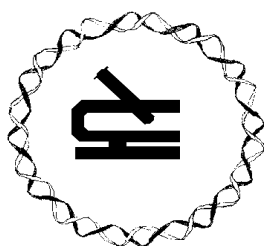


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять для студентів хімічного факультету



ОДЕСА
ОНУ
2018

УДК 579:578(072)
Я551

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 19.04.2018 р.

Рецензенти:

О. Б. Паузер, кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки ОНУ імені І. І. Мечникова;

Л. І. Сьомик, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова.

Ямборко Г. В.

Я551 Мікробіологія з основами вірусології : метод. вказівки до лаб. занять для студентів хім. ф-ту / Г. В. Ямборко, Н. О. Єлинська, О. Ю. Зінченко, Н. Ю. Васильєва. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім І. І. Мечникова, 2018. – 52 с.

У методичних вказівках визначені основні розділи лабораторних занять з мікробіології за програмою підготовки студентів, що отримують освітній рівень вищої освіти «бакалавр» спеціальності «хімія». Мета практикуму з мікробіології – забезпечити наявність у студентів-хіміків необхідного рівня знань, вмінь та навичок щодо ізоляції мікроорганізмів з природних субстратів, їх кількісного обліку та вивчення біологічних властивостей. Студенти мають змогу ознайомитись з організацією мікробіологічної лабораторії, її обладнанням та приладами, а також опанувати техніку мікробіологічних досліджень.

Рекомендовано для студентів хімічного факультету, що отримують освітній рівень «бакалавр».

УДК 579:578(072)

Заняття 1

Організація мікробіологічної лабораторії. Правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами. Методи підготовки і стерилізації мікробіологічного посуду і матеріалів.

Харчові потреби мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомлення з організацією мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній; ознайомлення з принципами і методами стерилізації; ознайомлення з потребами мікроорганізмів у поживних речовинах, принципами складання та стерилізації поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.

Студенти повинні знати

- сучасне лабораторне устаткування і апаратуру,
- основні правила роботи в мікробіологічній лабораторії,
- методика мікробіологічних досліджень, питання їх планування і організації;
- техніку безпеки при проведенні мікробіологічних робіт в лабораторних умовах;
- принципи та методи стерилізації,
- основні правила підготовки посуду і матеріалів до стерилізації,
- потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту);
- типи поживних середовищ за їх складом та призначенню;
- загальні вимоги до поживних середовищ;
- принципи складання та правила стерилізації поживних середовищ.

Студенти повинні вміти: застосовуючи дані про рецептуру, виготовляти поживне середовище для заданої групи мікроорганізмів, використовуючи систематизовані дані про принципи стерилізації, проводити стерилізацію лабораторного посуду та поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.

Студенти повинні мати навички: техніки приготування та підготовки до стерилізації поживних середовищ.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Облаштування мікробіологічної лабораторії і правила роботи в ній:

- облаштування лабораторій з різним ступенем безпеки;
- підготовка лабораторії до роботи;
- ламінарні бокси;
- правила роботи з культурами мікроорганізмів;
- обробка використаних культур і посуду;
- ведення журналу лабораторних досліджень.

2. Мікробіологічний посуд і поживні середовища.

3. Методи стерилізації (автоклавування (з описанням будови автоклаву); пастеризація; стерилізація сухим жаром; стерилізація газовими сумішами; стерилізація опроміненням; стерилізація фільтруванням.

4. Потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту). Типи поживних середовищ (за походженням, консистенцією, призначенням).

Структура бактеріологічної лабораторії

Бактеріологічна лабораторія - це комплекс приміщень, обладнання і приладів, що дозволяють використовувати різноманітні методи дослідження мікроорганізмів. Лабораторія включає кімнати для мікробіологічних досліджень та підсобні приміщення:

а) кімнати для мікробіологічних досліджень (робочі кімнати) - світлі, просторі, стіни покриті кахельною плиткою, підлога - лінолеумом або плиткою; лабораторні столи добре освітлені і обладнані газовою горілкою або спиртівкою, а також штативом для пробірок і інших приналежностей, необхідних для проведення конкретної роботи.

б) підсобні приміщення – автоклавна (стерилізаційна), мийна, кімната для готування поживних середовищ, матеріальна (для зберігання реактивів, посуду, апаратури та інвентарю), віварій для піддослідних тварин.

Правила роботи та техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії

- ◆ забороняється входити в верхньому одязі та класти на столі сумки та інші особисті речі;
- ◆ дозволяється працювати тільки при наявності спецодягу (халат, тапочки);
- ◆ робоче місце мікробіолога повинно утримуватись в повному порядку;
- ◆ в ході роботи необхідно притримуватись стерильності (бактеріологічні петлі знезаражувати в полум'ї спиртівки, використанні піпетки занурювати з дезрозчином та ін.);
- ◆ в лабораторії заборонено приймати їжу;
- ◆ не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови;
- ◆ у випадку попадання досліджуваного матеріалу на руки, стіл, халат необхідно провести дезінфекцію під наглядом викладача;
- ◆ після закінчення дослідження робоче місце ретельно прибирається, використаний матеріал та ін. предмети здаються лаборанту, миються з милом руки.

Стерилізація. Методи стерилізації

Повне звільнення будь-якого матеріалу від живих мікроорганізмів та їх спор називається *стерилізацією*. Агенти, що викликають загибель мікробних клітин, називаються *бактерицидними*: висока температура, променева енергія, деякі легкі хімічні сполуки. Рідини можна звільнити від мікроорганізмів фільтруванням.

а) стерилізація під дією високих температур:

- прокалювання в полум'ї горілки - фламбування; стерилізують бактеріологічні петлі, кінчики пінцетів та деякі інші металеві предмети;

- стерилізацію кип'ятінням здійснюють у стерилізаторі; стерилізують шприці, металеві інструменти (ножиці, скальпелі, пінцети);
- пастеризація (неповна стерилізація) – нагрівання рідин до температури нижче 100 °С (при 60 °С протягом 30 хвилин, при 75 °С протягом 15 хвилин або при 80 °С протягом 10 хвилин); пастеризують продукти харчування;
- стерилізація сухим жаром здійснюється в сушильних шафах; стерилізують скляний посуд при температурі 160-165 °С протягом 2 годин;
- стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) найбільш надійний та універсальний спосіб стерилізації поживних середовищ і матеріалів; повна стерилізація поживних середовищ при 120 °С і тиску 1 атм. забезпечується протягом 20 хвилин;
- стерилізація текучою парою (дробна стерилізація) здійснюється у апаратах Коха або у автоклаві з відкритим вентиляем; температура досягає 100 °С і нагрівання протягом 30-45 хв. забезпечує загибель вегетативних клітин бактерій, але загибелі спор не забезпечує. Повна стерилізація здійснюється протягом 3 днів;
- б) стерилізація опроміненням – використовують ультрафіолетові промені бактерицидної лампи;
- в) хімічна стерилізація (дезінфекція): спирт, фенол, H₂O₂ та ін.;
- г) стерилізація фільтруванням – використовується для поживних середовищ, що містять термолабільні (вітаміни, амінокислоти) компоненти, які швидко руйнуються під дією високих температур.

Харчові потреби мікроорганізмів

Мікроорганізмам, як і усім іншим організмам, необхідним є набір різних хімічних елементів. Деякі елементи – С, N, H, P, O, S, Ca, Mg, K, Fe необхідні у відносно великих кількостях і тому їх відносять до макроелементів, інші – Zn, Mn, B, Cu, J – у слідових кількостях, тому їх називають мікроелементами. Окрім того, деяким мікроорганізмам необхідні певні готові органічні сполуки, які називають фактори росту.

Виходячи із харчових потреб мікроорганізмів, для їх вирощування у лабораторних умовах створюють поживні середовища, які являють собою комплекс органічних і мінеральних речовин, що забезпечують ріст і розвиток мікроорганізмів.

Поживні середовища мають виключне значення у мікробіології. Правильний підбір складу середовища забезпечує можливість виділення мікроорганізмів із місць їх мешкання, отримання чистих культур, вивчення їх морфології і біохімічних особливостей, сприяють швидкій і правильній діагностиці інфекційних захворювань, дають можливість отримувати біомасу корисних для народного господарства мікроорганізмів.

Вимоги, що висуваються до поживних середовищ

1. До складу середовищ мають входити усі необхідні для мікроорганізму джерела живлення.

2. Окремі інгредієнти у поживні середовищах мають бути у певних співвідношеннях, що приблизно відповідають співвідношенню їх у клітині.

3. Середовища повинні мати достатню вологість, що забезпечує можливість дифузії поживних речовин у клітину.

4. Середовища повинні мати певну кислотність, величина якої різна для певних груп мікроорганізмів.

5. Середовища повинні мати певний окисно-відновний потенціал, який визначає насиченість середовища киснем і позначається gh_2 .

6. Середовища повинні бути ізотонічними для мікробної клітини, тобто осмотичний тиск у середовищі має бути таким самим, як усередині клітини.

7. Середовища повинні бути стерильними, щоб забезпечити ріст чистих культур мікроорганізмів.

Оскільки потреби мікроорганізмів надзвичайно різноманітні, неможливо скласти універсальне середовище, оптимальне для росту усіх мікроорганізмів.

За походженням і складом поживні середовища можна розділити на *натуральні (або природного походження), синтетичні (штучні) і напівсинтетичні.*

1. *Натуральні середовища* бувають рослинного і тваринного походження. Вони містять у своєму складі усі інгредієнти, необхідні для росту і розвитку мікроорганізмів. Склад цих середовищ не визначений. Такими середовищами є відвари злаків, трав, овочеві і фруктові соки, молоко, тваринні тканини, кров, сироватка, сеча, відвари м'яса, вода морів, озер і мінеральних джерел, дріжджовий автолізат, м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) і м'ясо-пептонний агар (МПА).

2. *Синтетичні середовища* готують із певних хімічно чистих сполук у точно вказаних концентраціях. З їх допомогою можна визначити, які речовини і у якій кількості поступають у клітину, зміну цих речовин під впливом мікроорганізмів, виявити метаболіти, що виділяються мікробними клітинами у процесі життєдіяльності. Тому на таких середовищах вивчають обмін речовин мікроорганізмів. Переваги синтетичних середовищ полягають також у тому, що їх можна чітко відтворити. Прикладом синтетичного середовища є середовище Чапека для пліснявих грибів, середовище Ешбі для виділення азотфіксуючих мікроорганізмів.

3. *Напівсинтетичні середовища* мають складний і невизначений склад. Компонентами цих середовищ разом із сполуками відомого складу (вуглеводи, фосфати і др.) є натуральні продукти невизначеного складу – м'ясний відвар, дріжджовий екстракт, пивне сусло. Такі середовища часто застосовуються для вирощування мікроорганізмів у лабораторних і промислових умовах.

За призначенням середовища поділяють на: **загальноживані і спеціальні.**

1. *Загальноживані або середовища загального призначення.* На таких середовищах вирощуються і накопичують біомасу багато мікроорганізмів. Це МПА, МПБ та ін.

2. *Спеціальні середовища або середовища спеціального призначення.* Ці середовища призначені для виявлення тих чи інших біохімічних особливостей

мікроорганізмів або для отримання культур мікроорганізмів, що характеризуються особливими властивостями.

Серед спеціальних середовищ розрізняють *елективні (вибіркові) і диференційно-діагностичні (індикаторні) середовища*.

Елективні середовища підібрані таким чином, щоби забезпечити найсприятливіші умови для вирощування певних мікроорганізмів. У них можуть бути добавлені речовини, що вибірково пригнічують ріст супутньої мікробіоти. При посіві на них матеріалу, у якому присутні мікроорганізми різних груп, найшвидше будуть рости ті мікроорганізми, для яких дане середовище буде вибіркоvim. Такі середовища використовують для виділення мікроорганізмів із місць їх природного мешкання або для отримання накопичувальних культур. До них відноситься середовище Ешбі.

Диференційно-діагностичні середовища використовують для визначення видової приналежності досліджуваного мікроорганізму, опираючись на особливості його обміну речовин. Склад цих середовищ дозволяє чітко виявити найхарактерніші властивості досліджуваного мікроорганізму. До таких середовищ відносяться середовища з молоком, кров'ю, желатиною, на яких виявляють протеолітичні і гемолітичні властивості мікроорганізмів. До складу диференційно-діагностичних середовищ, при назначених для виявлення цукролітичних і окисно-відновних ферментів, вводять індикатори. Прикладом таких середовищ є середовище Ендо, яке використовується для виділення і визначення бактерій кишкової групи.

Середовища розрізняють за **консистенцією**. Використовуються рідкі, сипучі і щільні середовища.

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або продуктів обміну мікроорганізмів, для відновлення культур, що довго зберігалися, для підтримки і зберігання тих культур, які погано ростуть на щільних середовищах. На рідких середовищах легше виявляються фізіолого-біохімічні особливості мікроорганізмів.

Сипучі середовища використовують переважно у промисловій мікробіології. Це розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, просочені поживними розчинами.

Щільні середовища необхідні для виділення і описання культуральних властивостей чистих культур мікроорганізмів, для зберігання культур, визначення низки їх властивостей і т.д. Щільні середовища готують із рідких, додаючи до них агар-агар, кремнекислий гель (силікагель) чи желатин. Кращою гелеутворюючою речовиною є агар-агар. Для отримання щільних середовищ вводять у рідкі 1 – 2 % агар-агару. Середовище, у яке внесли агар-агар, нагрівають на водяній лазні до повного розчинення останнього. Агаризовані середовища зберігають свої властивості після неодноразового плавлення і стерилізації.

Промисловим способом виготовляються деякі середовища у вигляді сухих порошоків. Перевага таких середовищ в їх стандартності, стабільності, простоті приготування і зручності при транспортуванні.

Поживні середовища відразу після приготування стерилізують. Режим і спосіб стерилізації визначається складом середовищ і їх консистенцією. Звичайно середовища стерилізують у автоклаві.

Агаризовані середовища краще стерилізувати при тиску 98 кПа (1 атм) протягом 20 хвилин. Желатинові середовища стерилізують текучою парою три дні підряд, кожного дня по 30 – 40 хвилин, або в автоклаві при 49 кПа (0,5 атм.) протягом 30 хвилин. Рідкі поживні середовища можна стерилізувати фільтруванням. Якщо у складі середовища є субстрати, в яких можуть бути спори, що відрізняються особливою термостабільністю, то такі середовища звичайно стерилізують один раз при 147 – 196 кПа (1,5 – 2 атм) 2 год. або два дні підряд по годині при такому ж тиску, а інколи при 196 кПа (2 атм.) 2 год.

До кожної ємності із середовищем обов'язково прикріплюють лист паперу із зазначенням назви середовища і часу його приготування. Підготовлені до використання поживні середовища перевіряють на стерильність. Зберігають поживні середовища у прохолодному, захищеному від світла і не надто вологому приміщенні.

Практичні завдання

1. Ознайомитись з структурою бактеріологічної лабораторії і правилами роботи в ній.
2. Ознайомитися з пристроями, що використовуються для стерилізації посуду, поживних середовищ, повітря (автоклав, сушильна шафа, фільтри, бактерицидні лампи).
3. Підготувати до стерилізації пробірки, піпетки, чашки Петрі.
4. Підготувати для стерилізації пробірки з водопровідною водою (по 9 мл).
5. Приготувати 500 мл МПА згідно інструкцій (з них 100 мл розлити по пробіркам по 5 мл), підготувати його до стерилізації.

Матеріали та обладнання

Піпетки, колби конічні та круглі плоскодонні, пробірки, чашки Петрі, папір, м'ясо-пептонний агар.

Протокол виконання лабораторного заняття

Посуд, що стерилізується	Підготовка до стерилізації	Вид стерилізації	Режим стерилізації
Скляні пробірки			
Піпетки			
Чашки Петрі			
Вода у пробірках			
М'ясо-пептонний агар (МПА)			
Середовище, до складу якого не входять термолабільні речовини			
Середовище з цукрами та іншими термолабільними речовинами			
Середовище, до складу якого входять речовини, що не витримують нагрівання вище 100 °С			
Середовище, до складу якого речовини, що не витримують нагрівання			

Заняття 2

Відбір та підготовка проб для дослідження. Поверхнєве культивування і визначення чисельності бактерій у повітрі та ґрунті. Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомлення з потребами певних груп бактерій у поживних речовинах, способами посіву та культивування мікроорганізмів, технікою посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів.

Студенти повинні знати:

- способи посіву мікроорганізмів;
- культуральні властивості мікроорганізмів (ріст на щільних та рідких середовищах);
- умови, що необхідні для вирощування мікроорганізмів (температура, аерація, кислотність середовища).

Студенти повинні вміти: сіяти досліджуваний матеріал у поживні середовища для виявлення мікроорганізмів.

Студенти повинні мати навички: відбирання проб з навколишнього середовища та підготовку їх для мікробіологічного дослідження, техніки розливу поживних середовищ, готування серійних кратних розведень досліджуваного матеріалу, техніки посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Способи посіву мікроорганізмів
2. Закономірності залежності росту мікроорганізмів від фізико-хімічних факторів.

Способи посіву мікроорганізмів

Внесення клітин мікроорганізмів у стерильне середовище називають *посівом*, або *інокуляцією*. Спосіб посіву у середовище залежить від його консистенції, якості матеріалу, що сіється, і мети дослідження. Перед посівом необхідно написати на пробірці, колбі або чашці Петрі назву мікроорганізму і дату посіву.

Посів матеріалу здійснюють бактеріологічною петлею, голкою або піпеткою.

За необхідності використовують *пересіви культури мікроорганізмів*. Для цього стерильною охолодженою петлею знімають зі щільного середовища невелику кількість клітин, а з рідкого – кількість клітин, що утворює плівку на петлі. Петлю з клітинами мікроорганізмів вводять у пробірку зі стерильним середовищем, не торкаючись стінок чи краю пробірки.

Посів на щільне поживне середовище проводять легким втиранням матеріалу у поверхню середовища, не пошкоджуючи її.

При посіві на скошену поверхню агару петлю з посівним матеріалом вносять у конденсаційну воду і ковзними рухами розтирають його штрихом знизу догори, направляючи штрих від однієї стінки до іншої.

При посіві у стовпчик середовища голкою з посівним матеріалом проколюють стовпчик у центрі. При посіві петлю чи голку виймають із пробірки, обпалюють горлечко пробірки і пробку у полум'ї пальника і закривають пробірку.

При посіві у рідке поживне середовище петлю занурюють у середовище або матеріал розтирають на стінці пробірки (колби і т.д.), а потім змивають рідким середовищем, струшуючи злегка пробірку (колбу і т.д.).

Таким же чином проводять посів на поверхню середовища у чашках Петрі. Петлею захоплюють мікробні клітини і невелику кількість їх втирають у поверхню поживного середовища біля краю чашки. Потім петлю пропалюють, щоб знищити залишок клітин. Після цього внесений матеріал розтирають петлею по середовищі штрихами.

Для отримання великої кількості мікроорганізмів, проводять суцільний посів газом за допомогою шпателя. Для цього посівний матеріал наносять також за допомогою петлі чи піпетки на поверхню поживного середовища біля краю чашки або у центрі її і потім шпателем розтирають його по всій поверхні середовища.

Посів можна проводити у товщу поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. У цьому випадку у стерильну пусту чашку Петрі спочатку піпеткою вноситься бактеріальна суспензія у кількості 0,1 – 1 мл, а потім наливається 10 – 20 мл розплавленого і охолодженого до 50 – 55 °С середовища. Для перемішування мікробних клітин із середовищем чашку злегка похитують. Можна спочатку змішати у стерильній пробірці щільне поживне середовище, розплавлене і охолоджене, з невеликою кількістю матеріалу, а потім швидко вилити вміст пробірки у чашку Петрі.

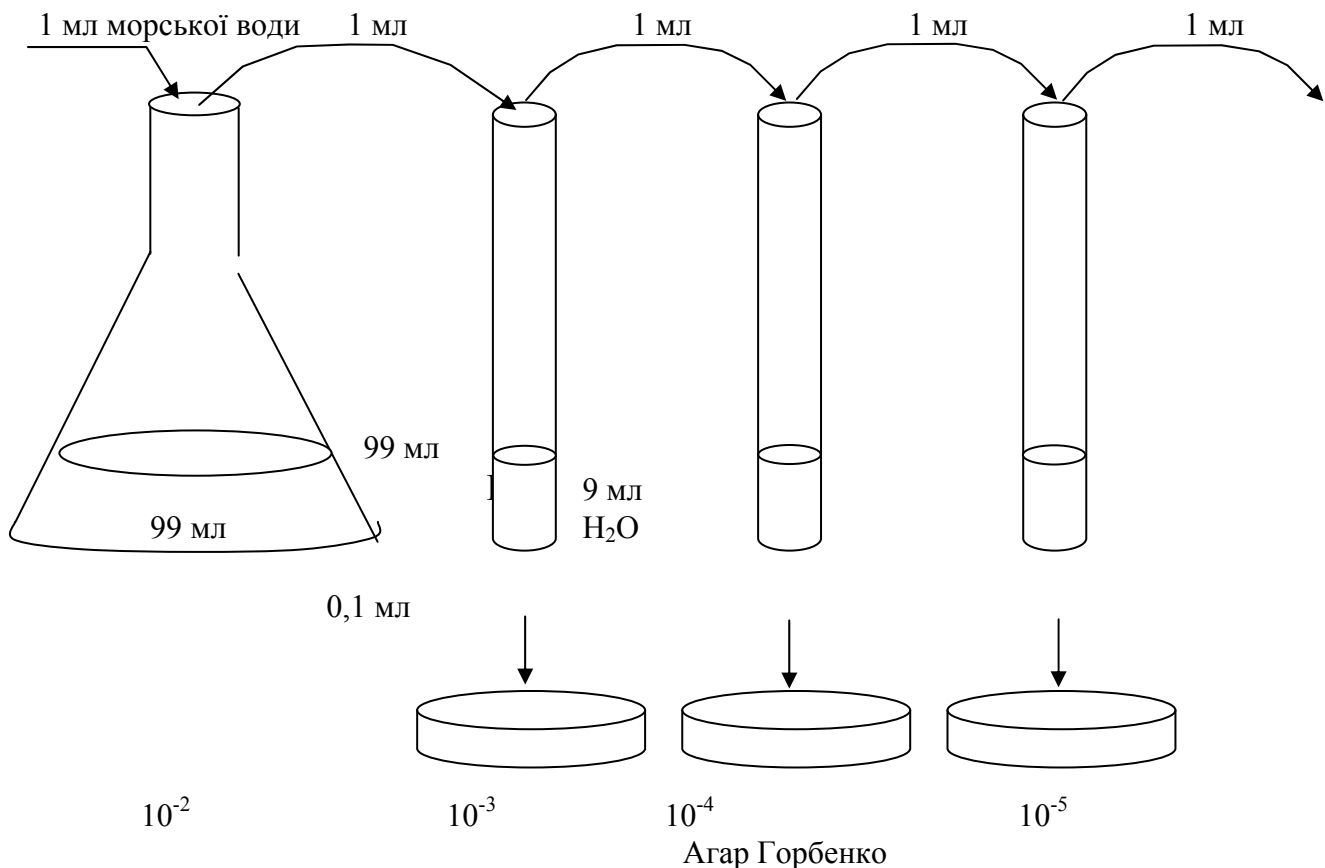
Щоб конденсаційна вода, яка утворюється, не заливала посіви, чашки Петрі перевертають догори дном і у такому положенні ставлять у термостат.

Для отримання великої кількості мікробних клітин використовуються спеціальні скляні ємності із плоскими стінками – *матраци*. Поживне середовище розподіляється на одній із широких площин. Засів матеріалу найчастіше проводять у вигляді бактеріальної суспензії, яка приготовлена у фізіологічному розчині або у водопровідній воді.

Якщо мікробних клітин у досліджуваному матеріалі мало, то їх концентрують на тонкопористих мембранних *фільтрах*, що виготовлюються із целюлози, ацетата чи інших матеріалів.

Засіяні середовища витримують в умовах, що забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів. До таких умов відноситься температурний режим, вологість, аерація, світло та інші специфічні фактори.

Протокол виконання лабораторного заняття



Практичні завдання

1. Розлити розплавлене агаризоване середовище Горбенко у стерильні чашки Петрі по 15-20 мл в кожну. Чашки залишити на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне.
2. Підготувати проби морської води для дослідження.
3. Приготувати послідовні розведення морської води.
4. На поверхню середовища стерильною піпеткою нанести точний об'єм (0,1 мл) відповідного розведення і розподілити його стерильним скляним шпателем по поверхні середовища.
5. Для визначення мікробної забрудненості повітря різних приміщеннях біологічного факультету седиментаційним методом розплавити на водяній лазні стерильне середовище МПА і розлити у 3 стерильних чашки Петрі (на кожну робочу групу). Чашки ставити у місці відбору проб і відкрити на 5, 10 і 15 хв. Час витримки відмітити на кришці чашки.
6. Закриті чашки Петрі з посівами дном догори помістити в термостат з температурою 28-30 °С.

Матеріали та обладнання

Проби морської води, терези, стерильна вода у пробірках і колбах для розведень, спиртівки, сірники, агар Горбенко стерильний в колбах, МПА, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки, скляні шпатель Дригальського, стаканчики зі спиртом, олівці по склу.

Заняття 3

Методи мікроскопії. Приготування і мікроскопія живих (дріжджі, актиноміцети, цвільові гриби) препаратів. Виявлення капсул, включень і рухливості бактерій

Мета заняття. Ознайомлення з методами мікроскопії та методами прижиттєвого мікроскопічного дослідження мікроорганізмів, освоєння техніки роботи з імерсійною системою мікроскопа, виявлення цитоплазматичних включень та рухливості бактерій.

Студенти повинні знати:

- існуючі методи мікроскопії,
- принцип роботи сучасного світлопольного мікроскопа,
- принцип роботи сучасного електронного мікроскопа,
- внутрішню будову клітин мікроорганізмів.

Студенти повинні вміти: використовуючи спеціальні методи мікроскопічних досліджень для заданої культури мікроорганізмів, виготовляти мікроскопічні препарати для виявлення поверхневих структур та включень мікроорганізмів.

Студенти повинні мати навички: виділення чистої культури мікроорганізмів, роботи з імерсійною системою світлопольного мікроскопа; приготування та забарвлення препаратів для прижиттєвого дослідження мікроорганізмів, для виявлення їх капсул, включень та рухливості.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Методи мікроскопії (світлопольна мікроскопія (будова світлового мікроскопа, робота з імерсійною системою); мікроскопія у темному полі; фазово-контрастна мікроскопія; люмінесцентна мікроскопія, препарати для люмінесцентної мікроскопії; просвітлювальна електронна мікроскопія; скануюча електронна мікроскопія).
2. Будова мікробної клітини: капсула, джгутики, цитоплазматичні включення – гранульоза, глікоген, жир.

Будова мікроскопа

Мікроскоп складається з трьох основних частин:

- а) до механічної частини входять штатив, тубусотримач, тубус, предметний столик, револьвер, макро- і мікрометричні гвинти;
- б) до освітлювального апарату входять конденсор і/чи дзеркало-освітлювач;
- в) до оптичної системи входять об'єктиви й окуляри.

Роздільна здатність мікроскопу – це мінімальна відстань між двома крапками, на якій ще ми їх бачимо роздільно. Роздільна здатність ока, дорівнює 0,1-0,2 мм; мікроскопа з об'єктивом 90х – 0,2 мкм.

Загальне збільшення, що дає мікроскоп, визначається добутком збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Наприклад: збільшення об'єктива 90х, а збільшення окуляра 15х, тоді загальне збільшення складає 1350х.

Методи мікроскопії

- Метод світлопольної мікроскопії дозволяє розглядати препарати фіксованих клітин.
- Фазово-контрастна мікроскопія призначена для спостереження живих, незабарвлених об'єктів.
- Люмінесцентна мікроскопія застосовується для спостереження живих і фіксованих клітин, а також при проведенні кількісних досліджень.
- Електронна мікроскопія. В електронному мікроскопі замість світлових променів використовується пучок електронів, що дозволяє підвищити роздільну здатність мікроскопа у кілька тисяч разів.

Правила роботи з імерсійною системою

1. За допомогою плоского дзеркала й об'єктива 8х зробити настроювання освітлення мікроскопа (ірисова діафрагма конденсора мікроскопа повинна бути відкрита, а конденсор цілком піднятий нагору). Інтенсивність освітлення повинна бути максимальної.
2. На предметний столик помістити предметне скло мазком нагору. За допомогою макрометричного гвинта домогтися найкращої чіткості зображення.
3. За допомогою макрометричного гвинта підняти об'єктив на 2-3 див від предметного скла і нанести на мазок краплю імерсійної олії.
4. За допомогою револьвера установити об'єктив 90х і за допомогою макрометричного гвинта занурити його у імерсійну олію, не досягаючи поверхні скла. Щоб уникнути ушкодження об'єктива і препарату слід контролювати цей процес, дивлячись на об'єктив збоку.
5. Дивлячись у окуляр, за допомогою макрометричного гвинта повільно піднімати об'єктив до появи у полі зору контурів зображення чи об'єкта забарвленої плями. Після цього чіткість зображення коректувати за допомогою мікрометричного гвинта.
6. По закінченні мікроскопіювання тубус мікроскопа підняти, препарат зняти з предметного столика і помістити у дезінфікуючий розчин. Фронтальну лінзу об'єктива ретельно очистити від олії, протерши сухою марлею.

Цитоплазматичні включення мікробної клітини (гранульоза, глікоген, волютин, жир)

Мікробна клітина, незважаючи на зовнішню простоту організації. – складна жива система, що характеризується високою упорядкованістю структур, з яких вона складається. Кожна структура має певну життєву функцію, а взаємодія їх між собою забезпечує існування клітини, її цілісність.

Для вивчення внутрішньої будови клітин застосовують спеціальні методи забарвлення – цитохімічні методи дослідження. Багато з них мають діагностичну мету. За формою клітини мікроорганізми не дуже різноманітні і в деяких випадках для того, щоб встановити належність мікроба до того чи іншого роду і виду, необхідно провести спеціальне забарвлення клітини або речовини, що накопичується в ній.

Значна частина цитоплазматичних включень є внутрішньоклітинними запасними речовинами, утворення яких залежить від умов культивування мікроорганізмів.

Полісахариди представлені включеннями крохмалю (у ціанобактерій), гранулози (крохмальоподібна речовина у маслянокислих бактерій), глікогену (полімер глюкози у дріжджів, бацил, сальмонел, сарцин, артробактерій).

Жироподібні речовини виявляються у клітинах практично усіх видів мікроорганізмів; особливо багато їх накопичується під час старіння культури. Жироподібні речовини представлені нейтральними жирами (наприклад, у дріжджів), включеннями полі- β -оксималяної кислоти.

Поліфосфати, або *гранули волютину* чи *метахроматинові зерна* – це включення, що мають широке розповсюдження серед бактерій (оцтовокислих, молочнокислих, азотфіксуючих, актиноміцетів та ін.), грибів (особливо дріжджів), водоростей. Гранули волютину локалізовані у цитоплазмі у бактерій і актиноміцетів, у вакуолях – у дріжджів і цільових грибів.

Практичні завдання

1. Приготувати препарат «відбиток» з колонії актиноміцетів („препарати - відбитки”). Для цього з агаризованого середовища вирізати скальпелем невеличкий кубик й перенести його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була повернута уверх. Потім до колонії пінцетом притиснути чисте покривне скло, обережно зняти й покласти на предметне скло, відбитком вниз, в краплю слабкого розчину метиленового синього. Препарати дослідити під мікроскопом з імерсією, замалювати, вказати назву препарату, спосіб забарвлення, спільне збільшення мікроскопа.

2. Приготувати препарат “роздавлена крапля ” з колонії цільових грибів (на предметному склі змішати краплю води і оцтової кислоти, препарувальною голкою перенести фрагмент колонії без агару в краплю води з кислотою, накрити покривним склом і розглянути препарат під мікроскопом з об’єктивом 8x і 40x.

3. Для виявлення полісахаридів в краплю суспензії дріжджів на предметному склі додати краплю розчину Люголю. Препарат обережно накрити покривним склом і розглянути під мікроскопом з об’єктивом 90x. Гранули глікогеноподібних полісахаридів забарвлюються у червоно-бурий колір.

4. Для виявлення крохмальоподібної речовини – гранулози на предметне скло нанести піпеткою краплю культури маслянокислих бактерій і краплю розчину Люголю, накрити покривним склом і розглянути під мікроскопом з об’єктивом 90x. Клітини, заповнені гранулозою, забарвлюються у синій колір.

5. Для виявлення ліпідних гранул приготувати тонкий мазок культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*:

а) на предметне скло нанести невелику краплю формаліну (40%) і внести петлею культуру дріжджів (формалін вбиває клітину і розрихлює оболонку);

б) через 5 хвилин в цю же краплю додати невелику краплю метиленового синього, а через 10 хвилин – краплю судану III (індикатор жироподібних речовин, розчинний у жирі);

в) загальну краплю, що утворилася, накрити покривним склом, видалити надмір рідини фільтрувальним папером і розглянути під мікроскопом з імерсією. Цитоплазма клітин забарвлюється в синій колір, включення жиру – в рожево-жовтогарячий.

6. Виявити наявність капсул у *Azotobacter chroococcum* у препараті, приготовленому за методом Омелянського: на предметне скло нанести краплю наполовину розведеного водою карболового фуксину Циля; у краплю барвника внести петлею культуру азотобактера; через 2-3 хв. додати краплю рідкої туші, краплі швидко і ретельно перемішати і, користаючись покривним чи предметним склом, приготувати мазок. Препарат висушити на повітрі і досліджувати під мікроскопом з імерсією. На темно-сірому фоні препарату виділяються рожево-малинові клітини бактерій, оточені безкольоровими капсулами.

Протокол виконання лабораторного заняття

Препарати замалювати, вказати повну латинську назву об'єкту, спосіб забарвлення, загальне збільшення мікроскопа

Об'єкт	Тип препарату	Тип забарвлення	Малюнок
<i>Actinomyces</i>	„Відбиток” Збільшення:	Слабкий розчин метиленового синього	
Цвільові гриби	„Роздавлена крапля” Збільшення:	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	„Роздавлена крапля” Збільшення:	Розчин Люголя	
Маслянокислі бактерії	„Роздавлена крапля” Збільшення:	Розчин Люголя	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Тонкий мазок Збільшення:	Судан III	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Мазок за методом Омелянського Збільшення:	Фуксин Циля на тлі рідкої туші	

Матеріали та обладнання

Чашки Петрі з культурами актиноміцетів, цвільових грибів та культурою *Azotobacter chroococcum*, суспензія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, накопичувальна культура маслянокислих бактерій, спиртівки, сірники,

бактеріологічні петлі, препарувальні голки, пінцети, предметні та покривні стекла, стерильна вода у пробірках, метиленовий синій, фуксин Пфейфера, оцтова кислота, мікроскопи, імерсійне масло.

Заняття 4

Приготування фіксованих препаратів, їх забарвлення і мікроскопія. Забарвлення клітин за методом Грама і ендоспор

Мета заняття. Ознайомлення з методами мікроскопічного дослідження мікроорганізмів у фіксованому забарвленому стані.

Студенти повинні знати:

- будову клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій,
- будову ендоспор прокариот.

Студенти повинні вміти: за систематизованими даними про особливості морфології мікробної клітини, використовуючи мікроскоп та цитохімічні барвники, визначати морфологічний тип мікроорганізмів; для мікробіологічних об'єктів за даними про склад та будову клітинної стінки виявляти відношення до забарвлення за Грамом, враховуючи дані про диференціацію на рівні клітинної організації прокариот, використовуючи цитологічні методи мікробіологічних досліджень, виявити типи диференціації.

Студенти повинні мати навички: фіксувати, забарвлювати та мікроскопіювати препарати мікроорганізмів.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Будова клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій. Окраска за методом Грама.
2. Будова ендоспор. Спороутворення. Резистентність ендоспор. Бактерії, що утворюють ендоспори.

Приготування фіксованих забарвлених препаратів

Приготування фіксованих забарвлених препаратів включає такі етапи: приготування мазка, висушування, фіксацію і забарвлення.

Приготування мазка. На знежирене предметне скло наносять невелику краплю водопровідної води і вносять у цю краплю петлею невелику кількість досліджуваного матеріалу. Отриману суспензію рівномірно розмазують петлею на площі 1 – 2 см³ тонким шаром. Мазок має бути настільки тонким, щоб висохнути відразу після приготування.

Висушування мазка. Найкраще сушити препарат при кімнатній температурі на повітрі. Добре приготований тонкий мазок висихає дуже швидко. Якщо висушування мазка уповільнено, то препарат можна злегка нагріти у струмені теплого повітря високо над полум'ям пальника, тримаючи скло мазком догори. Цю операцію потрібно проводити украй обережно, не перегріваючи мазок, оскільки клітини мікроорганізмів деформуються.

Фіксація. Фіксація препарату переслідує декілька цілей: вбити мікроорганізми, тобто зробити безпечним подальшу роботу із ними; забезпечити краще присипання клітин до скла; зробити мазок більш

сприйнятливим до забарвлення, оскільки мертві клітини забарвлюються краще, ніж живі. Найпростішим способом фіксації є термічна обробка. Для цього препарат звичайно тричі проводять через найгарячішу частину полум'я пальника, тримаючи предметне скло мазком догори. Для дослідження тонкої будови клітини застосовують фіксацію різними хімічними речовинами.

Забарвлення. Клітини мікроорганізмів забарвлюють головним чином аніліновими барвниками. Розрізняють кислі й основні барвники. До кислих барвників відносяться ті, у яких іон, який надає забарвлення (хромофор), - аніон. В основних барвників хромофором є катіон. Прикладом кислих барвників є еозин, еритрозин, нігрозин, кислий фуксин; усі ці барвники інтенсивно зв'язуються з цитоплазматичними компонентами клітини. Основні барвники – метиленовий синій, основний фуксин, генціановий фіолетовий, кристалічний фіолетовий, сафранін – інтенсивно зв'язуються з ядерними компонентами клітини. Висока концентрація ДНК і рибосомальної РНК у клітини бактерій робить її більш чутливою до основних барвників. Через це у мікробіологічній практиці застосовуються майже виключно основні барвники.

Розрізняють прості і диференціальні способи забарвлення мікроорганізмів. При простому забарвленні забарвлюється уся клітина, так що стають добре помітними її форма і розміри. За допомогою диференціального забарвлення виявляють деякі клітинні структури, запасні речовини і включення.

Після закінчення забарвлення препарат промивають водою, потім висушують на повітрі або обережно промочують фільтрувальним папером, поміщають на забарвлений мазок краплю імерсійної олії і дивляться з об'єктивом 90х. У правильно забарвленому і добре промину тому препараті поле зору світле і чисте, забарвлені тільки клітини мікроорганізмів. Фіксовані, забарвлені препарати можуть зберігатися тривалий час.

Забарвлення за методом Грама. Вперше запропоновано у 1884 р. датським вченим Х. Грамом для виявлення бактерій у гістологічних зрізах. Зараз цей метод широко використовується у мікробіології. По відношенню до забарвлення за Грамом усі бактерії діляться на дві групи: ті, що забарвлюються за Грамом – грампозитивні, і ті, що не забарвлюються за методом Грама – грамнегативні. Є група грамваріабельних бактерій, у яких відношення до забарвлення за Грамом змінюється протягом росту і розвитку клітин. Суть цього методу полягає у тому, що барвники трифенілметанового ряду (генціановий фіолетовий, кристалічний фіолетовий, метиловий фіолетовий та ін.) у комплексі з йодом утримуються грампозитивними клітинами при знебарвлюванні їх спиртом. Такі бактерії залишаються забарвленими у синьо-фіолетовий колір. Грамнегативні бактерії знебарвлюються і їх виявляють, додатково забарвлюючи контрастним барвником (водним фуксином).

Як правило, більшість кокових форм, спороутворюючих паличок є грампозитивними, звивисті форми, неспороутворюючі палички – грамнегативні. Але є виключення. Наприклад, серед коків грамнегативними є бактерії родів *Neisseria*, *Methylococcus*, *Veillonella*; серед неспороутворюючих

паличок грампозитивними є бактерії роду *Lactobacillus*. Забарвлення за Грамом є діагностичним тільки у відношенні прокариот, що мають клітинну стінку, і не може бути використано у таксономії мікоплазм і еукаріотичних клітин мікроорганізмів.

Для забарвлення за Грамом беруть клітини молодих 8 – 24-годинних культур бактерій, оскільки з віком у бактеріальній популяції збільшується кількість мертвих клітин, які завжди грамнегативні..

Ендоспори бактерій

У процесі життєдіяльності деякі бактерії утворюють **ендоспори**. У клітині утворюється тільки одна ендоспора, вона служить не для розмноження бактерій, а для виживання і збереження спороутворюючих видів.

Ендоспори характеризуються високим показником заломлення, слабкою проникністю для основних барвників, наявністю декількох оболонок і кортекса.

При простих методах забарвлення ендоспори не забарвлюються через слабку проникність їх оболонок для молекул основних барвників, тому при такому забарвленні їх видно у вигляді безбарвних утворень.

Складні методи забарвлення спор основані на комбінованій дії концентрованих розчинів барвника і температури з наступним знебарвленням цитоплазми вегетативної клітини і її контрастним дозбарвленням.

Одним із методів забарвлення для виявлення ендоспор є метод Ожешко.

Практичні завдання

1. Дослідити морфологію клітин у фіксованих препаратах, забарвлених за методом Грама:

- на чистому, знежиреному предметному склі приготувати тонкий мазок, висушити його на повітрі, зафіксувати в полум'ї спиртівки;
- смужку фільтрувального паперу, просоченого генціановим фіолетовим, покласти на мазок, налити 2-3 краплі води і щільно притиснути папір до мазка (час забарвлення 1-2 хв.)
- зняти папір, злити барвник та, не промиваючи препарат водою, забарвити його розчином Люголю (1-2 хв.);
- розчин Люголю злити (не промиваючи водою) і обробити препарат 96⁰ етиловим спиртом (30 сек.);
- препарат швидко промити водою і додатково забарвити водним розчином фуксину (1-2 хв.);
- препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером, дослідити під мікроскопом з імерсією.

Грампозитивні клітини забарвлюються у синьо-фіолетовий колір, грамнегативні - у червоний.

2. Освоїти методику забарвлення фіксованих препаратів мікроорганізмів за методом Ожешко для виявлення ендоспор бактерій.

- на чистих, знежирених предметних стеклах приготувати мазки з біомаси бактерій і висушити на повітрі;

- на висушений нефіксований мазок нанести декілька крапель 0,5% розчину HCl і підігріти (1-2 хв.) над полум'ям спиртівки до закипання, після чого залишок кислоти злити;
- охолоджений препарат промити водою, підсушити і зафіксувати у полум'ї спиртівки;
- на препарат покласти шматок білого фільтрувального паперу і налити карболовий фуксин Циля, підігріти до появи пари, відвести препарат від полум'я і підігріти знову. Дати препарату охолонути і промити водою;
- для знебарвлення цитоплазми обробити препарат 5% розчином H₂SO₄ на протязі декількох секунд, промити водою;
- дозабарвити препарат метиленовим синім (2-3 хв.) промити водою, висушити.

Ендоспори бактерій забарвлюються у червоний колір, вегетативні клітини - у синій.

Протокол виконання лабораторного заняття

Препарати замалювати, вказати повну латинську назву об'єкту, спосіб забарвлення, загальне збільшення мікроскопа.

Об'єкт	Метод забарвлення	Малюнок
	за Грамом Збільшення:	
Висновок	Грамнегативні <input type="checkbox"/>	Грампозитивні <input type="checkbox"/>
	за Ожешко Збільшення:	
Висновок:	Спори розташовуються термінально <input type="checkbox"/>	Спори розташовуються у центрі клітини <input type="checkbox"/>

Матеріали та обладнання

Чашки Петрі з посівами досліджуваних мікроорганізмів, стерильна вода в пробірках, папір з генціановим фіолетовим, розчин Люголю, 96⁰ етиловий спирт, водний фуксин, 0,5% HCl, 5% H₂SO₄, карболовий фуксин Циля, метиленовий синій, фільтрувальний папір, предметні стекла, штативи, спиртівки, бактеріологічні петлі, імерсійне масло, мікроскопи.

Заняття 5

Методи поверхневого культивування і визначення чисельності мікроорганізмів у воді та повітрі

Мета заняття. Ознайомитися з проведенням обліку чисельності мікроорганізмів у досліджуваному субстраті і культуральними властивостями бактерій (характером росту мікроорганізмів на щільних поживних середовищах).

Студенти повинні знати: існуючі методи для визначення загальної кількості мікроорганізмів у різних субстратах, а також виявлення і обліку чисельності представників окремих груп і видів мікроорганізмів, признаки колоній, які враховуються при вивченні культуральних властивостей бактерій.

Студенти повинні вміти: використовуючи чашковий метод Коха, визначати кількість мікроорганізмів у природному субстраті.

Студенти повинні мати навички: способів обліку колоній, що виростають при висіві природних субстратів на щільне середовище, та описання колоній бактерій за загальноприйнятою схемою.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Визначення понять «культивування мікроорганізмів» «культура», «клон», «колонія», «штам».
2. Ріст у мікроорганізмів у популяції.
3. Поверхневе культивування мікроорганізмів.
4. Кількісний облік мікроорганізмів (підрахунок в лічильних камерах; підрахунок на забарвлених мазках; підрахунок на забарвлених мембранних фільтрах; облік живих і мертвих клітин під люмінесцентним мікроскопом; пророщування на мембранних фільтрах; висів на щільні поживні середовища; висів на рідкі поживні середовища; проточна цитометрія; нефелометричний метод визначення кількості клітин і біомаси; стандарти мутності; методи визначення біомаси).

Для визначення загальної кількості мікроорганізмів в різних субстратах, а також виявлення і обліку чисельності представників окремих груп і видів мікроорганізмів застосовують ряд методів. До них відносяться: прямий облік клітин під мікроскопом, виділення і облік мікроорганізмів висівом на щільні (чашковий метод Коха) і в рідкі (метод граничних розведень) поживні середовища.

Якщо хочуть виділити і провести облік більш широкого кола мікроорганізмів з даного субстрату, користуються методом Коха і при цьому підбирають таке за складом поживне середовище, на якому здатні розвиватись мікроорганізми з різними властивостями. Однак в більшості випадків виявити все різноманіття мікроорганізмів субстрату на одному середовищі не можна внаслідок суттєвої фізіологічної різниці між ними.

Чашковий метод Коха. Суть метода полягає в висіві певного об'єму досліджуваної суспензії мікроорганізмів на тверде середовище в чашки Петрі і підрахунку колоній, що виростають після інкубації посівів. Прийнято рахувати, що кожна колонія – потомство однієї клітини. Робота за цим методом включає

три етапи: приготування розведень, посів на тверде середовище в чашки Петрі і підрахування колоній, що виростають. Результати паралельних посівів сумують і визначають середнє число колоній. Колонії підраховують, не відкриваючи чашки Петрі.

Метод граничних розведень. Суть метода полягає в висіві певного об'єму (1мл) досліджуваної суспензії мікроорганізмів на рідке середовище в пробірки. Після інкубації, виходячи з числа пробірок, в яких спостерігався або був відсутній ріст, розраховують найбільш вірогідну кількість клітин, що містяться в 1мл субстрату. Розрахунок проводять за таблицею Мак-Креді. Робота за методом граничних розведень включає такі етапи: приготування розведень, посів у рідке поживне середовище, реєстрацію наявності або відсутності росту після інкубації і розрахунок найбільш вірогідної кількості клітин в 1 мл досліджуваного субстрату. Після інкубації відмічають наявність або відсутність росту мікроорганізмів за характерними ознаками: візуально – по помутнінню середовища, утворенню плівки або осаду. Найбільш вірогідну кількість клітин в одиниці об'єму розраховують за таблицею Мак-Креді, розробленою на підставі методів варіаційної статистики. Для цього спочатку складають числову характеристику, яка включає три цифри. Перша цифра зліва показує кількість пробірок у тому останньому розведенні, при висіві з якого в усіх засіяних пробірках був ріст. Дві наступні цифри вказують на кількість пробірок, в яких був присутній ріст мікроорганізмів при висіві з двох наступних розведень. Потім по таблиці знаходять найбільш вірогідне число мікроорганізмів, що відповідає даному значенню числової характеристики.

Кількість мікроорганізмів у 1 мл (1 г) досліджуваного субстрату відповідає цьому числу, помноженому на те розведення, яке було взяте для одержання першої цифри числової характеристики.

Метод Виноградського широко використовується для визначення чисельності мікроорганізмів в різних природних субстратах – ґрунті, забруднених водах, молоці, в оптично непрозорих поживних середовищах, що містять нерозчинні у воді компоненти. Перевага методу полягає також в тому, що фіксовані, забарвлені препарати добре зберігаються, тому підрахунок можна здійснювати в зручний для дослідника час.

Метод обростання стекол використовують для виявлення характеру мікробіоти (мікробні пейзажі), щільності обростання а також домінуючих форм. Окремі асоціації можна зафіксувати на мікрофотознімках.

Практичні завдання

1. Здійснити облік колоній мікроорганізмів в чашках Петрі на агарі Горбенко.
2. Визначити кількість мікробних клітин в 1 мл морської води чашковим методом Коха, результати внести в таблицю. Для цього провести облік кількості колоній, що виростають при висіві з певного розведення в чашках Петрі.

Колонії, як правило, підраховують, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності відзначають прораховану колонію крапкою на зовнішній стороні дна

чашки, користуючись склографом. Колонії підраховують наступними способами: якщо вони ізольовані одна від одної, великі і в невеликій кількості то зазвичай їх рахують по всій поверхні чашки; при великій кількості колоній, що виростили, дно чашки Петрі ділять на сектори (4-6-8 і т. д.). Підраховують в 2-3 секторах, знаходять, середнє арифметичне на один сектор, а потім помножають на кількість секторів. Або підраховують кідькість колоній у кожному секторі і результати підсумовують. Результати паралельних посівів сумують і визначають середнє число колоній. Кращим розведенням слід вважати таке, при висіві з якого на середовищі в чашці Петрі виростає від 50 до 150 колоній. Прийнято рахувати, що кожна колонія – потомство однієї клітини. Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату підраховують за формулою

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}, \text{ де}$$

M – кількість клітин в 1 мл

a – середнє число колоній при висіві даного розведення

10^n – розведення, з якого зроблено посів

V – об'єм суспензії для посіву в мл.

3. Потім, не відкриваючи чашок, описати морфологію найбільш характерних, ізольованих колоній звернувши увагу на наступні ознаки:

а) форма (кругла, кореневидна, неправильна форми, амебоподібна, ризоїдна і т. д.);

б) забарвлення (безбарвне або пігментоване - біле, жовте, золотисте, червоне, чорне);

у) поверхня колоній (гладка, шорстка, складчаста, зморшкувата, концентрично- або радіально - покреслена і т. д.);

г) профіль колонії (плоский, опуклий, кратероподібний, конусовидний і т. д.);

д) блиск і прозорість (колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора);

е) розмір колонії (діаметр) вимірюють за допомогою звичайної лінійки і вказують її величину в міліметрах. Точковими називають колонії менше 1 мм в діаметрі; дрібні мають 1-2 мм, середні - 2-4 мм і великі - більше 4 мм в діаметрі;

ж) край колонії (рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчатий т. д.) визначають при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;

з) структура колонії (однорідна, дрібнозерниста, грубозерниста, струйчата і т. д.) визначається при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;

і) консистенцію колонії визначають, торкаючись до її поверхні бактеріологічною петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути щільною, м'якою або вростаючою в агар; слизуватою (прилипає до петлі), тягучою, крихкою (легко ламається при дотику петлею).

Колонії що відрізняються хоч би по одному з вказаних ознак, слід розглядувати як різні типи.

Отримані результати внести в таблицю. Колонії замалювати.

4. Приготувати препарати для мікроскопії з описаних колоній, забарвити водним розчином фуксину (3–5 хв.), розглянути під мікроскопом з імерсією. Замалювати морфологію клітин.

5. З описаних колоній вибрати одну, зростаючу найбільш ізольовано і переважаючу в посіві, для виділення чистої культури з досліджуваного об'єкту. Потім за допомогою стерильної бактеріологічної петлі узяти невелику кількість бактерійної маси вибраної колонії, злегка до неї торкаючись. Необхідно уважно стежити, щоб не зачепити довколишні колонії. Петлю з бактеріями ввести в пробірку зі «зкошеним» МПА, торкнутися поверхні в його нижній частині і повісті петлю вгору, ковзаючи по поверхні агару (не рихлити його) у вигляді штриха. При посіві необхідно дотримувати правил асептики.

6. Зробити висновок про санітарний стан повітря приміщень біологічного факультету. По кількості колоній, що вирости на МПА, підрахувати загальне мікробне число повітря, користуючись правилом Омелянського, відповідно до якого вважають, що на поверхню поживного середовища площею 100 см² протягом 5 хв. осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься у 10 л повітря. Знаючи кількість колоній, що вирости, і час експозиції, обчислюють кількість мікробів, що містяться в 1 м³ (1000 л) повітря.

Критерії оцінки повітря житлових приміщень

	Повітря	Загальне число мікроорганізмів у 1 м ³
Літній режим	Чисте	до 1500
	Забруднене	до 2500
Зимовий режим	Чисте	до 4500
	Забруднене	до 7000

Матеріали та обладнання:

Посіви на агарі Горбенко з попереднього заняття, мікроскопи, пробірки зі зкошеним МПА, предметні стекла, стерильна вода, водний розчин фуксину, імерсійне масло, спиртівки, сірники, бактеріологічні петлі, мікроскопи, фільтрувальний папір, лінійка.

Протокол виконання лабораторного заняття

1. Чисельність колоній мікроорганізмів, що вирости на агарі Горбенко і розрахунок кількості мікроорганізмів у 1 мл морської води

Розведення	Повторність	Кількість колоній на чашках	Сума	Середнє арифметичне	Кількість мікроорганізмів в 1 мл морської води
1:10 ³	1				
	2				
1:10 ⁴	1				
	2				
1:10 ⁵	1				
	2				

2. Ознаки колонії мікроорганізмів на агарі Горбенко

Форма	Діаметр	Блиск	Колір	Профіль	Край	Структура	Консистенція	Флуоресценція	Малюнок

3. Деякі особливості морфології клітин мікроорганізмів, що вирости на агарі Горбенко

Мікроскопічна картина	Форма клітин	Просторове розташування клітин	Спори	Малюнок
				Збільшення:

4. Чисельність колоній мікроорганізмів, що вирости на МПА при мікробіологічному дослідженні повітря

Приміщення	Час експозиції, хв.	Кількість колоній на чашках	Кількість мікробів, що містяться в 1 м ³ (1000 л) повітря	Висновок про санітарний стан повітря
	5			
	10			
	15			

Заняття 6

Методи виділення чистої культури мікроорганізмів. Вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак бактерій

Мета заняття. Ознайомитися із методами виділення чистої культури мікроорганізмів.

Студенти повинні знати: існуючі методи отримання чистих культур мікроорганізмів

Студенти повинні вміти: із наданого субстрату виділяти чисту культуру мікроорганізмів, використовуючи загальноприйняті методи.

Студенти повинні мати навички: одержувати чисту культуру із накопичувальної з окремої колонії.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Визначення понять «змішана» і «чиста» культура.
2. Задачі й методи виділення чистих культур мікроорганізмів.
3. Принцип виділення чистих культур.
4. Отримання чистих культур мікроорганізмів:
 - накопичувальні культури;
 - метод розсіву на (в) поживні середовища;
 - отримання чистої культури з однієї клітини;
 - визначення чистоти культури мікроорганізмів;
5. Зберігання культур мікроорганізмів методами субкультивування, під вазеліновим маслом, ліофілізації, при низьких температурах, у дистильованій воді, у висушеному стані на носіях.

Чистою культурою називають популяцію мікроорганізмів, що складається з клітин одного виду. Прикладом чистої культури є популяція мікроорганізмів, що виростили при посіві однієї клітини. На твердому середовищі чистою культурою може бути колонія мікроорганізмів. Вона являє собою ізольовану популяцію мікроорганізмів, що розмножились з однієї клітини.

Виділення чистих культур мікроорганізмів є необхідним для правильного уявлення про їх морфологічні, культуральні і фізіолого-біохімічні властивості для визначення видової належності. Виділення чистої культури включає три етапи:

1. Одержання накопичувальної культури.
2. Виділення чистої культури.
3. Визначення чистоти виділеної культури.

Для одержання накопичувальної культури певного виду бактерій використовують елективні поживні середовища і здійснюють посів досліджуваного субстрату.

Метод Коха. Чисту культуру із накопичувальної одержують з окремої колонії. Для цього із накопичувальної культури після її розведення здійснюють посів на тверде середовище за методом Коха. Кожну колонію, що виросла, вважають потомством однієї клітини. Біомасу з окремих, добре ізольованих колоній відсівають петлею в пробірки на поверхню зкошеного твердого поживного середовища.

Чистоту культури перевіряють одночасно декількома способами: візуально, мікроскопуванням і висівом на поживних середовищах. При візуальному контролі визначають характер росту культури на поверхні штриха на зкошеному агарі : якщо він однорідний, то культура вважається чистою, якщо неоднорідною - забрудненою.

Мікроскопічний контроль: якщо в препараті всі клітини морфологічно однорідні, культура чиста.

Чистоту культури перевіряють також посівом на поживні середовища. Однорідність характеру росту колоній свідчить про чистоту виділеної культури. Набір середовищ визначається особливостями виділених мікроорганізмів і їх можливих супутників.

Практичні завдання

1. Перевірити чистоту виділеної культури бактерій, яка була відсіяна на зкошений МПА на попередньому занятті:

- а) візуально (дослідити характер росту виділених бактерій на поверхні зкошеного МПА в пробірці);
- б) шляхом мікроскопії (приготувати препарат фіксованих клітин, забарвити за методом Грама і дослідити під мікроскопом з імерсією).
- в) зробити висновок про чистоту виділеної культур, виходячи з однорідності клітин.

2. Оволодіти методом позбавлення домішок сторонніх бактерій у виділеній культурі та здійснити посів виділеної культури у чашки Петрі на МПА бактеріологічною петлею в три сектори:

- на зовнішній поверхні дна чашки Петрі олівцем по склу (маркером) провести перпендикулярно 2 лінії, розділяючи дно на 3 сектори;
- стерильною бактеріологічною петлею відібрати частину біомаси чистої культури бактерій і штрихом засіяти 1-й сектор;

- петлю простерилізувати у полум'ї спиртівки, охолодити, провести один штрих через 1-й сектор, захвативши таким чином частину біомаси посіяної культури і штрихом засіяти 2-й сектор;
- аналогічним чином засіяти 3-й сектор, але біомасу для посіву взяти із засіяного 2-го сектору.

3. Провести посів цієї ж культури у рідке поживне середовище:

стерильною бактеріологічною петлею відібрати частину біомаси досліджуваної культури бактерій і внести у пробірку з середовищем.

4. Визначити здатність досліджуваної культури до окислення/ферментації глюкози (утилізація глюкози в аеробних/анаеробних умовах):

у дві пробірки із середовищем Хью-Лейфсона із глюкозою внести петлю культури одну, із пробірок залити стерильною вазеліною олією шаром 2 – 2,5 см для створення анаеробних умов.

Усі посіви культивують у термостаті при 28 – 30 °С.

Матеріали та обладнання

Пробірки з посівами (з заняття № 5), стерильні чашки Петрі, МПА стерильний у колбах, стерильна вода у пробірках, чашки Петрі з поживним агаром, пробірки з поживним бульйоном, пробірки із середовищем Хью-Лейфсона з глюкозою, стерильна вазелінова олія, 3 % перекис водню, спиртівки, бактеріологічні петлі, олівці по склу, набір барвників для забарвлення за Грамом, мікроскопи, імерсійне масло, предметні стекла, стерильні піпетки на 1 – 2 мл, штативи, олівці по склу (маркери), посуд з дезрозчином для відпрацьованих піпеток.

Протокол виконання лабораторного заняття

1. Деякі особливості морфології клітин мікроорганізмів, що виростили на скошеному МПА

Мікроскопічна картина	Форма клітин	Просторове розташування клітин	Спори	Малюнок
				Збільшення:

2. Висновок про чистоту виділеної культури:

3. Вивчення культуральних властивостей виділеної культури

№ досліджуваної культури	Культуральні властивості	
	посів на тверде середовище	посів у рідке середовище
		
	МПА	

Заняття 7

Вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак і ідентифікація бактерій

Мета заняття. Вивчити культуральні і фізіолого-біохімічні властивості чистої культури бактерій, провести ідентифікацію досліджуваної культури (визначити систематичне положення мікроорганізму за культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями).

Студенти повинні знати

- фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів;
- особливості використання бактеріями сполук вуглецю, азоту, відношення до молекулярного кисню і росту в анаеробних умовах;
- ознаки, необхідні для ідентифікації бактерій.

Студенти повинні вміти: досліджувати культуральні і фізіолого-біохімічні властивості бактерій, описувати й ідентифікувати бактерії за набором вивчених ознак

Студенти повинні мати навички: техніки посіву культури бактерій на різні поживні середовища для вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак, обліку посівів культури бактерій на різних поживних середовищах з метою вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Характеристика культуральних властивостей бактерій. Ознаки колоній, що виростають на щільних поживних середовищах. Особливості росту у рідких поживних середовищах.
2. Характеристика фізіолого-біохімічних властивостей бактерій. Особливості використання сполук вуглецю, азоту, молекулярного азоту, відношення до кисню, утворення позаклітинних ферментів.
3. Основні принципи систематики
4. Ідентифікація бактерій за фізіолого-біохімічними властивостями.

Знання таксономічної приналежності мікроорганізму є необхідною ланкою при вивченні будь-якого процесу, пов'язаного із його

життєдіяльністю. Теорія різноманітності організмів, що вивчає відношення між їх групами (класами, таксонами) називається систематикою. Класифікація – це поділ численності (безлічі) організмів на групи (класи, таксони). Таксономія – це найменування груп організмів (таксонів), встановлення їх меж і підпорядкування. Номенклатура – збірник правил найменування таксонів, доповнений списком цих найменувань. Діагностика (ідентифікація) – спосіб віднайдення заданого таксону та визначення належності об'єкта таксону.

Метою ідентифікації (от лат. *indentifico* — ототожнюю) є встановлення таксономічного положення досліджуваного штаму на підставі порівняння його властивостей із вивченими та офіційно зареєстрованими видами, тобто віднесення його до певного виду чи роду.

Ідентифікація прокариот базується не тільки на вивченні їхнього зовнішнього виду (морфолого-культуральні ознаки), але й в більшій мірі на їх функціональних ознаках, що проявляються у здатності здійснювати ті чи інші фізіолого-біохімічні процеси.

Морфологія клітини (коки, спірили, вібріони, палички, поодинокі розміщення клітин чи в агрегатах), характеристика поверхневих структур (наявність ендоспор, капсули, джгутиків, їх розміщення), забарвлення за Грамом, а також характер росту на агаризованих (характеристика колоній) та в рідких поживних середовищах відносяться до морфолого-культуральних ознак.

До фізіолого-біохімічних властивостей відносять тип живлення мікроорганізма (фототрофи, хемотрофи, автотрофи, гетеротрофи), тип енергетичного метаболізму (здатність до аеробного чи анаеробного дихання, здатність до фотосинтезу або бродинню), залежність росту від температури та рН. Із використанням спеціальних тестів досліджується здатність утилізувати ті чи інші субстрати в якості джерела вуглецю, азоту, сірки, необхідність додаткових факторів росту та утворення характерних продуктів метаболізму.

При роботі по ідентифікації бактерій необхідно суворо дотримуватись наступних принципів:

1. Використовуються тільки чисті культури мікроорганізмів.
2. Для контролю необхідно мати життєздатну культуру із стабільними властивостями, що зберігається у відповідних умовах.
3. Для виявлення ключових ознак використовуються тільки стандартні методи.
4. Для інокуляції діагностичних середовищ використовуються тільки культури, що знаходяться в активному фізіологічному стані.

Визначення таксономічної приналежності базується на простих, доступних, стандартних методах з використанням дихотомічних ключей, в яких пропонують альтернативні твердження, які ведуть до діагностики невідомого організму.

Для ідентифікації бактерій за фенотиповими ознаками використовують визначник Бергі ІХ видання, якій містить інформацію про 35 груп бактерій. Загальний підхід для визначення невідомого ізолюваного мікроорганізму складається з кількох основних етапів:

1) Із використанням таблиці ознак, які відрізняють прокаріоти від еукаріот, необхідно переконатися, що виділений ізолят відноситься до прокаріот.

2) Далі необхідно визначити, до якої основної категорії із чотирьох наведених у Визначнику відноситься ізольований мікроорганізм (грамнегативні бактерії з клітинною стінкою; грампозитивні бактерії з клітинною стінкою, еубактерії, які не мають клітинної стінки; архебактерії). Кожна основна категорія містить декілька груп.

3) Наступний крок – це визначення групи, до якої відноситься ізольований мікроорганізм за допомогою V розділу визначника Бергі, який містить список та короткий опис цих груп.

4) Визначення роду бактерій. Для більшості груп наведено таблиці або ключі, де вказано ознаки, за якими можна диференціювати роди всередині групи.

5) Визначення виду бактерій за допомогою диференційних таблиць, що містяться у описі більшості родів.

Практичні завдання

1. Вивчити макроморфологічні ознаки колоній, що виростили на чашках Петрі, вказавши форму, розмір (діаметр), поверхню, профіль, блиск і прозорість, колір, пігментоутворення, край, структуру і консистенцію.
2. З'ясувати особливості росту досліджуваної культури у поживному бульйоні, відзначивши наявність помутніння, утворення плівки, осаду, запаху, виділення газу.
3. Визначити здатність досліджуваної культури синтезувати фермент каталазу: на чисте знежирене предметне скельце нанести стерильною піпеткою краплю 3 % перекису водню, у яке помістити стерильною бактеріологічною петлею частину біомаси досліджуваної культури. Утворення бульбашок газу (O₂) свідчить про позитивний результат.
4. Провести облік результатів визначення здатності культури до утилізації глюкози в аеробних/анаеробних умовах. Зміна кольору індикатора з фіолетового на жовтий свідчить про позитивний результат. (Колір індикатора змінюється у результаті розкладання глюкози і утворення кислих продуктів метаболізму, що призводить до зсуву рН у кислий бік).
5. Скласти підсумкову таблицю із внесенням результатів визначення морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей.
6. Провести родову ідентифікацію досліджуваної культури на основі результатів вивчення основних біологічних властивостей із використанням визначника бактерій Бергі (спрощених ідентифікаційних схем/ключів).

Матеріали та обладнання

Чашки і пробірки з посівами, проведеними на попередньому занятті, визначник бактерій Бергі (спрощені ідентифікаційні схеми/ключі).

Оформлення протоколу виконання заняття

1. Результати вивчення культуральних властивостей досліджуваних культур внести у таблиці 1-2

Таблиця 1

Ознаки колоній досліджуваної культури бактерій, що вирости на щільному поживному середовищі

Ознака	Колонія бактерій
Форма	
Розмір (діаметр), мм	
Поверхня	
Профіль	
Блиск, прозорість	
Колір	
Пігментоутворення	
Край	
Структура	
Консистенція	

Таблиця 2

Ознаки росту досліджуваної культури бактерій у рідкому поживному середовищі

Ознака	Наявність ознаки при рості у поживному бульйоні
Помутніння	
Плівка	
Осад	
Наявність запаху	
Утворення газу	

2. Результати вивчення біохімічних властивостей досліджуваної культури внести у таблиці 3.

Таблиця 3

Біохімічні особливості досліджуваної культури

Середовище Хью-Лейфсона			
Без шару олії (анаеробні умови)		З шаром олії (аеробні умови)	
Зміна кольору з фіолетового на жовтий	<i>Колір не змінився</i>	Зміна кольору з фіолетового на жовтий	<i>Колір не змінився</i>
Наявність каталазної активності			
Так	<input type="checkbox"/>	Ні	<input type="checkbox"/>

3. Результати вивчення морфологічних, культуральних, фізіолого-хімічних властивостей досліджуваної культури внести у таблицю 4.

Таблиця 4

Основні біологічні властивості досліджуваної культури бактерій

Ознака/тест	Досліджувана культура
Форма клітин	
Розташування у полі зору	
Розміри клітин	
Відношення до забарвлення за Грамом	
Основні ознаки колоній	
Основні ознаки росту у рідкому поживному середовищі	
Каталаза	
Утилізація глюкози в аеробних умовах	
Утилізація глюкози в анаеробних умовах	

5. Записати латинською мовою і обґрунтувати родову назву досліджуваної культури.

Заняття 8**Визначення санітарно-бактеріологічних показників води.****Визначення колі-індексу та колі-титру методом мембранних фільтрів (1-й етап)**

Мета заняття: Опанувати методику посіву води для визначення колі-індексу та колі-титру.

Студенти повинні знати: основи санітарної бактеріології; методи санітарно-мікробіологічного дослідження різних об'єктів довкілля.

Студенти повинні вміти: відбирати проби водопровідної води з джерела водопостачання та висівати певні об'єми води у диференціально-діагностичне середовище.

Студенти повинні мати навички: приготування диференціально-діагностичного середовища Ендо, облік росту на ньому бактерій групи кишкової палички.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Мікробіота води.
2. Методи санітарно-бактеріологічного дослідження води – питної, відкритих водоймищ, стічних вод.
3. Визначення та кількісний облік загального мікробного обсеменіння води.
4. Оцінка якості води за санітарно-мікробіологічними показниками (колі-титр, коли-індекс).

Санітарна мікробіологія – це наука, яка вивчає мікробіоту навколишнього середовища та зобумовлені її діяльністю процеси, які можуть впливати безпосередньо або опосередковано на здоров'я людини. Санітарно-мікробіологічні дослідження використовуються у попереджувальному та поточному санітарному нагляді, при вирішенні питань щодо джерел та шляхів передачі інфекції, а також у промисловості та сільському господарстві (при проектуванні на місцевості окремих будівель та населених пунктів, при вирішенні питань водопостачання, каналізації та знешкодження викидів вентиляції приміщень, розташування сільськогосподарських об'єктів, тощо).

Санітарно-показові мікроорганізми - це деякі представники облигатної нормальної мікробіоти людини і тварин, присутність яких у зовнішньому середовищі говорить про фекальне або повітряно-крапельне забруднення виділеннями людини або теплокровних тварин. Санітарно-показові мікроорганізми (скорочено – СПМ) - це ті мікроорганізми, які **населюють порожнини тіла, що межують з навколишнім середовищем**. Саме тому СПМ виділяються у навколишнє середовище при фізіологічних актах (кашель, чхання, дихання, дефекація). СПМ інколи ще називають індикаторними мікроорганізмами.

Головна характеристика СПМ – вони **населюють ті ж самі еконіші, що й патогени**, тобто, якщо у навколишньому середовищі ми виявили СПМ у великій кількості, то ми можемо припустити, що в навколишньому середовищі з тією ж вірогідністю присутні й патогенні мікроорганізми. Прямі методи виявлення патогенів у навколишньому середовищі складні та трудомісткі, а виявити СПМ легше, тому що на відміну від багатьох патогенів вони присутні у виділеннях людини у великій кількості. Допускається розбіжність між вірогідним обсеменінням об'єкта, виявленим за допомогою СПМ, та істинним обсеменінням патогенами. Щоб зменшити цю розбіжність, виявляють одночасно декілька груп СПМ. Це дозволяє виявити масивність забруднення, час, що пройшов з моменту забруднення об'єкта, характер забруднення.

Наприклад, показниками фекального забруднення є такі СПМ, як *Escherichia coli* та інші бактерії групи кишкових паличок (БГКП), представники родів *Clostridium*, *Enterococcus*, *Proteus*. Вони населяють ті ж еконіші, що й збудники черевного тифу, дизентерії, холери, поліомієліту. *E. coli* – кишкова паличка – була першим мікроорганізмом, який у 1888 році запропонували визначати як санітарно-показовий. *E. coli* виділяються з кишечника людини і теплокровних тварин та слугують індикаторами фекального забруднення.

Обсіменіння води кишковою паличкою виражається колі-індексом. **Колі-індекс води** – це кількість клітин *E. coli* у 1 л води. Колі-індекс визначають:

- а) методом мембранних фільтрів;
- б) бродильним методом.

Це стандартні, вказані ДСТУ, методи.

Бродильний метод полягає у попередньому засіві зразків води у накопичувальне середовище. У методі мембранних фільтрів дослідну воду під тиском пропускають крізь нітроцелюлозні фільтри з розмірами пор, меншими за розмір бактеріальних клітин. Фільтр, на якому осіли бактерії, поміщають на поверхню поживного середовища, і через деякий час на фільтрі розвиваються колонії бактерій, які знаходилися у дослідній воді.

Зворотною від колі-індекса величиною є колі-титр. **Колі-титр** води - це найменший об'єм води, в якому ще виявляється хоча б одна клітина *E. coli*.

Для опису загального обсеменіння води використовують такий показник, як мікробне число. **Мікробне число** води – це загальна кількість мікроорганізмів у 1 мл води. Існують суворі нормативи, що описують допустиму кількість мікроорганізмів у воді.

Для відбору зразків води використовують склянки, пляшки або флакони об'ємом 0,5 – 1 л. Стерилізують такий посуд закритим ватно-марлевими пробками з паперовими ковпачками поверх пробок. Після відбору води склянки закорковують притертими гумовими або скляними пробками, які для стерилізації загортають окремо в папір.

Деякі санітарно-мікробіологічні показники води

Категорія води	Показники		
	мікробне число	колі-титр	колі-індекс
Питна вода з водогону	не більше 100	не менше 300	не більше 3
Вода басейнів для плавання	не більше 100	не менше 300	не більше 3
Вода артезіанських свердловин	не більше 100	не менше 500	не більше 2
Вода питна з колодязів	не більше 1000	не менше 100	не більше 10

Перед відбором проб кран водогону обпалюють полум'ям тампону, накрученого на довгий пінцет і змоченого спиртом. Потім кран повністю відкривають і спускають воду протягом 10-15 хвилин. Посуд для відбору води відкривають чисто вимитими руками, обробленими етиловим спиртом, при

цьому пробки не торкаються, а знімають її разом з паперовим ковпачком. Воду у об'ємі 500 мл набирають таким чином, щоб не замочити шийку склянки. Після цього склянку закривають стерильною гумовою або скляною пробкою, паперовим ковпачком і маркують. До кожної відібраної проби води додається супроводжувальний документ, у якому вказується опис джерела водопостачання, з якого проводився відбір (місце знаходження, технічний стан), дата та година відбору, мета дослідження (поточний санітарний нагляд або несприятливі епідемічні ситуації), посада, місце роботи, прізвище, ім'я та по-батькові особи, яка здійснювала відбір.

Транспортують воду у сумках-холодильниках і досліджують не пізніше 2 годин з моменту відбору (як виняток, можна зберігати пробу до 6 годин при 4-5°C).

Практичні завдання

1. Приготувати середовище Ендо та розлити його у стерильні чашки Петрі.
2. Здійснити відбір води з джерела водопостачання. Зразки об'ємом не менше 0,5 л відібрати з вуличних водорозборів і кранів внутрішніх водопроводів. Металеву частину крану обпалити за допомогою пінцета, обгорнутого ватою, намоченою у спирті. Потім повністю відкрити і спускати воду протягом 10 хв. Зразки відбирати з дотриманням вимог асептики, не змочуючи пробок.
3. Нітроцелюлозні фільтри кип'ятити 3-5 разів по 10 хвилин у дистильованій воді, зберігати у стерильному посуді і повторно кип'ятити у день постановки досліду.
4. Апарат Зейтца перед роботою простерилізувати фламбуванням за допомогою довгого пінцету, обгорнутого ватою, змоченою у спирті.
5. Після вистигання профламбованого апарату Зейтца на фільтрувальний столик покласти фільтр за допомогою профламбованого пінцету і обережно закріпити його верхньою частиною апарату.
6. Під тиском за допомогою апарату Комовського або водоструменевого насоса профільтрувати крізь мембранні фільтри №2 або №3 воду в об'ємі 100 мл у трьох повторностях.
7. Фільтр перенести стерильним пінцетом у чашки Петрі з середовищем Ендо і помістити його стороною, на якій осіли бактерії, таким чином, щоб між фільтром і середовищем не було бульбашок повітря. Чашки помістити у термостат при 37°C на добу.

Протокол виконання лабораторного заняття

Місце відбору зразка	Номер зразка	Середовище для висіву	Кількість повторностей

Матеріали і обладнання

Середовище Ендо, стерильні чашки Петрі, стерильні посуд та гумові пробки для відбору води, пінцети, спирт, вата, олівці по склу, піпетки, спиртівки, термостат на 37°C.

Заняття 9

Визначення санітарно-бактеріологічних показників води. Визначення колі-індексу та колі-титру методом мембранних фільтрів (2-й етап)

Мета заняття: Визначення колі-індексу та колі-титра води з водогону.

Студенти повинні знати: характеристику основних санітарно-показових мікроорганізмів води.

Студенти повинні вміти: використовуючи диференційно-діагностичне поживне середовище, визначати кількість клітин бактерій групи кишкової палички у водопровідній воді.

Студенти повинні мати навички: розраховувати колі-титр і колі-індекс води.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Санітарно-показові мікроорганізми води.
2. Визначення та кількісний облік показників фекального забруднення води (бактерій групи кишкових паличок (БГКП)).
3. Принципи визначення у воді патогенних мікробів – збудників кишкових захворювань.

Диференційно-діагностичне середовище Ендо, яке використовують для виявлення кишкових паличок, містить у якості джерела живлення лактозу. До складу середовища також входить фуксин, знебарвлений сірчанисто-кислим натром. Середовище не можна довго зберігати і ставити на світло, його готують за прописом на етикетці у день використання, розливають у стерильні чашки Петрі і зберігають не більше 3 днів у темному місці або у холодильнику. Саме по собі середовище Ендо - солом'яного кольору, а колонії кишкових паличок на ньому - червоні через те, що ці бактерії окислюють лактозу до кислоти, і як наслідок, утворюється альдегідсірчаста сполука. Колір фуксину відновлюється.

У випадку лактозонегативних варіантів кишкової палички може спостерігатися й ріст безбарвних колоній. Але найбільш характерними колоніями кишкових паличок є темно-вишневі, з металевим блиском. Колонії мають бути округлими, не розгалуженими.

При визначенні колі-індексу методом мембранних фільтрів пластинку фільтра оглядають на наявність колоній кишкових паличок, які можуть рости по самому фільтру та по його краях. З колоній, які нагадують ріст кишкової палички, готують мазки та забарвлюють за Грамом. БГКП – грамнегативні.

Наступним етапом визначення кишкових паличок є тест на наявність оксидази. Тест проводиться за допомогою індикаторного паперу, на який петлею наносять та розтирають дослідну біомасу. Якщо папір змінить колір, то

бактерія є оксидазопозитивною. До БГКП відносять грамнегативні, оксидазонегативні бактерії, які утворюють на Ендо характерні колонії.

Для визначення колі-індексу слід підрахувати кількість округлих колоній грамнегативних, оксидазонегативних бактерій. Кількість колоній кишкових паличок, що вирости в аналізованому об'ємі води, помножують на 100 мл та ділять на аналізований об'єм.

Наприклад, при посіві трьох об'ємів (повторностей) води по 100 мл на одному фільтрі вирости 8 колоній БГКП, а на двох інших росту немає. У даному випадку аналізований об'єм – 300 мл, загальна кількість бактерій з трьох об'ємів – 8.

$$\text{Колі-індекс} = \frac{8 \cdot 1000}{300} = 27$$

Якщо на фільтрах не вирости жодної колонії БГКП, то вважають, що колі-індекс буде менше тієї величини, яка була б визначена у випадку виявлення в аналізованому об'ємі однієї клітини кишкової палички. Тобто:

$$\text{Колі-індекс} = \frac{1 \cdot 1000}{300} < 3$$

Норма для питної води згідно ДСТУ: колі-індекс - не більше 3, колі-титр – не менше 300 мл.

Колі-індекс і колі-титр – це взаємозалежні величини. З титра можна перевести у індекс і навпаки, з індексу – у титр.

$$\begin{aligned} \text{Наприклад, для води титр} &= 1000 \text{ мл/індекс;} \\ \text{індекс} &= 1000 \text{ мл/титр.} \end{aligned}$$

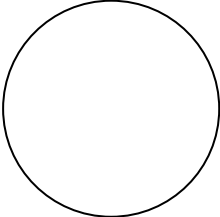
Практичні завдання

1. Провести облік колоній, які вирости на фільтрах на середовищі Ендо.
2. З колоній, морфологія яких є характерною для кишкових паличок, зробити мазки і забарвити за Грамом.
3. Якщо бактерії у мазках є грамнегативними, провести з ними тест на наявність оксидази.
4. Підрахувати кількість округлих колоній грамнегативних, оксидазонегативних бактерій.
5. За формулою, наведеною у теоретичній частині заняття, розрахувати колі-індекс та колі-титр.
6. Зробити висновок про санітарно-мікробіологічний стан води з дослідженого джерела водопостачання.

Матеріали і обладнання

Чашки з засіяним середовищем Ендо, бактпетлі, предметні скельця, набори для забарвлення за Грамом, мікроскопи, набори для тестування на наявність оксидази, олівці по склу, спиртівки.

Протокол виконання лабораторного заняття

Наявність на середовищі Ендо округлих колоній вишневого кольору (рожевих, безбарвних)			
<i>Так</i>		<i>Ні</i>	
Мікроскопія за Грамом		БГКП відсутні	
<div style="text-align: center;">  <p style="margin-top: 10px;">Збільшення:</p> </div>			
Грамнегативні палички ↓	Грампозитивні палички		
БГКП відсутні			
Оксидазний тест			
Негативний	Позитивний		
Колонія, що утворена БГКП	БГКП відсутні		

Розрахунок колі-індексу:

Кількість колоній БГКП	Колі-індекс	Стан дослідженої води

Заняття 10

Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів і чутливості до антибіотиків (1-й етап)

Мета заняття. Ознайомитись з методами виявлення антагоністичних властивостей мікроорганізмів і методами визначення чутливості до антибіотиків.

Студенти повинні знати:

- біологічну роль антагонізму, прояв антагоністичної активності мікроорганізмами;
- типи антагонізму;
- біологічну роль антибіотиків,
- основних продуцентів антибіотиків.

Студенти повинні вміти: досліджувати антагоністичні властивості мікроорганізмів (метод перпендикулярних штрихів) і визначати чутливість мікроорганізмів до антибіотиків (диско-дифузійний метод).

Студенти повинні мати навички: техніки посіву культури-антагоніста на поверхню щільного поживного середовища одним штрихом бактеріологічною петлею, підсіву суспензій тест-культур мікроорганізмів до культури антагоніста, посіву суспензій тест-мікроорганізмів суцільним газоном шпателем Дригальського, розкладання дисків з антибіотиками на поверхню засіяних мікроорганізмами чашок Петрі.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Типи взаємовідносин мікроорганізмів між собою та з іншими організмами.
2. Антагонізм. Типи антагонізму (активний і пасивний антагонізм).
3. Антибіотики. Продуценти антибіотиків.

Типи взаємовідносин мікроорганізмів у біоценозах

Мікроорганізми жорстко конкурують між собою. Це пов'язано з тим, що мікроорганізми, які мешкають в конкретному біоценозі, мають принципово схожі потреби в джерелах енергії та живлення. Кожен мікроорганізм пристосовується не лише до неживих субстратів, але й до інших організмів, що його оточують. Подібна адаптація іноді призводить до набуття особливих метаболічних властивостей, що надають їх володарю здатність займати специфічні ніші. Значна частина бактерій бере участь в конкурентній боротьбі, адаптуючись до співіснування з іншими формами життя або вступаючи з ними у протидію.

Розрізняють наступні типи взаємодії мікроорганізмів з макроорганізмами та між собою:

1) *Симбіоз* (від грецьк. *symbiosis*, сумісне проживання) — сумісне тривале існування мікроорганізмів у довгоживучих угрупованнях. Взаємовідносини, за яких мікроорганізм розташовується поза клітинами хазяїна (більш крупного організму), називаються *ектосимбіозом*; при локалізації всередині клітин — *ендосимбіозом*. Типові ектосимбіотичні мікроорганізми — *Escherichia coli*, бактерії родів *Bacteroides* та *Bifidobacterium*, *Proteus vulgaris*, а також інші представники кишкової мікробіоти. Як приклад ендосимбіозу можна розглядати илазмиди, що забезпечують, наприклад, резистентність бактерій до лікарських засобів.

Симбіотичні взаємовідносини також розділяють за користю, що отримує від них кожен з партнерів:

- *мутуалізм* (від лат. *mutuus*, взаємний) — взаємовигідні симбіотичні відносини. Так, мікроорганізми виробляють біологічно активні речовини, необхідні організму хазяїна (наприклад, вітаміни групи В). При цьому ендо- та ектосимбіонти, що мешкають в макроорганізмах, захищені від несприятливих умов середовища (висихання та екстремальних температур) і мають постійний доступ до поживних речовин.

- *коменсалізм* — різновид симбіозу, при якому користь здобуває лише один партнер (не спричиняючи «видимої» шкоди іншому); мікроорганізми, що

беруть участь в таких взаємовідносинах — коменсали (від лат. *com-*, с, + *mensa*, стіл; буквально — сотрапезники). Мікроорганізми-коменсали колонізують шкірні покриви та порожнини організму людини (наприклад, ШКТ), не спричиняючи «видимої» шкоди; їх сукупність — *нормальна мікробіота* (природна мікробіота). Типові ектосимбіотичні організми-коменсали — кишкова паличка, біфідобактерії, стафілококи, лактобацили. Багато бактерій-коменсалів належать до умовно-патогенної мікробіоти і здатні при певних обставинах викликати захворювання макроорганізму (наприклад, при внесенні їх в кровотік під час медичних маніпуляцій).

- *антагоністичний симбіоз* — симбіотичні відносини, що завдають хазяїну більш або менш вираженої шкоди; його крайній прояв — *паразитизм* (від грецьк. *para*, при, + *sitos*, їжа). Якщо мікроорганізми-сапрофіти (від грецьк. *sapros*, гнилий, + *phyton*, рослина) утилізують мертві органічні субстрати, то паразитичні види живуть за рахунок живих тканин рослин або тварин. Проникаючи в організм хазяїна, вони можуть викликати в нього захворювання, тому їх позначають як *патогенні мікроорганізми*.

Метабіоз. У деяких біотопах, особливо в ґрунті, деякі мікроорганізми утилізують продукти життєдіяльності інших; наприклад, нітрифікуючі бактерії використовують аміак, який утворюють амоніфікуючі бактерії. Подібні взаємовідносини відомі як *метабіоз*.

Сателізм. Деякі мікроорганізми здатні виділяти метаболіти, що стимулюють ріст інших мікроорганізмів. Наприклад, сарцини або стафілококи виділяють ростові фактори, що стимулюють ріст бактерій роду *Haemophilus*. Часто сумісний ріст декількох видів мікроорганізмів активує їх фізіологічні властивості. Подібні взаємовідносини відомі як *сателізм* (від лат. *satelles*, той, що супроводжує).

Антагонізм. Типи антагонізму (активний і пасивний антагонізм).

Антагоністичний симбіоз між мікроорганізмами має особливе значення і називається *мікробним антагонізмом* (від грецьк. *antagonizmai*, суперництво). Він відображує форми боротьби мікроорганізмів за існування (тобто за джерела живлення та енергії), які склалися еволюційно. Усі відомі на теперішній час форми мікробного антагонізму можна об'єднати у дві великі групи: “пасивний” та “активний”.

«Пасивний» антагонізм.

1. Антагонізм, що формується при сумісному розвитку різних видів, що потребують одних і тих же поживних речовин. При цьому переважаюче положення у розвитку буде у того мікроорганізму, швидкість росту якого вища за швидкість росту інших організмів, що його оточують.

2. Насильницький антагонізм — полягає в утворенні одним видом мікроорганізмів протеолітичних ферментів — лізинів, що викликають розчинення клітин іншого виду. Отже, якщо бактеріям, які в природних умовах не проявляють жодних ознак антагонізму, створити умови нестачі в середовищі поживних речовин (азотних або вуглецевих), то одна з бактерій, що має протеолітичні ферменти, як поживний матеріал може використовувати клітини інших бактерій, що не мають цих ферментів. У цьому полягає основна

властивість насильницького антагонізму.

«Активний» антагонізм.

1) неспецифічний - обумовлений утворенням мікробами органічних кислот, спиртів або інших продуктів обміну в результаті використання окремих компонентів субстрату. У деяких мікроорганізмів здатність утворювати ті чи інші продукти життєдіяльності в процесі еволюційного розвитку супроводжується їх паралельною адаптацією до відносно високих концентрацій цих сполук. У результаті різні за властивостями та хімічною природою продукти, які утворюються в процесі життєдіяльності мікроорганізмів, служать їм зброям у боротьбі за існування, пригнічуючи або гальмуючи ріст конкурентних організмів.

2) специфічний - обумовлений утворенням антибіотичних речовин. Найбільш істотною і яскравою формою антагонізму, широко розповсюдженою в світі мікроорганізмів, є утворення специфічних продуктів обміну, які пригнічують або повністю припиняють розвиток інших видів. Такі сполуки отримали назву *антибіотиків*.

Антибіотики. Продуценти антибіотиків

Антибіотики (від грецьк. *anti*, против, + *bios*, життя). Біологічний сенс утворення антибіотиків — пригнічення життєдіяльності мікроорганізмів-конкурентів. Зокрема, дія антибіотиків грибової природи зазвичай спрямована проти бактерій, а бактеріальної — проти грибів і навіть найпростіших. Було встановлено, що антибіотики утворюються також в рослинних і тваринних тканинах.

Антибіотики рослинного походження захищають рослини-продуценти від патогенних мікроорганізмів, а також пригнічують життєдіяльність інших рослин, що конкурують за основні джерела живлення. До антибіотиків рослинного походження відносять **фітонциди** [от грецьк. *phyton*, рослина, + лат. *caedo i-cido*), вбивати] — ефірні олії, що пригнічують життєдіяльність багатьох мікроорганізмів. Препарати, що містять фітонциди цибулі, часника, хрину, алое, перцю та інших рослин, знайшли широке застосування в народній медицині; їх використання в традиційній медицині обмежують труднощі отримання добре очищених та стійких лікарських форм.

Антибіотики тваринного походження. Найбільш відомий *лізоцим* (його виявив П.Н. Лашенков у 1909 р., детально вивчив Александр Флемінг). Лізоцим міститься в білку курячих яєць, слині, слізній рідині та різних тканинах. Лізоцим — фермент, що руйнує муреїновий шар клітинної стінки бактерій.

Інтерферони — низькомолекулярні білки, що мають протівірусну активність; продукуються фібробластами та лейкоцитами після проникнення в організм патогенних вірусів. Протівірусна дія інтерферонів не залежить від конкретного збудника; інфекційний агент не здатний проявляти резистентність до ефекту цих білків.

Бактеріоцини — білки, що синтезуються певними штамми бактерій. Бактеріоцини викликають загибель бактерій того ж або близьких видів, полегшуючи конкуренцію за життєво необхідні субстрати всередині окремого

або близькоспоріднених видів. На відміну від антибіотиків, секреція бактеріоцинів супроводжується загибеллю клітини-продуцента. Бактеріоцини беруть участь у формуванні та підтримці стабільних бактеріальних угруповань (наприклад, в кишечнику людини бактеріоцини кишкової палички викликають загибель патогенних ентеробактерій – шигел і сальмонел). **Бактеріоциногенія** (утворення бактеріоцинів) більш виражена у грамнегативних бактерій, але вона відома й у грампозитивних видів. Відомо близько 200 різноманітних бактеріоцинів, які зазвичай позначаються за родовою або видовою назвою продуцента – коліцини (*Escherichia coli*), пестицини (*Yersinia pestis*), стафілоцини (види стафілококів).

Практичні завдання

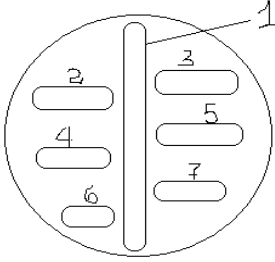
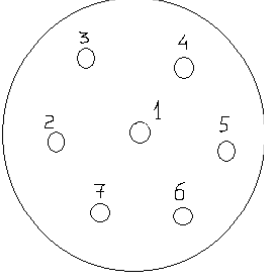
1. Вивчити антагоністичні властивості мікроорганізмів методом перпендикулярних штрихів (підсів тест-мікробів до антагоніста, що виріс на агаризованому середовищі у чашці Петрі):

- в чашки Петрі зі стерильним поживним агаром посіяти культуру-антагоніста. Сіють бактеріологічною петлею одним штрихом по діаметру чашки Петрі (антагоністи слід посіяти на попередньому занятті і помістити у термостат при 30 °С на 5 – 6 діб);
- на зовнішній поверхні дна чашки Петрі, в якій виросла культура антагоніста, олівцем по склу чи маркером провести перпендикулярно лінії росту антагоніста паралельні лінії на відстані 1 см одна від одної, які будуть служити трафаретом для підсіву тест-мікробів;
- провести підсів водних суспензій тест-мікробів, починаючи штрих на відстані 2 – 3 мм від межі росту мікроба-антагоніста. Штрих кожного тест-мікроорганізма пронумерувати. Чашки з посівами культивувати при 30 °С протягом 24 годин.

2. Вивчити чутливість мікроорганізмів до антибіотиків диско-дифузійним методом:

- на поверхню підсушеного агаризованого середовища стерильною піпеткою нанести 0,1 – 0,2 мл суспензії тест-мікроорганізма і провести посів шпателем Дригальського;
- на зовнішній поверхні дна чашки Петрі, засіяної тест-мікроорганізмом, олівцем по склу чи маркером нанести на відстані 3 – 4 см одна від одної і на відстані 2 – 2,5 см від краю чашки точки, що будуть служити трафаретом для розміщення дисків-антибіотиків і їх пронумерувати;
- стерильним пінцетом помістити по трафарету диски, просочені антибіотиками з різним механізмом дії на клітину мікроорганізма;
- кожний диск притиснути пінцетом так, щоб він щільно приставав до поверхні середовища;
- засіяні чашки помістити у термостат при 37°С на 24 години вверх дном, щоб запобігти попаданню конденсаційної води на поверхню посівів.

Оформлення протоколу виконання заняття

Визначення антагоністичних властивостей методом перпендикулярних штрихів	
	<p>1 – штам-антагоніст: 2-7 – тест-штами: 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 –</p>
Визначення чутливості до антибіотиків диско-дифузійним методом	
	<p>Штам, який перевіряється на чутливість до антибіотиків: Антибіотики: 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 –</p>

Матеріали та обладнання

Чашки Петрі з культурами-антагоністами, суспензії добових культур тест-мікроорганізмів, чашки Петрі з поживним агаром, бактеріологічні петлі, штативи, шпателя Дригальського, стаканчики зі спиртом, стерильні мікропіпетки, стандартні паперові диски з антибіотиками, спиртівки, олівці по склу (маркери), посуд з дезрозчином для відпрацьованих піпеток.

Заняття 11

Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів і чутливості до антибіотиків (2-й етап)

Мета заняття. Провести облік результатів визначення антагоністичних властивостей мікроорганізмів і чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

Студенти повинні знати:

- методи вивчення антагоністичної активності мікроорганізмів та чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

Студенти повинні вміти: провести облік результатів щодо визначення антагоністичних властивостей мікроорганізмів методом перпендикулярних штрихів і дослідження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків диско-дифузійним методом, а також оцінювати отримані результати.

Студенти повинні мати навички: вимірювання зон затримки (пригнічення) росту тест-культур.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Характер, спектр і механізм дії антибіотиків. Одиниці активності антибіотиків.
2. Формування механізмів резистентності мікроорганізмів до антибіотиків.

Характер, спектр і механізм дії антибіотиків

Характер і механізм біологічної дії антибіотика залежить насамперед від його хімічної природи, концентрації, виду мікроорганізму і мікроструктури його клітин, від умов прояву дії антибіотика та інших факторів. Під **характером** дії антибіотика розуміють зміни в культурі чутливого мікроорганізму, що виникають у присутності даного антибіотика. Розрізняють бактеріостатичний (цитостатичний), бактерицидний (цитотидний) і бактеріолітичний (цитолітичний) характер дії.

Якщо речовина має бактеріостатичну, бактерицидну або бактеріолітичну властивість, то це вказує лише на кінцевий результат дії антибіотика, а не на механізм, за допомогою якого досягнутий той чи інший біологічний ефект.

Під **спектром** дії антибіотика розуміють коло організмів, щодо яких він виявляє активність.

Умовно всі найважливіші в практичному відношенні антибіотики можна розділити на кілька груп:

1. Протибактерійні антибіотики вузького спектру дії, активні переважно щодо грампозитивних організмів (група пеніциліну і цефалоспоринів).
2. Протибактерійні антибіотики широкого спектру дії (тетрацикліни, аміноглікозиди та ін.).
3. Протитуберкульозні антибіотики (стрептоміцин, канаміцин, біоміцин, циклосерин).
4. Протигрибні антибіотики (ністатин, гризеофульвін, амфотерицин В та ін.).
5. Протипухлинні антибіотики (мітоміцин С, олівоміцин, брунеоміцин та ін.).
6. Протиамебні та протималярійні антибіотики (фумагілін, радіцикол).

Під **механізмом** біологічної дії антибіотика слід розуміти ті зміни в біохімічній діяльності клітини або, точніше, ті порушення шляхів обміну речовин мікроорганізму, контрольовані відповідними генами, які викликаються даним препаратом і в кінцевому результаті припиняють розвиток або призводять до загибелі організму.

Незважаючи на різноманіття хімічної будови антибіотиків, утворених різними групами організмів, всі вони характеризуються певною спільністю первинної дії на мікробні клітини:

а) всі антибіотики в тій чи іншій мірі адсорбуються клітиною (клітинної стінкою);

б) всі антибіотики пригнічують ріст чутливих культур, навіть у дуже низьких концентраціях;

в) всі антибіотики виявляють вибірккову біологічну дію стосовно певних видів (штамів) бактерій.

Разом з тим характер і особливо механізм біологічної дії кожної антибіотичної речовини специфічні. Навіть біологічна дія одного й того ж препарату в залежності від умов середовища, в якому він виявляє ефект, неоднакова.

Величина **біологічної активності антибіотика** зазвичай виражається в умовних одиницях, що містяться в 1 мл розчину (од/мл) або 1 мг препарату (од/мг).

За *одиницю біологічної активності* приймають мінімальну кількість антибіотика, здатну пригнітити розвиток або затримати ріст певного числа клітин стандартного штаму тест-мікроорганізму в одиниці об'єму поживного середовища.

Механізми антибіотикорезистентності мікроорганізмів

Основою терапевтичної дії антибактеріальних препаратів є пригнічення життєдіяльності збудника інфекційного захворювання внаслідок пригнічення більш-менш специфічного для мікроорганізмів (прокаріотів) метаболічного процесу. Інгібування відбувається в результаті зв'язування антибіотика з мішенню, якою може бути або фермент, або структурна молекула мікроорганізму.

Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків може бути природною і набутою.

- Справжня природна стійкість характеризується відсутністю у мікроорганізмів мішені дії антибіотика або недоступністю мішені внаслідок первинно низької проникності або ферментативної інактивації. При наявності у бактерій природної стійкості антибіотики клінічно неефективні. Природна резистентність є постійною видовою ознакою мікроорганізмів і легко прогнозується.

- Під набутою стійкістю розуміють властивість окремих штамів бактерій зберігати життєздатність при тих концентраціях антибіотиків, які пригнічують основну частину мікробної популяції. Можливі ситуації, коли більша частина мікробної популяції проявляє набуто стійкість. Формування

резистентності у всіх випадках обумовлено генетично: придбанням нової генетичної інформації або зміною рівня експресії власних генів.

Відомі наступні біохімічні механізми стійкості бактерій до антибіотиків:

1. Модифікація мішені дії антибактеріальних препаратів.
2. Інактивація антибактеріальних препаратів.
3. Активне виведення антибактеріальних препаратів з мікробної клітини (еффлюкс).
4. Порушення проникності зовнішніх структур мікробної клітини.
5. Формування метаболічного "шунта" (здатність до синтезу стійких до дії антибіотиків ферментів).

Практичні завдання

1. Провести облік результатів дослідження щодо визначення антагоністичної активності мікроорганізмів.
 - виміряти зону затримки (пригнічення) росту для кожної тест-культури;
 - звернути увагу на наступне: ріст тест-мікроорганізму на деякій відстані від мікроорганізма-антагоніста свідчить про пригнічення цього організму продуктами життєдіяльності мікроба-антагоніста. Якщо тест-мікроорганізми розвиваються, починаючи безпосередньо від антагоніста, це вказує на відсутність пригнічуючої дії на цей тест-мікроорганізм.
2. Провести облік результатів дослідження по визначенню чутливості мікроорганізмів до антибіотиків:
 - виміряти діаметр зон пригнічення росту тест-культури за допомогою лінійки виразити в міліметрах;
 - діаметр зони затримки росту тест-культури до 10 мм свідчить про слабку чутливість до антибіотику, зона затримки росту більше 10 мм – про чутливість.

Оформлення протоколу виконання заняття

1. Результати виміру зон затримки (пригнічення) росту тест-культур мікроорганізмів під впливом антагоніста внести у таблицю 1.

Таблиця 1

Вивчення антагоністичної активності мікроорганізмів

Тест-культура	Антагоністична активність (зона затримки росту, мм)

2. Відмітити, до яких антибіотиків чутливий тест-мікроорганізм.
3. Результати виміру діаметра зон затримки (пригнічення) росту тест-культур мікроорганізмів внести у таблицю 2.

**Чутливість тест-культур мікроорганізмів до антибіотиків
(диско-дифузійний метод)**

Тест-культура	Діаметр зони затримки (пригнічення) росту, мм				

Матеріали та обладнання

Чашки з посівами, проведені на попередньому занятті, лінійки.

Навчальне видання

Ямборко Ганна Валентинівна
Єлинська Наталія Олексійовна
Зінченко Оксана Юріїна
Васильєва Наталія Юріївна

МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять для студентів хімічного факультету

В авторській редакції

Підп. до друку 20.12.2018. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк.3,02. Тираж 20 пр.
Зам. № 1834.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р. Р 51