

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

ОДЕСА
ОНУ
2024

УДК 576.80.85
M597

Укладачі:

А. Г. Мерліч, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

Г. В. Ямборко, кандидат технічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

Н. Ю. Васильєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

І. В. Страшнова, кандидат технічних наук, с.н.с. Біотехнологічного науково-навчального центру.

Рецензенти:

С. С. Чернадчук, канд. біол. наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики;

І. Л. Рижко, канд. біол. наук, доцент кафедри фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти.

Рекомендовано вченою радою біологічного факультету

ОНУ імені І. І. Мечникова.

Протокол № 5 від 29 грудня 2023 р.

M597 **Мікробіологія** [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до лаб. занять та самост. роб. для здобув. першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти денної форми навч. спец. 091 Біологія / уклад.: А. Г. Мерліч, Г. В. Ямборко, Н. Ю. Васильєва, І. В. Страшнова. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. – 111 с. – 2,2 МБ.

Методичні рекомендації до лабораторних занять та самостійної роботи містять теоретичні відомості, детальні протоколи виконання лабораторних робіт та завдання для самостійної роботи, які є необхідними для успішного засвоєння здобувачами дисципліни «Мікробіологія». Наведено інформацію стосовно основних засад практичної мікробіології, надано методики по виділенню мікроорганізмів із об'єктів оточуючого середовища та їх підрахунку, виділенню чистої культури, характеристиці бактерій та їх ідентифікації. Окремі завдання присвячені санітарній та медичній мікробіології. Особливий акцент видання зроблено на дослідженні морських мікроорганізмів та блакитній мікробіології.

Розраховано для здобувачів першого (бакалаврського) рівня, що навчаються за спеціальністю 091 Біологія.

УДК 576.80.85

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	5
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1	
Організація мікробіологічної лабораторії. Правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами. Методи підготовки і стерилізації мікробіологічного посуду і матеріалів	9
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2	
Поживні середовища. Методики приготування та стерилізації поживних середовищ	18
ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ 3–4	
Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів. Виділення мікроорганізмів з води, ґрунту та повітря	26
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5	
Методи поверхневого культивування і визначення чисельності мікроорганізмів у воді і повітрі	34
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 6	
Виділення чистої культури мікроорганізмів	43
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 7	
Методи перевірки чистоти культури. Методи мікроскопії. Приготування фіксованих забарвлених препаратів. Забарвлення за Грамом. Морфологія бактеріальних клітин	48
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 8	
Методи вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак і ідентифікація бактерій	56
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 9	
Методи вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак і ідентифікація бактерій (продовження)	59
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 10	
Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів і чутливості до антибіотиків (1-й етап)	64
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 11	
Методи визначення антагоністичної активності мікроорганізмів і чутливості до антибіотиків (2-й етап)	68
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 12	
Метод ПЛР-аналізу для виявлення мікроорганізмів. Проведення ПЛР для діагностики бактеріального раку дводольних	71

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 13

Метод ПЛР-аналізу для виявлення мікроорганізмів (продовження). Облік результатів ПЛР: електрофорез в агарозному гелі	80
---	----

ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ 14–15

Метод глибинного культивування та побудова кривої росту періодичної культури	85
---	----

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 16

Визначення санітарно-бактеріологічних показників води. Визначення колі-індексу та колі-титру методом мембранних фільтрів (1-й етап)	98
---	----

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 17

Визначення санітарно-бактеріологічних показників води. Визначення колі-індексу та колі-титру методом мембранних фільтрів (2-й етап)	104
---	-----

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	109
---	-----

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Лабораторні заняття з дисципліни «Мікробіологія» є надзвичайно важливими для її успішного засвоєння, а також проводяться з метою формування спеціаліста-біолога в цілому. Лабораторні заняття з дисципліни

«Мікробіологія» забезпечують практичну підготовку здобувачів, надаючи їм основні вміння та навички при роботі з мікроорганізмами та їх продуктами метаболізму, які є важливими для подальшого працевлаштування у медико-діагностичних та наукових лабораторіях.

Дисципліна викладається у першому семестрі третього курсу. Для її успішного засвоєння необхідними є знання з курсів «Хімія загальна та неорганічна», «Хімія органічна», «Хімія біоорганічна», «Біохімія». Постреквізитами курсу є «Генетика і молекулярна біологія», «Вірусологія», «Лабораторний практикум з біології», «Біотехнологія», «Імунологія» та ін.

Метою курсу «Мікробіологія» є набуття здобувачами знань з сучасної мікробіології та отримання практичних навиків у об'ємі, необхідному для розуміння основних закономірностей життя і розвитку мікроорганізмів, їх ролі у природі, в основі біотехнологій, сільському господарстві та медицині. Завдання курсу:

1. Ознайомити здобувачів зі світом прокаріотичних та еукаріотичних мікроорганізмів, їх цитологічними, фізіологічними і біохімічними характеристиками, викласти сучасні дані про будову та функції клітин прокаріотичних та еукаріотичних мікроорганізмів;
2. розглянути питання сучасної систематики прокаріотичних мікроорганізмів та їх положення у системі живої природи, принципів класифікації та ідентифікації;
3. висвітлити особливості енергетичного та конструктивного обміну у мікроорганізмів, питання регуляції метаболізму, розглянути загальні властивості та різноманітність шляхів метаболізму мікроорганізмів та їх регуляції;
4. надати здобувачам необхідну інформацію про організацію геному прокаріотів, обмін генетичною інформацією, генотипову мінливість, селекцію мутантів, принципи генно-інженерних досліджень;
5. висвітлити біогеохімічну діяльність мікроорганізмів, поширення мікроорганізмів у повітрі, воді, ґрунті, роль мікроорганізмів у процесах самоочищення природного середовища;
6. розглянути проблему забруднення водою патогенними мікроорганізмами та мікробіологічні показники якості природного середовища;

7. ознайомити студентів з використанням мікроорганізмів у біотехнології та промисловості для отримання продуктів їх синтезу та мікробних препаратів;
8. забезпечити набуття студентами необхідного рівня знань, вмінь та навичок з мікробіології, що передбачені освітньо-професійною програмою.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен **знати**:

- Положення мікроорганізмів у системі живої природи, поділ прокариот на домени Бактерії (*Bacteria*) та Археї (*Archaea*), їх відмінності, характеристику представників окремих груп прокариот та їх латинські назви.
- Принципи класифікації прокариот та їх ідентифікації, біологічну номенклатуру, сучасні напрямки систематики прокариот.
- Особливості хімічного складу та будови клітин прокариот і еукаріот, приклади диференціації і морфогенезу у мікроорганізмів.
- Потреби мікроорганізмів у поживних середовищах, закономірності росту мікроорганізмів у періодичній та неперервній культурі.
- Закономірності залежності росту від фізико-хімічних факторів.
- Типи живлення прокариотів за джерелами енергії, вуглецю, донорами водню (електронів), схему обміну речовин хемоорганогетеротрофних мікроорганізмів, процеси синтезу АТФ.
- Шляхи катаболізму гексоз. Типи бродіння. Механізми анаеробного дихання.
- Різноманітність органічних субстратів, що окиснюються за участі кисню. Приклади неповного окиснення. Способи окиснення неорганічних сполук для отримання енергії.
- Шляхи обміну речовин у хемотрофних та фотолітотрофних бактерій.
- Шляхи асиміляції вуглекислоти автотрофами та гетеротрофами, механізм асиміляції молекулярного азоту.
- Біохімічні основи та рівні регуляції метаболізму. Генетичні елементи мікроорганізмів та механізми генотипової мінливості. Ризики при генетичній модифікації мікроорганізмів та основні принципи біобезпеки.
- Гіпотези походження життя. Шляхи еволюції мікроорганізмів та виникнення еукаріот. Хронометри еволюції.
- Участь мікроорганізмів у циклах вуглецю, азоту, сірки, фосфору у природі. Поширення мікроорганізмів у повітрі, ґрунті та воді.
- Роль мікроорганізмів у процесах евтрофікації та самоочищення. Мікробіологічні показники якості природного середовища та їх визначення. Роль мікроорганізмів в очищенні стічних вод.

- Взаємовідносини мікроорганізмів та макроорганізмів. Антагонізм. Антибіотики. Механізми дії антибіотиків та механізми резистентності мікроорганізмів до них.
- Основні представники нормальної мікробіоти людини.
- Патогенні мікроорганізми. Фактори патогенності: адгезія та колонізація, інвазивність, токсигенність, стійкість до дії захисних сил макроорганізму. Механізми резистентності до захисних сил макроорганізму.
- Застосування мікроорганізмів у біотехнології для отримання продуктів їх синтезу та мікробних препаратів, охороні та оздоровленні навколишнього середовища, медицині, фармації, харчовій промисловості та сільському господарстві.

вміти:

- Відбирати проби з навколишнього середовища та здійснювати їх підготовку для мікробіологічного дослідження.
- Використовуючи систематизовані знання про принципи стерилізації здійснювати стерилізацію лабораторного посуду та поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.
- Застосовуючи знання про рецептуру, виготовляти поживне середовище для заданої групи мікроорганізмів.
- Здійснювати виготовлення живих та фіксованих препаратів та їх мікроскопію в світловому мікроскопі. Виявляти капсули, включення, ендоспори, джгутики, рухливість та відношення бактерій до забарвлення за Грамом.
- Використовуючи методи виділення мікроорганізмів, визначити їхню кількість у природному субстраті, провести бактеріологічні дослідження мікробної різноманітності, біологічних особливостей мікроорганізмів.
- Із наданого субстрату отримувати чисту культуру мікроорганізмів, використовуючи загальноприйняті методи та визначати її чистоту, здійснити молекулярно-біологічну ідентифікацію бактерій.
- Для наданої культури мікроорганізму будувати криву росту при періодичному культивуванні, визначати тривалість лаг-фази, питому швидкість росту популяції та період подвоювання.
- Визначати санітарно-мікробіологічну якість продуктів харчування та об'єктів навколишнього середовища).

- Використовуючи методику оцінювання чутливості бактерій до антибіотиків, визначати чутливість до антибіотиків заданого штаму бактерій та складати антибіотикограму.
- Використовуючи знання про принцип полімеразної ланцюгової реакції, виділити бактеріальну ДНК і провести з нею ПЛР з метою діагностики мікроорганізму.

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. 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 живильні середовища.
3. Методи стерилізації:
 - автоклавування (з описанням будови автоклаву);
 - пастеризація;
 - стерилізація сухим жаром;
 - стерилізація газовими сумішами;
 - стерилізація опроміненням;
 - стерилізація фільтруванням.
4. Життєвий цикл бактерій.
5. Форми спокою у бактерій.
6. Будова бактеріальних ендоспор.

Теоретичні відомості

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

Кімнати для мікробіологічних досліджень (учбові лабораторії) – світлі, просторі, стіни покриті кахельною плиткою, підлога – лінолеумом або плиткою з метою спрощення їх миття та дезінфекції (рис. 1.1). У кімнатах для мікробіологічних досліджень проводиться основна робота з мікроорганізмами

та їх продуктами метаболізму. Лабораторні столи мають бути добре освітленими і обладнаними газовою горілкою або спиртівкою для забезпечення асептичної роботи з мікроорганізмами. На лабораторних столах мають обов'язково стояти ємкості з дезрозчином для відпрацьованого матеріалу. Крім того, на робочих столах розміщуються штативи з бактеріологічними петлями, пінцетами, пробірками та іншим інструментом, автоматичні піпетки та наконечники для них, ексикатори для приготування забарвлених мікроскопічних препаратів, мікроскопи для їх обстеження та ін. У робочих кімнатах також знаходяться термостати, які являють собою шафи, де підтримується оптимальна для певних мікроорганізмів температура вирощування, а також холодильники з режимом +4 °С для зберігання реактивів та культур бактерій.



Рис. 1.1. Приклад навчальної лабораторії для мікробіологічних досліджень з необхідним для роботи устаткуванням (авторське фото)

Примітка: 1 – лабораторні робочі столи, 2 – стіл для лабораторних приладів,
3 – холодильники для зберігання культур та реактивів,
4 – термостати для вирощування культур мікроорганізмів

В навчальних лабораторіях також можуть розміщуватися класичні мікробіологічні бокси, або ламінарні шафи, в яких проводиться робота, що потребує високого рівня асептики, наприклад, розлив поживного середовища.

Підсобні приміщення – автоклавна (стерилізаційна) (рис. 1.2), мийна, кімната для готування поживних середовищ, матеріальна (для зберігання реактивів, посуду, апаратури та інвентарю), віварій для піддослідних тварин. У підсобних приміщеннях здійснюється підготовка до роботи з мікроорганізмами. Так, у стерилізаційній кімнаті проводять стерилізацію посуду, реактивів та матеріалів, необхідних для правильної роботи з мікроорганізмами. Однак, у ній також виконують й вбивку відпрацьованого матеріалу. У такій кімнаті розміщуються прилади для здійснення стерилізації: автоклави та сухожарові шафи.

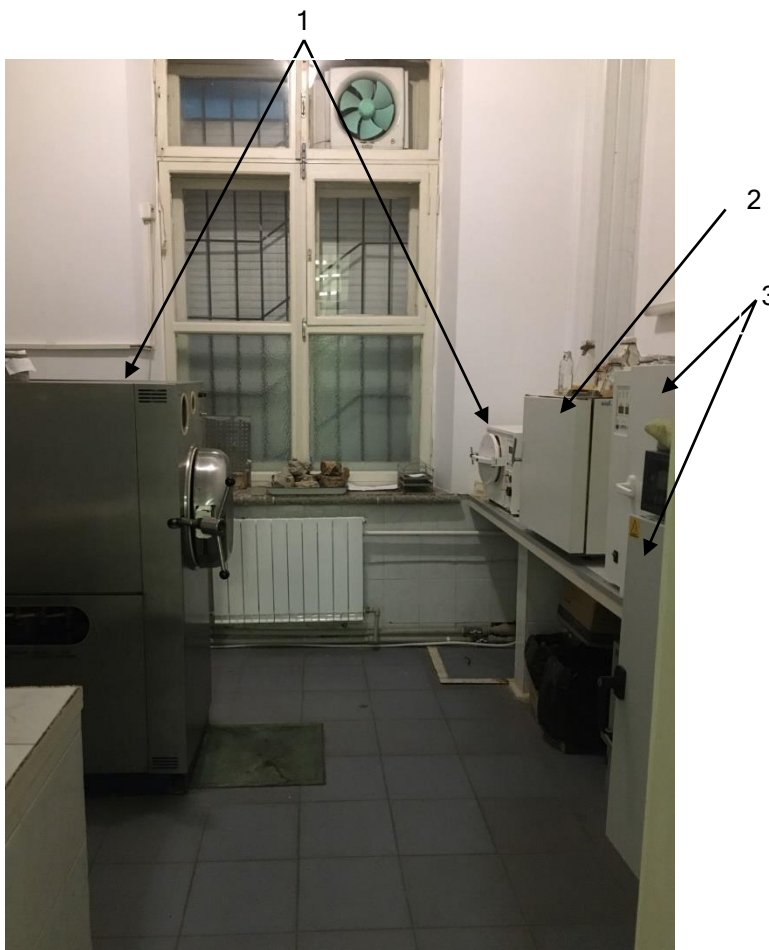


Рис. 1.2. Приклад підсобного приміщення – стерилізаційної кімнати з відповідним обладнанням (авторське фото)

Примітка: 1 – автоклави, 2 – сушильна шафа, 3 – сухожарові шафи

Перед роботою важливо ознайомитися з правилами роботи та техніки безпеки при роботі у мікробіологічній лабораторії. Вони наступні:

- забороняється входити в верхньому одязі та класти на стіл сумки та інші особисті речі;
- дозволяється працювати тільки при наявності спецодягу (халат, рукавички);

- робоче місце мікробіолога повинно утримуватись в повному порядку;
- в ході роботи необхідно притримуватись стерильності (бактеріологічні петлі знезаражувати в полум'ї спиртівки, використані піпетки занурювати в ємності з дезрозчином та ін.);
- з метою забезпечення асептичної роботи під час здійснення посівів вікна та двері лабораторії мають бути закритими;
- в лабораторії заборонено приймати їжу;
- не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови;
- при роботі зі спиртівками дотримуватися правил протипожежної безпеки. Над спиртівками не нахилятися. Довге волосся має бути зібране та поміщене назад під комірець халату;
- у випадку попадання досліджуваного матеріалу на руки, стіл, халат необхідно провести дезинфекцію під наглядом викладача;
- після закінчення дослідження робоче місце ретельно прибирається, використаний матеріал та ін. предмети здаються лаборанту, миються з милом руки.

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

а) стерилізація під дією високих температур:

- прокалювання в полум'ї горілки – фламбування. Таким методом в основному стерилізують металеві інструменти: бактеріологічні петлі, кінчики пінцетів, скальпелі. Фламбуванням також стерилізують скляні шпатель Дригальського;
- стерилізацію кип'ятінням можна здійснити у стерилізаторі. Раніше так стерилізували шприці, металеві інструменти (ножиці, скальпелі, пінцети). У сучасній мікробіологічній лабораторії даний метод стерилізації не використовується;
- 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 впродовж 10 хвилин). Пастеризують продукти харчування. У мікробіологічній лабораторії даний вид стерилізації використовується рідко. Дані режими прогрівання можуть бути використаними при отриманні накопичувальної культури бацил;

- стерилізація сухим жаром здійснюється в сушильних шафах (рис. 1.3). Стерилізуючим агентом при даному методі виступає сухе гаряче повітря, яке циркулює всередині приладу між об'єктами стерилізації. Таким методом стерилізують скляний посуд, металеві інструменти при температурі 160–165 °С впродовж 2 годин або 180 °С протягом 1 години.



Рис. 1.3. Сухожарова шафа – прилад для стерилізації скляних та металевих об'єктів під дією гарячого повітря, що циркулює всередині камери (авторські фото)

У сухожарову шафу ні в якому разі не поміщають вироби із пластику або розчини;

- стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування). Автоклавування є найнадійнішим та універсальним способом стерилізації поживних середовищ і матеріалів, таких як пластикові наконечники, пластикові мікропробірки, гумові кришки та ін. Повна стерилізація даних об'єктів відбувається при 120 °С і тиску 1 атм впродовж 20 хвилин. Тиск дозволяє підвищити температуру кипіння води та, відповідно, ефективність стерилізації. Підвищення температури кипіння води над стандартним значенням 100 °С забезпечується тиском та дозволяє вбити не лише вегетативні клітини мікроорганізмів, але й їх термостабільні спори.

Не всі розчини можна піддавати автоклавуванню. У випадку присутності в їх складі таких термолабільних речовин як амінокислоти, вітаміни, антибіотики вони, як правило, фільтруються. Коли до складу поживного середовища входять цукри, то такі розчини в більшості випадків автоклавують при 0,5 атм (115 °С) впродовж 20 хв.

Парова стерилізація здійснюється у приладі, що носить назву автоклав (рис. 1.4). Оскільки в процесі стерилізації в ньому створюється високий тиск, то працювати з автоклавом дозволено лише інженерам або спеціально навченому персоналу. Робота з ним може бути небезпечною.



Рис. 1.4. Автоклав – прилад для здійснення парової стерилізації під тиском
(авторські фото)

Примітка: 1 – манометри для вимірювання тиску, 2 – стерилізаційна камера з об'єктами стерилізації, 3 – металевий кожух, 4 – кришка, що загвинчується герметично

- стерилізація текучою парою (дробна стерилізація) здійснюються у апаратах Коха або в автоклаві з відкритим вентиляем; температура досягає 100 °С і нагрівання впродовж 30–45 хв. забезпечує загибель вегетативних клітин бактерій, але загибелі спор не забезпечує. Повна стерилізація здійснюється протягом 3 днів. У сучасній мікробіологічній лабораторії використовується рідко і в основному замінюється на фільтрацію;
- 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.

Матеріал та обладнання

1. колби конічні та круглі плоскодонні;
2. скляні пробірки;
3. чашки Петрі;
4. наконечники та ємкості для них;

5. пластикові мікропробірки;
6. папір, нитки, ножиці.

Завдання 1. Знайомство з мікробіологічною лабораторією

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, рециркулятори повітря).
3. Ознайомитися з переліком матеріалів, необхідних для виконання подальших досліджень (таблиця 1.1).

Завдання 2. Підбір методів стерилізації

Хід роботи:

1. Підібрати вид та режим стерилізації для кожного об'єкта, наведеного в таблиці 1.1, виходячи із їх матеріалу та інформації про методи стерилізації з теоретичних відомостей.
2. Заповнити таблицю 1.1.

Таблиця 1.1

Матеріали, необхідні для проведення мікробіологічних досліджень та їх способи стерилізації

Об'єкти, що стерилізується	Вид стерилізації	Режим стерилізації
Наконечники для дозаторів об'ємом 10–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл		
Чашки Петрі		
Пластикові мікропробірки		

Завдання 3. Підготовка об'єктів до стерилізації

Хід роботи:

1. Наконечники та пластикові мікропробірки помістити в ємкості для них (пластикові бокси або скляні банки), ємкості закрити та завернути в папір.
2. Чашки Петрі розмістити по три ДНОМ ДОГОРИ та завернути в папір конвертом.
3. Всі об'єкти підписати маркером. Обов'язково зазначити вид та режим стерилізації, дату.

4. Віднести об'єкти в стерилізаційну кімнату. Наконечники розмістити на автоклаві для подальшої стерилізації, яку проводить інженер.
5. Чашки Петрі розмістити в сухожаровій шафі. Між стопками з чашками та між ними та стінками шафи має залишатися простір для вільної циркуляції гарячого повітря, який є чинником стерилізації.

Завдання для самостійної роботи

1. Розпочати складати словник термінів:
Мікробіологічна лабораторія –
Асептика –
Стерилізація –
Сухий жар –
Автоклавування –
Пастеризація –

Питання для перевірки знань

1. Що таке мікробіологічна лабораторія? З чого вона складається?
2. Наведіть приклади приладів, інструментів та обладнання, які знаходяться у мікробіологічній лабораторії та використовуються у роботі?
3. Перерахуйте правила роботи та техніки безпеки, яких необхідно дотримуватися у мікробіологічній лабораторії.
4. Що таке стерилізація? Які методи стерилізації ви знаєте?
5. Чим зумовлена потреба у складних методах стерилізації?
6. В якому приладі проводиться стерилізація сухим жаром та який її принцип?
7. Який принцип автоклавування? З чого складаються автоклави?
8. Що таке пастеризація та тиндалізація?
9. Опишіть підготовку до стерилізації чашок Петрі, наконечників, пластикових мікропробірок.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. До підсобних приміщень мікробіологічної лабораторії належить:
А. робоча кімната;
Б. стерилізаційна кімната;
В. кімната для мікробіологічних досліджень;
Г. усі варіанти вірні.
2. Посіви мікроорганізмів здійснюються в:
А. стерилізаційній кімнаті;
Б. мийній кімнаті;

- В. віварію;
Г. робочій кімнаті.
3. Скляний посуд найчастіше стерилізують:
А. автоклавуванням;
Б. ультрафіолетом;
В. сухим жаром;
Г. кип'ятінням.
4. Стерилізація прокалювання у полум'ї спиртівки носить назву:
А. пастеризація;
Б. фламбування;
В. автоклавування;
Г. тиндалізація.
5. Стерилізація гарячим паром під тиском називається:
А. автоклавування;
Б. фламбування;
В. пастеризація;
Г. тиндалізація.
6. Яке із тверджень є вірним?:
А. в автоклаві найчастіше стерилізують скляний посуд та металеві інструменти;
Б. в сухожаровій шафі стерилізують об'єкти із пластика та резини;
В. фламбуванням стерилізують наконечники для дозаторів, поверхні та розчини;
Г. для стерилізації робочих поверхонь використовують дезінфектанти та ультрафіолетове світло.
7. Яке із тверджень є хибним:
А. у кімнатах для мікробіологічних досліджень проводять роботу з культурами мікроорганізмів;
Б. в автоклавній кімнаті здійснюється стерилізація поживних середовищ;
В. у мийній кімнаті миють, сушать та стерилізують лабораторний посуд;
Г. у матеріальній кімнаті зберігаються реактиви, необхідні для роботи з мікроорганізмами.

Ситуаційні задачі

1. Уявіть собі, що при роботі з рідкою культурою мікроорганізмів невідомого таксономічного положення пробірка випадково розбилася. Досліджуваний матеріал потрапив на шкіру рук та на стіл. Якими будуть ваші дії?

Список літератури

1. Люта В. А., Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. Київ: Здоров'я, 2001. С. 280.
URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/6399_01.pdf
2. Філімонова Н. І., Сілаєва Л. Ф., Дика О. М. та ін., Мікробіологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. С. 676. URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>

Електронні та інформаційні ресурси

1. https://www.tru.ca/shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory)

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

Поживні середовища.

Методики приготування та стерилізації поживних середовищ

Мета заняття – ознайомитися з типами поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів, навчитися готувати та стерилізувати поживні середовища.

Питання для підготовки до заняття

1. Потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту).
2. Типи поживних середовищ за їх складом та призначенню.
3. Загальні вимоги до поживних середовищ.
4. Принципи складання поживних середовищ.
5. Правила стерилізації поживних середовищ.
6. Культуральні властивості мікроорганізмів (ріст на щільних та у рідких середовищах).
7. Умови, що необхідні для вирощування мікроорганізмів (температура, аерація, кислотність середовища).

Теоретичні відомості

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, В, Cu, J – у слідових кількостях, тому їх називають мікроелементами. Окрім того, деяким мікроорганізмам необхідні певні готові органічні сполуки, які називають факторами росту.

Виходячи із харчових потреб мікроорганізмів, для їх вирощування у лабораторних умовах створюють поживні (культуральні) середовища, які являють собою набір 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 всі необхідні для мікроорганізму джерела живлення.
2. Окремі інгредієнти у поживних 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. Існують різні за складом і технікою приготування середовища. Використовуються різні природні і штучні субстрати, починаючи від простої

водопровідної води і сольових розчинів до складних екстрактів із зародків тварин і рослин, від відходів (гній) до повноцінних білків людини і тварин.

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 і т. д.

Прикладами натуральних середовищ є м'ясо-пептонний бульон (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. У залежності від потреб мікроорганізмів синтетичні середовища можуть бути дуже складного складу або досить простими.

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 та ін.) 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 підбрані таким чином, щоб 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, желатином, на яких виявляють протеолітичні і гемолітичні властивості мікроорганізмів.

До складу диференційно-діагностичних середовищ при назначених для виявлення цукролітичних і окисно-відновних ферментів вводять індикатори. Змінюючи забарвлення при різних значеннях рН, індикатор вказує на наявність чи відсутність розкладання, окислення чи відновлення введеного у середовище субстрату.

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 живильними 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 у рідкі вводять 1–2 % агар-агару.

Середовище, в яке внесли агар-агар, нагрівають на водяній бані 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. Сухі поживні середовища являють собою гігроскопічні порошки, що зберігаються у спеціальних флаконах. У лабораторії із порошків готують середовища за прописом, вказаним на етикетці. Найчастіше використовують сухі середовища Ендо, сухий живильний агар і т. д.

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

Зазвичай середовища стерилізують в автоклаві. Тривалість стерилізації залежить від того, наскільки добре і швидко прогрівається середовище у ємності. Швидкість нагрівання залежить від об'єму ємності, в'язкості середовища і від того, чи вільно проходить пар до стінок ємності і чи повністю вилучено повітря із автоклаву.

Агаризовані середовища краще стерилізувати при тиску 98 кПа (1 атм) – 20 хвилин. Желатинові середовища стерилізують текучим паром три дні підряд, кожного дня по 30–40 хвилин, або в автоклаві при 49 кПа (0,5 атм) – 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 зазвичай стерилізують один раз при 147–196 кПа (1,5–2 атм) 2 години або два дні підряд по годині при такому ж тиску, а інколи при 196 кПа (2 атм) 2 години.

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.

Матеріал та обладнання

1. Електронні ваги;
2. компоненти для приготування поживних середовищ та фізіологічного розчину;
3. шпателі;

4. дистильована вода;
5. мірні циліндри та градуйовані стакани;
6. колби конічні та круглі плоскодонні;
7. папір, алюмінієва фольга, нитки, ножиці.

Завдання 1. Ознайомлення зі складом розчинів, вживаних у мікробіологічній лабораторії

Хід роботи:

1. Ознайомитися з розчинами, необхідними для проведення подальших робіт (таблиця 2.1).
2. Заповнити таблицю 2.1, відмітивши склад поживних середовищ, який наводиться на банках з їх порошками.

Таблиця 2.1

Розчини, необхідні для проведення роботи з мікроорганізмами та способи їх стерилізації

Розчини, що стерилізується	Склад	Вид стерилізації	Режим стерилізації
МПА			
MRS бульйон			
MRS агар			
Фізіологічний розчин	0,9 % NaCl		

Завдання 2. Підбір методів стерилізації

Хід роботи:

1. Виходячи з даних про хімічний склад указаних розчинів підібрати вид та режим стерилізації для кожного з них. Заповнити таблицю 2.1.
2. У випадку поживних середовищ перевірити правильність вибраних методів, звіривши з зазначеним на банці.

Завдання 3. Приготування поживних середовищ та їх підготовка до стерилізації

Приготувати 200 мл МПА, MRS бульйону та MRS-агару згідно з інструкцією виробників (зазначено на банці).

Хід роботи:

1. Здійснити необхідні розрахунки:

2. Користуючись електронними вагами зважити необхідну кількість порошку середовища*.

***Згадати правила користування електронними вагами.**

3. Розчинити порошок в 200 мл дистильованої води так, щоб на стінках колби не залишилося його решток (у випадку поганого розчинення можна скористуватися магнітною мішалкою).
4. Подібним чином приготувати 100 мл фізіологічного розчину (0,9 % NaCl). Місце для розрахунків:

5. Закрити колби алюмінієвою фольгою та папером. Зазначити на них режим стерилізації та віднести в стерилізаційну кімнату.

Завдання для самостійної роботи

1. Доповнити словник термінів:

Поживне середовище –

МПА – MRS –

Агар-агар –

Питання для перевірки знань

1. Що таке поживне середовище?
2. Які вимоги висуваються до поживних середовищ?
3. Для яких цілей використовують поживні середовища у мікробіологічній лабораторії?
4. Які бувають класифікації поживних середовищ?

5. Якими бувають поживні середовища за походженням та складом? Назвати їх приклади.
6. Якими бувають поживні середовища за призначенням? За консистенцією?
7. Які методи та режими використовуються для стерилізації поживних середовищ? Від чого залежить їх вибір?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Середовище MRS, яке використовується для культивування лактобактерій, відноситься до:
 - А. синтетичних;
 - Б. натуральних;
 - В. загального призначення;
 - Г. напівсинтетичних.
2. За походженням та складом середовище МПА належить до:
 - А. натуральних;
 - Б. синтетичних;
 - В. загального призначення;
 - Г. спеціальних.
3. Для отримання накопичувальної культури бактерій роду *Azotobacter* використовується середовище:
 - А. МПА;
 - Б. MRS;
 - В. Ешбі;
 - Г. Ендо.
4. Для диференціальної діагностики кишкової палички використовується середовище:
 - А. Чапека;
 - Б. Ендо;
 - В. Ешбі;
 - Г. MRS.
5. Середовища, склад яких підібраний таким чином, щоб забезпечити найсприятливіші умови для росту певних мікроорганізмів називаються:
 - А. селективними;
 - Б. диференціально-діагностичними;
 - В. загального призначення;
 - Г. синтетичними.
6. Найкращим ущільнювачем для використання у мікробіологічній лабораторії є:
 - А. желатин;
 - Б. силікагель;

- В. агар-агар;
 - Г. кремнезем.
7. Середовище МПА стерилізують:
- А. кип'ятінням при 1 атм впродовж 20 хв;
 - Б. пастеризацією при 80 °С протягом 10 хв;
 - В. автоклавуванням при 0,5 атм впродовж 20 хв;
 - Г. паровою стерилізацією при 1 атм впродовж 20 хв.

Список літератури

1. Климнюк С. І., Ситник І. О., Широбоков В. П. та ін. Практична мікробіологія: навчальний посібник. Вінниця: Нова Книга, 2018. С. 576.
2. Ananthanarayan R. and Paniker C.K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.
URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextbookOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Textbook%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf>

Електронні та інформаційні ресурси

1. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/06%3A_Culturing_Microorganisms/6.03%3A_Culturing_Bacteria/6.3A%3A_Culture_Media](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/06%3A_Culturing_Microorganisms/6.03%3A_Culturing_Bacteria/6.3A%3A_Culture_Media)

ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ 3–4

Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів. Виділення мікроорганізмів з води, ґрунту та повітря

Мета заняття – ознайомитися з існуючими техніками посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів та навчитися виділяти мікроорганізми з різних об'єктів оточуючого середовища.

Питання для підготовки до заняття

1. Мікробіологічний посів. Інструменти для посіву.
2. Техніки посіву.
3. Методи виділення мікроорганізмів з об'єктів оточуючого середовища.
4. Накопичувальна культура мікроорганізмів. Умови для її отримання.
5. Практичне значення виділення мікроорганізмів.

Теоретичні відомості

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. При взятті петлею рідини вона повинна зтягнути петлю тонкою плівкою. Піпеткою користуються у тому випадку, коли матеріал засівають у великій кількості або великому об'ємі. Якщо досліджуваний матеріал розподіляється у рідині нерівномірно у вигляді плівки або осаду, то для пересіву використовують частину плівки або осаду.

За необхідності використовують *пересіви культури мікроорганізмів із пробірки*, де вона є на поживному середовищі, у *пробірку* зі стерильним середовищем. 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 по центру. При посіві петлю чи голку виймають із пробірки, обпалюють горлечко пробірки і пробку у полум'ї пальника і закривають пробірку.

При посіві у рідке живильне 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.).

Пересів із рідкого середовища у рідке можна проводити стерильною градуйованою або пастерівською піпеткою.

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 газоном 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 зі середовищем чашку злегка похитують. Можна спочатку змішати у стерильній пробірці щільне оживне 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 бактеріальною суспензією, яка приготовлена у фізіологічному розчині або у водопровідній воді.

Якщо мікробних клітин мало у досліджуваному матеріалі, то їх концентрують на тонкопористих мембранних *фільтрах*, що виготовлюються із целюлози, ацетата чи інших матеріалів. Для цього рідину з мікробними клітинами у стерильних умовах фільтрують через такий фільтр, а потім фільтр із осадженими на ньому клітинами накладають на поживне середовище, розлите у чашки Петрі. Мікроорганізми на таких фільтрах використовують поживне середовище, що дифундує через пори фільтра, і ростуть у вигляді окремих колоній. Можна проводити *посів шляхом відбитку фільтра на поверхні середовища*.

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

Для вирощування мікроаерофільних мікроорганізмів, таких як лактобактерії, використовуються ексикатори, в яких створюються мікроанаеробні умови (рис. 3.1).



А

Б

Рис. 3.1. Відкритий ексикатор з кришкою (А) та закритий (Б) (авторські фото)
 Примітка: У закритому герметично ексикаторі випалюється кисень за рахунок горіння свічки, що призводить до створення мікроанаеробних умов, сприятливих для росту мікроаерофілів.

Ексикатор являє собою посуд із товстого скла, який герметично закривається кришкою. Для її щільного притирання краї посуду та самою кришки змочуються невеликою кількістю вазелінової олії. Перед закриттям ексикатору в ньому запалюється свічка, горіння якої призводить до зниження концентрації кисню в ексикаторі та створення мікроанаеробних умов, сприятливих для росту мікроаерофільних мікроорганізмів.

Мікроанаеробні умови можуть бути створеними також за допомогою спеціальних анаеробних систем, які поміщаються в ексикатор. Прикладом їх може слугувати GasPak EZ Anaerobe Container System with Indicator (Becton, Dickinson and Company, США).

Матеріал та обладнання

1. Проби морської води, ґрунту або гідробіонтів (водорості, мідії), відібрані в асептичних умовах;
2. стерильний фізіологічний розчин;
3. спиртівки та 96 % етиловий спирт для них;
4. стерильні пластикові мікропробірки та штативи для них;
5. дозатори та стерильні наконечники для них;
6. термостат для епендорфів;
7. вортекс;
8. чашки Петрі з МПА та агаром MRS;
9. скляні шпателі Дригальського;
10. стаканчики для спирту;

11. ексикатор з невеликою свічкою;
12. вазелінова олія;
13. марля.

Завдання 1. Отримання накопичувальної культури мікроорганізмів з проб морського походження

На даному занятті необхідно отримати накопичувальні культури лактобактерій, бактерій роду *Bacillus* та актиноміцетів для подальшого виділення чистих культур та роботи з ними.

Хід роботи:

1. Забрати зі стерилізаційної кімнати стерильні матеріали, які є необхідними для проведення роботи.
2. Розплавити на водяній бані стерильне середовище МПА та MRS і розлити в стерильні чашки Петрі по 15–20 мл в кожную. Чашки залишити на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне, та підписати.
3. Відібрані проби води відібрати по 1 мл в епендорфи в асептичних умовах у двох повторах. У випадку використання у роботі водоростей зробити з них змив. При роботі з мідіями необхідно їх ретельно помити, відкрити в асептичних умовах та відібрати ліквор.
4. Пробірки одного повтору помістити в термостат для епендорфів та проінкубувати їх при 80 °С впродовж 10 хв (це робиться для того, щоб життєздатними залишились лише термостійкі спори бацил та актиноміцетів).
5. Приготувати серійні десятикратні розведення прогрітих та непрогрітих проб відповідно до рисунку 3.2. Для цього:
 - 5а) в кожную пластикову мікропробірку налити по 900 мкл стерильного фізіологічного розчину та підписати їх (у двох повторах);
 - 5б) внести в першу мікропробірку 100 мкл проби та добре перемішати на вортексі (отримано розведення 10^{-1});
 - 5в) замінити наконечник та перенести 100 мкл отриманої суспензії з попередньої пробірки в наступну та добре провортексувати отриману суміш (отримано розведення 10^{-2});
 - 5г) продовжити таким чином виконання розведення до 10^{-5} .

УВАГА! Для якісного виконання розведень важливо кожного разу замінити наконечник та перемішувати суспензії на вортексі!

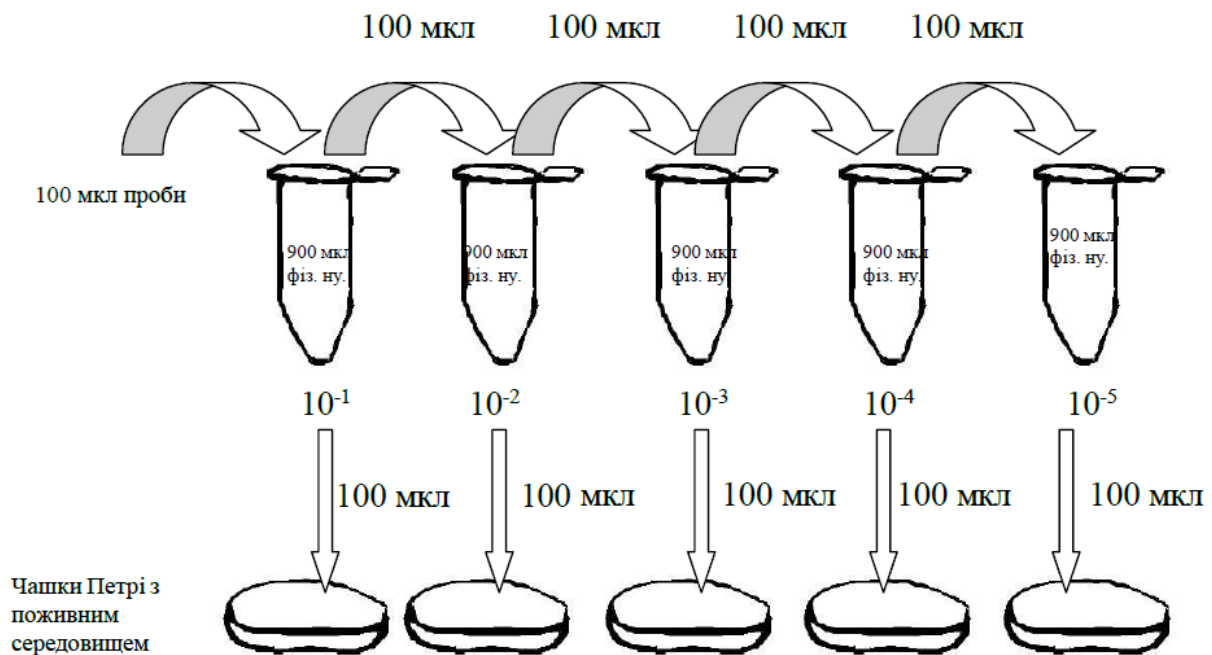


Рис. 3.2. Схема виконання серійних десятикратних розведень

6. На поверхню поживного середовищ МПА дозатором зі стерильним наконечником нанести точний об'єм (100 мкл) відповідного розведення прогрітих проб з метою виділення бацил та актиноміцетів.
7. Повторити крок 5, але з непрогрітими пробами для визначення загального мікробного числа (ЗМЧ).
8. Для виділення лактобактерій висіяти 100 мкл нерозведених, непрогрітих проб на середовище MRS.
9. Профламбувати шпатель Дригальського, охолодити його та розподілити ним нанесений об'єм суспензії по поверхні середовища.
10. Помістити чашки в термостат для інкубації. Чашки з MRS (для виділення лактобактерій) помістити в ексикатор зі свічкою, свічку підпалити, а ексикатор закрити герметично, змазавши перед цим кришку вазеліновою олією. Після затухання свічки помістити ексикатор в термостат з температурою 37 °С.
11. Посіви, виконані на МПА (для виділення бацил, актиноміцетів та визначення ЗМЧ), помістити в термостат зі звичайними аеробними умовами, в якому підтримується температура 28 °С.

Завдання 2. Виділення мікроорганізмів з повітря з метою визначення його санітарного стану

Хід роботи:

1. Для визначення мікробної забрудненості повітря в різних приміщеннях

біологічного факультету седиментаційним методом кожній групі взяти по три чашки Петрі з МПА та підписати кожну із них. Відмітити групу, дату та час експозиції – 5, 10, 15 хв.

2. Чашки ставити в місці відбору проб і відкрити на 5, 10 і 15 хв.
3. Закриті чашки Петрі з посівами дном догори помістити в термостат з температурою 37 °С.

Завдання для самостійної роботи

1. Після двох днів інкубації вийняти чашки Петрі з посівами та перевірити їх на наявність росту мікроорганізмів. У випадку появи їх колоній помістити чашки в холодильник з температурою + 4 °С. Якщо росту не помітно або він ослабкий – повернути чашки Петрі в термостати та витримати там ще впродовж декількох днів.
2. Доповнити словник термінів:
Посів –
Бактеріологічна петля –
Культура мікроорганізмів –
Виділення бактерій –

Питання для перевірки знань

1. Що таке посів? З якою метою здійснюються посіви мікроорганізмів?
2. Які ви знаєте способи посівів?
3. Які ви знаєте інструменти для здійснення посівів мікроорганізмів?
4. Від чого залежить вибір способу посіву?
5. Як проводиться посів рідкої та щільної біомаси мікроорганізмів?
6. Яким чином біомаса бактерій сіється на поверхню щільного поживного середовища?
7. Як здійснюється посів у стовпчик щільного поживного середовища?
8. Як проводиться посів мікроорганізмів у пробірку з бульйоном?
9. Які умови необхідно створити мікроорганізмам для росту на поживних середовищах та від чого залежить їх вибір?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Для отримання накопичувальної культури бацил:
А. використовується висів на середовище MRS;
Б. використовується безпосередній висів дослідної проби на МПА;
В. використовується висів пропастеризованої проби на МПА;
Г. використовується висів пропастеризованої проби на MRS.

2. Для посіву щільної біомаси бактерій використовують наступний інструмент:
 - А. бактеріологічна петля;
 - Б. мікологічна голка;
 - В. піпетка;
 - Г. дозатор з наконечниками.
3. Для виділення мікроорганізмів посіви як правило здійснюються:
 - А. на щільне поживне середовище дозатором та шпателем Дригальського;
 - Б. втиранням біомаси бактеріологічною петлею;
 - В. бактеріологічною петлею в стовпчик агару;
 - Г. піпеткою переноситься біомаса в пробірку з бульйоном.
4. Для отримання накопичувальної культури лактобактерій як правило:
 - А. використовується висів на середовище МПА та інкубація при мікроеаеробних умовах;
 - Б. використовується висів пропастеризованої проби на MRS та інкубація при мікроеаеробних умовах;
 - В. використовується висів пропастеризованої проби на МПА та інкубація при аеробних умовах;
 - Г. використовується безпосередній висів на середовище MRS та інкубація при мікроеаеробних умовах.
5. Яке з даних тверджень є хибним:
 - А. для приготування якісних розведень пробірки необхідно вортексувати;
 - Б. для висіву розведених суспензій бактерій на поверхню щільного поживного середовища використовується дозатор з наконечниками;
 - В. відбір проб для виділення мікроорганізмів із оточуючого середовища важливо проводити в асептичних умовах;
 - Г. при додаванні 100 мкл бактеріальної суспензії до 900 мкл фізіологічного розчину отримується розведення у 1000 разів.

Список літератури

1. Ananthanarayan R. and Paniker C.K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.
 URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextbookOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Textbook%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf>
2. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
 URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A

273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://conductscience.com/bacteria-enumeration/#:~:text=Techniques%20for%20Bacteria%20Enumeration,the%20one%20that's%20commonly%20used.>
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/05%3A_Enumeration_of_Bacteria/5.01%3A_Introduction_to_Enumeration_of_Bacteria](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/05%3A_Enumeration_of_Bacteria/5.01%3A_Introduction_to_Enumeration_of_Bacteria)

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5

Методи поверхневого культивування і визначення чисельності мікроорганізмів у воді і повітрі

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

Питання для підготовки до заняття

1. Визначення понять «культивування мікроорганізмів» «культура», «клон», «колонія», «штам».
2. Ріст мікроорганізмів у культурі.
3. Поверхневе культивування мікроорганізмів.
4. Методи кількісного облік мікроорганізмів.
7. Нефелометричний метод визначення кількості клітин і біомаси.
8. Турбідиметричний метод визначення концентрації клітин.
9. Стандарти мутності.
10. Методи визначення біомаси.

Теоретичні відомості

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 тверді

(чашковий метод Коха) і в рідкі (метод граничних розведень) поживні середовища.

Методом висіву на тверді і рідкі поживні середовища проводиться облік тільки життєздатних клітин мікроорганізмів. 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 у висіві певного об'єму (1 мл) 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 ідмічають 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, пофарбовані препарати добре зберігаються, тому підрахунок можна здійснювати в зручний для дослідника час.

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

Матеріал та обладнання

1. посіви на МПА та MRS з попереднього заняття;
2. лупи;
3. таблиця з морфологічними ознаками колоній;
4. спиртівки та 96 % етанол для них;
5. бактеріологічні петлі;
6. лінійки.

Завдання 1. Облік результатів виділення мікроорганізмів з проб морського походження

Здійснити облік колоній мікроорганізмів з морських джерел в чашках Петрі з МПА та MRS. Визначити кількість мікробних клітин в 1 мл досліджуваного матеріалу чашковим методом Коха, результати внести в таблицю 5.1.

Хід роботи:

1. Провести облік кількості колоній, що виростають при висіві з певного розведення в чашках Петрі.

Колонії, як правило, підраховують за допомогою лупи, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності відзначають прораховану колонію крапкою на зовнішній стороні дна чашки, користуючись склографом або маркером. 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 у 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.

- Визначити кількість живих клітин мікроорганізмів в 1 мл досліджуваного об'єкта, користуючись наступною 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 Місце для розрахунків:

- Отримані результати внести в таблицю 5.1.

Таблиця 5.1

Чисельність колоній мікроорганізмів, що вирости на МПА та MRS агарі і розрахунок кількості мікроорганізмів у 1 мл субстрату морського походження

Розведення	Кількість колоній на чашках	Кількість мікроорганізмів в 1 мл морської води/суспензії ґрунту/ліквору або змиву гідробіонтів (КУО/мл)
МПА (бацили та актиноміцети)		
1		
1:10 ³		
1:10 ⁴		
1:10 ⁵		

MRS (лактобактерії)		
1		
1:10 ²		
1:10 ³		
МПА (загальне мікробне число)		
1		
1:10 ³		
1:10 ⁴		
1:10 ⁵		

Завдання 2. Опис морфології колоній

Хід роботи:

- Не відкриваючи чашок, описати морфологію найбільш характерних, ізольованих колоній, звернувши увагу на наступні ознаки:
 - форма (кругла, кореневидна, неправильна форми, амебоподібна, ризоїдна і т. д.);
 - забарвлення (безбарвне або пігментоване: біле, жовте, золотисте, червоне, чорне);
 - поверхня колоній (гладка, шорстка, складчаста, зморшкувата, концентрично або радіально покреслена і т. д.);
 - профіль колонії (плоский, опуклий, кратероподібний, конусовидний і т. д.);
 - блиск і прозорість (колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора);
 - 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;
 - край колонії (рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчатий т. д.) визначають при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;
 - структура колонії (однорідна, дрібнозерниста, грубозерниста, струйчата і т. д.) визначається при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;
 - 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. Результати внести в таблицю 5.2.

Ознаки колоній мікроорганізмів на МПА та MRS агарі

Форма	Діаметр	Блиск	Колір	Профіль	Край	Структура	Консистенція	Флуоресценція	Малюнок
МПА									
MRS									

Завдання 3. Облік результатів виділення мікроорганізмів з повітря з метою визначення його санітарного стану

Зробити висновок про санітарний стан повітря приміщень біологічного факультету.

Хід роботи:

1. Порахувати кількість колоній на чашках з МПА як було зазначено вище.
2. 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 побудувавши пропорції, або за допомогою формули Омелянського:

$$X = \frac{a \times 100 \times 1000 \times 5}{b \times 10 \times T}$$

Місце для розрахунків:

3. Результати розрахунків внести в таблицю 5.3.

Таблиця 5.3

**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			

4. Користуючись даними таблиці 5.4 зробити висновок про чистоту повітря вибраного приміщення біологічного факультету.

Таблиця 5.4

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

Завдання для самостійної роботи

1. Порівняти отримані результати щодо кількості мікроорганізмів в 1 мл досліджуваного субстрату морського походження та морфологічні ознаки їх колоній з даними рекомендованої літератури:

2. Сформулювати висновки по виконаній роботі:

3. Доповніть словник термінів:

Колонія –

Граничні розведення – КУО –

Санітарний стан повітря –

Морфологія колоній –

Чашковий метод Коха –

Метод Виноградського –

Метод стекол обростання –

Питання для перевірки знань

1. Що таке колонія мікроорганізмів?
2. Який принцип чашкового методу Коха? Для яких цілей він використовується при проведенні наукових досліджень?
3. Про що свідчить кількість колоній, що вирости на чашці Петрі при висіві певного розведення?
4. Який принцип методу граничних розведень?
5. Які принципи методів Виноградського та стекол обростання? Як визначається кількість клітин мікроорганізмів у досліджуваному субстраті за допомогою даних методів?
6. Що таке седиментаційний метод та для чого він використовується?
7. З якою метою визначають кількість клітин мікроорганізмів у досліджуваному об'єкті?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Який метод дозволяє визначити кількість життєздатних клітин мікроорганізмів у досліджуваному субстраті:
 - А. турбідиметричний;
 - Б. метод стекол обростання;
 - В. чашковий метод Коха;
 - Г. метод Виноградського.
2. Який метод використовується для визначення санітарного стану повітря:
 - А. Чашковий метод Коха;
 - Б. седиментаційний метод;
 - В. турбідиметричний;
 - Г. граничних розведень.
3. При висіві морської води на поверхню МПА на чашці виросло 50 колоній бактерій. Скільки живих клітин мікроорганізмів містилося у 100 мкл суспензії, які було нанесено на чашку?
 - А. 50;
 - Б. 50000;
 - В. 500;
 - Г. 500000.
4. При висіві морської води у розведенні 10^{-2} на агар MRS на ньому виросло 50 колоній лактобактерій. Скільки мікроорганізмів даної групи містилося в 1 мл морської води?
 - А. 50;
 - Б. 50000;
 - В. 500;
 - Г. 500000.
5. Найвірогіднішу кількість клітин в одиниці об'єму розраховують за таблицею Мак-Креді при використанні методу:
 - А. Виноградського;
 - Б. нефелометричний;
 - В. турбідиметричний;
 - Г. граничних розведень.

Список літератури

1. Климнюк С.І., Ситник І.О., Ширококов В.П. та ін. Практична мікробіологія: навчальний посібник. Вінниця: Нова Книга, 2018. С 576.
URL: <http://ir.librarynmu.com/bitstream/123456789/5410/1/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0%20%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F.pdf>

2. Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія. Іваниця В. О. [та ін.]. Одеса: ОНУ, 2021. С. 282. URL: <https://www.doi.org/10.18524/978-617-689-454-4>
3. Філімонова Н. І., Сілаєва Л. Ф., Дика О. М. та ін. Мікробіологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. С. 676.
URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>

Електронні та інформаційні ресурси

1. https://asutoshcollege.in/new-web/Study_Material/Nirmalya_Sir_Air_MicroBiology_1_31032020.pdf

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 6

Виділення чистої культури мікроорганізмів

Мета заняття – ознайомити студентів із методами виділення чистої культури мікроорганізмів та навчити їх виділяти чисту культуру бактерій.

Питання для підготовки до заняття

1. «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) живильні 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.

Теоретичні відомості

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

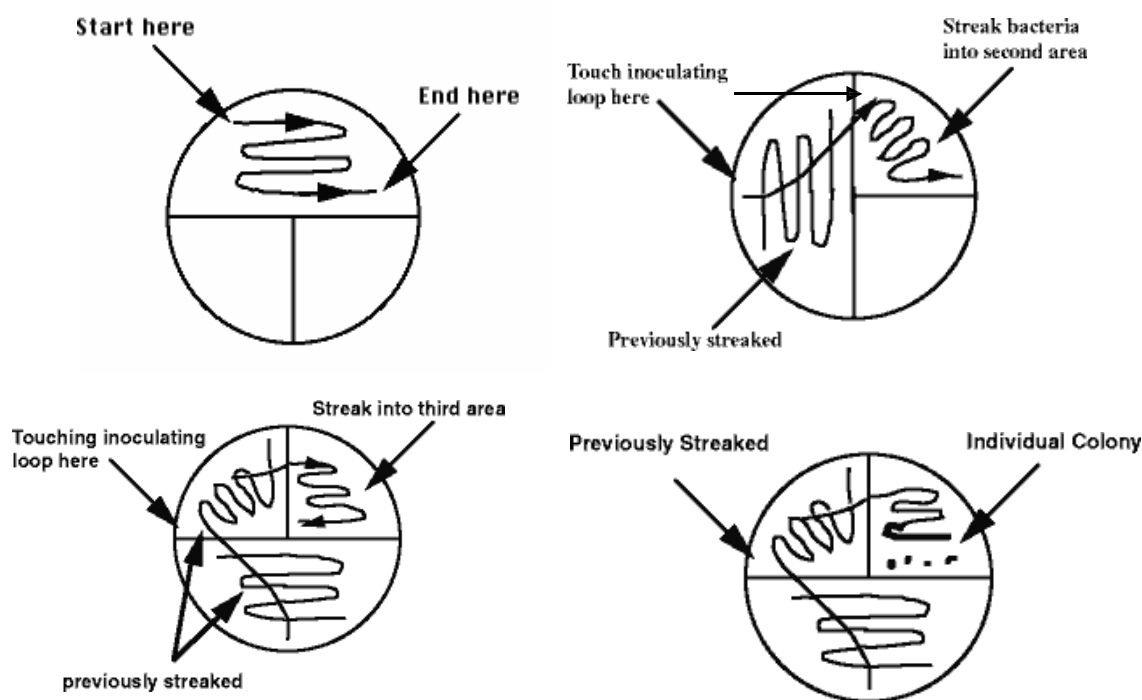
чистою культурою може бути колонія мікроорганізмів. Вона являє собою ізольовану популяцію мікроорганізмів, що розмножились з однієї клітини.

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 скошеного твердого поживного середовища або чашку Петрі за методом штриха (рис. 6.1).



A

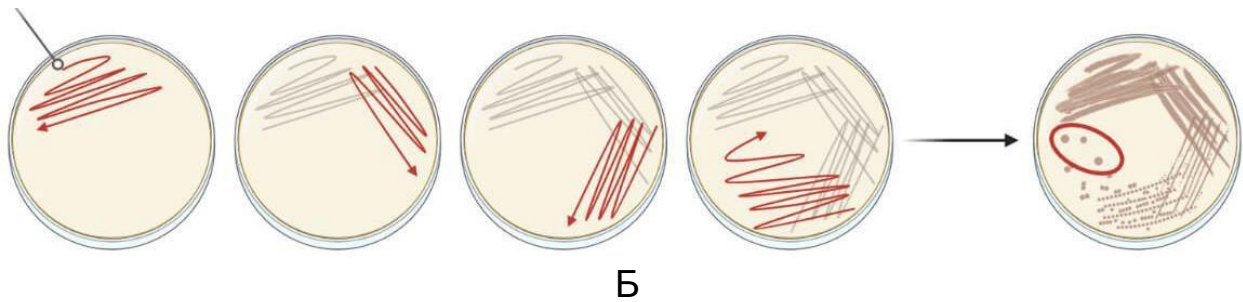


Рис. 6.1. Схема використання методу штриха (“Streak plate method”) за типом трьох секторів “T-Streaking”, “three-sector streak (A) та чотирьох квадрантів “four-quadrant streak”(Б) (<https://microbenotes.com/streak-plate-method-principle-methods-significance-limitations/>; <http://archive.physionet.org/tutorials/ept/html/chp51exp2.htm>)

Метод штриха слугує для зменшення кількості клітин, щоб ріст на чашках Петрі був не у вигляді газону, а у вигляді окремих колоній (рис. 6.2).

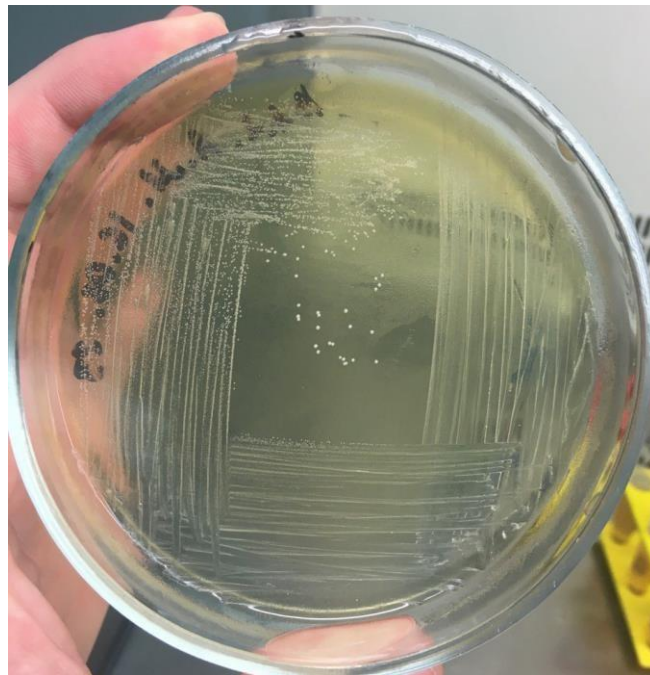


Рис. 6.2. Культура ентерококів посіяна на MRS агар за методом штриха за типом чотирьох квадрантів (авторське фото)

Примітка: Окремі колонії спостерігаються в останньому – четвертому квадранті

Ріст у вигляді окремих колоній дозволяє визначити чистоту виділеної культури та використовувати їх для подальших пересівів з метою характеристики та ідентифікації.

Матеріал та обладнання

1. чашки з мікроорганізмами, виділеними з морських джерел;
2. стерильні чашки Петрі з МПА та MRS;

3. спиртівки;
4. бактеріологічні петлі.

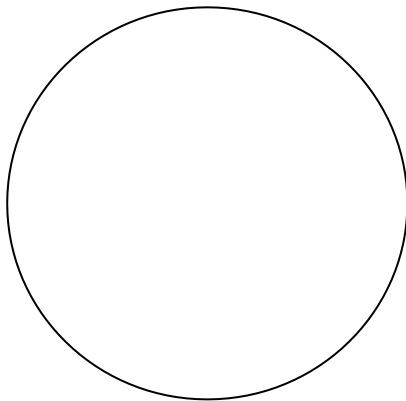
Завдання 1. Виділення чистої культури

Хід роботи:

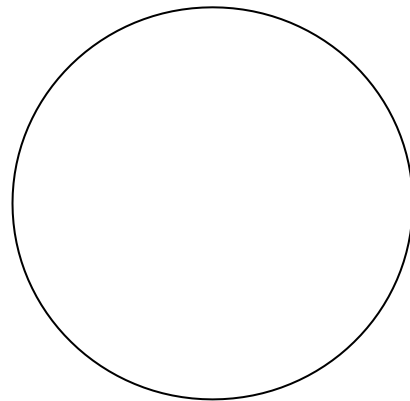
1. З описаних колоній, що були виділені з морських джерел, вибрати одну, що за своєю морфологією нагадує лактобактерії, актиноміцети, або представників роду *Bacillus* та яка зростає найбільш ізольовано.
2. Потім за допомогою стерильної бактеріологічної петлі узяти невелику кількість бактерійної маси вибраної колонії, злегка до неї торкаючись. Необхідно уважно стежити, щоб не зачепити довколишні колонії.
3. Відібрану біомасу розсіяти за методом штриха на нові чашки з МПА та MRS за одним із вибраних типів (рис 6.1). Посів здійснюється, ковзаючи петлею по поверхні агару (не рихлити його) у вигляді штриха. При посіві необхідно дотримувати правил асептики.
4. Помістити засіяні чашки в термостат з 37 °С для інкубації впродовж 1–2 днів.

Завдання для самостійної роботи

1. Зобразити схематично використання методу штриха за типом непереривного (А) та радіального (Б) штрихування:



А



Б

Питання для перевірки знань

1. Що таке чиста культура? Які етапи її виділення?
2. Для чого проводиться виділення чистої культури?
3. Якими методами здійснюється виділення чистої культури?
4. Які типи методу штриха ви знаєте?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Чиста культура мікроорганізмів є потомством:
 - А. однієї клітини;
 - Б. декількох клітин;
 - В. багатьох клітин;
 - Г. багатьох колоній.
2. Правильна послідовність етапів виділення чистої культури:
 - А. виділення чистої культури – одержання накопичувальної культури – визначення чистоти виділеної культури;
 - Б. виділення чистої культури – визначення чистоти виділеної культури – одержання накопичувальної культури;
 - В. одержання накопичувальної культури – виділення чистої культури – визначення чистоти виділеної культури;
 - Г. одержання накопичувальної культури – визначення чистоти виділеної культури – виділення чистої культури.
3. Використання методу штриха дозволяє отримати ріст мікроорганізмів:
 - А. у вигляді газону;
 - Б. у вигляді окремих колоній;
 - В. у вигляді однієї колонії;
 - Г. у вигляді суцільного росту.
4. Виділення чистої культури бактерій потрібно для:
 - А. встановлення таксономічного положення;
 - Б. правильного уявлення про їх морфологічні та культуральні властивості;
 - В. правильного уявлення про їх фізіолого-біохімічні властивості;
 - Г. усі варіанти вірні.

Список літератури

1. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://microbenotes.com/streak-plate-method-principle-methods-significance-limitations/>
2. <http://archive.physionet.org/tutorials/ept/html/chp51exp2.htm>
3. <https://byjus.com/neet/streak-plate-technique/>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 7

Методи перевірки чистоти культури. Методи мікроскопії. Приготування фіксованих забарвлених препаратів. Забарвлення за Грамом. Морфологія бактеріальних клітин

Мета заняття – ознайомлення зі способами перевірки чистоти культури, методами мікроскопії та приготування фіксованих забарвлених препаратів.

Питання для підготовки до заняття

1. Методи мікроскопії:
 - світлопольна мікроскопія (будова світлового мікроскопа, робота з імерсійною системою);
 - мікроскопія в темному полі;
 - фазово-контрастна мікроскопія;
 - люмінесцентна мікроскопія, препарати для люмінесцентної мікроскопії.
2. Будова мікробної клітини.
3. Будова клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій. Забарвлення за методом Грама.
4. Будова ендоспор. Спороутворення. Резистентність ендоспор. Бактерії, що утворюють ендоспори.

Теоретичні відомості

Чистоту культури перевіряють одночасно декількома способами: візуально, мікроскопуванням і висівом на поживних середовищах. При візуальному контролі визначають характер росту культури на поверхні штриха на скошеному агарі або на чашці Петрі: якщо він однорідний, то культура вважається чистою, якщо неоднорідний – змішаною.

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

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

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 см² 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 вкрай 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 зазвичай тричі проводять через найгарячішу частину полум'я пальника, тримаючи предметне скло мазком догори. Не слід перегрівати мазок, оскільки при цьому відбуваються грубі порушення клітинних структур, а інколи і зовнішнього вигляду клітин, наприклад, їх зморщування. Для дослідження тонкої будови клітини застосовують фіксацію різними хімічними речовинами. Фіксує рідину наливають на мазок або препарат на певний час занурюють у ємність з фіксатором.

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 профарбовується вся клітина, так що стають добре помітними її форма і розміри. Диференціальний спосіб припускає забарвлення не всієї клітини, а певних її структур. За допомогою диференціального забарвлення виявляють деякі клітинні структури, запасні речовини і включення.

Для простого забарвлення клітин мікроорганізмів найчастіше використовують фуксин, генціановий фіолетовий, метиленовий синій. Фіксований препарат розміщують на паралельних скляних рейках, що лежать над кюветою, і наносять барвник на 1–3 хвилини. Слідкують за тим, щоб під час забарвлення розчин барвника на препараті не підсихав. У разі необхідності на мазок наносять нові порції барвника.

Після закінчення забарвлення препарат промивають водою до тих пір, поки вода, що стікає, не стане прозорою. Потім препарат висушують на повітрі або обережно промочують фільтрувальним папером, поміщають на пофарбований мазок краплю імерсійної олії і дивляться з об'єктивом 90х. Для отримання більш чистих препаратів барвник наносять на мазок, покритий фільтрувальним папером. Метод забарвлення у модифікації Синьова дозволяє використовувати замість розчинів барвників фільтрувальний папір, що раніше був просочений барвником.

У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору світле і чисте, забарвлені тільки клітини мікроорганізмів. Фіксовані, забарвлені препарати можуть зберігатися тривалий час.

Забарвлення за Грамом. 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).

Механізм забарвлення за Грамом до цих пір достеменно невідомий, але в основі його лежать особливості хімічного складу і будови клітинних стінок бактерій. При обробці бактерій спиртом відбувається розбухання пептидоглікану і зменшення діаметру пор клітинної стінки, що загалом призводить до зниження її проникності. Оскільки грампозитивні бактерії характеризуються високим вмістом муреїну (пептидоглікану) – 50–80 %, інколи 95 % всієї ваги стінки, то в результаті обробки спиртом стінки їх стають майже непроникними для барвників і барвник із клітин не вимивається. У грамнегативних бактерій шар пептидоглікану тонкий (5–10 % загальної ваги

стінки) і проникність клітинної стінки їх збільшується завдяки розчиненню і вимиванню ліпідів спиртом, вміст яких досить високий (до 22 % ваги стінки).

У забарвленні за Грамом основну роль відіграє клітинна стінка, оскільки протопласти грампозитивних бактерій стають грамнегативними. Сфероласти (клітини, що частково позбавлені клітинної стінки), клітини, у яких порушена цілісність клітинної стінки, – всі грамнегативні. Грампозитивні і грамнегативні бактерії відрізняються низкою ознак: структурних (товщиною і макромолекулярною будовою клітинної стінки, структурними елементами клітини), хімічних (вмістом і складом пептидогліканів, полісахаридів, білків, ліпополісахаридів клітинних стінок), фізіологічних (відношенням до барвників, до поверхневого натягу, тиску, ультразвуку, ізоелектричної точки і т. п.).

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. Деякі грампозитивні бактерії з віком можуть перетворюватися у грамнегативні, наприклад, бактерії роду *Lactobacillus*. Неспороутворюючі грампозитивні молочнокислі бактерії стають грамнегативними як з віком, так і при підвищеній кислотності середовища.

Існує багато модифікацій методу Грама, серед яких найчастіше використовується модифікація Каліні.

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.

Ендоспори можна спостерігати в живих клітинах у світлопольному мікроскопі, де їх видно як більш темні включення різної форми; у фазово-контрастному мікроскопі, коли на фоні майже чорних клітин видно світлі ендоспори; електронно-мікроскопічно.

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. Таким чином спори можна виявляти, використовуючи забарвлення за Грамом, після якого спори виглядають як округлої форми безбарвні утворення всередині забарвлених клітин.

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

Одним із методів забарвлення для виявлення ендоспор є метод Ожешко.

Матеріал та обладнання

1. чашки Петрі з посівами досліджуваних мікроорганізмів;
2. лупи;
3. стерильний фізіологічний розчин;
4. папір з генціановим фіолетовим;
5. розчин Люголю;
6. 96 % етиловий спирт;
7. водний фуксин;
8. фільтрувальний папір та марля;
9. предметні стекла;
10. спиртівки;
11. бактеріологічні петлі;
12. імерсійне масло;
13. мікроскопи.

Завдання 1. Перевірити чистоту виділеної культури бактерій візуально

Хід роботи:

1. Користуючись лупою, дослідити характер росту виділених бактерій на поверхні МПА та MRS та встановити його однорідність або неоднорідність (у випадку однорідності росту всі колонії мають однакову морфологію).
2. У випадку встановлення однорідності росту, що може свідчити про чистоту культури, внести дані по морфології колоній в узагальнюючу таблицю 9.1, яка є необхідною для ідентифікації виділених мікроорганізмів.

Завдання 2. Перевірити чистоту культури та дослідження її морфологічних ознак шляхом приготування забарвленого за Грамом препарата

Хід роботи:

1. На чистому, знежиреному предметному склі приготувати тонкий мазок, висушити його на повітрі, зафіксувати в полум'ї спиртівки;
2. 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.);
3. зняти папір, злити барвник та, не промиваючи препарат водою, забарвити його розчином Люголю (1–2 хв.);
4. розчин Люголю злити (не промиваючи водою) і обробити препарат 96 % етиловим спиртом (30 сек.);
5. препарат швидко промити водою і додатково забарвити водним розчином фуксину (1–2 хв.);
6. препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером, та дослідити під мікроскопом з імерсією мінімум 20 полів зору. Однорідність морфології клітин та їх кольору свідчить про чистоту виділеної культури.
Указати робочу назву штаму, спосіб забарвлення, тинкторіальні та морфологічні особливості досліджуваної культури. Дані внести в таблицю 7.1.
7. Препарати замалювати, відмітити загальне збільшення мікроскопа.

Таблиця 7.1

Інформація про чистоту культури та деякі особливості морфології клітин мікроорганізмів, що вирости на МПА та/або MRS

Об'єкт (робоча назва штаму)	Спосіб забарвлення	Грам+/ Грам -	Форма клітин	Просторове розташування клітин	Наявність спор	Малюнок
						
						Загальне збільшення:

Завдання для самостійної роботи

1. Зробити висновок про чистоту досліджуваної культури:

2. У випадку встановлення чистоти культури, перенести інформацію з таблиці 7.1. до узагальненої таблиці 9.1 (Лабораторне заняття 9). Вона є необхідною для подальшої ідентифікації виділених мікроорганізмів.
3. Доповнити словник термінів:
Чиста культура –
Змішана культура –
Тинкторіальні властивості –
Морфологічні властивості –
Забарвлення за Грамом –

Питання для перевірки знань

1. Що таке чиста культура мікроорганізмів? Чим вона відрізняється від змішаної?
2. Які методи визначення чистоти культури ви знаєте?
3. Як готується фіксований забарвлений препарат? Назвати основні етапи.
4. Які барвники використовуються у мікробіологічній лабораторії?
5. Який принцип забарвлення за Грамом?
6. Для яких цілей використовується забарвлення за Грамом у мікробіологічній лабораторії?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Якщо після посіву за методом штриха на чашці Петрі при здійсненні візуального обстеження виявлено колонії різної морфології, то це свідчить про те, що культура є:
А. чистою;
Б. змішаною;
В. брудною;
Г. забрудненою.
2. Виберіть етапи приготування фіксованого забарвленого препарату у правильній послідовності:
А. висушування – приготування мазка – фіксація – забарвлення;
Б. приготування мазка – фіксація – забарвлення – висушування;
В. приготування мазка – висушування – фіксація – забарвлення;
Г. приготування мазка – забарвлення – висушування – фіксація

3. До основних барвників належать:
 - А. основний фуксин;
 - Б. сафранін;
 - В. генціановий фіолетовий;
 - Г. всі відповіді вірні.
4. Забарвлення за Грамом відноситься до:
 - А. простих методів забарвлення;
 - Б. складних методів забарвлення;
 - В. диференційних методів забарвлення;
 - Г. вірної відповіді немає.
5. Методика, що дозволяє забарвити ендоспори бактерій носить назву:
 - А. за Ожешко;
 - Б. за Грамом;
 - В. Циля-Нільсена;
 - Г. Пфейфера.
6. Лактобактерії після забарвлення за Грамом виглядають:
 - А. грампозитивними з прозорими спорами всередині;
 - Б. грам негативними без спор всередині;
 - В. грам негативними з прозорими спорами всередині;
 - Г. грам позитивними без спор всередині.
7. Бактерії роду *Vacillus* у препараті забарвленого за Грамом виглядають:
 - А. грампозитивними з прозорими спорами всередині;
 - Б. грамнегативними без спор всередині;
 - В. грамнегативними з прозорими спорами всередині;
 - Г. грампозитивними без спор всередині.

Список літератури

1. Люта В. А., Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. Київ: Здоров'я, 2001. С. 280.
URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/6399_01.pdf
2. Ястремська Л. С., Малиновська І. М. Загальна мікробіологія і вірусологія. Навчальний посібник. Київ: НАУ, 2017. С. 232.
URL: https://er.nau.edu.ua/bitstream/NAU/38706/1/%D0%97%D0%9C%D0%92_%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%81.1-50%20%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://medlineplus.gov/lab-tests/gram-stain/#:~:text=A%20Gram%20stain%20is%20colored,%2C%20they%20are%20Gram%2Dnegative.>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 8

Методи вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних ознак і ідентифікація бактерій

Мета заняття – вивчити культуральні і фізіолого-біохімічні властивості чистої культури бактерій.

Питання для підготовки до заняття

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.

Теоретичні відомості

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.

Вид у бактерій – це сукупність мікроорганізмів, що характеризуються спільними морфологічними, фізіолого-біохімічними, молекулярно-генетичними ознаками. Види об'єднуються у роди, роди іноді у триби, а ті – в родини. Родини об'єднуються в порядки, порядки в класи, а класи можуть об'єднуватись у відділи.

Ідентифікація прокаріот 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 бродіння), залежність росту від температури та

pH. 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.

Матеріали та обладнання

1. чашки Петрі з чистими культурами;
2. пробірки з поживним бульйоном;
3. пробірки із середовищем Хью-Лейфсона з глюкозою;
4. стерильна вазелінова олія;
5. 3 % перекис водню;
6. предметні скельця;
7. спиртівки;
8. бактеріологічні петлі;
9. стерильні піпетки на 1–2 мл;
10. штативи;
11. посуд з дезрозчином для відпрацьованих піпеток.

Завдання 1. Здійснення посівів для визначення культуральних та фізіолого-біохімічних ознак

Хід роботи:

1. Провести посів досліджуваної чистої культури мікроорганізмів у рідке поживне середовище МПБ або MRS.
2. Стерильною бактеріологічною петлею відібрати частину біомаси досліджуваної культури бактерій і внести у пробірку з середовищем.
3. Для визначення здатності 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 вазеліновою олією шаром 2–2,5 см для створення анаеробних умов. Усі посіви культивують у термостаті при 37 °С.

Завдання 2. Визначити наявність ферменту каталази в клітинах виділених бактерій

Хід роботи:

1. На чисте знежирене предметне скельце нанести стерильною піпеткою краплю 3 % перекису водню, у яке помістити стерильною бактеріологічною петлею частину біомаси досліджуваної культури.
2. Утворення бульбашок газу (O₂) свідчить про позитивний результат. Результат внести в узагальнюючу таблицю 9.1.

Завдання для самостійної роботи

Доповнити словник термінів:

Ідентифікація –

Вид бактерій –

Штам бактерій –

Культуральні ознаки –

Фізіолого-біохімічні ознаки –

Питання для перевірки знань

1. Що таке ідентифікація? Які її загальні принципи?
2. Які ознаки необхідно визначити у досліджуваної культури мікроорганізмів для здійснення надійної ідентифікації?
3. Назвати приклади культуральних ознак бактерій. Яким чином їх визначають?
4. Назвати приклади фізіолого-біохімічних та біохімічних характеристик мікроорганізмів.
5. Яким чином визначають здатність бактерій утилізувати певні цукри?
6. Як проводиться тест на каталазу та для чого він необхідний?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Встановлення таксономічного положення досліджуваного штаму мікроорганізмів носить назву:
А. диференціація;
Б. фенотипування;
В. ідентифікація;
Г. ізоляція.
2. Сукупність мікроорганізмів, що характеризуються спільними морфологічними, фізіолого-біохімічними, молекулярно-генетичними ознаками, носить назву:
А. штам;
Б. вид;
В. таксон;
Г. ізолят.
3. Для ідентифікації мікроорганізмів необхідно вивчити ознаки:
А. морфологічні;
Б. культуральні;
В. фізіолого-біохімічні;
Г. всі відповіді вірні.

4. Середовище для визначення здатності мікроорганізмів утилізувати цукри носить назву:
 - А. Хью-Лейфсона;
 - Б. Ендо;
 - В. Ешбі;
 - Г. МПА.
5. Більшість штамів лактобактерій при проведенні тесту на каталазу реагують:
 - А. негативно;
 - Б. позитивно;
 - В. варіабельно;
 - Г. невизначено.

Список літератури

1. Ananthanarayan R. and Paniker C.K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.
URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextbookOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Textbook%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf>
2. Trivedi P. C., Pandey S., Bhadauria S. The book of Microbiology. Jaipur: Aavishkar Publishers, 2010. P. 446.
URL: https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Microbiology/Text_Book_of_Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. https://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab15/introduction.htm
2. <https://www.slideshare.net/HarishReddy280/biochemical-tests-and-physiological-tests-for-various-groups-of-bacteria>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 9

Методи вивчення культуральних і фізіолого- біохімічних ознак і ідентифікація бактерій (продовження)

Мета заняття – провести ідентифікацію досліджуваної культури (визначити систематичне положення мікроорганізму за культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями).

Питання для підготовки до заняття

1. Основні принципи систематики.
2. Ідентифікація бактерій за фізіолого-біохімічними властивостями.

Теоретичні відомості

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 ключів, в яких пропонують альтернативні твердження, які ведуть до діагностики невідомого організму.

Для ідентифікації бактерій за фенотиповими ознаками використовують визначник Бергі IX видання, якій містить інформацію про 35 груп бактерій. Загальний підхід для визначення невідомого ізольованого 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 в описі більшості родів.

Матеріали та обладнання

1. чашки і пробірки з посівами, проведеними на попередньому занятті;
2. визначник бактерій Бергі або спрощені ідентифікаційні схеми/ключі.

Завдання 1. Провести облік результатів проведених посівів

Хід роботи:

1. З'ясувати особливості росту досліджуваної культури у поживному бульйоні, відзначивши наявність помутніння, утворення плівки, осаду, запаху, виділення газу.
2. 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).
3. Результати внести в узагальнюючу таблицю 9.1.

Завдання 2. Здійснення родової ідентифікації виділених

мікроорганізмів за визначником Бергі

Хід роботи:

1. Провести родову ідентифікацію досліджуваної культури на основі результатів вивчення основних біологічних властивостей із використанням визначника бактерій Бергі (спрощених ідентифікаційних схем/ключів).

Таблиця 9.1

Узагальнююча таблиця

Ознаки колоній досліджуваної культури бактерій, що вирости на щільному поживному середовищі (культуральні властивості)	
Ознака	Колонія бактерій
Форма	
Розмір (діаметр), мм	
Поверхня	
Профіль	
Блиск, прозорість	
Колір	
Пігментоутворення	
Край	

Структура	
Консистенція	
Ознаки росту досліджуваної культури бактерій у рідкому поживному середовищі (культуральні властивості)	
Ознака	Наявність ознаки при рості у поживному бульйоні
Помутніння	
Плівка	
Осад	
Наявність запаху	
Утворення газу	
Морфологічні, тинкторіальні та фізіолого-біохімічні властивості досліджуваної культури бактерій	
Ознака/тест	Досліджувана культура
Форма клітин	
Розташування у полі зору	
Відношення до забарвлення за Грамом	
Каталаза	
Утилізація глюкози в аеробних умовах	
Утилізація глюкози в анаеробних умовах	

2. Записати латинською мовою і обґрунтувати родову назву досліджуваної культури:

Завдання для самостійної роботи

1. Надати коротку характеристику бактеріям ідентифікованого роду. Чи є морське середовище типовим для їх виділення? Яким може бути практичне значення виділеного штаму?

Питання для перевірки знань

1. Які ви знаєте загальні принципи ідентифікації мікроорганізмів?
2. За якими ознаками мікроорганізми згруповані в ІХ визначнику Бергі? Надати характеристику даному виданню.
3. Як проводиться ідентифікація мікроорганізмів, користуючись ІХ визначником Бергі?
4. Які ознаки росту мікроорганізмів у бульйоні ви знаєте? Про що вони можуть говорити?
5. Як проводять облік результатів посівів, зроблених у середовище Хью-Лейфсона?
6. Назвіть роди мікроорганізмів, які мешкають у морському середовищі. Яке вони можуть мати практичне значення?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. У ІХ визначнику Бергі мікроорганізми згруповані на основі:
 - А. морфологічних ознак;
 - Б. генетичних ознак;
 - В. фенотипових ознак;
 - Г. родинних зв'язків.
2. Скільки груп мікроорганізмів є у ІХ визначнику Бергі:
 - А. 35;
 - Б. 100;
 - В. 38;
 - Г. 45.
3. Яка правильна послідовність етапів ідентифікації мікроорганізмів за ІХ визначником Бергі:
 - А. визначення належності до прокариот – визначення групи – визначення категорії – рід – вид;
 - Б. визначення належності до прокариот – визначення категорії – визначення групи – рід – вид;
 - В. визначення категорії – визначення належності до прокариот – визначення групи – рід – вид;
 - Г. визначення категорії – визначення належності до прокариот – визначення групи – вид – рід.
4. У випадку зміни кольору середовища Хью-Лейфсона лише у пробірці без шару олії досліджувані мікроорганізми по відношенню до кисню:
 - А. факультативні анаероби;
 - Б. факультативні аероби;
 - В. облігатні аероби;
 - Г. облігатні анаероби.

5. У випадку позитивної реакції по утилізації цукрів у середовищі Хью-Лейфсона колір індикатора бромфенолового синього змінюється на:
- А. зелений;
 - Б. жовтий;
 - В. синій;
 - Г. червоний.

Список літератури

1. Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія. Іваниця В. О. [та ін.]. Одеса: ОНУ, 2021. С. 282. URL: <https://www.doi.org/10.18524/978-617-689-454-4>
2. Ястремська Л. С., Малиновська І. М. Загальна мікробіологія і вірусологія. Навчальний посібник. Київ: НАУ, 2017. С. 232.
URL: https://er.nau.edu.ua/bitstream/NAU/38706/1/%D0%97%D0%9C%D0%92_%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%81.1-50%20%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82.pdf
3. Trivedi P. C., Pandey S., Bhaduria S. The book of Microbiology. Jaipur: Aavishkar Publishers, 2010. P. 446.
URL: https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Microbiology/Text_Book_of_Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://ocean.si.edu/ocean-life/microbes/marine-microbes>
2. <https://ocean.si.edu/ocean-life/microbes>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 10

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

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

Питання для підготовки до заняття

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

Матеріали та обладнання

1. чашки Петрі з культурами-антагоністами;
2. суспензії добових культур тест-мікроорганізмів;
3. чашки Петрі з поживним агаром;
4. бактеріологічні петлі;
5. штативи;
6. шпателя Дригальського;
7. стаканчики зі спиртом;
8. стерильні мікропіпетки;
9. стандартні паперові диски з антибіотиками;
10. спиртівки;
11. посуд з дезрозчином для відпрацьованих піпеток.

Завдання 1. Здійснення посівів для визначення антагоністичної активності

Хід роботи:

1. 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);
2. 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;
3. провести підсів водних суспензій тест-мікробів, починаючи штрих на відстані 2–3 мм від межі росту мікроба-антагоніста. Штрих кожного тест-мікроорганізму пронумерувати. Чашки з посівами культивувати при 30 °С протягом 24 годин.

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

Хід роботи:

1. На поверхню підсушеного агаризованого середовища стерильною піпеткою нанести 0,1–0,2 мл суспензії тест-мікроорганізма і провести посів шпателем Дригальського;
2. 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;

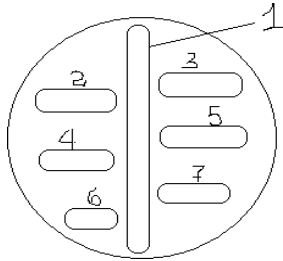
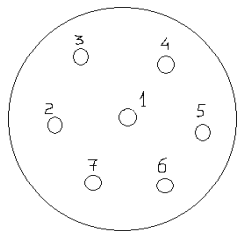
3. стерильним пінцетом помістити по трафарету диски, просочені антибіотиками з різним механізмом дії на клітину мікроорганізма;
4. кожний диск притиснути пінцетом так, щоб він щільно приставав до поверхні середовища;
5. засіяні чашки помістити у термостат при 37 °С на 24 години вверх дном, щоб запобігти попаданню конденсаційної води на поверхню посівів.

Завдання 3. Оформити протоколи виконання заняття

1. Заповнити таблицю 10.1.

Таблиця 10.1

Протоколи експериментів по визначенню антагоністичної активності мікроорганізмів морського походження та їх чутливості до антибіотиків

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

Завдання для самостійної роботи

1. Ознайомитися з іншими методами перевірки антагоністичної активності та законспектувати їх принципи (коротко)

Питання для перевірки знань

1. Які є типи взаємовідношень мікроорганізмів у природі?
2. Що таке антагоністична активність? Які бувають типи антагонізму?
3. Чим відрізняється активний антагонізм від пасивного?
4. Які методи визначення антагоністичної активності вам відомі?
5. Який принцип методу агарових лунок?
6. Описати принцип методу агарових блочків? Як його проводять?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Штам мікроорганізмів, який виступає у ролі продуцента антимікробних речовин носить назву:
А. тест-штам;
Б. штам-антагоніст;
В. референтний штам;
Г. контрольний штам.
2. Антибіотики за своєю природою є:
А. первинними метаболітами;
Б. завжди пептидами;
В. вторинними метаболітами;
Г. ферментами.
3. Бактеріоцини, що продукуються лактобактеріями містяться:
А. у культуральній рідині;
Б. всередині клітин;
В. у складі клітинної стінки;
Г. у складі мембрани.
4. Метод визначення антагоністичної активності, що передбачає додавання тест-штаму до складу агару з послідуочим вирізанням в ньому отворів, куди будуть внесені штами-антагоністи носить назву:
А. метод перпендикулярних штрихів;
Б. метод блочків;
В. диско-дифузійний метод;
Г. метод агарових лунок.

Список літератури

1. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784. URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf
2. <https://microchemlab.com/test/zone-inhibition-test-antimicrobial-activity/>

ЛАБОРАТОРНЕ 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.

Питання для підготовки до заняття

1. Спектр і механізм дії антибіотиків. Одиниці активності антибіотиків.
2. Формування механізмів резистентності мікроорганізмів до антибіотиків.

Матеріал та обладнання

1. чашки з посівами, проведеними на попередньому занятті;
2. лінійки.

Завдання 1. Провести облік результатів дослідження щодо визначення антагоністичної активності мікроорганізмів

Хід роботи:

1. Виміряти зону затримки (пригнічення) росту для кожної тест-культури;
2. звернути увагу на наступне: ріст тест-мікроорганізму на деякій відстані від мікроорганізму-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.

Завдання 2. Провести облік результатів дослідження по визначенню чутливості мікроорганізмів до антибіотиків

Хід роботи:

1. Виміряти діаметр зон пригнічення росту тест-культури за допомогою лінійки та виразити в міліметрах;
2. Діаметр зони затримки росту тест-культури до 10 мм свідчить про слабку чутливість до антибіотику, зона затримки росту більше 10 мм – про чутливість.

Завдання 3. Оформити протокол виконання заняття

Хід роботи:

1. Результати виміру зон затримки (пригнічення) росту тест-культур мікроорганізмів під впливом антагоніста внести у таблицю 11.1.

Таблиця 11.1

Результати 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 11.2.

Таблиця 11.2

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

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

Завдання для самостійної роботи

1. Сформулювати висновки по виконаній роботі:

Питання для перевірки знань

1. Чим зумовлена стійкість мікроорганізмів до антибіотиків та яке її практичне значення?
2. Описати диско-дифузійний метод, який використовується для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків та його принцип.
3. Описати метод перпендикулярних штрихів. Який його принцип?
4. Назвати приклади сполук, що є чинниками антагоністичної активності.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Метод визначення антагоністичної активності, що передбачає нанесення культуральної рідини штаму-антагоніста на паперовий диск з послідувачим його розміщенням на газоні тест-штаму носить назву:
А. метод перпендикулярних штрихів;
Б. метод блочків;
В. диско-дифузійний метод;
Г. метод агарових лунок.
2. Бактеріоцини є антимікробними сполуками:
А. білкової природи та первинними метаболітами;
Б. білкової природи та вторинними метаболітами;
В. ліпідної природи та первинними метаболітами;
Г. вуглеводної природи та первинними метаболітами.
3. Зона просвітління, що виникає навколо штаму-антагоніста є наслідком:
А. зміни кольору середовища під дією антимікробних сполук;
Б. відсутності росту чутливого тест-штаму;
В. реакції компонентів поживного середовища з антибіотиками;
Г. всі відповіді вірні.
4. Штам мікроорганізмів, що проявляє чутливість до антимікробних сполук іншого штаму при визначенні антагоністичної активності, носить назву:
А. тест-штам;
Б. штам-антагоніст;
В. референтний штам;
Г. контрольний штам.

Список літератури

1. Ananthanarayan R. and Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.
URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextbookOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Textbook%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf>
2. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://medlineplus.gov/lab-tests/antibiotic-sensitivity-test/>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 12

Метод ПЛР-аналізу для виявлення мікроорганізмів. Проведення ПЛР для діагностики бактеріального раку дводольних

Мета – опанувати методику постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення збудників бактеріального раку дводольних.

Питання для підготовки до заняття

1. Лабораторія полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
2. Правила роботи та техніка безпеки у ПЛР-лабораторії.

Теоретичні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це реплікація певного фрагмента ДНК *in vitro*. За допомогою ПЛР за дві-три години ми можемо клонувати окрему ділянку ДНК до кількості 10^9 копій. Такі клоновані фрагменти – копії ділянки, яка нас цікавить, називаються ампліконами, а сам процес збільшення копій ДНК у ПЛР – ампліфікацією (від англ. «to amplify – помножувати»). Метод ПЛР застосовують тоді, коли нам потрібно накопичити велику кількість ДНК для подальших досліджень, або якщо нам потрібно

виявити наявність у зразку ДНК певного організму, тобто для діагностичних цілей.

Для кожного виду мікроорганізмів характерна наявність специфічних послідовностей генома, властивих саме цьому виду. Виявляючи наявність таких послідовностей, ми можемо визначити, до якого виду відноситься виділений штам, чи є він патогенним, чи ні. За допомогою ПЛР вивчають також генетичне різноманіття, зміни у генотипі макро- і мікроорганізмів, а крім того, даний метод є основою для багатьох інших методів молекулярної біології.

ПЛР проводять у спеціальній реакційній суміші, в яку додають нуклеотиди, необхідні для побудови нових ланцюгів ДНК, термостабільну ДНК-полімеразу (у нашому випадку – Таq-полімеразу), іони магнію, необхідні для роботи фермента, праймери – невеликі олігонуклеотиди, що обмежують необхідну нам ділянку ДНК, та буфер.

Концентрації компонентів реакційної суміші ретельно підбираються таким чином, щоб отримати максимальну кількість ампліконів заданої довжини і у той самий час уникнути утворення неспецифічних продуктів ампліфікації, які ускладнюють інтерпретацію результатів ПЛР. Так, недостатня кількість одиниць Таq-полімерази та мала концентрація іонів магнію може призвести до утворення недостатньої кількості продуктів ПЛР. Навпаки, підвищена кількість іонів магнію призводить до зменшення специфічності реакції: крім специфічних ампліконів на гелевій пластинці можна побачити фрагменти ДНК різноманітної довжини, які утворилися внаслідок неспецифічного відпалу. Позбавитися неспецифічних ампліконів зазвичай можна, зменшуючи концентрацію іонів магнію. Специфічність реакції при цьому збільшується, але врожай ампліконів зменшується, тому треба добре підібрати оптимальну концентрацію іонів для достатньої візуалізації ампліконів.

У реакційну суміш додають ДНК. Існує багато методів виділення ДНК. У нашому випадку ми застосовуємо **метод теплового лізису** культури, оскільки якість ДНК, яка виділяється цим нескладним і швидким методом навіть без етапів очищення є достатньою для постановки ПЛР за даною методикою. Метод теплового лізису полягає у прогріванні бактеріальної суспензії за високої температури (95 °С), внаслідок чого клітини руйнуються, і ДНК виходить у розчин. Потім суспензію центрифугують, уламки клітин осідають на дно, і надосадова рідина містить ДНК, необхідну для дослідження.

ПЛР проводять у спеціальному приладі – ампліфікаторі (програмуємому термоциклері), який забезпечує швидку та точну зміну температур реакційних сумішей. Саме тому для ампліфікації ДНК *in vitro* достатньо застосовувати один фермент – ДНК-полімеразу замість значно більшої кількості ферментів, що забезпечують процес реплікації ДНК у природі. Дію решти ферментів

заміняє зміна температур. Так, підігрівання молекул ДНК до 94–95 °С спричиняє розплітання (денатурацію) дволанцюгових молекул, а температурні значення від 48 до 68 °С забезпечують оптимальні умови для відпалу праймерів з послідовністю- мішенню. Останнім температурним режимом є режим 72 °С – оптимум роботи *Taq*-полімерази. Сама назва фермента говорить про те, що він є термостабільним (аббревіатура «*Taq*» – від назви термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, яка населяє гарячі струмки). Фермент має бути термостабільним, адже ДНК-полімераза звичайних організмів не витримає циклічних нагрівань до 94 °С.

ДНК бактерій ампліфікують шляхом чергування 1 хвилини денатурації при 94 °С, 1 хвилини відпалу при 52 °С, 1 хвилини елонгації при 72 °С, і кількість таких циклів дорівнює 40 (у першому циклі час денатурації збільшено до 3 хвилин, а у останньому циклі час елонгації збільшено до 7 хвилин). Відповідну програму задають ампліфікаторові. У середньому процес ампліфікації займає 2–4 години.

Детекцію продуктів ПЛР, які накопичилися під час ампліфікації, здійснюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

На практичному занятті буде проведена ПЛР для виявлення патогенних штамів збудників бактеріального раку рослин. На багатьох дводольних рослинах можна спостерігати характерні пухлини, які є наслідком розростання тканин. Пухлини заважають нормальному відтоку води та метаболітів. Уражені рослини відстають у рості, врожайність в них зменшується, і зрештою хвороба може призвести до загибелі рослини. Найбільш сприйнятливими видами є виноград, троянди, хризантеми, персик, яблуна.

Збудником бактеріального раку винограду є *Rhizobium vitis*, раніше відомий як *Agrobacterium vitis*. Пухлини, які спричиняються цим фітопатогеном, мають усі ознаки тваринних злоякісних пухлин.

Клітини у місці потрапляння патогена у рослину починають неконтрольовано поділятися і утворюють пухлини. Нові властивості ураженим клітинам надає фрагмент плазмідної ДНК патогенних ризобій, який вноситься у пошкоджену рослинну клітину за допомогою процесу, подібного до кон'югації, і вбудовується у власну ДНК рослинної клітини.

Для проведення діагностики будемо застосовувати метод так званої біо-ПЛР, який передбачає попереднє виділення патогена на живильні середовища і виділення ДНК вже з ізольованих штамів мікроорганізмів. Метод біо-ПЛР дозволяє уникнути впливу інгібіторів ПЛР, які можуть міститися у зразку рослинних тканин, і збільшити кількість клітин, що аналізуються.

Усі патогенні штами *R. vitis* несуть велику Ті-плазмиду, відповідальну за здатність штаму спричиняти захворювання. У непатогенних штамів такої плазмиди немає. Для того, щоб відрізнити патогенні і непатогенні штами даного виду, достатньо за допомогою ретельно підібраних праймерів виявити специфічні ділянки Ті-плазмиди. Будемо виявляти за допомогою модифікованої методики Дж. Хааса (1995 рік) ділянки гену *ipt*, характерного для патогенних штамів *R. vitis*. Даний ген кодує фермент ізопентенилтрансферазу, яка приймає участь у синтезі гормону росту, підвищена продукція якого й призводить до розростання рослинних тканин. У наведеній методиці застосовується наступна пара праймерів: *ipt* 5' – GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT - 3' і 5' – GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT - 3' (Haas, 1995).

Структура лабораторії ПЛР. Основною умовою успішної роботи лабораторії ПЛР є відсутність контамінації обладнання, поверхонь і реактивів молекулами ДНК. У приміщенні, де працюють з ДНК або РНК, фрагменти молекул даних нуклеїнових кислот можуть знаходитися у повітрі у вигляді аерозолів, які утворюються при розбризкуванні і осідають на поверхнях столів та приладів. Потрапляння у реактиви ДНК-мішені або ампліконів призводить до хибно-позитивних результатів ПЛР.

Через загрозу контамінації лабораторію ПЛР поділяють на три блоки – пре-ПЛР блок, ПЛР-блок і пост-ПЛР блок. Ці три приміщення забезпечені УФ-лампами.

У пре-ПЛР блоці здійснюють підготовку зразків. У даному приміщенні знаходяться ламінарні бокси для розливання реактивів і виділення ДНК. У пре-ПЛР блоці також знаходиться холодильник для збереження реактивів. Це так звана “чиста” зона ПЛР-лабораторії. У “чистій” зоні працюють в окремих халатах, які перевдягають у передбокснику, у змінному взутті, у гумових рукавичках, які не виносять у інші зони ПЛР-лабораторії.

У ПЛР-блоці знаходиться ампліфікатор.

Пост-ПЛР блок представляє собою приміщення для проведення електрофорезу. Це так звана “забруднена зона” лабораторії. ДНК, яка ампліфікується під час ПЛР у великій кількості, знаходиться у буфері для електрофорезу, на накінецьниках, на внутрішній поверхні кришечок епандорфів, на дозаторах, на одязі співробітника тощо. Перед тим, як зайти до пост-ПЛР блоку, необхідно перевдягти халат і взуття, змінити гумові рукавички.

Правила роботи та техніка безпеки у лабораторії ПЛР. Усі етапи постановки ПЛР у лабораторії повинні проводитися у одному напрямку: від “чистої” зони до “забрудненої”. Ні в якому разі не можна переносити обладнання або предмети із “забрудненої” зони у “чисту”. Якщо на різних етапах проведення ПЛР використовуються одні й ті ж самі реактиви, необхідно,

щоб у окремих блоках знаходилися різні упаковки, які б не виносилися за межі блоків лабораторії.

Бажано, щоб на етапах підготування зразків і на етапі електрофорезу працювали різні співробітники. Стерильності необхідно дотримуватися лише на етапі роботи з дослідним матеріалом та з культурою мікроорганізмів. Реактиви для проведення ПЛР не є стерильними, однак під час роботи з ними слід бути дуже уважним, щоб не допустити потрапляння до пробірок пилу, у тому числі – тальку з гумових рукавичок, зайвих речовин (кожний раз при роботі з дозатором потрібно користуватися новим накінецьником, який ще не був у використанні), ДНК та РНК мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, епендорфи з реактивами для ПЛР відкривають на якомога менший термін у стерильному боксі. Реактиви зберігають при -18-20 °С у холодильнику, а перед роботою залишають відтанути на льоду при кімнатній температурі. Працюють з такими реактивами якомога швидше і одразу ж після роботи поміщають до холодильника.

Матеріал та обладнання

1. Пересіяні за добу до постановки ПЛР дослідні культури на картопляному агарі;
2. контрольні культури;
3. пластикові епендорфи на 1,5 мл;
4. пластикові епендорфи для проведення ПЛР на 75 мкл;
5. штативи для епендорфів;
6. лід;
7. гумові неопудрені рукавиці;
8. бактеріальні петлі;
9. спиртівки та 96 % етанол для них;
10. програмований термостат для епендорфів;
11. “Вортекс”;
12. центрифуга для епендорфів;
13. ампліфікатор;
14. дозатори різного об'єму та нові наконечники для них;
15. дейонізована вода;
16. Тритон X-100, азид натрію;
17. ПЛР-буфер;
18. пара праймерів *ipt* або *virD₂*;
19. суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів;
20. розчин сульфату магнію для ПЛР;
21. Таq-полімераза.

Завдання 1. Ознайомитися зі структурою ПЛР-лабораторії та правилами роботи у ній

Хід работ:

1. Відвідати ПЛР-лабораторію кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології під наглядом викладача.
2. Прислухати інструкції викладача стосовна правил роботи у ПЛР-лабораторії та занотувати їх:

Завдання 2. Виділення ДНК з досліджуваних штамів збудників бактеріального раку дводольних

Хід роботи:

1. У підписані за назвою штама пластикові епендорфи внести по 225 мкл дейонізованої води.
2. За допомогою бакпетлі перенести бактеріальну біомасу у епендорфи з водою з таким розрахунком, щоб концентрація бактеріальних клітин у отриманій суспензії склала б 10^8 кл/мл (змішати суспензію у вортексі).
3. До отриманої суспензії бактеріальних клітин додати 25 мкл розчину, який містить 10 % Тритона X-100 і 2,5 % азида натрію; перемішати у вортексі.
4. Суспензію прогріти 10 хвилин при 95 °С.
5. Прогріту суспензію центрифугувати 5 хвилин при 5700 g.
6. Відібрати надосадову рідину, що містить ДНК в окремий епендорф.
7. Визначити наявність та концентрацію виділеної ДНК за допомогою спектрофотометра.

Завдання 3. Приготування реакційної суміші для проведення ПЛР

Хід роботи:

1. Розморозити реактиви на льоду при кімнатній температурі.
2. Внести у епендорфи для проведення ПЛР на 75 мкл необхідні компоненти у таких кількостях (наведені кількості на одну реакцію у об'ємі 20 мкл):
 - 5,8 мкл дейонізованої води;
 - 4 мкл 5х ПЛР буфера;
 - 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (200 мкМ);
 - 1,0 мкл кожного із пари 10 мМ праймерів (0,5 мкМ);
 - 0,8 мкл 50 мМ Mg^{++} (2 мМ Mg^{++});
 - 0,4 мкл Таq-полімерази, 5 Од/мкл (2 Од).

Усі реагенти фірми “ThermoFisher Scientific”, США.

3. Компоненти перемішати 3–5 секунд на вортексі.
4. Епендорфи з реакційною сумішшю підписати і у кожний внести по 5 мкл досліджуваного зразку (надосадова рідина з ДНК штаму). Перемішати накінецьником дозатора.
5. Поставити епендорфи у ампліфікатор і задати відповідну програму.
6. Після закінчення ампліфікації епендорфи помістити у холодильник при – 20 °С до дня проведення електрофорезу.

Завдання для самостійної роботи

1. Заповнити протокол виконання заняття:

Назва дослідного штаму	
Послідовність генома, яку необхідно виявити	
Роль гена, послідовність якого потрібно виявити	
Послідовності праймерів	
Концентрації/кількості компонентів реакційної суміші	
Дейонізована вода	
Буфер для проведення ПЛР	
дНТФ, суміш	
Іони магнію	
Праймер 1	
Праймер 2	
Тақ-полімераза	
Зразок	
Назва зразка	
Цикли ПЛР	
1-й цикл (однократний)	3 хвилини денатурації при 94 °С, 1 хвилина відпалу при 52 °С, 1 хвилина елонгації при 72 °С
38 циклів	1 хвилина денатурації при 94 °С, 1 хвилина відпалу при 52 °С, 1 хвилина елонгації при 72 °С
40-й цикл (однократний)	1 хвилина денатурації при 94 °С, 1 хвилина відпалу при 52 °С, 7 хвилин елонгації при 72 °С

2. Доповнити словник термінів:
ПЛР –
Праймери –
Тақ ДНК-полімераза –
Ампліфікація –
Термоциклер –
3. Ознайомитися з принципами складання реакційної суміші для проведення ПЛР з метою ідентифікації бактерій. Законспекуйте прочитану інформацію:

Питання для перевірки знань

1. Які методи виділення ДНК ви знаєте? Які їх принципи?
2. Що таке ПЛР? Який спектр її використання при проведенні мікробіологічних досліджень?
3. Які компоненти входять до складу реакційної суміші для проведення ПЛР?
4. З яких етапів складається цикл ампліфікації? Що відбувається на кожному з них?
5. З яких відділів складається ПЛР-лабораторія та які види робіт проводяться у кожному з них?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Синтез комплементарних ланцюгів за допомогою Тақ ДНК-полімерази відбувається на етапі ПЛР, що носить назву:
А. денатурація;
Б. відпал праймерів;
В. елонгація;
Г. ініціація.
2. Кофакторами Тақ ДНК-полімерази слугують іони:
А. Mn^{+} ;
Б. Mg^{2+} ;
В. Cl^{-} ;
Г. NH_4^{+} .

3. Виділення ДНК та приготування реакційної суміші проводиться у відділі ПЛР-лабораторії, що носить назву:
 - А. пре-ПЛР блок;
 - Б. пост-ПЛР блок;
 - В. ПЛР блок;
 - Г. правильної відповіді немає.
4. Ампліфікація проводиться у відділі ПЛР-лабораторії, що носить назву:
 - А. пре-ПЛР блок;
 - Б. пост-ПЛР блок;
 - В. ПЛР блок;
 - Г. правильної відповіді немає.
5. До складу реакційної суміші для проведення ПЛР входить:
 - А. Таq ДНК-полімераза;
 - Б. праймери;
 - В. ПЛР-буфер;
 - Г. всі відповіді вірні.
6. ПЛР проводиться для:
 - А. збільшення кількості певного фрагменту ДНК;
 - Б. збільшення довжини певного фрагменту ДНК;
 - В. виділення ДНК із бактеріальної клітини;
 - Г. усього вищезазначеного.
7. Реакція ПЛР забезпечується приладом, що носить назву:
 - А. транслюмінатор;
 - Б. ДНК-синтезатор;
 - В. ампліфікатор;
 - Г. дейонізатор.

Список літератури

1. Мерліч А. Г., Жумінська Г. І. Методи біотехнологічних досліджень. Модуль 3. Основні молекулярно-біологічні методи досліджень : метод. рек. до лабораторних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія», 091 «Біологія», 1 рівень навчання. Одеса: Одес. нац. ун-т, 2023. С. 46–47.
URL: <https://drive.google.com/file/d/1r1tSe2pcOtXuhpcnCXyC-bnDWw-kkbxE/view>
2. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. V. 63, P. 1–15. Doi: 10.3791/3998.
3. Szegedi E. and Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. *Vitis*. 2002. V. 41 (1), P. 37–42.
URL: <https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/article/view/4436/4382>

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://app.jove.com/v/10081/detecting-environmental-microorganisms-with-the-polymerase-chain-reaction-and-gel-electrophoresis>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 13

Метод ПЛР-аналізу для виявлення мікроорганізмів (продовження).

Облік результатів ПЛР: електрофорез в агарозному гелі

Мета заняття – провести облік результатів ПЛР за допомогою електрофорезу в агарозному гелі з метою встановлення наявності у геномі ділянки *ipt*.

Питання для підготовки до заняття

1. Застосування ПЛР у геносистематиці, діагностиці інфекційних та спадкових захворювань, судово-медичній експертизі.
2. Принцип електрофорезу ДНК у агарозному гелі.

Теоретичні відомості

Облік результатів класичної ПЛР проводять за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Електрофорез в молекулярній біології – це метод, який дозволяє розділити біополімери за їх розмірами під час руху молекул під дією електричного струму. Зразки поміщають у гелеві пластинки, що складаються з агарози або поліакриламідю. Під великим збільшенням структура геля нагадує ситечко з багатьма порами, крізь які можуть рухатися молекули. Гелі готують з порошкоподібних речовин, які після розчинення та певної підготовки залишають застигати на спеціальних підложках, вставляючи так звані гребінки для утворення лунок, в котрі будуть вноситися дослідні зразки. Більш щільні гелі застосовують для розділення невеличких фрагментів ДНК, а більш рідкі – для розділення великих.

Якщо нанести зразки, що містять ДНК, у лунки гелю, помістити гелеву пластинку у камеру для електрофорезу, заповнену спеціальним буфером, та включити джерело живлення, то молекули зразка будуть рухатися крізь гель відповідно до їх зарядів – від негативно зарядженого електроду до позитивно зарядженого. Лунки для внесення зразків ДНК слід розташовувати біля негативно зарядженого електроду. При цьому найменші молекули будуть рухатися скоріше від усіх, а найбільші залишаться недалеко від лунок через повільну

швидкість руху. Біополімери рухаються у вигляді смуг за формою прямокутних лунок, в яких їх було внесено.

Для електрофорезу фрагментів ДНК – ампліконів ПЛР – у нашому випадку слід приготувати 1,5 % агарозний гель. Для того, щоб побачити ДНК у гелевій пластинці, її фарбують бромистим етидієм. Спеціальний буфер для електрофорезу – зазвичай ТБЕ (трис-боратний) може містити у собі бромистий етидій, або ж бромистим етидієм забарвлюють гелеву пластинку окремо, після завершення електрофорезу. Забарвлену пластинку продивляються під ультрафіолетовим світлом, і смуги ДНК світяться рожевим світлом. Необхідно уникати потрапляння бромистого етидію у розчині або порошку у дихальні шляхи, на шкіру і слизові оболонки.

Бромистий етидій – канцероген. Працювати з ним, як і з усіма реагентами для ПЛР, слід тільки у гумових рукавичках.

Для освітлення пластинки УФ-проміннями використовують спеціальні транслюмінатори із захисними екранами, крізь які слід розглядати гель. Ні в якому разі не можна дивитися на УФ-світло без спеціальних окулярів або захисного екрану! Це призведе до опіків очей та шкіри!

Електрофореграму фотографують за допомогою фотоапарату або відеокамери.

Результати ПЛР оцінюють, порівнюючи розмір ампліконів з розміром маркерів молекулярної ваги. Маркери молекулярної ваги – це відомі за розмірами фрагменти ДНК, які вносять в окрему лунку паралельно з внесенням дослідних зразків.

Розмір ампліконів у разі пари праймерів до послідовності *ipt* становить 427 п. о. Фрагменти ампліфікованої ДНК меншого або більшого розміру, які можуть виявитися на електрофореграмі, є неспецифічними ампліконами і вказують на недостатньо збалансовані концентрації реактивів або недотримання умов проведення ПЛР. Неспецифічні амплікони враховувати не слід.

Матеріал та обладнання

1. амплікони після попереднього заняття;
2. форма для заливки гелю з гребінкою для неї;
3. камера для проведення горизонтального електрофорезу та джерело струму;
4. агароза;
5. 1x ТАЕ-буфер;
6. мікрохвильова піч;
7. розчин бромистого етидію;

8. дозатор на 10 мкл та наконечники для нього;
9. буфер для внесення проб;
10. маркер молекулярної ваги;
11. нітрилові рукавички;
12. транслюмінатор;
13. фотоапарат або відеокамера;
14. комп'ютер з відповідним програмним обладнанням для зйомки електрофореграм.

Завдання 1. Приготування 1,5 % агарозного гелю

Хід роботи:

1. Зважити 1,5 г агарози на електронних вагах.
2. Розчинити отриману наважку в 100 мл 1x TAE-буферу.
3. Скип'ятити отриману суміш у мікрохвильовій печі три рази.
4. Зібрати форму для заливки гелю не забувши помістити в неї гребінку, необхідну для формування лунок.
5. Залити розчин агарози в зібрану форму та зачекати її застигання.
6. Вийняти гребінку та помістити гель в камеру для проведення електрофорезу, заливши його до верха 1x TAE буфером.

Завдання 2. Підготовка зразків ДНК, внесення їх у гель та проведення електрофорезу

Хід роботи:

1. Змішати амплікони з буфером для внесення проб у пропорції 1/6.
2. Внести у певному порядку у лунки дослідні зразки і зразки позитивного і негативного контролів.
3. У зошиті занотувати схему розташування зразків.
4. У окрему лунку по центру або з краю пластинки внести маркер молекулярної ваги.
5. Під'єднати камеру до джерела струму та провести електрофореуз при 50 мА.

Завдання 3. Забарвлення та фотографування гелю

Хід роботи:

1. Приготувати розчин бромистого етидію (0,5 мкг/мл). Зберігати його слід при +4°C у темряві.
2. Налити розчин бромистого етидію у ванночку, покласти в неї гелеву пластинку і залишити на 15–20 хвилин (усі роботи проводити у гумових рукавичках!).

3. Помістити гелеву пластинку на транслюмінатор з УФ освітленням та сфотографувати гель отримавши електрофореграму. При огляді не дивитися на УФ-світло без спеціальних окулярів або захисного екрану!

Завдання 4. Заповнити протокол виконання лабораторного заняття

Хід роботи:

1. Внесіть всю інформацію, що стосується виконання лабораторного заняття до таблиці 13.1.

Таблиця 13.1

Протокол виконання лабораторного заняття

Послідовність, яку потрібно виявити	Розмір амплікона	Концентрація агарози, %	Буфер для електрофорезу	Візуалізація ДНК за допомогою

Завдання для самостійної роботи

1. Проаналізувати отриману електрофореграму. Провести облік результатів ПЛР за наявністю або відсутністю ампліконів заданого розміру.
2. Результати електрофореза внести у таблицю 13.2.

Таблиця 13.2

Результати ПЛР

№ лунки									
№ зразка									
Результат ПЛР*									

* - результат ПЛР у нашому випадку, коли треба виявити факт присутності патогена у зразку, оцінюють як “+” або “-”. Це якісна реакція. Інколи треба виявити концентрацію ДНК у ампліконі, яка вказує на первинну кількість патогена у зразку. Тоді виявляють також кількісні характеристики реакції.

3. З отриманих даних зробити висновок про патогенність досліджуваного штаму агробактерій:

Висновок про наявність патогена у зразку		
Назва зразка	Ген <i>ipt</i> виявлено	Ген <i>ipt</i> не виявлено
	Штам є патогенним	Штам не є патогенним

4. Доповнити словник термінів:
Електрофорез ДНК –
Агарозний гель –
Бромистий етидій –

Питання для перевірки знань

1. Яке застосування має класична ПЛР у геносистематиці та при діагностиці інфекційних та спадкових захворювань?
2. Що таке електрофорез ДНК? Де він застосовується при проведенні мікробіологічних досліджень?
3. З яких етапів складається процес проведення електрофорезу ДНК?
4. З чого складається матрикс та буфер для проведення електрофорезу?
5. Що таке маркер молекулярної маси та з якою метою він завжди вноситься у лунки гелю при проведенні електрофорезу?
6. Яких правил техніки безпеки необхідно дотримуватись при проведенні електрофорезу?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. Електрофорез ДНК проводиться у відділі ПЛР-лабораторії, що носить назву:
А. пост-ПЛР блок;
Б. пре-ПЛР блок;
В. ПЛР блок;
Г. правильної відповіді немає.
2. Для забарвлення ДНК після електрофорезу гелі занурюють у розчин наступної сполуки:
А. бромистий етидій;
Б. бромфеноловий синій;
В. ксилен ціанол;
Г. генціановий фіолетовий.
3. Фрагменти ДНК рухаються у гелі при проведенні електрофорезу до:
А. Катоду;
Б. одночасно в обох напрямках;
В. аноду;
Г. спочатку до аноду, а потім до катоду.
4. Матрикс для проведення електрофорезу ДНК найчастіше складається з:
А. поліакриламідом;
Б. агар-агару;
В. агарози;
Г. целюлози.

Список літератури

1. Мерліч А. Г., Жумінська Г. І. Методи біотехнологічних досліджень. Модуль 3. Основні молекулярно-біологічні методи досліджень : метод. рек. до лабораторних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія», 091 «Біологія», 1 рівень навчання. Одеса: Одес. нац. ун-т, 2023. С. 46–47.
URL: <https://drive.google.com/file/d/1r1tSe2pcOtXuhpcnCXyC-bnDWw-kkbxE/view>

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://goldbio.com/articles/article/Interpreting-Gel-Electrophoresis- Results>
2. <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:a03c81b4:html:1>

ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ 14-15

Метод глибинного культивування та побудова кривої росту періодичної культури

Мета заняття – знайомлення з основними принципами глибинного культивування мікроорганізмів та побудовою кривої росту при періодичному культивуванні.

Питання для підготовки до заняття

1. Типи культивування мікроорганізмів.
2. Особливості різних типів глибинного культивування у рідких середовищах: періодичного, продовженого періодичного, багатоциклічного.
3. Основні принципи росту культури при безперервному вирощуванні. Принцип хемостата і турбідостата.
4. Характеристики кожної фази кривої росту: початкова фаза, експоненціальна фаза, стаціонарна фаза, фаза відмирання.

Теоретичні відомості

Культивування мікроорганізмів і крива росту. Проблема культивування мікроорганізмів впритул пов'язана з кінетичною теорією, засновником якої був Моно, що виявив й обґрунтував зв'язок між швидкістю росту культур мікроорганізмів і концентрацією в середовищі субстрату, що

лімітує. Після цього роботи з кінетичного моделювання росту культур мікроорганізмів набули досить велике поширення. У розвиток кінетичної мікробіології великий і багато в чому визначальний внесок внесли дослідники Н. Д. Ієрусалимський, Н. С. Печуркін, І. А. Терсков.

Мікроорганізми, як головна модель для кінетичної теорії були обрані завдяки наступним своїм особливостям:

- високі швидкості розмноження мікроорганізмів;
- великий приріст біомаси;
- висока швидкість росту мікробних популяцій;
- висока швидкість мікроеволюційних процесів у мікробних угрупованнях.

Культивування мікроорганізмів може здійснюватися у двох основних режимах: періодичному й безперервному. Перший тип культивування відноситься до процесів у закритих системах, другий – у відкритих.

Кінетичні моделі росту культур мікроорганізмів. Кінетичні криві росту мікроорганізмів у закритих системах (періодичне культивування) мають складний характер. Виділяють дві основні форми кривих росту – експонентну (J-подібну) і сигмоїдну (S-подібну) (рис. 14.1).

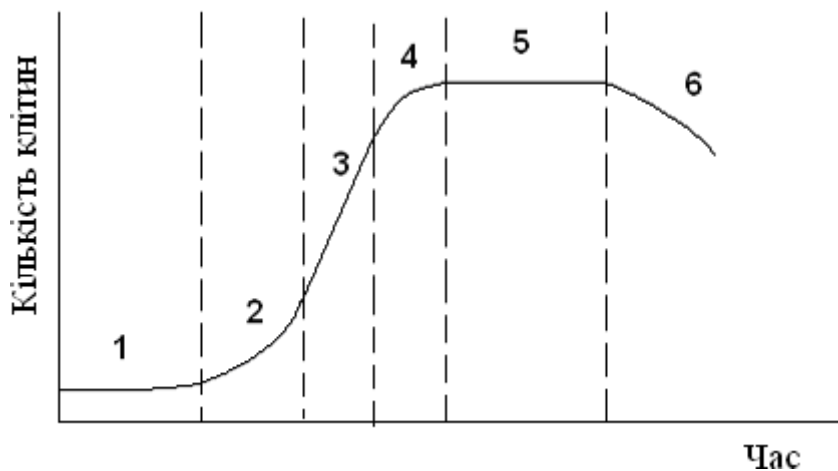


Рис. 14. Типова кінетична крива росту популяції мікроорганізмів

Примітка: 1- індукційний період; 2- фаза експонентного росту;
3- фаза лінійного росту; 4- фаза вповільнення росту; 5- стаціонарна фаза;
6- фаза відмирання культури

Сигмоїдна або S-подібна крива, описує ситуацію, при якій у новому для популяції місцеперебуванні її щільність спочатку зростає повільно (лаг-фаза, відповідна періоду адаптації до умов), а потім швидко, майже експоненційно. По закінченні деякого часу швидкість росту вповільнюється й стає в остаточному підсумку нульовою: народжуваність повністю врівноважується смертністю. Говорять, що крива виходить на плато. Уповільнення росту

популяції пояснюється збільшенням внутрішньовидової конкуренції за ресурси. У результаті по механізму негативного зворотного зв'язку підвищується смертність особин і вповільнюється їх розмноження. Інакше кажучи опір середовища, що зростає, врівноважує біотичний потенціал.

S-подібні криві росту чисельності властиві популяціям багатьох мікроорганізмів. Наочним прикладом може служити ріст бактерій на свіжому культуральному середовищі.

Виділяють кілька фаз у розвитку культури.

1. **Початкова фаза.** Ця фаза охоплює проміжок часу між інокуляцією й досягненням максимальної швидкості розподілу. Після введення інокуляту звичайно спостерігають індукційний період (лаг-фаза) (1), протягом якого не відбувається скільки-небудь помітного збільшення числа кліток або утворення яких-небудь продуктів. У цей період перебудовується метаболізм клітки, синтезуються ферменти, специфічні до використання нових субстратів, активується біосинтез білка. Тривалість цієї фази залежить головним чином від попередніх умов культивування й віку інокуляту, а також від того, наскільки придатне для росту дане середовище. Якщо інокулят узятий зі старої культури (у стаціонарній фазі росту), то клітинам доводиться спочатку адаптуватися до нових умов шляхом синтезу РНК, утворення рибосом і синтезу ферментів. Якщо джерела енергії й вуглецю у новому середовищі відрізняються від тих, які були присутні в попередньому середовищі, то пристосування (адаптація) до нових умов може бути пов'язане із синтезом нових ферментів, які раніше не були потрібні й тому не синтезувалися. Утворення нових ферментів індукується новим субстратом.

Гарним прикладом впливу субстрату на синтез ферментів служить так звана **діауксія** (рис. 14.2). Це явище двофазного росту або подвійного циклу росту спостерігається на середовищах, що містять суміш живильних речовин. Із суміші глюкози й сорбітолу *Escherichia coli*, наприклад, поглинає в першу чергу глюкозу. Глюкоза індукує спочатку в клітинах синтез ферментів, які потрібні для її використання й одночасно пригнічує (репресує) синтез ферментів, необхідних для використання сорбітолу. Ці останні ферменти утворюються лише після того, як уся глюкоза буде витрачена. Такі регуляторні процеси досить добре пояснюють наявність двох початкових фаз.

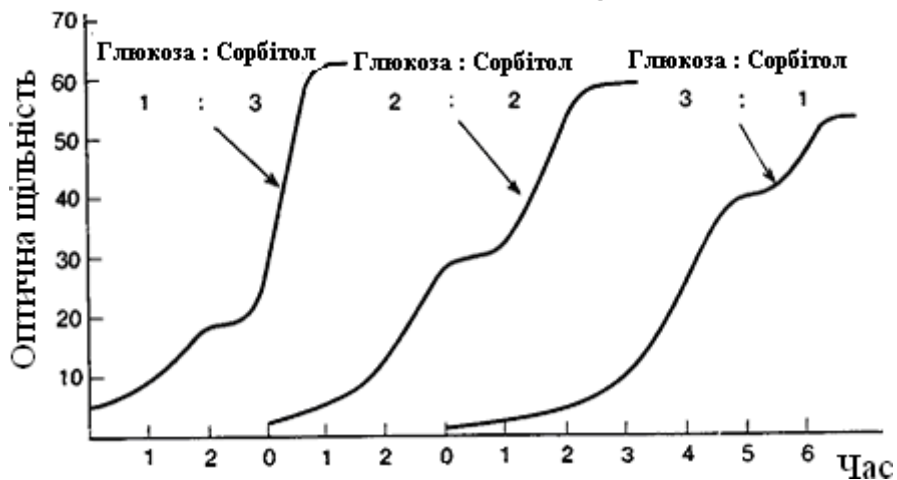


Рис. 14.2. Двофазний ріст (діауксія) *E. coli* у поживних середовищах, що містять глюкозу й сорбітол у різних співвідношеннях

Кількісна зміна складу бактеріальної клітки під час початкової фази росту сильніше всього торкається рибонуклеїнової кислоти: зміст РНК підвищується у 8–12 разів. Це вказує на участь РНК і рибосом у синтезі ферментних білків.

2. Індукційний період переміняється фазою **експонентного росту** (2), протягом якої швидко накопичуються біомаса й продукти різних реакцій. Ця фаза досить строго описується експонентною кривою.

Експонентний ріст без виходу на плато (J-подібна крива) відповідає ситуації, при якій після початкового адаптаційного періоду (лаг-фази) чисельність особин різко зростає. Експонентна (логарифмічна) фаза росту характеризується постійною максимальною швидкістю розподілу клітин. Ця швидкість під час експонентної фази залежить від виду бактерій, а також від середовища.

Величина клітин і вміст в них білка в багатьох бактерій теж залишаються в експонентній фазі постійними. У відомому вмісті можна сказати, що бактеріальна культура в цьому випадку складається зі "стандартних клітин". Якщо точно встановлене, що число клітин, вміст в них білка і їх суха біомаса збільшуються з однаковою швидкістю, то за ростом культури можна стежити, користуючись яким-небудь одним із цих показників.

Подальший ріст популяції може бути незалежним від щільності популяції й концентрації субстрату (так званий необмежений ріст) або залежним від цих факторів. Такий тип популяційного росту зветься залежним від щільності, оскільки для даного набору ресурсів швидкість росту визначається числом особин в обмеженому просторі, займаному популяцією. Кількість організмів, відповідне до виходу кривій на плато (нульова швидкість росту), – це максимальна несуча ємність середовища для даного виду.

Нерідко, однак, і в експонентній фазі росту клітини при періодичному культивуванні перетерплюють зміни, тому що поступово змінюється середовище: зменшується концентрація субстрату, збільшується щільність клітинної суспензії й накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим, що в експонентній фазі швидкість ділення клітин відносно постійна, ця фаза найбільш зручна для визначення швидкості ділення (і швидкості росту). У замкненій системі експонентна фаза росту не може розвиватися необмежено.

3. **Фаза лінійного росту (3)** характеризується рівномірним у часі лінійним ростом культури. При цьому має місце відхилення у бік менших значень кількості клітин або продуктів, що служить експериментальним критерієм переходу культури в лінійну фазу росту. Фаза лінійного росту може змінитися досить нетривалим періодом, протягом якого швидкість росту культури значно знижується. Це **фаза вповільнення росту (4)**.

4. **Стаціонарна фаза росту** настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватися. У деяких випадках це досить стійка по тривалості фаза. У цих умовах культура розвивається в режимі сталості загального числа клітин. Режим характеризується досить високими швидкостями відмирання клітин. При цьому швидкість приросту біомаси повністю компенсується швидкістю загибелі й лізису клітин. Швидкість росту залежить від концентрації субстрату – при зменшенні цієї концентрації, ще до повного використання субстрату, швидкість росту починає знижуватися. Тому перехід від експонентної фази до стаціонарної, відбувається поступово. Швидкість росту може знижуватися не тільки через нестачу субстрату, але також через велику щільність бактеріальної популяції, через низький парціальний тиск O_2 або накопичення токсичних продуктів обміну; всі ці фактори викликають перехід до стаціонарної фази. У стаціонарній фазі можуть ще відбуватися такі процеси, як використання запасних речовин, розпад частини рибосом і синтез ферментів. Спостережувана картина залежить від того, який саме фактор лімітує ріст. Швидко гинуть лише дуже чутливі клітини; інші ще довго зберігають життєздатність – доти, поки є можливість одержувати необхідну для цього енергію в процесі окислення яких-небудь запасних речовин або клітинних білків.

Кількість біомаси, досягнута в стаціонарній фазі, називають виходом або врожаєм. Врожай залежить від природи й кількості використовуваних живильних речовин, а також від умов культивування.

5. **Фаза відмирання.** Якщо система повністю виснажується по субстрату або накопичення інгібуючих ріст продуктів є значним, то швидкість приросту біомаси стає рівною нулю, відбуваються істотні фізіологічні зміни клітин і, як правило, спостерігається фаза відмирання культури (6), супроводжувана часто повним лізисом клітин. Фаза відмирання й причини

загибелі бактеріальних клітин у нормальних живильних середовищах вивчені недостатньо. Порівняно легко зрозуміти випадки, коли в середовищі накопичуються кислоти (при росту *Escherichia*, *Lactobacillus*). Іноді клітини лізуються під дією власних ферментів (автоліз).

Принциповою особливістю кінетики мікробних популяцій є залежність швидкості росту культури від концентрації одного або декількох найбільш важливих компонентів середовища, що забезпечують біосинтетичну основу метаболізму. Ці компоненти, що одержали назву субстратів, що лімітують, деякою мірою регулюють швидкість росту популяції.

У результаті експериментальних досліджень залежності росту культур мікроорганізмів були виявлено дві особливості:

1. Швидкість зміни кількості мікроорганізмів у режимі росту (в експонентній фазі) лінійно пов'язана з початковою концентрацією клітин у системі:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

де N – це число клітин; μ – коефіцієнт пропорційності, що одержав назву питомої швидкості росту:

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

μ має розмірність зворотного часу. Передбачається, що μ не залежить від часу в досліджуваному інтервалі. Властиво це рівняння в інтегральній формі і являє собою рівняння експонентного росту. Його інтегрування при початковій умові $t = 0, N = N_0$ приводить до функції:

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

2. Було знайдено, що в більшості випадків значення питомої швидкості росту залежить від концентрації субстрату, що лімітує, і ця залежність може бути представлена у формі:

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

де μ_m – гранична максимальна питома швидкість росту; K_s – параметр, що має назву константи спорідненості субстрату до мікроорганізму.

Вперше на залежність швидкості росту культури від концентрації субстрату звернув увагу Моно, тому це рівняння одержало назву рівняння Моно. За своєю формою це рівняння відповідає залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (рівняння Міхаеліса – Ментен).

Матеріал та обладнання

1. добова культура мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі МПБ;
2. колби з рідким поживним середовищем для культивування мікроорганізмів (МПБ);
3. гойдалка;
4. пробірки;
5. спиртівки;
6. стерильні піпетки або дозатори з наконечниками для відбору культуральної рідини;
7. спектрофотометр та кювети для нього;
8. 70 % етанол;
9. транспортир.

Завдання 1. Побудова кривої росту

Хід роботи:

1. В 5 колб ємністю 250 мл з поживним середовищем (кількість середовища – 100 мл) внести по 1 мл добової культури мікроорганізмів (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*, *A. tumefaciens*, *Micrococcus sp.*, вирощених на МПБ), використовуючи стерильні скляні піпетки. Працювати необхідно або у боксі, або у лабораторному приміщенні поряд із полум'ям спиртівки.
2. Розташувати колби на гойдалці для утворення умов періодичного культивування за умов аерації при кімнатній температурі.
3. Кожні півгодини (тобто 6 разів) відбирати з кожної колби по 1 мл культуральної рідини. Відбір зразків необхідно проводити в умовах стерильності.
4. У відібраних пробах визначити оптичну щільність за допомогою спектрофотометру SmartSpec (BioRad, США). Для цього необхідно увімкнути прилад за 30 хв до початку роботи, вибрати довжину хвилі 600 нм. Потім, налити в кювету 1 мл МПБ, вставити її в кюветне відділення та натиснути на кнопку «Read Blank». Після обнуління приладу, яке проводиться лише на початку один раз, замінити вміст кювети на відібрану культуру, помістити її в кюветне відділення та натиснути на «Read Sample». Отримані результати стосовно оптичної щільності внести в таблицю 1.
5. На осях координат за визначеними показниками побудувати криву росту для кожної окремої культури мікроорганізмів (рис. 14. 3).

Завдання 2. Визначення тривалості лаг-фази

Хід роботи:

1. Для визначення тривалості лаг-фази отримані дані з оптичної щільності по кожному окремому середовищу (табл. 14.1) наведемо у координатах $\{t, \ln(E_x)\}$. Для цього обчислити натуральний логарифм показників оптичної щільності з таблиці 14.1, та внести значення до таблиці 14.2. На підставі отриманих даних побудувати графік росту оптичної щільності бактеріальної культури у логарифмічному вигляді.
2. На побудованій кривій визначити прояву ефекту початкової затримки росту культури бактерії або лаг-фази (якщо така буде мати місце). У разі присутності ефекту затримки росту лаг-фаза буде відповідати горизонтальній ділянці кривий, а експоненціальна фаза росту – похилій прямий (рис. 14.4).
3. Знайти графічним способом час початку експоненціальної фази росту або лог-фази. Порівняти отримані дані зі значеннями з таблиці 14.1 і 14.2.

Завдання 3. Визначення питомої швидкості росту популяції та періоду подвоювання

Хід роботи:

1. Достеменно визначити початок експоненціальної фази зростання було необхідно, оскільки питома швидкість зростання популяції визначається тільки під час цієї фази. Нелімітований ріст чисельності популяції бактерій описується експоненціальною функцією Мальтуса:

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

де N_0 – початкова численність популяції, μ – питома швидкість зростання популяції, t – тривалість.

2. У нашому випадку, за початкову численність популяції будемо мати початкову оптичну щільність.
3. Для визначення питомої швидкості зростання популяції μ та періоду подвоювання T чисельності популяції використаємо логарифмічну форму цього рівняння:

$$\ln \frac{Ex_t}{Ex_0} = \mu t$$

4. С цією метою кожен елемент 2-6 стовпців необхідно розділити на відповідний початковий елемент і взяти натуральний логарифм цього відношення. Дані занести у таблицю 14.3.

5. Подальше, для кожного окремого спостереження на підставі таблиці 3, необхідно побудувати графік, де по осі абсцис відкладемо час (тривалість дослідження), а по осі ординат – відповідне значення $\ln (E_{x_t} / E_{x_0})$. Дані повинні згрупуватися коло прямої, тангенс кута якого і буде шуканим значенням питомої швидкості зростання популяції (рис. 14.3).
6. Показник періоду подвоювання T знаходимо за формулою:

$$T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Результати обробки даних занести у таблицю 14.4.

7. У виводах з'ясувати, чи є різниця між показниками в залежності від виду мікроорганізмів.

Завдання 4. Заповнити протокол виконання лабораторного заняття

Таблиця 14.1

Показники оптичної щільності залежно від тривалості дослідження та виду мікроорганізмів

Тривалість дослідження (хвилини)	Оптична щільність культур різних мікроорганізмів на поживному середовищі (E_x)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
0					
30					
60					
90					
120					
150					
180					

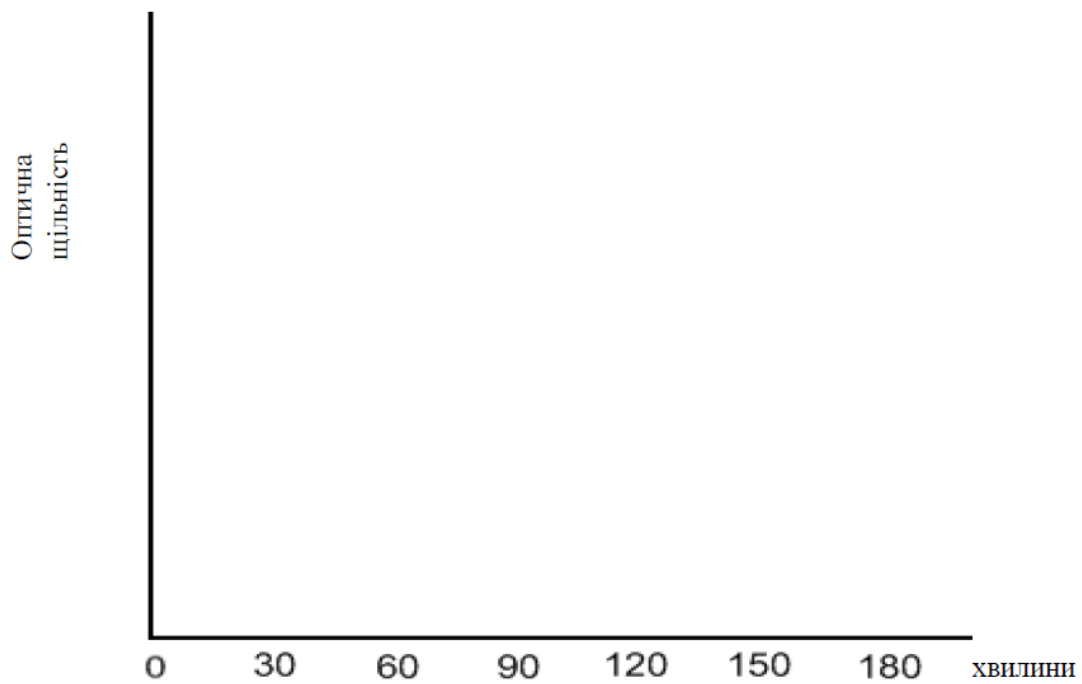


Рис. 14.1. Крива росту бактеріальних культур при періодичному культивуванні в залежності від виду мікроорганізмів

Таблиця 14.2

Натуральний логарифм показників оптичної щільності залежно від тривалості дослідження та виду мікроорганізмів

Тривалість дослідження	Натуральний логарифм оптичної щільності культур мікроорганізмів ($\ln(E_x)$)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
0					
30					
60					
90					
120					
150					
180					

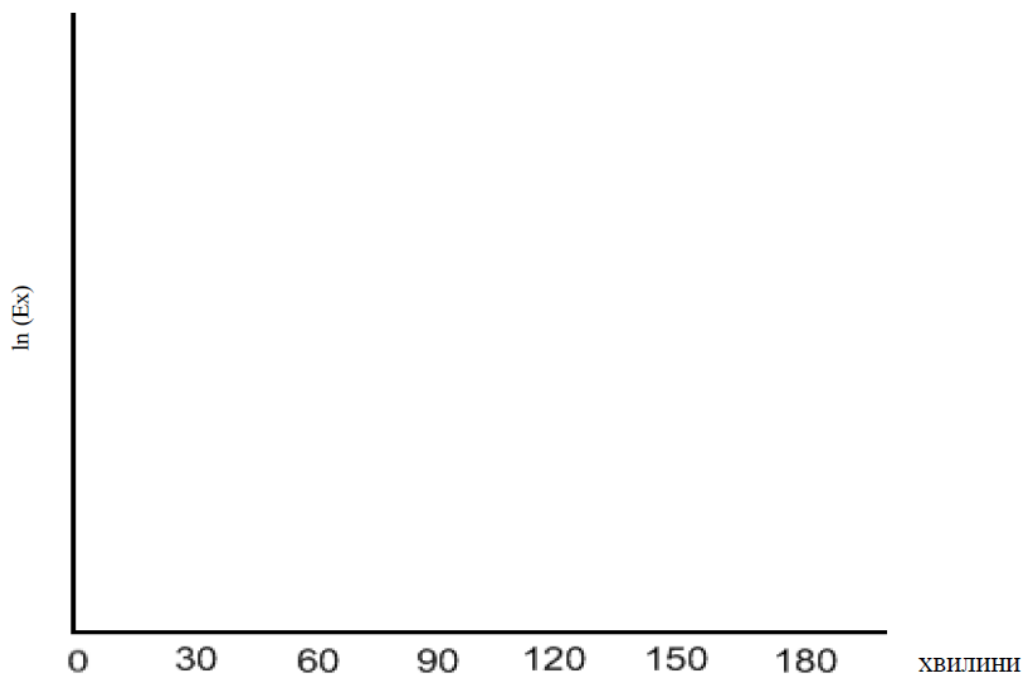


Рис. 14.2. Тривалість лаг-фази і початок експоненціальної фази росту популяцій мікроорганізмів у логарифмічному вигляді

Таблиця 14.3

Показники $\ln (Ex_t/Ex_0)$ в залежності від тривалості дослідження та виду мікроорганізмів

Тривалість дослідження (хвилини)	Показники $\ln (Ex_t/Ex_0)$				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
0					
30					
60					
90					
120					
150					
180					

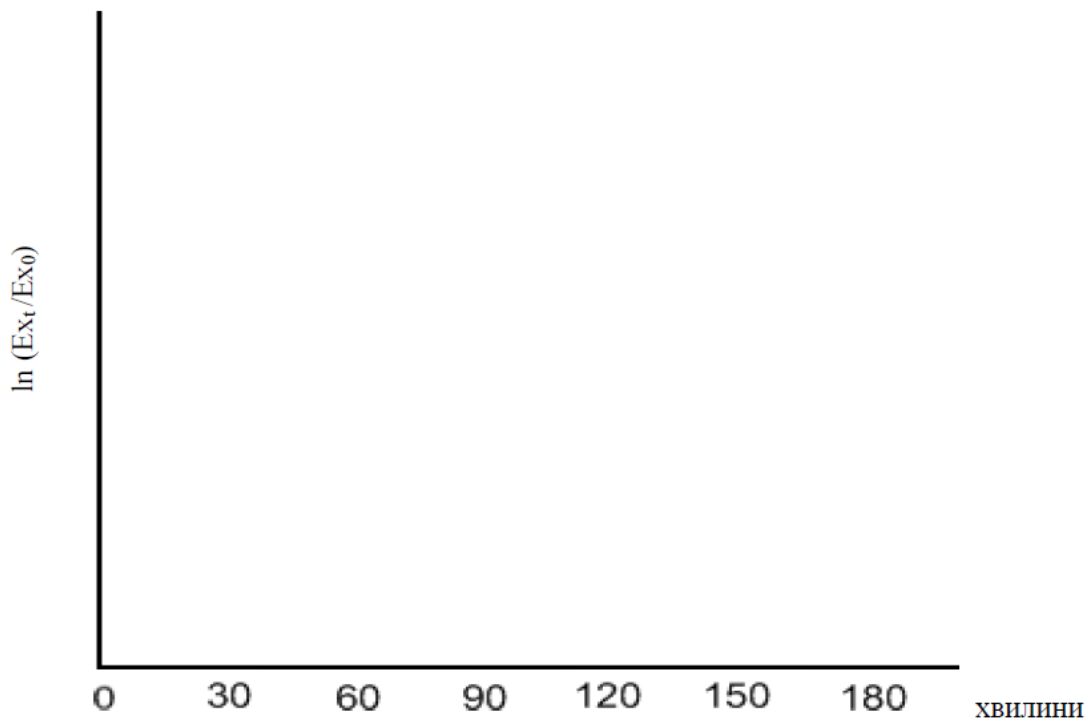


Рис. 14.3. Визначення показників питомої швидкості росту популяцій (μ) клітин мікроорганізмів ($\text{tg}(\alpha)$)

Таблиця 14.4

Показники питомої швидкості зростання популяції та періоду подвоювання в залежності від виду мікроорганізмів

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
μ , час ⁻¹					
<i>T</i> , час					

Завдання для самостійної роботи

- Зробити висновок про залежність значення показників питомої швидкості росту культур мікроорганізмів та їх періоду подвоювання від родової належності бактерій:

Питання для перевірки знань

- Які види культивування мікроорганізмів ви знаєте?
- Чим відрізняється періодичне культивування від безперервного?
- Що таке крива росту? Для чого її будують?

4. Які фази кривої росту спостерігаються при періодичному культивуванні? При безперервному?
5. Що відбувається з мікробною культурою на кожній із фаз кривої росту?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. При періодичному культивуванні виділяють наступну кількість основних фаз кривої росту:
 - А. дві;
 - Б. три;
 - В. чотири;
 - Г. одну.
2. При безперервному культивуванні виділяють наступну кількість основних фаз кривої росту:
 - А. дві;
 - Б. три;
 - В. чотири;
 - Г. одну.
3. Швидкість поділу клітин дорівнює швидкості відмирання при наступній фазі кривої росту:
 - А. лог-фаза;
 - Б. лаг-фаза;
 - В. фаза відмирання;
 - Г. стаціонарна фаза.
4. Перебудова метаболізму клітини, синтез необхідних ферментів для використання нового субстрату відбувається на наступній фазі кривої росту:
 - А. лаг-фаза;
 - Б. лог-фаза;
 - В. стаціонарна фаза;
 - Г. фаза відмирання.
5. Виходом або врожаєм називають кількість біомаси, досягнуту в:
 - А. лог-фазі;
 - Б. лаг-фазі;
 - В. фазі відмирання;
 - Г. стаціонарній фазі.

Список літератури

1. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.

URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

2. Ananthanarayan R. and Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.

URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextbookOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Textbook%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf>

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://app.jove.com/v/10511/growth-curves-generating-growth-curves-using-colony-forming-units-and-optical-density-measurements>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 16

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

Мета – опанувати методику посіву води для визначення колі-індексу та колі-титру.

Питання для підготовки до заняття

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

Теоретичні відомості

Санітарна мікробіологія – це наука, яка вивчає мікробіоту навколишнього середовища та обумовлені 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 облігатної 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 населяють 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 населяють ті ж самі еконіші, що й патогени, тобто, якщо у навколишньому середовищі виявили СПМ у великій кількості, то 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 обсіменінням об'єкта, виявленим за допомогою СПМ, та істинним обсіменінням 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 *E. 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 досліджувану воду

під тиском пропускають крізь нітроцелюлозні фільтри з розмірами пор, меншими за розмір бактеріальних клітин. Фільтр, на якому осіли бактерії, поміщають на поверхню живильного середовища, і через деякий час на фільтрі розвиваються колонії бактерій, які знаходилися у досліджуваній 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 обсіменіння 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.

Таблиця 16.1

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

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.

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 °С).

Матеріал та обладнання

1. середовище Ендо;
2. стерильні чашки Петрі;
3. стерильні посуд та гумові пробки для відбору води;
4. пінцети;
5. спирт;
6. вата;
7. піпетки або дозатори з наконечниками;
8. спиртівки та 96 % етанол для них.

Завдання 1. Підготовка чашок Петрі з середовищем

Хід роботи:

1. Розплавити середовище Ендо на водяній бані.
2. Трішки охолодити середовище та розлити його по 15–20 мл у стерильні чашки Петрі в ламінарному боксі.

Завдання 2. Здійснити відбір води з джерела водопостачання

Хід роботи:

1. Зразки об'ємом не менше 0,5 л відібрати з вуличних водозборів 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.
2. Нітроцелюлозні фільтри кип'ятити 3–5 разів по 10 хвилин у дистильованій воді, зберігати у стерильному посуді і повторно кип'ятити в день постановки досліду.
3. Апарат Зейтца перед роботою простерилізувати фламбуванням за допомогою довгого пінцету, обгорнутого ватою, змоченою у спирті.
4. Після вистигання профламбованого апарату Зейтца на фільтрувальний столик покласти фільтр за допомогою профламбованого пінцету і обережно закріпити його верхньою частиною апарату.
5. 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.

- 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 °С на добу.

Завдання для самостійної роботи

- Заповнити протокол виконання лабораторного заняття (табл. 16.2).

Таблиця 16.2

Протокол виконання лабораторного заняття по визначенню санітарного стану води

Місце відбору зразка	Номер зразка	Середовище для висіву	Кількість повторностей

- Доповнити словник термінів:
 Санітарна мікробіологія –
 Санітарно-показові мікроорганізми –
 Колі-індекс –
 Колі-титр –
 Мікробне число –

Питання для перевірки знань

- Чим займається санітарна мікробіологія?
- З якою метою проводяться санітарно-мікробіологічні дослідження?
- Охарактеризувати санітарно-показові мікроорганізми. Навести приклади.
- Що таке колі-індекс? Колі-титр?
- Що таке мікробне число? Для чого воно визначається?
- Як здійснюється правильний відбір проб води та їх висів для визначення її санітарного стану?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

- Найменший об'єм води, в якому ще виявляється хоча б одна клітина кишкової палички це:
 А. колі-індекс;
 Б. мікробне число;
 В. колі-титр;
 Г. граничне розведення.

2. Показник, що відображає загальну кількість мікроорганізмів у 1 мл води носить назву:
 - А. колі-індекс;
 - Б. мікробне число;
 - В. колі-титр;
 - Г. граничне розведення.
3. До санітарно-показових мікроорганізмів належить:
 - А. *Clostridium*;
 - Б. *V. cholerae*;
 - В. *S. typhi*;
 - Г. жоден із них.
4. Показник, що відображає обсіменіння води *E. coli* носить назву:
 - А. мікробне число;
 - Б. колі-індекс;
 - В. колі-титр;
 - Г. граничне розведення.
5. Якщо у 1 л досліджуваного зразка води виявили 30 клітин кишкової палички, то колі індекс становитиме:
 - А. 0,03;
 - Б. 0,3;
 - В. 30;
 - Г. 3.

Список літератури

1. Філімонова Н. І., Сілаєва Л. Ф., Дика О. М. та ін. Мікробіологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. С. 676.
URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>
2. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://www.wcs-group.co.uk/wcs-blog/water-quality-water-microbiology-and-common-contaminants>

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 17

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

Мета заняття – визначення колі-індексу та колі-титру води з водогону.

Питання для підготовки до заняття

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.

Теоретичні відомості

Диференційно-діагностичне середовище Ендо, яке використовують для виявлення кишкових паличок, містить у якості джерела живлення лактозу. До складу середовища також входить фуксин, знебарвлений сірчанистокислим 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 (таблиця 17.1).

Схема ідентифікації БГКП

Наявність на середовищі Ендо округлих колоній вишневого кольору (рожевих, безбарвних)		
<i>Так</i> ↓		<i>Ні</i>
Мікроскопія за Грамом		БГКП відсутні
Грамнегативні палички ↓	Грампозитивні палички	
Оксидазний тест		БГКП відсутні
Негативний	Позитивний	
Колонія, що утворена БГКП	БГКП відсутні	

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 з ДСТУ: колі-індекс – не більше 3, колі-титр – не менше 300 мл.

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

Наприклад, для води титр = 1000 мл/індекс;
індекс = 1000 мл/титр.

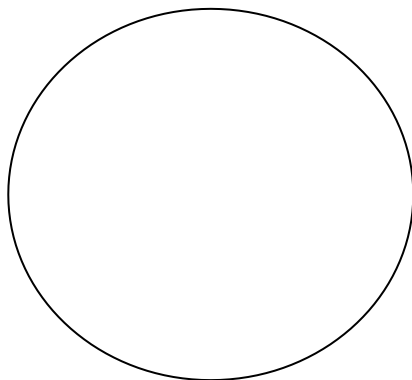
Матеріал та обладнання

1. чашки з засіяним середовищем Ендо;
2. бактеріологічні петлі;
3. предметні скельця;
4. набори для забарвлення за Грамом;
5. імерсійна олія;
6. мікроскопи з імерсійними об'єктивами;
7. набори для тестування на наявність оксидази;
8. спиртівки та 96 % етанол для них.

Завдання 1. Облік результатів посівів, зроблених на минулому занятті

Хід роботи:

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. Замалювати мікроскопічну картину та підписати її.



3. Якщо бактерії у мазках є грамнегативними, провести з ними тест на наявність оксидази.
4. Підрахувати кількість округлих колоній грамнегативних, оксидазонегативних бактерій.
5. Користуючись схемою, наведеною у теоретичних відомостях (табл.17.1) провести ідентифікацію виділених БГКП із морської води.

Завдання 2. Визначення колі-індексу та колі-титру

Хід роботи:

1. За формулами, наведеними у теоретичній частині заняття, розрахувати колі-індекс та колі-титр.

Місце для розрахунків:

2. Отримані дані внести до таблиці 17.2.

Таблиця 17.2

Дані по колі-індексу та колі-титру досліджуваної проби води

Місце відбору води	Кількість колоній БГКП	Колі-індекс	Стан дослідженої води

Завдання для самостійної роботи

1. Зробити висновок про санітарно-мікробіологічний стан води з досліджуваного джерела водопостачання:

Питання для перевірки знань

1. Яким чином проводять облік результатів посівів води на санітарний стан?
2. Який хімічний склад та колір середовища Ендо?
3. Які характеристики є властивими для БГКП?
4. Як ідентифікують представників групи БГКП?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань

1. До складу середовища Ендо входять:
 - А. лактоза, фуксин, сірчанистоокислий натр;
 - Б. глюкоза, сафранін, сірчанистоокислий натр;
 - В. лактоза, фуксин, сірчаноокислий калій;
 - Г. лактоза, сафранін, сірчанистоокислий натр.
2. Колонії бактерій групи БГКП найчастіше виглядають на середовищі Ендо:
 - А. безбарвними на червоному фоні середовища;
 - Б. рожевими на червоному фоні середовища;
 - В. червоними на фоні середовища солом'яного кольору;
 - Г. безбарвними на фоні середовища солом'яного кольору.
3. До БГКП відносять мікроорганізми з наступними характеристиками:
 - А. грампозитивні, оксидазонегативні, які утворюють на Ендо характерні колонії;
 - Б. грамнегативні, оксидазопозитивні, які утворюють на Ендо характерні колонії;

- В. грамнегативні, оксидазонегативні, які не утворюють на Ендо характерні колонії;
 - Г. грамнегативні, оксидазонегативні, які утворюють на Ендо характерні колонії.
4. Колонії БГКП мають бути:
- А. округлими;
 - Б. розгалуженими;
 - В. з ризоїдними краями;
 - Г. усі варіанти вірні.

Список літератури

1. Філімонова Н. І., Сілаєва Л. Ф., Дика О.М. та ін. Мікробіологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. С. 676.
URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>
2. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar+-+Textbook+of+Microbiology.pdf

Електронні та інформаційні ресурси

1. <https://asm.org/videos/microbiology-is-safe-drinking-water>
2. https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/02/4_Enterobacteriaceae.pdf

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Єлинська Н. О., Васильєва Н. Ю., Зінченко О. Ю. Малий практикум з мікробіології : метод. посіб. для студентів 3-го курсу біологічного факультету ОНУ. Одеса : Одес. нац. ун-т, 2015. С. 60.
2. Климнюк С. І., Ситник І. О., Ширококов В. П та ін. Практична мікробіологія: навчальний посібник. Вінниця: Нова Книга, 2018. С. 576.
URL: <http://ir.librarynmu.com/bitstream/123456789/5410/1/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0%20%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F.pdf>
3. Люта В. А., Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. Київ: Здоров'я, 2001. С. 280.
URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/6399_01.pdf
4. Мерліч А. Г., Жумінська Г. І. Методи біотехнологічних досліджень. Модуль 3. Основні молекулярно-біологічні методи досліджень : метод. рек. до лабораторних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія», 091 «Біологія», 1 рівень навчання. Одеса: Одес. нац. ун-т, 2023. С. 46–47.
URL: <https://drive.google.com/file/d/1r1tSe2pcOtXuhpcnCXyC-bnDWw-kkbxE/view>
5. Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія. Іваниця В. О. [та ін.]. Одеса: ОНУ, 2021. С. 282.
URL: <https://www.doi.org/10.18524/978-617-689-454-4>
6. Філімонова Н. І., Сілаєва Л. Ф., Дика О. М. та ін. Мікробіологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. С. 676.
URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>
7. Ястремська Л. С., Малиновська І. М. Загальна мікробіологія і вірусологія. Навчальний посібник. Київ: НАУ, 2017. С. 232.
URL: https://er.nau.edu.ua/bitstream/NAU/38706/1/%D0%97%D0%9C%D0%92_%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%81.1-50%20%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B8%D1%81%D1%82.pdf
8. Ananthanarayan R. and Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 7th Edition. Chennai: Orient Longman, 2005. P. 658.
URL: <https://ia600107.us.archive.org/6/items/AnanthanarayanAndPanikersTextb>

o okOfMicrobiology7thEdition/Ananthanarayan%20and%20Panikers%20Text
book%20of%20Microbiology%2C%207th%20Edition.pdf

9. Davis R. W., Botstein D., Roth J. R. A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. New York: Cold Spring Harbor, 1980. C. 251.
10. Ibryamova S., Arhangelova N., Koynova T. et al. Antifungal activity of Lactic acid bacteria, isolated from *Mytilus galloprovincialis* Lam. in the Bulgarian Black Sea aquatory. *Journal of IMAB*. 2020. V. 26, № 1. P. 2875–2882.
DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2020261.2875>
11. Kumar S. Textbook of Microbiology. New Delhi, Panama City, London, Dhaka, Kathumandu: Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd, 2012. P. 784.
URL: https://www.researchgate.net/profile/Abdelrahman-Zueter/post/What_book_for_basic_microbiology_in_human_and_what_book_genetic_engineering_for_basic/attachment/59d63056c49f478072ea0769/AS%3A273602740457479%401442243384960/download/Surinder+Kumar++Textbook+of+Microbiology.pdf
12. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. V. 63, P. 1–15.
Doi: 10.3791/3998.
13. Szegedi E. and Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. *Vitis*. 2002. V. 41 (1), P. 37–42.
URL: <https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/article/view/4436/4382>
14. Trivedi P. C., Pandey S., Bhadauria S. The book of Microbiology. Jaipur: Aavishkar Publishers, 2010. P. 446.
URL: https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Microbiology/Text_Book_of_Microbiology.pdf

Навчальне видання

МІКРОБІОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
денної форми навчання спеціальності 091 Біологія

Електронне практичне видання

Укладачі:

Мерліч Андрій Геннадійович

Ямборко Ганна Валентинівна

Васильєва Наталія Юріївна

Страшнова Ірина Валентинівна

В авторській редакції

Затвердж. авт. 08.11.2024. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 2,2 МБ. Зам. № 2836.

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