

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

МІКРОБІОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних занять та самостійної роботи
з курсу «Мікробіологія»
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
заочної форми навчання спеціальності 091 Біологія

ОДЕСА
ОНУ
2024

**УДК 576.80.85
М597**

Укладач:

Г. В. Ямборко, кандидат технічних наук, доцент, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Рецензенти:

С. С. Чернадчук, кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

Ю. С. Назарчук, кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки, фізіології рослин та садово-паркового господарства Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

*Рекомендовано вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 5 від 29 грудня 2023 р.*

М597 **Мікробіологія** [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до лаб. занять та самост. роб. з курсу «Мікробіологія» для здобув. першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти заочн. форми навч. спец. 091 «Біологія» / уклад. Г. В. Ямборко. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. – 40 с. – 0,9 МБ.

Методичні рекомендації розроблені відповідно до вимог навчальної програми з дисципліни «Мікробіологія» для здобувачів першого рівня вищої освіти спеціальності 091 «Біологія» заочної форми навчання. Мета методичних рекомендацій – допомогти студентам засвоїти теоретичні розділи курсу та набути практичних навичок та вмінь. В методичних рекомендаціях наводиться план та завдання до проведення лабораторних занять, завдання для самостійного опрацювання окремих питань, перелік питань для підготовки до періодичного контролю, рекомендована література та інформаційні ресурси. Послідовність лабораторних занять відповідає робочій програмі.

УДК 576.80.85

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	4
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1	
Організація мікробіологічної лабораторії. Правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами. Методи підготовки і стерилізації мікробіологічного посуду і матеріалів	5
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2	
Харчові потреби мікроорганізмів. Методи підготовки і стерилізації поживних середовищ. Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів	9
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3	
Поверхнєве культивування. Визначення чисельності мікроорганізмів у воді та повітрі. Характеристика колоній мікроорганізмів, що вирости	18
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4	
Будова мікроскопу. Методи мікроскопії. Приготування і мікроскопія живих препаратів	26
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5	
Приготування і мікроскопія фіксованих препаратів. Забарвлення клітин за методами Грама та Ожешко	33

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Без знання особливостей мікроорганізмів та стратегій їхнього виживання неможливо зрозуміти усього різноманіття проявів життя на Землі, умов його розвитку та еволюції, структури біосфери та її функцій. Оволодіння теоретичними основами загальної мікробіології формують науковий світогляд про різноманіття світу мікроорганізмів. Засвоєння знань з дисципліни дають можливість розрізняти відмінності будови та фізіологічних процесів різних груп мікроорганізмів; ідентифікувати мікроорганізми та розкривати їх значення для довкілля і людини; розкривати перспективи використання мікроорганізмів для захисту довкілля та господарських потреб людини.

Під час вивчення курсу розглядаються питання про різноманіття мікроорганізмів, їх морфологічні, фізіологічні, біохімічні, генетичні, систематичні та екологічні особливості, різноманітні методи та методики мікробіологічних досліджень, особливості метаболізму у різних груп мікроорганізмів, сучасний рівень і перспективи розвитку мікробіології в Україні та за її межами.

Метою вивчення дисципліни є забезпечення майбутніх фахівців біологів необхідними теоретичними знаннями з основ загальної мікробіології; формування навичок роботи з мікроорганізмами; усвідомлення значення мікроорганізмів у природі, в основі біотехнологій, сільському господарстві та медицині.

Для полегшення і систематизації підготовки студентів до занять розроблені питання, які здобувачі повинні розглянути до початку роботи.

Для закріплення матеріалу після кожної роботи наводяться контрольні питання, а також різні ситуаційні завдання для самостійного опрацювання, вирішення яких допоможе здобувачеві побачити можливість застосування своїх знань у практичній діяльності.

Виконані роботи оформляються студентами у вигляді протоколів, з акцентуванням уваги на заповненні таблиць, формулювання висновків, аналіз та обговорення отриманих матеріалів.

На біологічному факультеті Одеського національного університету імені І. І. Мечникова дисципліна «Мікробіологія» входить до обов'язкових дисциплін для здобувачів першого (бакалаврського) рівня навчання спеціальності 091 «Біологія». На вивчення дисципліни на заочному відділенні відводиться 4 кредити ЄСТС (120 годин), і передбачає 12 годин лекцій, 10 годин лабораторних занять та організацію самостійної роботи студентів (98 годин). Курс викладається у 5 семестрі.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1

Організація мікробіологічної лабораторії.

Правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами.

Методи підготовки і стерилізації мікробіологічного посуду і матеріалів

Мета заняття. Ознайомлення з організацією мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній; ознайомлення з принципами і методами стерилізації.

Питання для підготовки до заняття

1. Сучасне лабораторне устаткування і апаратура.
2. Основні правила роботи в мікробіологічній лабораторії.
3. Методика мікробіологічних досліджень, питання їх планування і організації.
4. Техніка безпеки при проведенні мікробіологічних робіт в лабораторних умовах.
5. Принципи та методи стерилізації.
6. Основні правила підготовки посуду і матеріалів до стерилізації.

Теоретичні відомості

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, підлог – 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 леткі 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 °C (при 60 °C протягом 30 хвилин, при 75 °C протягом 15 хвилин або при 80 °C протягом 10 хвилин); пастеризують продукти харчування;
- стерилізація сухим жаром здійснюється в сушильних шафах; стерилізують скляний посуд при температурі 160–165 °C 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 °C і тиску 1 атм. забезпечується протягом 20 хвилин;
- стерилізація текучою парою (дрібна стерилізація) здійснюється у апаратах Коха або в автоклаві з відкритим вентилем; температура досягає 100 °C 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, H_2O_2 та ін.;

г) стерилізація фільтруванням – використовується для поживних середовищ, що містять термолабільні (вітаміни, амінокислоти) компоненти, які швидко руйнуються під дією високих температур.

Матеріали та обладнання: вата, марля, нитки, ножиці, піпетки, колби конічні та круглі плоскодонні, пробірки, чашки Петрі, папір.

Хід роботи

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, водопроводну воду для розведень.

Завдання для самостійної роботи

1. Користувачись рекомендованою літературою та конспектом лекцій, заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Стерилізація лабораторного посуду та матеріалів

Об'єкт, що стерилізується	Підготовка до стерилізації	Вид стерилізації	Режим стерилізації
Скляні пробірки			
Піпетки			
Чашки Петрі			
Вода у пробірках			
Повітря			

2. Виконайте тестові завдання для самоперевірки.

1. У сухожарових шафах стерилізують:

А - пробірки, флакони

Б - чашки Петрі

В - пастерівські і мірні піпетки

Г - поживні середовища

2. У бактеріологічній лабораторії підготували до стерилізації м'ясо-пептонний бульйон. Який із способів стерилізації слід застосувати?
- А - фільтрування
 - Б - сухим жаром температури 160 °С 2 год.
 - В - кип'ятіння 1 год
 - Г - автоклавування при температурі 121 °С 20 хв.
3. Дія хімічних речовин на бактерії може бути
- А - стимулюючою
 - Б - бактеріостатичною
 - В - бактерицидною
 - Г - фунгіцидною
4. При температурі 112–115 °С і тиску 0,05 МПа впродовж 20–30 хв. стерилізують
- А - молоко
 - Б - желатинові середовища
 - В - середовища, що містять цукри та вітаміни
 - Г - м'ясо-пептонні середовища
5. Нагрівання рідин до температури нижче, ніж температура кипіння, з метою направленої елімінації мікроорганізмів називається
- А - стерилізація
 - Б - пастеризація
 - В - тіндалізація
 - Г - дезінфекція
6. Яким з нище наведених методів найкраще руйнувати бактеріальні клітини?
- А - автоклавуванням при 121 °С
 - Б - розчином хлору
 - В - кип'ятінням при температурі 100 °С.
 - Г - заморожуванням і розморожуванням декілька разів.
7. Для стерилізації повітря приміщень використовують обробку
- А - ультрафіолетовими променями
 - Б - тіндалізацією
 - В - гамма-випромінюванням
 - Г - паром під тиском
8. У якому діапазоні довжина хвилі УФ-опромінення забезпечує якісний стерилізаційний ефект:
- А - 200–300 нм
 - Б - 2000–3000 нм
 - В - 500–600 нм
 - Г - 5000–6000 нм

9. Процес знищення всіх видів мікроорганізмів, включаючи їх спорові форми, це:
А - дезінфекція
Б - стерилізація
В - передстерилізаційна обробка
Г - асептика
10. Знайти помилку. Для проведення дезінфекції використовуються такі способи знезараження об'єктів:
А - фізичні
Б - хімічні
В - мікробіологічні
Г - комбіновані
11. Вказати, які хімічні сполуки не застосовуються для проведення дезінфекційних заходів:
А - кисневмісні засоби
Б - галоїдовмісні сполуки
В - альдегідовмісні засоби
Г - амінокислоти

Контрольні питання

1. Мікроорганізми і фактори зовнішнього середовища.
2. Вплив фізичних і хімічних факторів на ріст і поширення мікроорганізмів.
3. Ріст мікроорганізмів залежно від температури, концентрації розчинених солей, рН середовища, кисню.
4. Методи стерилізації та консервації.

Інформаційні ресурси:

1. Люта В. А. Практикум з мікробіології: навчальний посібник / В. А. Люта, О. В. Кононов. – 3-є вид., випр. – К. : ВСВ “Медицина”, 2018. – 184 с.
2. Практикум з мікробіології: навч. посібник. – 2-е вид., переробл. та доповн. / О. В. Кононов. – К.: Медицина, 2011. – 184 с.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

Харчові потреби мікроорганізмів.

Методи підготовки і стерилізації поживних середовищ.

Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомлення з потребами мікроорганізмів у поживних речовинах, принципами складання та стерилізації поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.

Питання для підготовки до заняття

1. Потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту).
2. Типи поживних середовищ за їх складом та призначенням.
3. Загальні вимоги до поживних середовищ.
4. Принципи складання та правила стерилізації поживних середовищ.

Теоретичні відомості

Харчові потреби мікроорганізмів

Мікроорганізмам, як і усім іншим організмам, необхідний 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 r_{H_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.

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 всі 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 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 порошків. 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.

Розливання поживних середовищ. Поживні середовища, як правило, готують про запас в колбах великого об'єму. Перед роботою, середовища розливають у пробірки або чашки Петрі. Тверді середовища перед розливанням розплавляють на водяній бані. Після цього їх розливають в посуд необхідного об'єму, дотримуючись умов стерильності: горло колби під час розливання проводять крізь полум'я спиртівки, ватяний корок обпалюють. Після розливання пробірки з середовищами, стерилізують одним із способів (в залежності від складу середовища).

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 газonom 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.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби конічні та круглі плоскодонні, пробірки, чашки Петрі, папір, м'ясо-пептонний агар, агар Горбенко.

Хід роботи:

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 в 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.

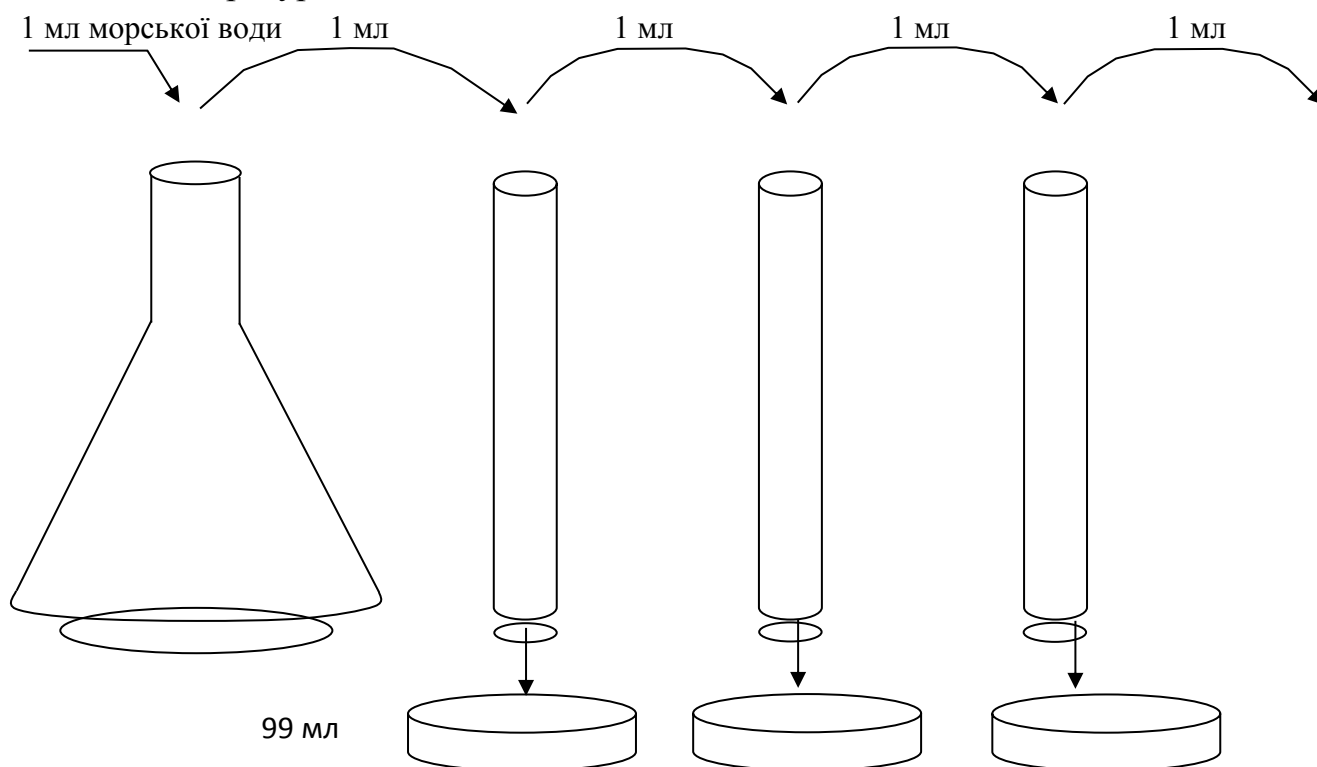


Рис. 1. Метод серійних розведень

Завдання для самостійної роботи:

1. Користуйтесь рекомендованою літературою та конспектом лекцій, заповнити таблиці 2, 3.

Таблиця 2

Стерилізація різних поживних середовищ

Середовище	Метод стерилізації	Режим стерилізації
Рідке та агаризоване середовище, до складу якого не входять цукри та ін. термолабільні речовини		
Рідке та агаризоване середовище з цукрами та іншими термолабільними речовинами		
Середовище, до складу якого входять речовини, що не витримують нагрівання вище 100 °С		
Середовище, до складу якого входять білки, вітаміни та ін., що не витримують нагрівання.		

Таблиця 3

Характеристика різних типів культивування мікроорганізмів

Тип культивування	Обладнання, яке потрібне	Призначення
Глибинне		
Поверхневе		

2. Виконайте тестові завдання для самоперевірки.

1. До поживних середовищ висувають такі основні вимоги, крім:

- А - наявність необхідних живильних речовин
- Б - стерильність.
- В - певна консистенція
- Г - прозорість

2. Агар-агар є найкращим агентом для приготування щільних поживних середовищ, тому що

- А - він добре джерело живлення

- Б - його практично не розщеплюють бактерії
- В - його отримують з морських водоростей
- Г - його розщеплюють багато бактерій

3. Для отримання щільних поживних середовищ використовують агар-агар. Вкажіть його хімічну природу.

- А - білок
- Б - полісахарид
- В - ліпід
- Г - нуклеотид

4. Середовища, які складають з продуктів тваринного або рослинного походження, називають

- А - натуральними
- Б - синтетичними
- В – селективними
- Г - комплексними

5. Середовища, склад яких відомий, називають

- А - натуральними
- Б - синтетичними
- В – селективними
- Г - комплексними

6. Середовища, які використовують для виділення і культивування певних груп мікроорганізмів, називають

- А - натуральними
- Б - синтетичними
- В – селективними
- Г - комплексними

7. Поживні середовища за консистенцією бувають

- А - рідкі, сипучі та тверді
- Б - синтетичні та натуральні
- В - селективні та консервуючі
- Г - рідкі та желатинізовані

8. Які з перелічених сполук відносяться до факторів росту?

- А - глюкоза
- Б - лактоза
- В - ліпіди
- Г - амінокислоти

9. Хемоорганогетеротрофи найчастіше використовують як джерело вуглецю

- А - вуглекислий газ
- Б - тригліцериди

- В - глюкозу
- Г - крохмаль

10. Організми, які потребують факторів росту, називаються

- А - прототрофами
- Б - ауксотрофами
- В - гетеротрофами
- Г - автотрофами

Контрольні питання

1. Потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту).
2. Типи поживних середовищ.
3. Закономірності росту бактеріальної популяції.
4. Поверхневе та глибинне культивування.
5. Періодичне та безперервне культивування.

Інформаційні ресурси

1. Гудзь С. П. Мікробіологія: практикум, тести / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська .- Львів: ВЦЛНУ, 2012. - 227 с.
2. Рудавська Г. Б. Мікробіологія : підручник / Г. Б. Рудавська, Л. І. Демкевич. – 2-ге вид., переробл. та доповн. – К. : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2015. – 407 с.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3

Поверхневе культивування.

Визначення чисельності мікроорганізмів у воді та повітрі.

Характеристика колоній мікроорганізмів, що вирости

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

Питання для підготовки до заняття

1. Визначення понять «культивування мікроорганізмів» «культура», «клон», «колонія», «штам».
2. Ріст 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).

Теоретичні відомості

Методи визначення загальної кількості мікроорганізмів у різних субстратах

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 у 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 у висіві певного об'єму (1 мл) досліджуваної суспензії мікроорганізмів на рідке середовище в пробірці. Після інкубації, виходячи з числа пробірок, в яких спостерігався або був відсутній ріст, розраховують найбільш вірогідну кількість клітин, що містяться в 1 мл 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. Із середньої проби ґрунту відважують 5 г, розтирають у ступці та вносять у конічну колбу об'ємом 250–300 мл, додають 50 мл стерильної водогінної води і збовтують протягом 5 хв на спеціальному апараті. Після осідання великих частинок (протягом 3–5 сек) стерильною градуйованою мікропіпеткою відбирають 0,01 мл зависі суспензії та наносять її на знежирене предметне скло. До суспензії на склі додають краплю 0,01 %-вого розчину агару (агар заздалегідь промивають і виготовляють на дистильованій воді). Суспензію перемішують з агаром і стерильним накривним скельцем розподіляють по предметному склу за допомогою трафарету на площі 4 см². Після цього препарат підсушують, фіксують 96 %-вим спиртом і фарбують карболовим еритрозином (занурюють скло в розчин барвника й витримують протягом 30 хв, а за потреби до 24 год). Залишок фарби змивають, занурюючи препарат у воду (тильною стороною), підсушують і вивчають під мікроскопом за допомогою імерсійної системи. Кількість бактерій у ґрунті визначають прямим підрахунком під мікроскопом. Перевага методу полягає також в тому, що фіксовані, забарвлені препарати добре зберігаються, тому підрахунок можна здійснювати в зручний для дослідника час.

Метод пластинок обростання (за М. Г. Холодним). На відміну від наведених вище, цей метод дає можливість вивчати цілі мікробні асоціації безпосередньо в ґрунті, тобто в природному середовищі. Метод обростання використовують для виявлення характеру мікробіоти (мікробні пейзажі), щільності обростання а також домінуючих форм. Окремі асоціації можна

зафіксувати на мікрофотознімках. На рівній поверхні ґрунту роблять гострим ножом розріз, глибина якого залежить від досліджуваного ґрунтового горизонту. До вертикальної стінки зрізу щільно прикладають стерильне знежирене предметне скло, на 2–3 см нижче від поверхні ґрунту. Зверху зріз закривають ґрунтом. Місце, де встановлено скло, позначають. Залежно від мети дослідження, скло витримують у ґрунті 10–15 днів, а іноді й кілька місяців. Після цього обережно ножом знімають землю й виймають скло. Поверхню скла, що була притулена до стінки ґрунтового розрізу, висушують на повітрі. Протилежну сторону скла витирають сухою ганчіркою. Препарат фіксують на полум'ї спиртівки. Потім предметне скло занурюють у банку з водою верхньою стороною донизу, внаслідок чого великі частинки ґрунту відмокають і падають на дно, а мікроби та дрібні частинки залишаються на склі. Після закінчення промивання препарат фарбують карболовим еритрозином (витримують від 30 хв до 24 год), висушують і вивчають під мікроскопом з імпресійною системою.

Матеріали та обладнання: посіви на агарі Горбенко та МПА з попереднього заняття, лупа, лінійка.

Хід роботи

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 4. Для цього провести облік кількості колоній, що виростають при висіві з певного розведення в чашках Петрі.

Таблиця 4

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				

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 вирости, 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 помножують на кількість секторів. Або підраховують кількість 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);

в) 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 5. Колонії замалювати.

Таблиця 5

Ознаки колонії мікроорганізмів на агарі Горбенко

Форма	Діаметр	Блиск	Колір	Профіль	Край	Структура	Консистенція	Флуоресценція	Малюнок

4. Зробити висновок про санітарний стан повітря приміщень біологічного факультету, користуючись таблицею 6.

Таблиця 6

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

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 (табл. 7).

Таблиця 7

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

Завдання для самостійної роботи:

1. Користуючись рекомендованою літературою та конспектом лекцій, заповнити таблицю 8.

Таблиця 8

Порівняння методів визначення загальної кількості мікроорганізмів у різних субстратах

Методи	Переваги	Недоліки
Чашковий метод Коха		
Метод граничних розведень		
Метод Виноградського		
Метод пластинок обростання		

2. Виконайте тестові завдання для самоперевірки

1. Максимальну кількість клітин чи біомаси, яку можна одержати за певних умов в одиниці обсягу, називають

- А - подвоєння біомаси
- Б - врожай культури
- В - питома активність культури
- Г - генерація

2. Коли рахують колонії, що вирости на чашці Петрі

- А - вважають, що кожна колонія утворюється з однієї клітини
- Б - підраховують тільки життєздатні клітини

В - враховують, що живильне середовище повинно бути придатним для росту бактерій
Г - усе вищенаведене

3. Кількість колоній, що вирости на чашці Петрі, не залежить від

- А - об'єму суспензії для посіву
- Б - розмірів колоній
- В - типу поживного середовища
- Г - терміну інкубації

4. Під ростом мікроорганізмів розуміють

- А - збільшення біомаси за рахунок засвоєння поживних речовин
- Б - збільшення розмірів клітин
- В - збільшення розмірів колоній
- Г - зростання кількості клітин

5. Який спосіб не використовують для вимірювання біомаси мікроорганізмів

- А - визначення абсолютно сухої ваги клітин ваговим методом
- Б - визначення біомаси за вмістом клітинного азоту, білка тощо
- В - вимірювання оптичної густини суспензії мікроорганізмів за допомогою оптичних приладів
- Г - визначення біомаси за сумарної кількості клітин

6. Дайте найбільш вірне визначення поняття «клон»:

- А - популяція бактерій, яка розмножується в природних умовах
- Б - культура, яка була отримана із ізолюваної колонії
- В - чиста культура бактерій
- Г - популяція клітин, отримана з однієї клітини шляхом її розмноження

7. Культура, що була отримана з однієї клітини –

- А - варіант
- Б - клон
- В - штам
- Г - тип

8. Що таке чиста культура?

- А - популяція мікроорганізмів, що складається з клітин одного виду
- Б - популяція клітин мікроорганізму, що штучно вирощується
- В - ізольоване скупчення клітин, що вирощується
- Г - скупчення клітин, що штучно вирощується

9. На яких основних принципах базується виділення чистих культур бактерій?

- А - відбору та аналізу;
- Б - фізичного та хімічного
- В - біохімічного й серологічного
- Г - кількісного та якісного

10. У якій фазі спостерігається максимальна швидкість поділу клітин і зростання їх кількості:

- А - стаціонарна
- Б- експоненціальна
- В - лаг-фаза
- Г - відмирання

Контрольні питання

1. Закономірності розповсюдження мікроорганізмів у водоймах та повітрі. Мікроорганізми як фактор забруднення навколишнього середовища.
2. Характеристика мікробіоти прісних і морських водойм.
3. Санітарно-показові мікроорганізми.
4. Мікробіологічні показники якості природного середовища та методи їх визначення.
5. Санітарно-мікробіологічні показники та мікроорганізми-індикатори санітарного стану води та повітря.

Інформаційні ресурси:

1. Люта О. В. Кононов. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія: підручник (ВНЗ I—III р. а.) 2-е. вид. підручник. — К.: Медицина, 2018. — 576 с.
2. Мікробіологія: підручник/ за ред. Н. І. Філімонової. — Харків, 2019. — 676 с.
3. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія / Т. П. Пирог. - Київ: Видавництво НУХТ, 2004. — 462 с.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4

Будова мікроскопу. Методи мікроскопії. Приготування і мікроскопія живих препаратів

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.

Питання для підготовки до заняття

1. Існуючі методи мікроскопії,
2. Принцип роботи сучасного світлопольного мікроскопа,
3. Принцип роботи сучасного електронного мікроскопа,
4. Внутрішня будову клітин мікроорганізмів.

Теоретичні відомості

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 ми ще 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.



Рис. 2. Будова мікроскопу [Гудзь та ін, 2012]

Правила роботи з імерсійною системою

1. За допомогою плоского дзеркала й об'єктива 8х зробити налаштування освітлення мікроскопа (ірисова діафрагма конденсора мікроскопа повинна бути відкрита, а конденсор цілком піднятий нагору). Інтенсивність освітлення повинна бути максимальною.
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 см 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 в 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, арtribактерій).

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.

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.

Хід роботи

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 вгору. 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, замальовати, вказати назву препарату, спосіб забарвлення, спільне збільшення мікроскопа.

2. Приготувати препарат “роздавлена крапля ” з колонії цвільових 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 8х і 40х.

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 90х. 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 90х. 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, користуючись 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.

7. Препарати замалювати, вказати повну латинську назву об'єкта, спосіб забарвлення, загальне збільшення мікроскопа, результати внести у таблицю 9.

Таблиця 9

Результати мікроскопічного дослідження

Об'єкт	Тип препарату	Барвник	Рисунок
<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	

Завдання для самостійної роботи

1. Користуйчись рекомендованою літературою та конспектом лекцій, заповнити таблицю 10.

Таблиця 10

Характеристика методів мікроскопії

Метод мікроскопії	Сутність методу	Призначення
Світлова мікроскопія		
Електронна мікроскопія		
Фазово-контрастна мікроскопія		
Люмінесцентна мікроскопія		

2. Виконайте тестові завдання для самоперевірки.

1. Роздільна здатність мікроскопа – це
 - А - кратність збільшення мікроскопа
 - Б - довжина хвилі видимого світла
 - В - добуток збільшення об'єктива на збільшення окуляра
 - Г - мінімальна відстань між двома точками, на якій вони ще сприймаються окремо
2. Для вивчення рухливості бактерій звичайно використовують мікроскопію
 - А - нефіксованих незабарвлених препаратів
 - Б - фіксованих забарвлених препаратів
 - В - фіксованих незабарвлених препаратів
 - Г - нефіксованих забарвлених препаратів
3. Бактерії зі джгутиками, що розташовані по всій поверхні клітини, називаються
 - А - перитрихи
 - Б - монотрихи
 - В - амфітрихи
 - Г - лофотрихи
4. Виберіть правильну відповідь: У прокаріотичній клітині можуть бути ...
 - А - мезосоми, ядро, рибосоми, ЦПМ, фімбрії, мітохондрії
 - Б - нуклеоїд, мітохондрії, вакуолі, ЦПМ, клітинна стінка
 - В - рибосоми, нуклеоїд, ЦПМ, мезосоми, фімбрії, клітинна стінка
 - Г - фімбрії, мезосоми, хлоропласти, ЦПМ, утворені з білка піліну

5. Резерв вуглецю у більшості прокаріотичних клітин

- А - крохмаль
- Б - гранульоза
- В - глікоген
- Г - ліпіди

6. Що таке зерна волютину?

- А - білки
- Б - поліфосфати
- В - ненасичені жирні кислоти
- Г - вуглеводи

7. До освітлювальної системи мікроскопа відносять:

- А - тубус і діафрагма
- Б - окуляр і об'єктиви
- В - конденсор
- Г - предметний столик

8. Імерсійні об'єктиви дають збільшення:

- А - у 10–15 разів
- Б - у 20–50 разів
- В - у 90–120 разів
- Г - у 600–900 разів

9. Капсули прокаріотів мають у своєму складі:

- А - жирні кислоти
- Б - ліпіди
- В - полісахариди або поліпептиди
- Г - тейхоеві кислоти

Контрольні питання

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.

Інформаційні ресурси:

1. Климнюк С. І. Практична мікробіологія : навчальний посібник; за заг.ред.: В. П. Широбокова, С. І. Климнюка. – Вінниця : Нова Книга, 2018. – 576 с.

2. Люта О. В. Кононов. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія: підручник (ВНЗ I–III р. а.) 2-е. вид. підручник. – К.: Медицина, 2018. – 576 с .

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5

Приготування і мікроскопія фіксованих препаратів. Забарвлення клітин за методами Грама та Ожешко

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

Питання для підготовки до заняття

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

Теоретичні відомості

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 у край 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 прилипання 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 вірно забарвленому і добре промитому 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 прокаріот, 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 ґрунтовані на комбінованій дії концентрованих розчинів барвника і температури з наступним знебарвленням цитоплазми вегетативної клітини і її контрастним дозабарвленням.

Одним із методів забарвлення для виявлення ендоспор є метод Ожешко.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з посівами досліджуваних мікроорганізмів, стерильна вода в пробірках, папір з генціановим фіолетовим, розчин Люголю, 96 % 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.

Хід роботи

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 96 % 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 протягом декількох секунд, промити водою;
- дозабарвити препарат метиленовим синім (2–3 хв.) промити водою, висушити.

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

3. Препарати замалювати, вказати повну латинську назву об'єкта, спосіб забарвлення, загальне збільшення мікроскопа. Дані внести у таблицю 11.

Таблиця 11

Результати мікроскопічного дослідження

Об'єкт	Метод забарвлення	Рисунок
	за Грамом	
	Збільшення:	

Висновок	Грамнегативні ☐	Грампозитивні ☐
	за Ожешко Збільшення:	
Висновок:	Спори розташовуються термінально ☐	Спори розташовуються у центрі клітини ☐

Завдання для самостійної роботи:

1. Користуйтесь рекомендованою літературою та конспектом лекцій, заповнити таблицю 12.

Таблиця 12

Основні відмінності клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій

Ознаки	Грампозитивні бактерії	Грамнегативні бактерії
Особливості хімічного складу		
Структурні особливості		
Приклади бактетрій		

2. Виконайте тестові завдання для самоперевірки.

1. Які властивості мікрорганізмів визначають їх відношення до забарвлення?

А - антигенні
Б - біологічні
В - біохімічні
Г - тинкторіальні

2. Ендоспори бактерій

А - форми спокою, здатні виживати в екстремальних умовах навколишнього середовища
Б - структури для репродукції бактерій
В - утворюються в результаті інвагінації бактеріальної клітинної стінки
Г - беруть участь у адгезії клітин

3. Характерний компонент ендоспор бактерій
- А - дипіколінова кислота
 - Б - D- та L-амінокислоти
 - В - мезодіамінопімелінова кислота
 - Г - білок пілін
4. Ендоспори бактерій на відміну від вегетативних бактерій
- А - активно синтезують пептидоглікан
 - Б - мають високий вміст жирних кислот
 - В - мають багато вільної води
 - Г - містять підвищену концентрацією іонів кальцію
5. Вкажіть вірну відповідь стосовно пептидоглікану
- А - до складу входять жирні кислоти
 - Б - до складу входять D- та L-амінокислоти
 - В - знаходиться тільки у грампозитивних бактерій
 - Г - до складу входять ліпополісахариди
6. Який барвник не використовують при забарвленні за Грамом?
- А - генціанвіолетовий
 - Б - метиленовий синій
 - В - фуксин Пфейфера
 - Г - розчин Люголю
7. Структура клітинної стінки грампозитивних бактерій включає
- А - багатошаровий пептидоглікан, пронизаний тейхоєвими кислотами
 - Б - багатошаровий ліпополісахарид, пронизаний тейхоєвими кислотами
 - В - моношаровий пептидоглікан, пронизаний тейхоєвими кислотами
 - Г - багатошаровий пептидоглікан з ліпополісахаридом
8. Структура клітинної стінки грамнегативних бактерій включає
- А - одношаровий пептидоглікан, периплазматичний простір, зовнішня мембрана.
 - Б - багатошаровий пептидоглікан, зовнішня мембрана, інтегрований з нею ліпополісахаридний шар
 - В - багатошаровий пептидоглікан, шар ліпопротеїдів, зовнішня мембрана, інтегрований з нею ліпополісахаридний шар
 - Г - шар фосфоліпідів, пронизаний тейхоєвими кислотами
9. Яка з названих речовин може руйнувати клітинну стінку бактерій:
- А - спирт
 - Б - інтерферон
 - В - лізоцим
 - Г - сульфаніламід

10. Сферопласти:

- А - мають тонкий шар пептидоглікану
- Б - потребують високого осмотичного тиску для виживання
- В - втратили бактеріальну хромосому
- Г - втратили цитоплазматичну мембрану

Контрольні питання

1. Клітинна стінка бактерій.
2. Муреїн, його будова.
3. Будова клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій.
4. Протопласти та сферопласти, їх отримання.
5. Диференціація і морфогенез у мікроорганізмів.
6. Екзо- і ендоспори.
7. Будова ендоспор.
8. Спороутворення.
9. Ознаки спор, їх витривалість.
10. Резистентність ендоспор.

Інформаційні ресурси:

1. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія / Т. П. Пирог. - Київ: Видавництво НУХТ, 2004. – 462 с.
2. Практикум з мікробіології: навч. посібник. – 2-е вид., переробл. та доповн. / О. В. Кононов. – К.: Медицина, 2011. – 184 с.
3. Рудавська Г. Б. Мікробіологія : підручник / Г. Б. Рудавська, Л. І. Демкевич. – 2-ге вид., переробл. та доповн. – К. : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2015. – 407 с.

Навчальне видання

МІКРОБІОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до лабораторних занять та самостійної роботи
з курсу «Мікробіологія»

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
заочної форми навчання спеціальності 091 Біологія

Електронне практичне видання

Укладач:

Ямборко Ганна Валентинівна

В авторській редакції

Затвердж. авт. 28.08.2024. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 0,9 МБ. Зам. № 2864.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Університетська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua