміцетів.

Натуральне середовище – *вівсяний агар* (г): вівсяне борошно (чи пластивці) – 20; агар 20-25; дистильована вода – 1000 мл; сліди солей FeSO_4 -0,1; MnCl_2 –0,1; ZnSO_4 –0,1.

Для приготування середовища вівсяне борошно (чи пластивці) проварюють у 1 л води 20 хвилин, фільтрують та доводять об'єм до 1 л. Середовище застосовують для збереження та визначення культуральних, а також морфологічних ознак.

Синтетичне середовище – *середовище Гаузе* (г): крохмаль розчинний – 20; KNO_3 -1,0; K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; NaCl - 0,5; FeSO_4 – сліди; рН 7,0-7,4; дистильована вода – 1000 мл.

6. Підготувати середовища до стерилізації.

7. Підготувати для стерилізації 5 пробірок із ізотонічним розчином (0,9 % NaCl) – по 9 або 4,5 мл у кожену пробірку та окремо колбу з 100 мл ізотонічного розчину (0,9% NaCl).

8. Отримати накопичувальні культури аеробних спороутворюючих бактерій.

а) Одержати культуру сінної палички – *Bacillus subtilis*.

- для одержання накопичувальної культури сінної палички помістити приблизно 1-3 г сіна у колбу на 250 мл і залити 20-50 мл водопровідної води, що нагріта до 40-50°C.

- додати пучку крейди та прокип'ятити отриману суміш протягом 15-30 хв (середовище буде мати колір міцного чаю – із сіна екстрагуються речовини, які слугують поживним субстратом для бактерій). За цей час, вегетативні клітини та спори більшості бактерій загинуть. Тільки спори деяких бактерій, у тому числі термостійкі спори *Bacillus subtilis*, залишаться життєздатними. Відвар розлити у стерильні пробірки, закрити їх ватними пробками та помістити у термостат при 25-30°C.

Через **дві доби** на поверхні середовища розвивається білувата плівка *Bacillus subtilis*, яка через 3-4 доби стає сірувато-зеленою. Інші мікроорганізми за цих умов проростають рідко та у невеликій кількості.

б) Одержати культуру картопляної палички – *Bacillus subtilis var. mesentericus*.

- помити бульби картоплі, не очищаючи, нарізати кільцями,

- поверхню натерти крейдою та помістити у чашки Петрі на подвійний шар фільтрувального паперу, змоченого дистильованою водою.

- чашки з картопляним середовищем обробити текучою парою протягом 10 хв і помістити у термостат при 27-30°C на 3-4 доби.

На поверхні шматочків картоплі з'являється щільна зморшкувата плівка культури картопляної палички. Забарвлення плівки: білувато-сіре, рожеве, жовто-буре, чорне, що залежить від культури, яка розвивається.

9. Одержати накопичувальну культуру *анаеробних спороносних* бактерій.

- неочищену картоплю нарізають шматочками та заповнюють ними стерильну пробірку на 1/3 об'єму,

- додають пучку крейди і доливають водою майже доверху.

- пробірки ставлять на водяну баню з температурою 80°C на 10-15 хв.

- потім пробірки закривають пробками та ставлять у термостат при 25°C.

Через 2-3 доби у рідині виявляють елективну культуру бактерій маслянокислого бродіння – *Clostridium pasteurianum*.

10. Одержати накопичувальну культуру оцтовокислих бактерій *Acetobacter aceti* – аеробних безспорових бактерій.

- у стерильну конічну колбу наливають тонкий шар пива (0,5-1,0 см). Товщина шару пива має значення для результату досліду, тому що для оцтовокислих бактерій треба створити аеробні умови.

- колби закривають ватними пробками та поміщають у термостат при 30°C на 5-7 діб.

11. Одержати накопичувальні культури молочнокислих бактерій.

а) Для одержання накопичувальної культури молочнокислих паличок *Lactobacterium plantarum*:

- у стерильні пробірки із солодовим сусликом (6-8° за Баллінгом) внести 12-15% (об'ємних) етанолу 96%-ного та 1% розсолу капусти або огірків.

- засіяні пробірки помістити у термостат із температурою 30°C.

б) Для виділення молочнокислих стрептококів *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*:

- свіже молоко наливають у стерильні пробірки та залишають при температурі 30°C для розвитку бактерій.

- для подальшого дослідження відбирають пробірки з молоком, в яких утворився згусток раніше, ніж в інших пробах.

12. На наступному занятті переконатися у одержанні накопичувальних культур різноманітних мікроорганізмів.

13. Провести дослідження отриманих накопичувальних культур. Одержання накопичувальної культури визначають візуально за проявом ознак росту мікроорганізмів: помутнінню середовища, формуванню плівки, осаду, виділенню пігменту, газів, а також шляхом мікроскопії прижиттєвих та фіксованих мікробіологічних препаратів.

На наступному занятті одержані результати оформити у вигляді таблиці 7.1.

Таблиця 7.1. – Характеристика накопичувальних культур

Накопичувальна культура	Умови культивування	Візуальні ознаки росту	Морфологічні особливості

Контрольні питання

1. Дайте визначення поняттю «поживні середовища». Які основні компоненти має містити живильне середовище?
2. На які групи поділяють живильні середовища за складом? Наведіть приклади.
3. Які є види поживних середовищ 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 щільних поживних середовищ? Дайте характеристику цих речовин. Чому агар є найбільш використовуваним загущувачем?
7. Що таке процес культивування, культура, колонія, штам?
8. Опишіть процес отримання накопичувальної культури. Наведіть приклади.
9. Наведіть основні відмінності між чистою, змішаною та накопичувальною культурами мікроорганізмів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ТЕХНІКА ПОСІВУ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР

Мета: освоїти техніку розливу поживних середовищ, способи культивування мікроорганізмів, методи виділення чистих культур та посіву бактерій.

Матеріали та устаткування: накопичувальні культури, зразки ґрунту, чисті культури (*Micrococcus lysodeikticus*, р. *Ervinia*), стерильні живильні середовища (МПА, Сусло-агар, картопляний агар, Сабуро), водяна баня, електроплитка, стерильні чашки Петрі, мікробіологічні пробірки, шпатели Дригальського, піпетки, скляні палички, бактеріологічні петлі, спирт етиловий, спиртівка.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Пересів або пасирування – це перенесення вирощеної культури клітин мікроорганізмів з одного поживного середовища на інше.

Внесення клітин мікроорганізмів у стерильне живильне середовище для одержання накопичувальної чи чистої культури називається **посівом чи інокуляцією**.

Посів (і пересів) мікроорганізмів виконують із дотриманням правил стерильності – усі маніпуляції здійснюють біля полум'я пальника (у радіусі 15-20 см) по можливості швидко, щоб запобігти контамінації дослідної культури сторонніми біоб'єктами. Не рекомендується робити різкі рухи, ходити біля того, хто виконує посів мікроорганізмів, тому що рух повітря збільшує ймовірність випадкового забруднення культури.

Спосіб посіву у середовище залежить від його консистенції, якості матеріалу, що засівається та мети дослідження.

Перед посівом на пробірці, колбі чи чашці Петрі необхідно вказати назву культури і дату проведення роботи.

Етапи виділення чистої культури:

- одержання накопичувальної культури;
- виділення чистої культури з ізольованих колоній за методом Коха;
- визначення чистоти виділеної культури та вивчення культуральних властивостей;
- ідентифікація мікроорганізмів шляхом вивчення ряду властивостей: морфологічних, тинкторіальних, біохімічних (ферментативних), антигенних та ін.

Виділення чистих культур за методом Коха

Для одержання ізольованих колоній за методом Коха і виділення з них чистих культур **аеробних** бактерій роблять посів на поверхню твердого поживного середовища у чашки Петрі з накопичувальної культури:

– розплавляють стерильне агаризоване МПА або сусло-агар у колбі на водяній бані та розливають у 3-4 стерильні чашки Петрі по 15-20 мл; дають середовищу застигнути за кімнатної температури та поміщають у термостат для видалення надлишку вологи і перевірки середовища «на чистоту».

– дослідну культуру послідовно висівають і розподіляють по декількох готових чашках Петрі з середовищем, шпателем Дригальського чи петлею, використовуючи техніку виснаженого штриха чи мазка (рис. 8.1, 8.2):

а) спочатку на поверхню середовища першої чашки, використовуючи петлю (або піпетку), наносять краплю розведення накопичувальної культури та обережно розтирають її стерильним шпателем Дригальського по всій поверхні.

б) потім цим же шпателем із клітинами мікроорганізмів, що залишилися на ньому, засівають поверхню другої чашки Петрі, а далі – цим же шпателем проводять вздовж поверхні третьої.

– після посіву чашки Петрі перевертають догори дном і поміщають у термостат із температурою, що сприятлива для даного мікроорганізму.

– інкубують посіви звичайно протягом 1-5 днів (залежно від швидкості росту конкретних мікроорганізмів).

– таким чином, після інкубації у перших чашках звичайно спостерігається суцільний ріст мікроорганізмів («газон»), а у наступних – утворюються ізольовані колонії.

У випадку засіву за секторами: у перших чашках відбувається суцільний ріст (рис. 8.3), а уздовж наступних штрихів виростуть відособлені колонії мікроорганізмів, що представляють потомство однієї клітини.

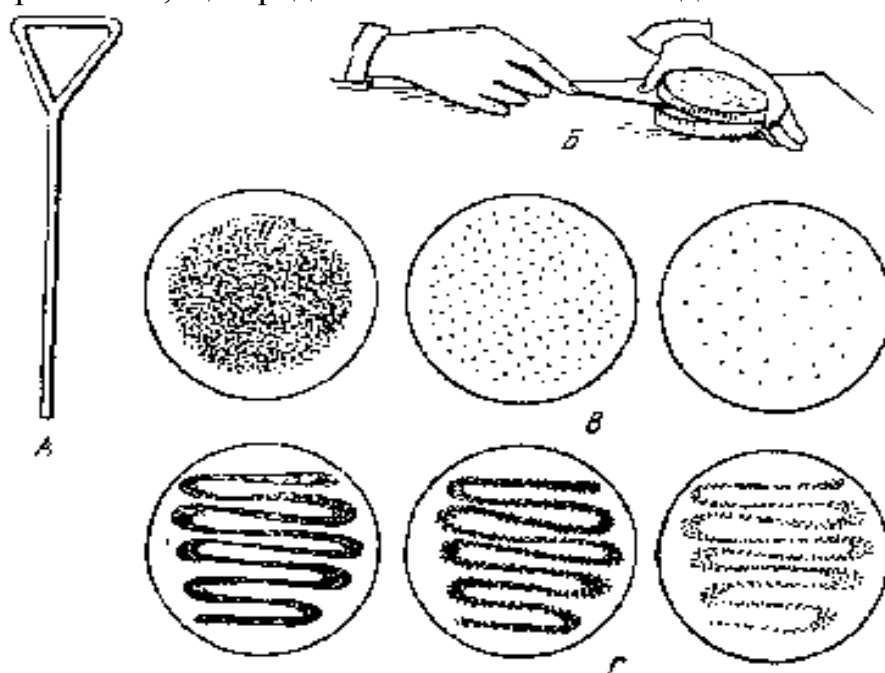


Рис. 8.1. Посів мікроорганізмів на поверхню щільного середовища за допомогою шпателя Дригальського: а – шпатель Дригальського; б – розсів; в – ріст мікроорганізмів після посіву шпателем; г – ріст мікроорганізмів після посіву петлею

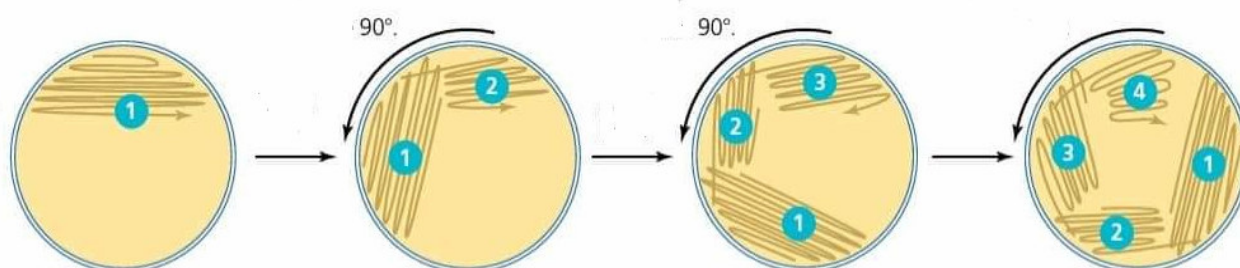


Рис. 8.2. Техніка посіву виснажувальним штрихом для виділення чистої культури за допомогою бактеріологічної петлі

– ізольовані колонії відсівають петлею в пробірки на поверхню скошеного густого середовища чи в рідке середовище.

– усі операції з посівів мікроорганізмів виконуються стерильно біля вогню (рис. 8.3).

Для одержання ізольованих колоній із накопичувальної культури мікроорганізмів, що відносяться до **факультативних аеробів** чи **факультативних анаеробів** застосовують метод глибинного посіву у пробірки зі стовпчиком стерильного агару:

- стерильною голкою беруть чисту культуру з колоній, одночасно виймають пробку, обпалюють край пробірки і, тримаючи її дном догори, голкою над пальником роблять прокол до дна.



Рис. 8.3. Результат посіву культури виснажувальним штрихом

Виділення чистої культури **анаеробних** бактерій за методом Коха можливо тільки в умовах, що виключають доступ до них вільного кисню. анаеробні мікроорганізми можна культивувати у звичайних пробірках і чашках Петрі, поміщаючи їх після посіву в анаеростати (рис. 8.4).



Рис. 8.4. Анаеростат лабораторний для культивування анаеробних мікроорганізмів

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Підготувати скошений агар (косяки) та стовпчики твердого живильного середовища у мікробіологічних пробірках для подальшого культивування та перевірки чистоти культур (МПА, сусло-агар). Заповнювати середовищем не більш, ніж на 1/3 пробірки. Техніка розливу поживного середовища:

а) Колбу із середовищем беруть у праву руку (за дно), а стерильну пробірку, у яку наливають середовище, – у ліву. Горло колби проводять через полум'я спиртівки. Під час роботи пробку тримають між мізинцем та безіменним пальцем правої руки, після розливу обпалюють. Пробірки поміщають на скошувач.

б) Для одержання стовпчика з поживним середовищем, пробірку залишають до застигання середовища у вертикальному положенні. Стовпчики використовують для посіву культури уколом.

Потрібно стежити за тим, щоб край пробірок чи флаконів не був змочений живильним середовищем, тому що ватно-марлеві пробки можуть приклеїтись до скла під час стерилізації і важко вийматимуться, ускладнюючи процес роботи.

2. Підготувати по 3 чашки Петрі з твердим поживним середовищем: розлити МПА, Сусло-агар у чашки Петрі по 15 –20 мл у кожному. Техніка розливу:

а) Стерильне агаризоване поживне середовище розплавляють у колбі на водяній бані та охолоджують до 45-50°C.

б) Виймають чашки Петрі з папера або бікса, у якому вони стерилізувалися, і ставлять їх на рівну горизонтальну поверхню догори дном.

в) Беруть пробірку чи колбу з охолодженим поживним середовищем, виймають ватяну пробку, обпалюють у полум'ї пальника край колби та тримають її у похилому положенні.

г) Відкривають кришку чашки Петрі лівою рукою у бік полум'я, а правою – наливають 15-20 мл середовища, злегка рухаючи чашкою для його рівномірного розподілу по всій поверхні дна.

д) Залишають чашку Петрі на столі до повного застигання середовища, потім ставлять у термостат для підсушування (видалення конденсату та зайвої вологи).

3. Підготувати до стерилізації 5-6 пробірок з ізотонічним розчином (0,9 % NaCl) для приготування розведень.

4. Виконати посів накопичувальних культур за методом виснаженого штриха у чашки Петрі:

а) на сусло-агар – молочнокислих мікроорганізмів та оцтовокислих бактерій (*Acetobacter aceti*),

б) на МПА – аеробних бактерій (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*).

Увага! Слідкувати, щоб петля не пошкодила поверхні середовища.

Перед посівом виконати мікроскопічний аналіз мікроорганізмів накопичувальних культур.

5. Для виділення культур і вивчення культуральних властивостей анаеробних культур зробити посів бактеріальних культур накопичувальних культур (*Clostridium pasteurianum*) у чашці Петрі із МПА і молочнокислих бактерій глибинним способом.

Техніка глибинного посіву на тверді середовища в чашці Петрі:

а) Розплавляють агаризоване поживне середовище у колбі на водяній бані та охолоджують його до 40°C.

б) Відкривають стерильну чашку та поміщають петлею чи піпеткою краплю посівного матеріалу на дно чашки.

в) Обпалюють край пробірки чи колби у полум'ї пальника і виливають середовище (15-20 мл) у чашку Петрі з внесеним посівним матеріалом, дотримуючись правил стерильної роботи.

г) Обережно, круговими рухами переміщують чашку Петрі по поверхні столу для рівномірного розподілу посівного матеріалу у поживному середовищі.

д) Залишають чашки Петрі на столі до повного застигання середовища.

е) Роблять на чашці напис: вид мікроорганізму та вказують дату засіву.

є) Посіви поміщають у термостат із температурою, що сприятлива для їх росту.

6. Виконати пересівання культур бактерій, вирощених на рідких живильних середовищах в інше рідке стерильне живильне середовище (картопляне середовище).

Техніка пересівання культур мікроорганізмів, вирощених у рідкому середовищі:

а) Стерильну піпетку виймають із паперу і тримають середнім і великим пальцями правої руки, не торкаючись поверхні тієї частини піпетки, що буде контактувати із поживним середовищем під час відбору матеріалу та його засіву.

б) Лівою рукою тримають пробірку (чи колбу) із культурою мікроорганізмів, що вирощена у рідкому середовищі, у вертикальному положенні, щоб не замочити пробку.

в) Відкривають пробку, дотримуючись правил асептики, і вводять піпетку у ємність.

г) Набирають у піпетку суспензію мікроорганізмів, закривають пробкою пробірку (чи колбу), вносять визначену кількість суспензії у свіже стерильне живильне середовище, дотримуючись правил стерильності.

д) Після використання піпетку поміщають у посудину з дезінфікуючим розчином.

7. Виконати пересів чистих культур бактерій (*Micrococcus lisodeikticus*) на скошений МПА та мікроскопічних грибів на скошений СА або середовище Сабуро з пробірки в пробірку за допомогою бактеріологічної петлі.

Техніка посіву мікроорганізмів, що вирощені на твердому середовищі в пробірках, в іншу пробірку із середовищем:

а) Стерилізують бактеріологічну петлю у полум'ї пальника. Упродовж прожарювання петлю тримають у полум'ї майже вертикально, щоб весь дріт був розпечений.

б) Лівою рукою тримають дві пробірки – одну зі стерильним середовищем, іншу – із культурою мікроорганізмів.

в) Не випускаючи бактеріологічної петлі, мізинцем та безіменним пальцем правої руки притискають зовнішні кінці ватяних пробок до долоні і виймають пробки з пробірок. **УВАГА! Класти пробки на стіл не можна.**

г) Злегка обпалюють у полум'ї пальника край відкритих пробірок.

д) Прожарену бактеріологічну петлю вводять у пробірку з культурою мікроорганізмів. Щоб не зашкодити клітинам, петлю спочатку охолоджують, торкаючись до внутрішньої поверхні пробірки чи до живильного середовища, вільного від клітин, після цього відбирають невелику кількість мікробної маси.

е) Виймають петлю та вводять її у пробірку зі стерильним живильним середовищем, не торкаючись стінок пробірки.

є) Від дна догори роблять петлею зигзагоподібний чи прямий штрих, злегка торкаючись поверхні агару.

ж) Обпалюють ватяні пробки і край пробірок одночасно у полум'ї та закривають обидві пробірки.

з) Обпалюють петлю у полум'ї.

8. Лабораторну роботу оформлюють, роблять висновки. Результати всіх посівів розглядають на наступному занятті та фіксують.

Контрольні запитання:

1. Назвіть техніки посіву мікроорганізмів.
2. Опишіть техніку посіву виснаженим штрихом за допомогою мікробіологічної петлі або шпателя Дригальського. У чому різниця?
3. З яких етапів складається виділення чистої культури мікроорганізмів?
4. Охарактеризуйте техніку посіву мікроорганізмів у рідке та тверде поживне середовище.
5. Назвіть ознаки чистої культури.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

ДОСЛІДЖЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРООРГАНІЗМІВ. ПЕРЕВІРКА ЧИСТОТИ КУЛЬТУР

Мета: визначити характер росту мікроорганізмів на твердому поживному середовищі.

Матеріали та устаткування: колонії мікроорганізмів на твердих середовищах у чашках Петрі, мікробіологічні пробірки зі скошеним СА, МПА, спиртівка (брикети сухого пального), мікроскоп, предметні та покривні скельця, барвники для зафарбовування за Грамом – генціанвіолет, фуксин, розчин Люголю, 96%-ний спирт.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

До *культуральних чи макроморфологічних* властивостей відносяться характерні риси росту мікроорганізмів на твердому та рідкому живильному середовищах. На поверхні твердих живильних середовищ мікроорганізми можуть рости у вигляді характерних колоній (рис. 9.1), чи штрихів суцільного газону.

Колонія – це ізольоване скупчення клітин одного виду, що сформувалося з однієї клітини. Залежності від того, де росте мікроорганізм (на поверхні щільного поживного середовища, у його товщі або на дні колби/пробірки з рідким середовищем), розрізняють:

- поверхневі,
- глибинні;
- донні колонії.

Колонії, що виростили на поверхні середовища, відрізняються великою різноманітністю. Під час їх опису враховують наступні ознаки: форму, профіль, край, структуру, розмір, поверхню, колір. Культуральні властивості є діагностичними під час ідентифікації мікроорганізмів (рис 9.2).

Чистоту культури мікроорганізмів ретельно перевіряють застосовуючи наступні методи:

- візуально (дослідження колоній),
- мікроскопічний контроль (приготування мікробіологічних препаратів),
- висів на поживні середовища.

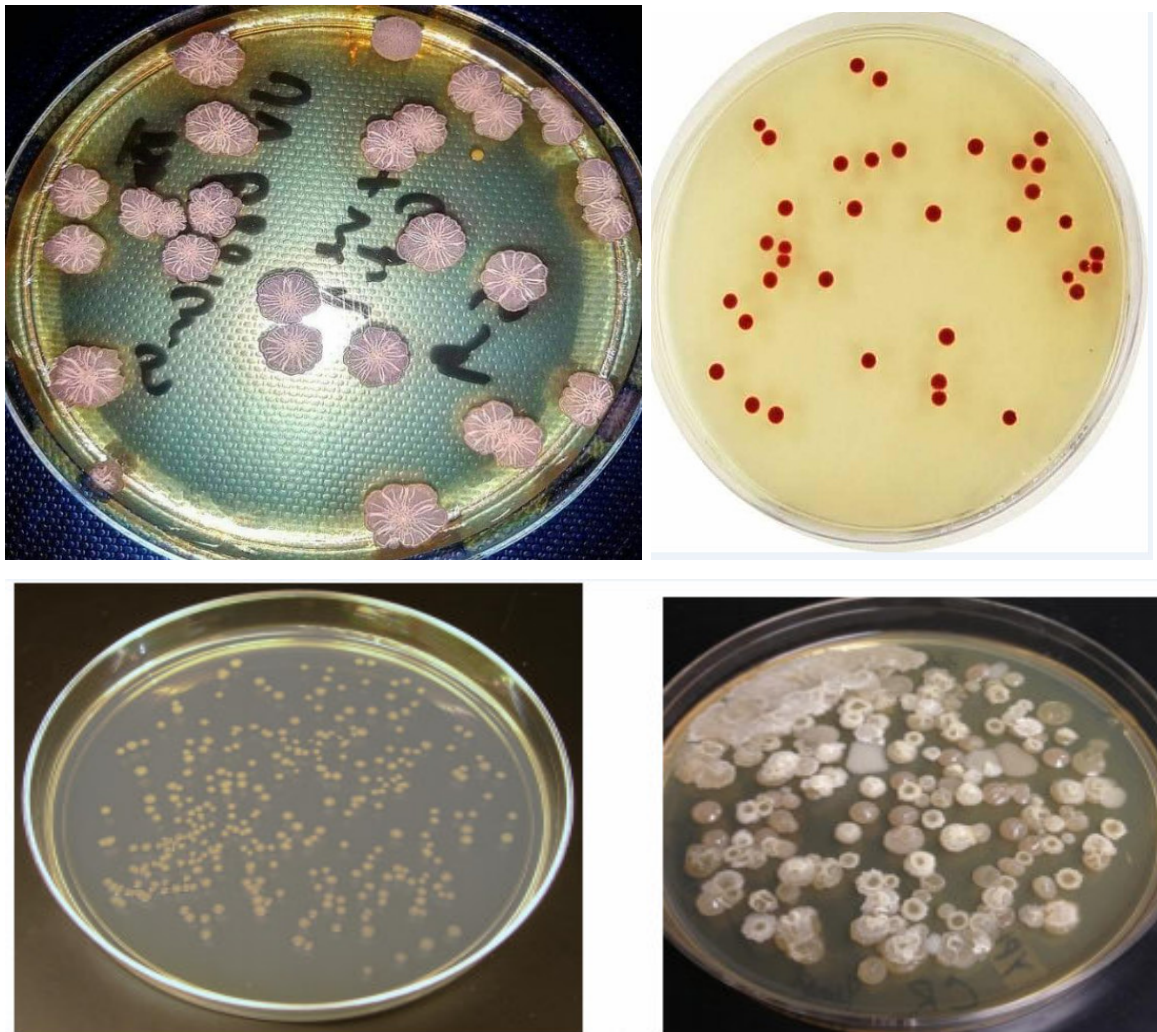


Рис. 9.1. Ізольовані колонії бактерій на твердих поживних середовищах у чашках Петрі

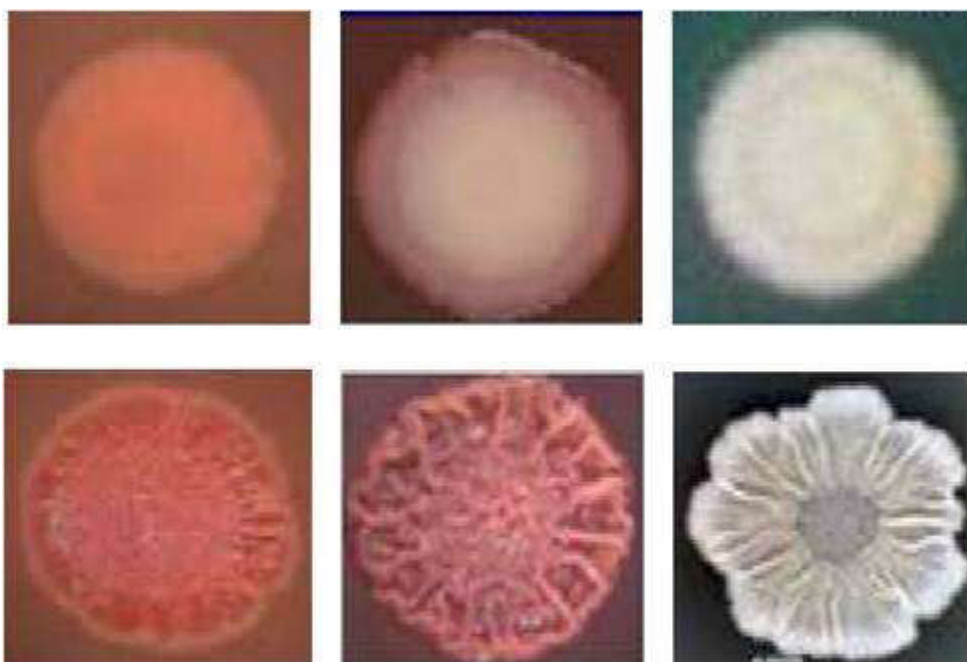


Рис. 9.2. Колір та зовнішній вигляд колоній мікроорганізмів

Зазвичай колонії з клітин чистої культури, що висіяна на тверде середовище, схожі одна на одну, що є доказом чистоти культури. Але є виключення, наприклад, у випадку дисоціації колоній на гладкі S- та складчасті R - форми.

Інший критерій чистоти культури – це морфологія клітин. Для чистої культури характерний високий ступінь морфологічної подібності у забарвлених препаратах. Однак бувають виключення – залежно від віку культури, поживного середовища та інших умов росту.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Переглянути колонії на чашках Петрі. Колонії, що виростили на твердому поживному середовищі, переглянути спочатку неозброєним оком чи через лупу.

2. Помістити чашки на столик мікроскопа догори дном і вивчити колонії у прохідному світлі з об'єктивом 8х.

3. Описати та замалювати ізольовані колонії, які переважають (3-5 видів).

Опис колоній виконують за наступною схемою, враховуючи наступні ознаки:

Форма колонії (рис. 9.3) – округла, амебоподібна, ризоїдна, неправильна і т.д.

Структура колонії (рис. 9.4) – однорідна, дрібно- чи грубозерниста, струминна та ін.

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

Оптичні властивості (блиск і прозорість) колоній:

- Блискуча,
- матова,
- тьмяна,
- борошниста,
- прозора,
- напівпрозора,
- непрозора тощо.

Колір колонії – безбарвна або пігментована – біла, жовта, золотава, помаранчева, бузкова, рожева, червона, чорна та ін (рис. 9.2). В описі колоній актиноміцетів вказують пігментацію повітряного і субстратного міцелію. Особливо відзначають виділення пігменту в субстрат.

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

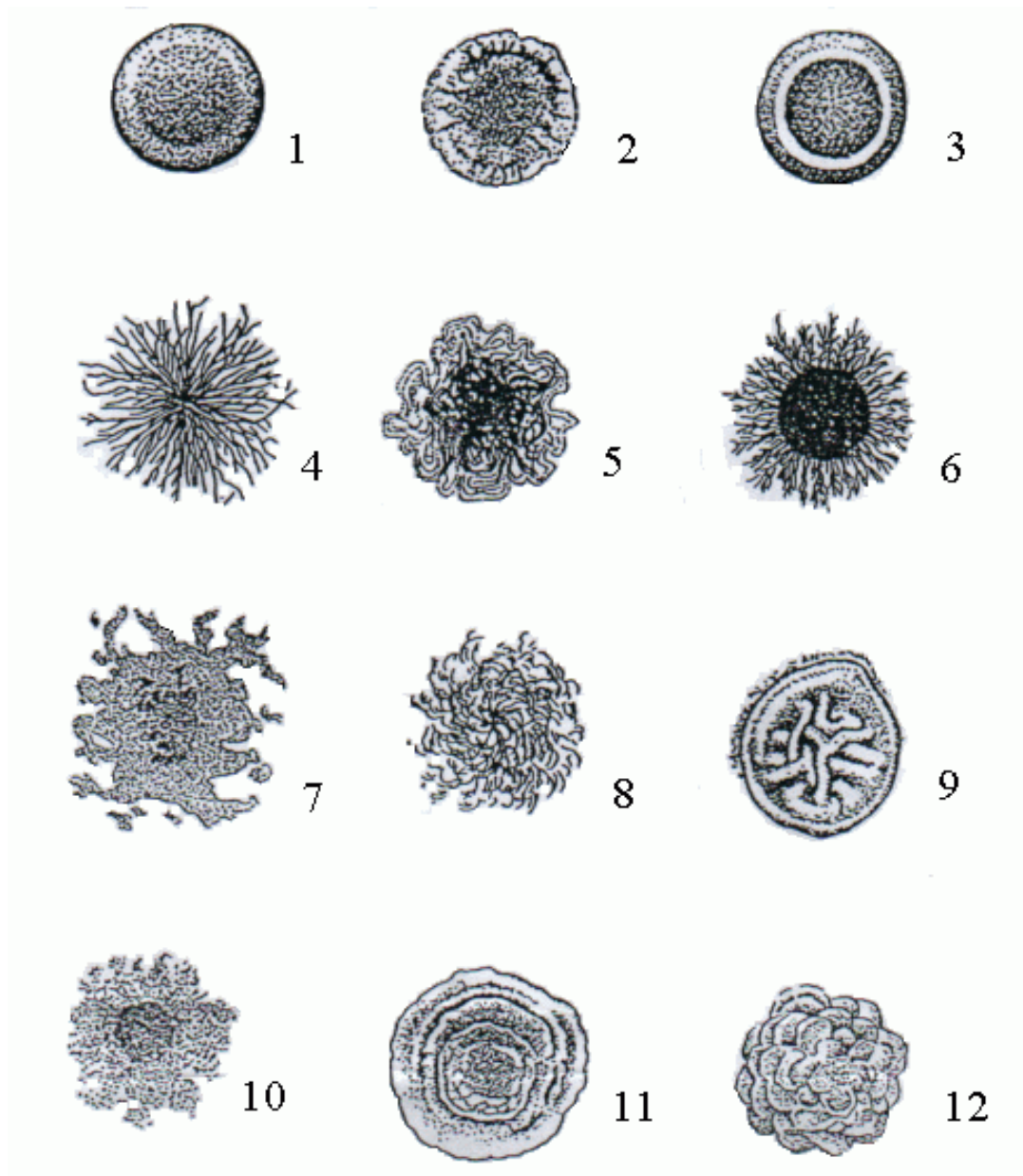


Рис. 9.3. Форма колоній: 1 – кругла; 2 – кругла з фестончастим краєм; 3 – кругла з валиком; 4 і 5 – ризоїдні; 6 – із ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – нитковидна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна

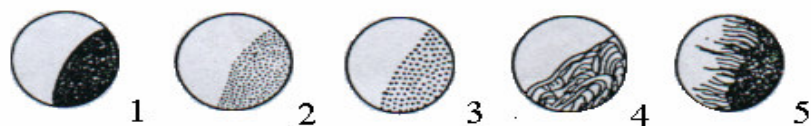


Рис. 9.4. - Структура колоній: 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – грубозерниста; 4 – струминна; 5 – волокниста

Профіль колонії (рис. 9.5) – плоский, вигнутий, опуклий, кратероподібний, конусоподібний.

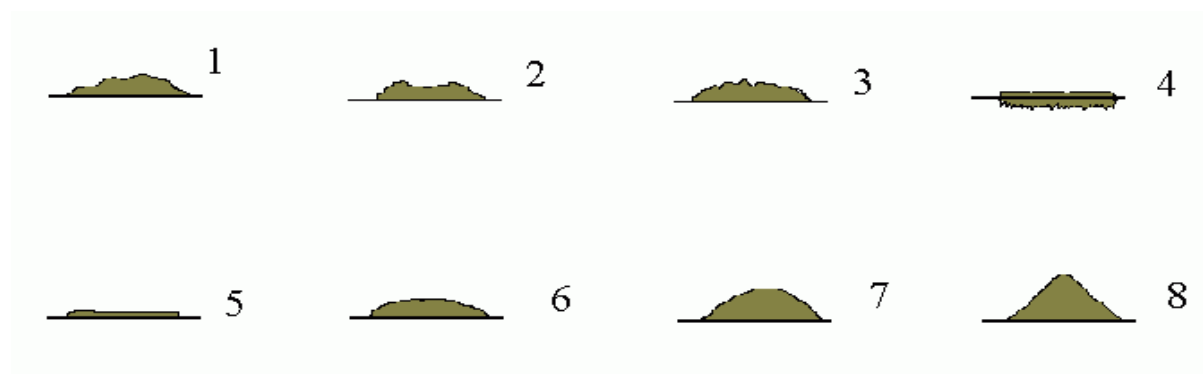


Рис. 9.5. Профіль колонії: 1 – вигнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбистий; 4 – колонія, що вростає у субстрат; 5 – плоский; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний

Край колонії (рис. 9.6) – рівний, хвилястий, зубцюватий, торочкуватий і т.д.

Консистенцію колонії визначають, доторкаючись до її поверхні петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути густою, м'якою чи вростати у середовище, слизуатою (прилипати до петлі), тягучою, плівчатою (знімається цілком), тендітною (легко ламається за умов дотику петлею).

Розміри та деякі інші особливості колоній змінюються з віком і залежать від складу середовища, тому під час опису вказують вік культури, склад середовища та температуру культивування.



Рис. 9.6. Край колонії

Здатність до емульгування – рівномірною чи зернистою суспензією у воді, слабо чи зовсім не суспендується у воді.

4. Після опису, колонії піддаються мікроскопічному дослідженню. З кожної групи колоній, що виростили на твердих поживних середовищах, для **вивчення морфології та тинкторіальних** властивостей мікроорганізмів приготувати фіксовані мікробіологічні препарати та забарвити за Грамом.

5. Визначити: морфологію та преналежність за Грамом – Грам-позитивні або Грам-негативні. Замалювати отримані результати мікроскопії.
6. Ознаки колоній занести у таблицю.

Таблиця 9.1. – Ознаки колоній мікроорганізмів

№ колонії	Форма	Діаметр, мм	Блиск, прозорість	Колір	Поверхня	Профіль	Край	Структура	Консистенція	Флуоресценція	Здатність до емульгування	Морфологія мікроорганізмів

7. Підготувати живильні середовища та посуд до лабораторної роботи №10.
8. Пересіяти одержані чисті культури на скошене тверде живильне середовище у мікробіологічні пробірки.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте основні ознаки колоній, що вирости на поверхні щільних поживних середовищ.
2. Яка форма та структура колоній буває?
3. Що мають на увазі під оптичними властивостями?
4. Як перевірити здатність до емульгації?
5. Які фактори впливають на розміри та особливості зростання колоній?
6. Окрім візуального, який ще метод опису колоній застосовують та які його переваги?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ОБЛІКУ МІКРООРГАНІЗМІВ. ПОСІВ ЗА МЕТОДОМ КОХА.

Мета: опанувати методи кількісного визначення мікроорганізмів

Матеріали та устаткування: предметні та покривні скельця, барвники, водяна баня зі штативом, бактеріологічні петлі, пінцети, спиртівка, 0,1%-ний розчин агар-агару, мікроскоп, чисті добові культури мікроорганізмів, рахункова камера Горяєва, стерильні пробірки, стерильні піпетки, колба зі стерильним ізотонічним розчином (0,9 % NaCl), спирт 96%, зразки ґрунту, стерильні живильні середовища (МПА), електроплитка, стерильні чашки Петрі, шпатель Дригальського, скляні палички.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання**:

- Застосовувати методи виділення з метою отримання накопичувальних та чистих культур мікроорганізмів, використовувати на практиці методи кількісного підрахунку мікроорганізмів, дотримуючись умов стерильності та правил техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Метод кількісного обліку мікроорганізмів на твердих поживних середовищах

Метод Коха – найбільш розповсюджений спосіб кількісного обліку мікроорганізмів. Метод полягає у посіві визначеного об'єму досліджуваної суспензії мікроорганізмів на щільне середовище у чашки Петрі з наступним підрахунком кількості колоній, що вирости. Вважають, що кожна колонія – це потомство однієї клітини. Переваги методу: визначає кількість тільки життєздатних клітин.

Підрахунок чисельності клітин мікроорганізмів у рахункових камерах

Для підрахунку клітин у відомому об'ємі рідини використовують спеціальні лічильні пристрої – камера Горяєва (рис. 10.1), Тома, Фукса-Розенталя, Бюркера та ін.

Метод кількісного обліку мікроорганізмів за допомогою рахункових камер має ряд недоліків: під час підрахунку враховують, як мертві, так і живі клітини; рахункові камери можуть бути використані лише для визначення кількості відносно великих об'єктів – клітин водоростей, дріжджів, спор, грибів, які можна дослідити методом мікроскопії з об'єктивами 8х-40х.

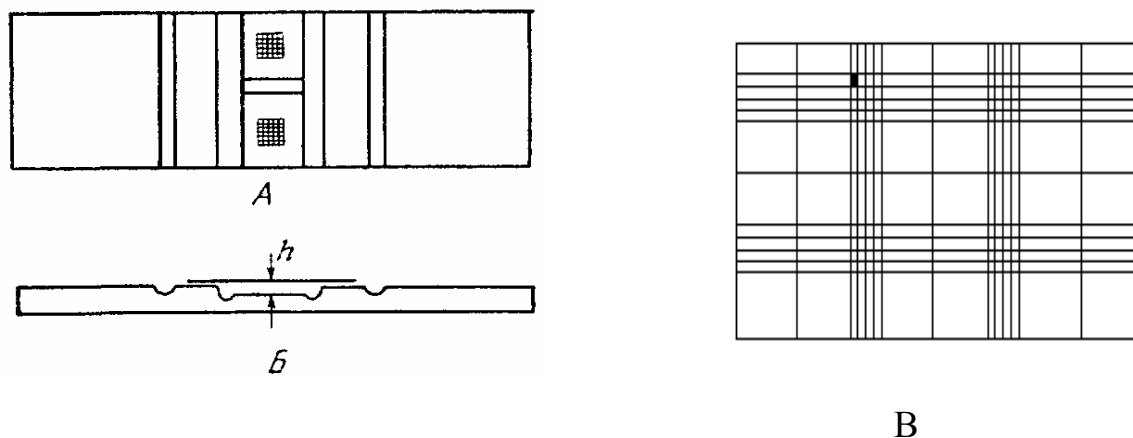


Рис. 10.1. Рахункова камера Горяєва: А – вигляд зверху; Б – збоку; В – камера Горяєва під малим збільшенням мікроскопа

У випадку рухливості клітин, препарат підігрівають або додають краплю 0,1%-го розчину агар-агару. Фіксація та фарбування препаратів призводить до деяких змін розмірів мікробних клітин.

Рахункова камера Горяєва – це товсте предметне скло з нанесеними на нього поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розташовані плоскі зони. Середня зона подовжнім прорізом розділена навпіл, на кожній половині нанесена квадратна сітка. Дві бічні зони розташовано на 0,1 мм вище за середню. Вони слугують для притирання покривного скла. Сітка розділена на визначене число згрупованих великих і маленьких квадратів.

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

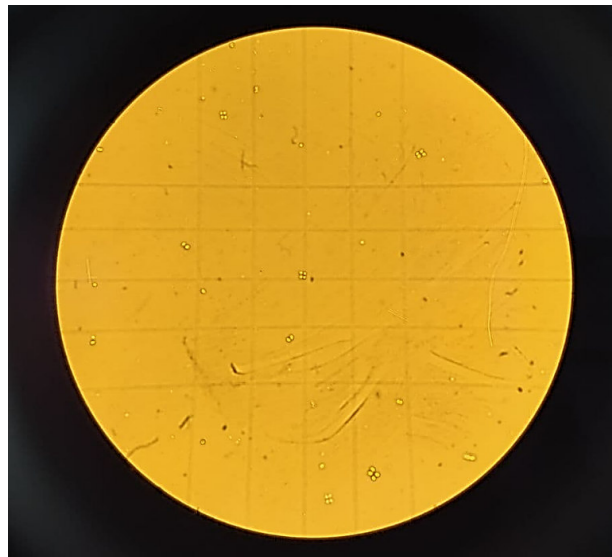


Рис. 10. 2. Мікроскопічна сітка камери Горяєва з клітинами *Chlorella vulgaris*: під мікроскопом Olympus CX1 із застосуванням окуляра 10x та об'єктиву 40x

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 мкл.

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

Підрахунок клітин у камері починають через 3-5 хв після заповнення її, коли клітини осіли й розташувалися в одній площині. Звичайно рахують клітини у 10 великих або у 20 малих квадратах, переміщаючи її за діагоналлю. З вихідної суспензії варто приготувати 3-4 кратні розведення.

1.2. ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Виконати посів за методом Коха суспензії зі зразка ґрунту, що розведена у 10^{-3} та 10^{-4} на щільне вівсяне середовище, МПА і середовище Сабуро:

а) Наважку підготовленого ґрунту (1 г) поміщають у чисту ступку з невеликою кількістю стерильної води та розтирають протягом 5 хв.

б) Підготовлену ґрунтову суміш переносять у колбу зі 100 мл стерильної водопровідної води.

в) Готують десятикратні розведення (рис. 10.3): 1 мл отриманої ґрунтової суспензії переносять послідовно у 4-5 пробірок з 9 мл стерильного ізотонічного розчину (0,9 % NaCl).

Увага! Ступінь розведення дослідного зразка визначається передбачуваною кількістю мікроорганізмів у матеріалі. Ґрунт є середовищем, що заселений великою кількістю різноманітних мікроорганізмів. *Вважається, що у 1 г ґрунту міститься від 1 до 10 млрд. клітин мікроорганізмів.*

г) На поверхню щільного та підсушеного поживного середовища наносять краплю ґрунтової суспензії певного розведення та за допомогою стерильного шпателя розподіляють по всьому агару. Якщо висів виконують, починаючи з великих розведень, то використовують нову стерильну піпетку та новий шпатель для кожного розведення.

д) Засіяні чашки Петрі перевертають догори дном та поміщають у термостат при 29° С .

е) Підрахунок колоній, що вирости, виконують через 1, 3-5 діб.

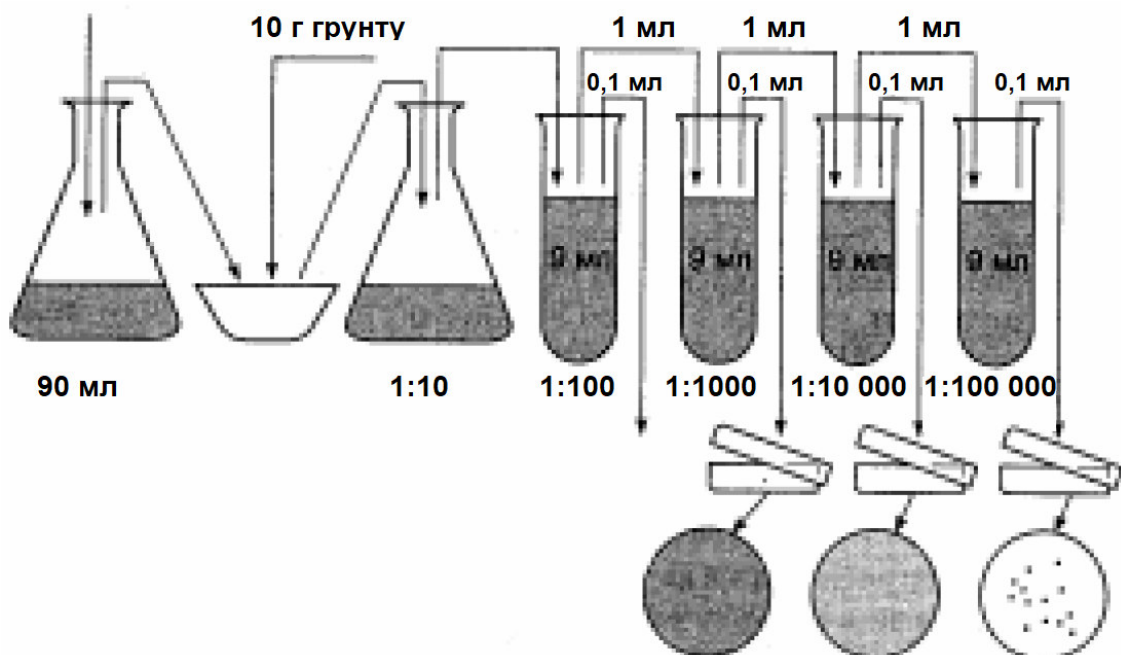


Рис. 10.3. Схема приготування розведення та посіву суспензії мікроорганізмів.

На МПА звичайно на 2-3 добу інкубації враховують спорові та безспорові форми бактерій. На вівсяному середовищі (або на середовищі Гаузе) на 5-7 добу враховують колонії актиноміцетів, на сусло-агарі або Сабуро на 5-7 добу – колонії грибів та дріжджів.

є) Підрахунок колоній проводять не відкриваючи чашку Петрі, перевертаючи її догори дном та переглядаючи у прохідному світлі.

Якщо кількість колоній, що сформувалася, є великою і їх важко підрахувати, дно чашки поділяють на сектори, підраховують кількість колоній у секторах.

Під час підрахунку кожен відлічену колонію позначають крапкою за допомогою маркера із нижньої сторони чашки Петрі. Для підрахунку колоній зручно користатися спеціальним приладом із лічильником.

Кращим розведенням вважають те, під час висіву якого на щільному живильному середовищі виростає від 50 до 150 колоній.

Підрахувавши кількість колоній на всіх паралельних чашках, обчислюють їх середнє число на одній чашці, а потім виконують перерахування для визначення вмісту мікроорганізмів у 1 г ґрунту (або іншого дослідного зразка) за формулою (10.1):

$$N = a \cdot b \cdot c, \quad (10.1)$$

де, N – кількість клітин у 1 г ґрунту;

a – середня кількість колоній на чашці;

b – розведення, із якого зроблений посів;

c – об'єм бактеріальної суспензії, що використали для засіву у мл.

Увага! Найчастіше засівають або 1 краплю суспензії, що містить 0,03 мл або 1 мл.

2. Приготувати препарат із добової культури дріжджів р. *Saccharomyces* та підрахувати кількість клітин у вихідній суспензії за допомогою камери Горяєва:

а) виконати розведення добової культури р. *Saccharomyces* для того, щоб можна було провести підрахунок кількості клітин у камері;

б) мікробіологічною петлею наносять краплю суспензії дріжджів у центр рахункової камери;

в) рахункову камеру накривають покривним склом, ретельно притираючи його з країв до утворення ньютонівських кілець (кольорових смуг).

г) підрахунок клітин дріжджів робити (зі збільшенням мікроскопа: окуляр 10-15х, об'єктив 20-40х) у 20 малих квадратах, у 3-4 пробах досліджуваної суспензії.

Потім розраховують середнє число мікробних клітин у одному малому квадраті і роблять перерахування на вміст у 1 мл вихідної суспензії за формулою (10.2):

$$N = \frac{a * 1000}{h * s} * n, \quad (10.2)$$

де, N – число клітин у 1 мл суспензії;

a – середнє число клітин у малому квадраті сітки;

h – глибина камери у мм;

s – площа малого квадрата сітки у мм²;

n – розведення вихідної суспензії; 1000 – коефіцієнт перерахування мм³ у мл.

3. Отримані результати досліджень записують.

Петлі, голки обпалюють у полум'ї пальника. Посуд дезінфікують.

4. Результати культивування та підрахунок кількості колоній зробити на наступному занятті.

5. Підготувати матеріали до наступного лабораторного заняття.

Контрольні питання:

1. Які методи кількісного визначення клітин існують? Чим вони відрізняються?
2. Опишіть переваги визначення кількості клітин за методом Коха.
3. Які пристрої для підрахунку клітин мікроорганізмів існують?
4. Що таке рахункова камера? Які її особливості?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

ЯВИЩЕ ФЕРМЕНТОУТВОРЕННЯ БАКТЕРІЙ. КОЛЬОРОВИЙ РЯД ГІССА

Мета: ознайомитись з методами визначення біохімічної активності для проведення видової ідентифікації мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, імерсійна олія, фільтрувальний папір, предметні скельця, бактеріологічні петлі, ізотонічний розчин, дистильована вода, барвники за Грамом, пробірки з поживними середовищами для визначення культуральних та біохімічних властивостей Гісса, перекис водню, розчин диметил-п-фенілдіаміну, індикаторні папірці, кисле молоко, огірковий чи капустяний розсіл, вино, пиво.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Аналізувати кольоровий ряд Гісса з метою ідентифікації та вивчення властивостей мікроорганізмів;
- Знати та проводити аналіз антагоністичних взаємодій мікроорганізмів, визначати стійкість до антибіотиків у бактерій, мікробний синтез.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Обмін речовин (метаболізм) – це сукупність усіх біохімічних реакцій, що проходять у клітині. Вони забезпечують життєдіяльність організму та чітко координовані у часі та просторі. Усі біохімічні реакції, що відбуваються у клітині, можна умовно поділити на дві групи: енергетичний обмін та конструктивний обмін.

Основна функція *енергетичного обміну* – забезпечення енергією всіх видів роботи, *конструктивного* – синтез усіх необхідних сполук, що складають структурні компоненти клітини (рис. 11.1).

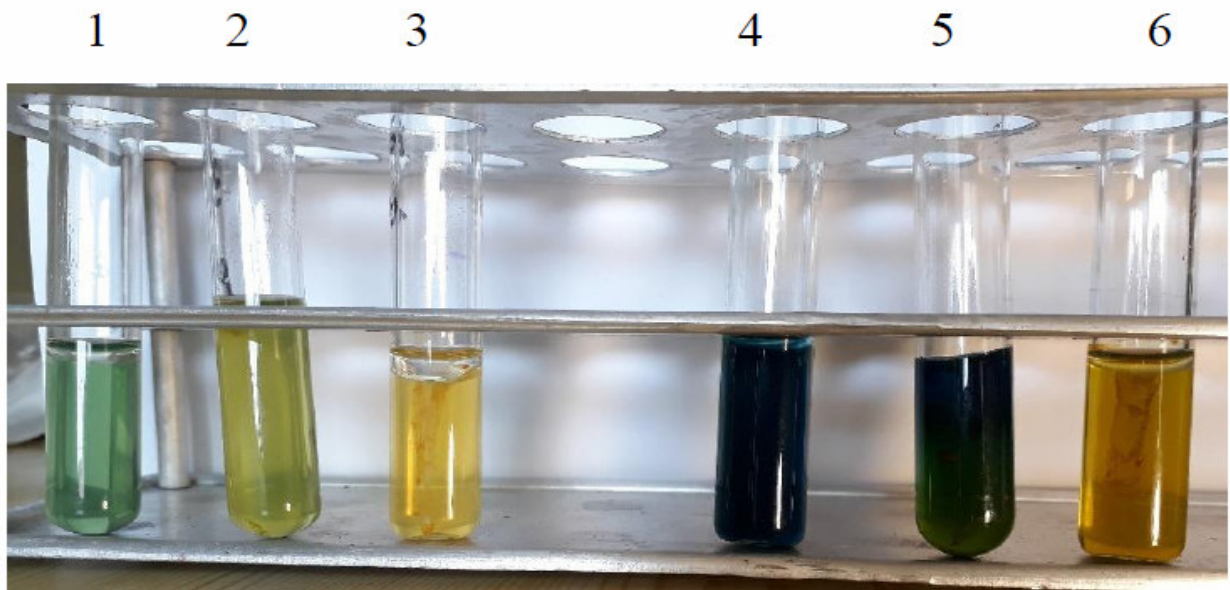


Рис. 11.1. Ріст бактерій роду *Staphylococcus* на середовищі Хью Лейфсона з глюкозою або манітом в анаеробних умовах: 1-контроль, середовище з глюкозою; 3 – позитивна реакція, утилізація глюкози з утворенням кислоти; 4 – контроль, середовище з манітом; 6 – позитивна реакція, утилізація маніту з утворенням кислоти; пробірки 2 та 5 – сумнівні результати

Метаболізм прокаріотів, як енергетичний, так і конструктивний, відрізняється надзвичайним різноманіттям біохімічних реакцій, що є результатом їх здатності використовувати у якості джерел енергії та вихідних субстратів для побудови компонентів клітин найпоширеніший набір органічних і неорганічних сполук.

Детальне дослідження основних шляхів метаболізму проводять за допомогою ферментативного аналізу, так як існування мікробної клітини також, як і будь-якого живого організму, обумовлено *каталітичною дією специфічного набору ферментів*. Кожен вид мікроорганізмів продукує постійний для нього комплекс ферментів, одні з яких розщеплюють у різному ступені білки, жири та вуглеводи, а інші викликають окислення та відновлення

різноманітних субстратів. Стабільність ферментативних систем бактерій дозволяє використовувати біохімічні властивості мікроорганізмів у сполученні з їх морфологічними, культуральними та іншими постійними ознаками для ідентифікації бактерій.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Провести третій етап виділення чистої культури (вивчення посіву на скошеному агарі):

а) визначити культуральні властивості виділених культур;

б) виявити морфологічні та тинкторіальні ознаки бактерій у препаратах пофарбованих за методом Грама.

2. Визначити біохімічну активність бактеріальних клітин з метою їх ідентифікації. Провести посів виділених культур на короткий кольоровий ряд – середовища Гісса з глюкозою, лактозою, манітом та сахарозою (рис. 11.2).



Рис. 11.2. Кольоровий ряд Гісса

Середовища Гісса з вуглеводами є диференційно-діагностичними (індикаторними) середовищами для визначення здатності мікроорганізмів утилізувати субстрати вуглеводної природи. До складу середовища входять, крім різних вуглеводів, індикатори, які залежно від рН середовища змінюють колір.

а) посів у напіврідкі вуглеводні середовища проводять уколком крізь їх товщу.

б) пробірки підписати, помістити у термостат при 29 °С.

3. Провести посів культур у пробірки з пептонною водою та молоком для визначення протеолітичної активності досліджуваних культур.

а) у пробірку з пептонною водою після посіву бактерій під пробку поміщують індикаторні папірці з метою виявлення сірководню, індолу, аміаку. Папірець, змочений оцтовокислим свинцем, під час взаємодії з сірководнем чорніє; папірець насичений розчином щавлевої кислоти, реагуючи з індолом – червоніє; лакмусовий папірець показує виділення аміаку.

б) проводять посів досліджуваних культур на молоко для визначення здатності мікроорганізмів утворювати згусток та розщеплювати білок-казеїн.

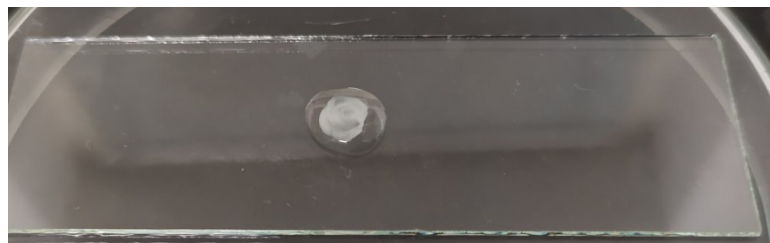
3. Для вивчення активності ферментів енергетичного обміну провести тести на наявність каталази та цитохромоксидази у клітинах досліджуваних культур.

а) Для визначення наявності ферменту каталази у бактеріальних клітинах:

- на предметне скло петлею нанести мікробну масу та додати краплю 3%-го розчину перекису водню. Виділення бульбашок кисню вказує на наявність у мікроорганізмів ферменту каталази (рис. 11.3).



А



Б

Рис. 11.3. Вивчення каталазної активності: А - позитивна каталазна активність; Б – негативна каталазна активність.

б) Важливим тестом для ідентифікації грам-негативних бактерій є визначення оксидазної активності. Тест ґрунтується на перетворенні диметил-п-фенілдіаміну в забарвлену сполуку під час взаємодії з розчинним цитохромом с:

- краплю реактиву (1%-ий водний розчин) наносять на колонії. Позитивна реакція – колонії червоніють, а згодом – чорніють.

4. Дослідити препарати мікроорганізмів – збудників різних типів бродінь. Приготувати мазки з кислого молока, огіркового чи капустяного розсолу, вина та пива для вивчення морфології мікроорганізмів, що викликають різні типи

бродіння: молочнокисле, оцтовокисле, ацетоно-бутилове.

Мазки з кислого молока перед забарвленням необхідно знежирити (препарат обробляють розчином аміаку протягом 2-3 хв., потім промивають водою). Фарбування здійснюється фуксином чи метиленовим синім.

5. Приготувати середовище для виявлення амілолітичної активності (г/л): пептон – 10,0; KH_2PO_4 – 5,0; розчинний крохмаль – 2,0; агар – 15,0; рН середовища 6,8 – 7,0. Середовище стерилізують при 1 атм та розливають в стерильні чашки Петрі.

Середовище з крохмалем обробити розчином Люголю та визначити зону амілолітичної активності.

5. Дослідити ріст мікроорганізмів на поживних середовищах, зафіксувати отримані результати досліджень та зробити висновки.

Контрольні питання:

1. Дати характеристику процесів енергетичного та конструктивного обміну речовин у бактерій.

2. Які методи застосовують для дослідження метаболічних процесів у мікроорганізмів?

3. Які способи трансформації енергії притаманні прокариотам?

4. У чому полягає процес бродіння та чим обумовлюються різні типи бродінь?

5. Чим відрізняються аеробні, анаеробні та факультативно анаеробні бактерії?

6. До яких типів фотосинтезу здатні прокариоти?

7. Які поживні середовища та тести застосовують для проведення ідентифікації та вивчення мікроорганізмів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

ФОРМИ ВЗАЄМОВІДНОСИН МІКРООРГАНІЗМІВ. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ ТА ЯВИЩА АНТАГОНІЗМУ

Мета: ознайомитись з формами взаємовідносин мікроорганізмів, визначити антимікробний спектр актиноміцетів та виявити чутливість бактерій до антибіотиків диск-дифузійним методом.

Матеріали та обладнання: культури бактерій, культури актиноміцетів, виділені з ґрунту, стерильні пробірки з ізотонічним розчином, чашки з МПА, середовищем Чапека, диски з антибіотиками, бактеріологічні петлі, пінцети, дезінфікуючий розчин.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати основні форми взаємовідносин між мікро- та макроорганізмами;
- Знати та проводити аналіз антагоністичних взаємодій мікроорганізмів, визначати стійкість до антибіотиків у бактерій, мікробний синтез.

1.1 ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Мікроорганізми у природі існують у тісних асоціаціях один з одним. У цих асоціаціях вони пов'язані між собою складними динамічними зв'язками та здійснюють взаємний вплив. Форми взаємовідносин мікроорганізмів умовно поділяють на симбіотичні та антагоністичні:

1. Симбіотичні – характеризуються взаємною вигодою.

Симбіоз – це форма тісного співіснування мікроорганізмів, коли обидва симбіонти мають користь від сумісного існування. Прикладом симбіозу є співжиття бактерій р. *Sporocytophaga* з бактеріями-супутниками.

Коменсалізм – співіснування мікроорганізмів із макроорганізмом, коли симбіонти користуються захистом або джерелами живлення за рахунок макроорганізму, не приносячи йому ані користі, ані шкоди.

Метабіоз – форма взаємовідносин, за якої продукти метаболізму одного виду мікроорганізмів є поживним або енергетичним субстратом для іншого виду.

Синергізм – форма існування мікроорганізмів, коли асоціати взаємно підсилюють фізіологічні функції та викликають нові властивості. Приклад – співіснування оцтовокислих бактерій та дріжджів.

3. Антагоністичні – інгібуючий вплив одного або декількох членів мікробного біоценозу один на одного. Для визначення антибіотичних властивостей актиноміцетів застосовують методи, засновані на здатності антибіотика дифундувати у товщу агару та затримувати ріст або вбивати мікроорганізми, які знаходяться у зоні дифузії антибіотика. Антимікробний спектр виділених чистих культур актиноміцетів-антагоністів вивчають за методом перпендикулярних штрихів і методом агарового блочка.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Визначити антимікробний спектр культур актиноміцетів-антагоністів методом перпендикулярних штрихів.

а) Досліджувані культури актиноміцетів висівають на середовище Чапека у чашки Петрі штрихом по діаметру.

б) Після того, як актиноміцети проростуть і утворять антибіотичну речовину – через 4–7 діб інкубації посівів за температури 28°C, перпендикулярно до їх росту, необхідно зробити штрихові посіви різних тест-мікроорганізмів.

- У якості тест-об'єктів використовують такі мікроорганізми: *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus subtilis* тощо.

- Із указаних культур готують суспензії, які містять $5,0 \times 10^6$ клітин/мл. Суспензії чотирьох тест-культур підсівають із одного боку штриха актиноміцета, який виріс, трьох - з іншого. Чашки ставлять у термостат за температури 29°C на 24 год.

- Тест-об'єкти, нечутливі до антибіотичної речовини, яка виділяється, ростуть біля краю штриха актиноміцета. Чутливі мікроорганізми розвиваються на більшій чи меншій відстані від штриха досліджуваної культури.

- Для оцінки рівня чутливості кожного тест-об'єкта слід виміряти за допомогою лінійки зони затримки росту культури у міліметрах. Дані про спектр і рівень антибіотичної дії актиноміцетів занести до табл. 12.1.

Таблиця 12.1 – Антагоністичний спектр дії актиноміцетів

№ культури актиноміцета	Зона пригнічення росту тест-об'єкта, мм				
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>X. campestris</i>	<i>B. subtilis</i>

2. Визначити чутливість бактерій до антибіотиків диск-дифузійним методом (рис. 12.2).



Рис. 12.2. Визначення чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом: А – загальний вигляд; Б – Визначення зони затримки росту у см або мм

а) Приготувати суспензії досліджуваних культур, наприклад *M. lysodeikticus*, *P. fluorescens*, *X. campestris*, що містять 10^6 клітин/мл.

б) 1 мл бактеріальної суспензії кожної досліджуваної культури наносять на поверхню МПА у чашку Петрі та рівномірно розподіляють. Чашки залишають на 30 хвилин за кімнатної температури для підсихання.

в) потім, дотримуючись умов стерильності, на отриманий засів кладуть на однаковій відстані комерційні паперові диски з різними антибіотиками.

г) чашки Петрі ставлять у термостат за температури 29°C на 24 год.

Антибіотик, який міститься у паперовому дискі, дифундує в агар і спричинює затримку росту культури бактерій, тому навколо диска утворюється зона відсутності росту чутливого до цього антибіотика мікроорганізму. Чим чутливіший мікроб до даного антибіотика, тим більшим буде діаметр зони затримки росту.

3. Результати досліду записують у вигляді табл. 12.2.

Таблиця 12.2 – Визначення чутливості бактерій до антибіотиків диск-дифузійним методом

Досліджувана культура	Діаметр зони пригнічення росту, мм			
	Назва антибіотика	Назва антибіотика	Назва антибіотика	Назва антибіотика

4. Зробити висновок про чутливість досліджуваних бактерій до антибіотиків. Якщо зона затримки росту - більш 25 мм, то мікроорганізм є високочутливий, 15-25 мм - чутливий, 11-15 мм - малочутливий, менше 10 мм - стійкий.

Контрольні питання

1. Які існують форми взаємовідносин між мікроорганізмами?
2. Як визначити антимікробний спектр мікроба-антагоніста?
3. Як визначити чутливість мікроорганізмів до антибіотиків?
4. Що таке диск-дифузійний метод? Які його переваги та для чого застосовують?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзь С. П. Мікробіологія: практикум, тести./ С.П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С.Білінська. – Львів: Вид. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2012. – 228 с.
2. Люта В. А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія. Друге видання / В.А. Люта, О.В. Кононов. – К.: ВСВ «Медицина», 2018. – 576 с
3. Мікробіологія. Том 1 : підручник / Сергійчук М. Г., Сківка Л. М., Сергійчук Т. М. та ін. – К. : ФОП Маслаков, 2020. – 500 с.
4. Мікробіологія. Том 2 : підручник / Сергійчук М. Г., Сківка Л. М., Сергійчук Т. М. та ін. – К. : ФОП Маслаков, 2020. – 348 с.
5. Практична мікробіологія: навчальний посібник / С.І. Климнюк, І.О. Ситник, В.П. Широбоков; за заг. ред.: В.П. Широбокова, С.І. Климнюка. – Вінниця : Нова книга, 2018. – 576 с.

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	3
ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	4
Лабораторна робота № 1. Правила техніки безпеки при роботі в навчальній мікробіологічній лабораторії. Обладнання мікробіологічної лабораторії.	5
Лабораторна робота № 2. Сучасні методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів. Просте забарвлення	10
Лабораторна робота № 3. Вивчення морфологічних форм бактерій.	18
Лабораторна робота № 4. Морфологія дріжджів, цвілевих грибів та найпростіших.	24
Лабораторна робота № 5. Будова бактеріальної клітини. Диференційні методи забарвлення.	30
Лабораторна робота № 6. Методи стерилізації. Підготовка лабораторного посуду та поживних середовищ до стерилізації.	34
Лабораторна робота № 7. Фізіологія мікроорганізмів. Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів. Культивування мікроорганізмів. Одержання накопичувальних культур.	40
Лабораторна робота № 8. Культивування мікроорганізмів. Техніка посіву. виділення чистих культур.	46
Лабораторна робота № 9. Дослідження культуральних властивостей мікроорганізмів. Перевірка чистоти культур.	51
Лабораторна робота № 10. Методи кількісного обліку мікроорганізмів.	58
Лабораторна робота № 11. Явище ферментоутворення бактерій. Кольоровий ряд Гісса.	63
Лабораторна робота № 12. Форми взаємовідносин мікроорганізмів. Методи вивчення стійкості до антибіотиків та явища антагонізму.	67
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	71

СІДАШЕНКО Ольга Ігорівна
ФЕДОТОВ Вячеслав Вікторович

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія»
Частина I «Мікробіологія»**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
спеціальності 091 Біологія та біохімія
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Видано в авторській редакції

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