

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНІКА»**

КАФЕДРА БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ**

«МІКРОБІОЛОГІЯ»

Для студентів напряму підготовки 6.140101 «Готельно-ресторанна справа»
та спеціальності 7.04010401 «Географія»

**Івано-Франківськ
2016**

Автор-укладач: к.б.н. Абрят О.Б.

Посібник орієнтований на допомогу у виконанні лабораторних робіт та самостійної роботи студентів напряму підготовки 6.140101 «Готельно-ресторанна справа» та спеціальності 7.04010401 «Географія» спеціалізація «Вчитель географії, біології та основ економіки; організатор краєзнавчо-туристичної роботи». Методичні вказівки містять роботи, які дозволяють студентам оволодіти навичками роботи з мікроорганізмами, вивчити їх морфологію, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості, освоїти методи мікробіологічного дослідження об'єктів навколишнього середовища та харчових продуктів.

Затверджено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології Інституту природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника» (протокол №17 від 26 лютого 2016 р.)

Затверджено до друку вченою радою Інституту природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника» (протокол № 7 від ___ березня 2016 р.)

Рецензенти:

к.б.н., доцент кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, Байляк М.М.

к.б.н., доцент кафедри біології та екології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, Заморока А.М.

ВСТУП

Методичні вказівки до лабораторних занять з курсу «Мікробіологія» орієнтовані на допомогу студентам денної і заочної форм навчання напряму підготовки 6.140101 «Готельно-ресторанна справа» та спеціальності 7.04010401 «Географія» спеціалізація «Вчитель географії, біології та основ економіки; організатор краєзнавчо-туристичної роботи». У посібнику викладені методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт, а також основні теоретичні відомості до даної теми. Лабораторні роботи стосуються питань загальної мікробіології, програма якої включена у підготовку студентів обох зазначених спеціальностей, а також додаткові роботи по спеціальній мікробіології (санітарно-мікробіологічний контроль води, приміщень та організму людини, виділення мікроорганізмів із природних середовищ та мікробіологічний аналіз продуктів харчування), які більше зорієнтовані на студентів спеціальності «Готельно-ресторанна справа».

Підготовка до лабораторного заняття передбачає теоретичне опрацювання матеріалу даної теми і знайомство з методикою виконання роботи. До початку заняття в робочому зошиті повинні бути описані принцип методу та хід роботи. По закінченні практичної частини студенти захищають роботу у викладача.

Мета курсу – вивчення основ сучасної мікробіології та отримання практичних навиків у об'ємі, необхідному для розуміння основних закономірностей життя і розвитку мікроорганізмів, їх ролі у природі, в основі технологій багатьох харчових виробництв, сільському господарстві та медицині.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен набути таких компетенцій: *знати* основні завдання та значення курсу; принципи систематики мікроорганізмів; особливості мікрофлори ґрунту, повітря, води, організму людини; типи взаємовідносин мікроорганізмів між собою та іншими організмами; *освоїти* найважливіші біохімічні процеси, які проходять за участю мікроорганізмів; фактори патогенності у мікроорганізмів та механізмів протиінфекційного захисту; вивчити основні методи контролю мікробіологічного та санітарно-гігієнічного стану виробництва; використання мікроорганізмів у промисловості, народному господарстві та медицині; мікробіологічні процеси, які мають місце при зберіганні та переробці харчової сировини; *вміти* користуватись приладами та обладнанням мікробіологічної лабораторії; готувати тимчасові та постійні препарати для мікроскопії та мікроскопувати їх при різному збільшенні; виділяти чисту культуру мікроорганізмів; відбирати зразки води, ґрунту і повітря та здійснювати їх бактеріологічне дослідження; виявляти та ідентифікувати збудників псування харчових продуктів та різних видів бродінь; здійснювати санітарно-мікробіологічний контроль стану виробництва; оформляти результати практичних робіт; користуватись довідниками та посібниками з мікробіології; застосовувати теоретичні знання на практиці.

МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ ТА ПРАВИЛА РОБОТИ В НІЙ

Особливістю мікробіологічних робіт є постійний контакт працівників лабораторії з біологічно-небезпечним матеріалом: культурами патогенних мікроорганізмів, тканинами, кров'ю і виділеннями живих організмів тощо. Тому всі працівники мікробіологічної лабораторії зобов'язані дотримуватись державних санітарних правил безпеки роботи з мікроорганізмами ДСП 9.9.5.035-99 затверджених МОЗ України, а також наступних правил роботи, які забезпечують стерильність в роботі і попереджують можливість зараження:

1. До приміщення мікробіологічної лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу - халату.
2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.
3. Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
4. Двері мікробіологічної лабораторії повинні бути постійно зачиненими.
5. В приміщенні мікробіологічної лабораторії категорично заборонено палити, вживати їжу, зберігати продукти харчування.
6. Весь матеріал, який потрапляє до мікробіологічної лабораторії для аналізу повинен трактуватися як інфікований.
7. При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезинфікуючим розчином.
8. Переливання рідин, які містять патогенні мікроорганізми, здійснюють над посудиною з дезинфікуючим розчином.
9. У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витік слід негайно повідомити відповідальну особу і провести заходи для обеззараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.
10. При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.
11. По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезинфікувати.
12. Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук - по закінченні роботи руки дезинфікуються.
12. Мікробіологічний матеріал та культури мікроорганізмів, які потрібні для подальшої роботи, здаються відповідальній особі.

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає, щоб приміщення лабораторії було ізольованим від інших кімнат. До мікробіологічної лабораторії належать: приміщення для бактеріологічних досліджень; стерильний бокс для виконання робіт в стерильних умовах; передбоксник, де знаходиться стерильний матеріал; автоклавна для стерилізації посуду, живильних середовищ та знешкодження відпрацьованого матеріалу; приміщення для миття посуду та приготування середовищ. Бокс повинен бути обладнаним бактерицидною лампою, стіни і підлога вистелені плиткою або лінолеумом, що забезпечує можливість використання дезинфікуючих розчинів при прибиранні кімнати.

До необхідних інструментів та обладнання мікробіологічної лабораторії відносять:

- ✓ набір фарб і реактивів для фарбування препаратів;
- ✓ пристрої для фарбування препаратів;
- ✓ скельця предметові та покривні;
- ✓ штативи для пробірок;
- ✓ петлі бактеріологічні;
- ✓ шпателі скляні та металеві;
- ✓ пінцети, ножиці, скальпелі, шприци;
- ✓ ємності з дезинфікуючими розчинами;
- ✓ олівці по склу;
- ✓ газові пальники;
- ✓ мікроскопи з освітлювачами;
- ✓ терези;
- ✓ набір стерильного посуду (чашки Петрі, пробірки, колби, мірні пляшки, піпетки градуйовані, скляні матраци тощо).

Мікробіологічна лабораторія обладнана шафами для зберігання стерильного посуду і середовищ, термостатами, холодильниками, центрифугами, пристроями для культивування мікроорганізмів при постійному струшуванні (качалки), фотоелектроколориметром, обладнанням для проведення необхідних біохімічних досліджень.

Лабораторна робота №1 МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ

Мета роботи: ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії, з особливостями підготовки приміщення, обладнання і лабораторного посуду до роботи з мікроорганізмами.

Матеріали та обладнання: пальники, спиртівка, автоклав, сушильна шафа, фільтри, бактерицидні лампи, піпетки, чашки Петрі, шпателі, пробірки, колби, предметні скла, пергаментний папір, вата, марля, термостат, електрична плита, свіжовиготовлений м'ясний бульйон.

Теоретичні відомості

Стерилізація – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці. В практичній роботі стерилізацію трактують, як методи які застосовують для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів стерилізації. Стерилізують живильні середовища, посуд, інструменти з метою не допустити розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах. Розрізняють стерилізацію: термічну, хімічну, фільтруванням та опроміненням.

Термічна стерилізація

Прожарювання вогнем (фламбування) у верхньому полум'ї пальника (рис. 1) застосовують безпосередньо перед використанням для стерилізації петель, голок, пінцетів, ножиць, шпательів, скляних паличок, предметних та покривних скелець та іншого дрібного інструменту.

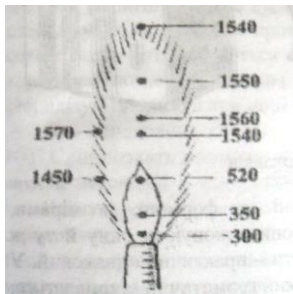


Рис. 1. Значення температури (у °С) в різних ділянках газового пальника.

Кип'ятіння у воді використовують для стерилізації шприців, голок, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду, фільтрів у стерилізаторах. При цьому гинуть, в основному, вегетативні клітини, спори бактерій зберігають життєздатність.

Пастеризація – одноразовий короточасний прогрів матеріалу при температурах, нижчих 100°C, для знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Луї Пастер. Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості, для обробки продуктів, які втрачають смакові і поживні якості при кип'ятінні: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін. Пастеризацію зазвичай проводять при 60°C–75°C протягом 15–30 хв чи при 80°C 15 хв. Інколи нагрівають матеріал до 90°C і одразу ж охолоджують.

Стерилізацію сухим жаром при температурі 170°C, 160°C або 140°C здійснюють у сушильних шафах відповідно протягом 1 год, 2 год та 3 год. Нагрівання за допомогою сухого жару справляє значно слабший вплив на мікроорганізми, ніж волога пара. В той же час можуть серйозно пошкоджувати такі матеріали, як гума, папір, вата, тканина. Тому цей прийом переважно використовують для стерилізації предметів, які є непроникними для пари, зокрема посуду (чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо).

Перед стерилізацією пробірки і колби закривають корками. Ватно-марлеві корки не тільки захищають посуд та його вміст від потрапляння сторонніх мікроорганізмів, але на відміну від інших (гумових, алюмінієвих, пластмасових), забезпечують повітрообмін із зовнішнім середовищем. При стерилізації скляних піпеток їх верхні кінчики також

закривають шматочками вати. При роботі з ними доцільно користуватися гумовими грушами, але зручніше використовувати спеціальні автоматичні піпетки з одноразовими змінними наконечниками. Пробірки з корками завертають у папір по 10–15 шт., а чашки Петрі – по 2–3 шт. Кожну піпетку щільно обгортають паперовими смужками, а корки на колбах накривають фольговими ковпачками. У такому вигляді посуд вміщують до сушильної шафи і стерилізують.

Температура в сушильній шафі не повинна перевищувати 170°C, оскільки у протилежному випадку з вати та деяких сортів паперу можуть виділятися смолисті речовини, жирні кислоти, які мають здатність пригнічувати ріст мікроорганізмів. Ці речовини у невеликих кількостях також можуть виділятися й при значно нижчих температурах, а при охолодженні шафи осаджуватись на її стінках. Тому час від часу слід очищувати стінки печі. Для попередження інтенсивного змішування холодного забрудненого повітря зі стерильним вмістом шафи, її небажано відкривати до охолодження.

Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) - найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації живильних середовищ і посуду. Цей метод ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску, вищому від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні її тиску. Наприклад, при тиску 1,5 атм. температура пари становить 127°C, 2 атм. – 135°C.

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини і найстійкіші спори. Стерилізацію парою під тиском здійснюють у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах. Для правильного автоклавування необхідно повністю витіснити повітря з робочої камери, оскільки повітря затримується між предметами, які автоклавуються, внаслідок чого вони можуть не нагріватися до заданої температури. Крім того, заповнювати автоклав слід таким чином, щоб не перешкоджати вільному рухові пари.

Температура і тривалість автоклавування живильних середовищ визначається, перш за все, їх складом. Термолабільні субстрати (молоко, желатинові середовища, середовища з цукрами, вітаміни тощо) зазвичай стерилізують при 0,5 атм. протягом 15-30 хв, пивне сусло та сусло-агар при 0,7 атм. 20 хв, м'ясо-пептонні середовища при 1 атм. 20 хв.

Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкцій. Оскільки автоклав – апарат, який працює при високому тиску і високій температурі, неправильна експлуатація його може бути причиною нещасних випадків. Для роботи з автоклавом допускаються тільки особи, які мають спеціальну підготовку і дозвіл відповідної інстанції.

Для контролю правильного режиму стерилізації використовують кілька методів: за допомогою прямого вимірювання температури, максимальних термометрів або хімічних індикаторів. Перший спосіб

здійснюють за допомогою термопар, розташованих в різних частинах камери. Зручнішим є використання максимальних термометрів та патентованих хімічних індикаторів. Останні змінюють своє забарвлення внаслідок прогрівання протягом певного часу при заданій температурі.

Хімічна стерилізація

Хімічну стерилізацію використовують для дезінфекції приміщень, столів, знищення патогенних культур мікроорганізмів тощо.

Для стерилізації цим методом застосовують солі важких металів (найчастіше ртуті, міді, цинку), 50-60%-ний розчин етилового спирту, β -оксихіноліну, лізол, формалін (41%-ний розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, пероксид водню, перманганат калію, β -пропіолактон, йод, йодоформ, детергенти та інші хімічні сполуки.

Обладнання, яке має дзеркальні, оптичні поверхні, радіодеталі, а також вироби з термолабільних пластмас (чашки Петрі, центрифужні пробірки тощо) стерилізують, застосовуючи газовий метод. Найчастіше використовують оксид етилену, метилбромід, формальдегід, β -пропіолактон, озон тощо. Газову стерилізацію здійснюють у спеціальних герметичних апаратах. При стерилізації строго контролюють концентрацію газу, тиск, вологість, температуру і тривалість обробки, у більшості випадків процес відбувається при температурі 45°C–70°C. Режим стерилізації різними газами неоднаковий. Предметами, простерилізованими газами, можна користуватися лише через 24 години (після десорбції газів).

Стерилізація ультрафіолетовими променями

Приміщення (стерильні бокси, операційні, реанімаційні), інколи вироби з термолабільних пластмас, стерилізують за допомогою ультрафіолетових променів у діапазоні 260-280 нм. Час опромінення, який встановлюють експериментально, залежить від потужності бактерицидної лампи, від величини об'єкту стерилізації. При обробці УФ-променями дрібних предметів їх одразу після стерилізації кладуть у стерильний обгортковий матеріал або стерильний посуд, де і зберігають до використання.

Стерилізація фільтруванням

Метод часто застосовують для стерилізації субстратів, які не витримують нагрівання, зокрема, сироваток, рідких середовищ і розчинів, до яких входять термолабільні білки, вітаміни, вуглеводи, деякі антибіотики. Спосіб полягає в пропусканні рідин через спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менший за розміри бактерій.

У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують:

1. Мембранні (колоїдні) фільтри, виготовлені на основі ефірів целюлози. Це диски різного діаметру товщиною 0,1-0,5 мм. Розміри пор вітчизняних мембранних фільтрів коливаються в межах від 0,35 до 3,5

мкм. Фірма “Міліпор” (Франція, США) продукує фільтри з розміром пор від 0,01 до 14 мкм, фірма “Синпор”(Чехія) – від 0,12 до 4 мкм.

На практиці придатність фільтрів для стерилізації встановлюють шляхом пробного фільтрування через них суспензії дрібних мікроорганізмів (наприклад, *Serratia marcescens*). Для перевірки на стерильність фільтрат у великих кількостях висівають на живильні середовища. Якщо протягом 5-ти діб тест-мікроорганізм не проросте, фільтри можуть бути використані для стерилізації.

2. Азбестові фільтри Зейца виготовляють з суміші азбесту і целюлози. Їх недоліком є те, що азбест адсорбує речовини рідини, а фільтрат забруднюється волокнами.

3. Пористі скляні фільтри виготовляють з фрагментів скла “пірекс”, сплавляючи їх диски фільтрів впаяні в скляні лійки – держачи різної форми. Скляні фільтри нестандартні, тому перед використанням їх обов’язково перевіряють, як і мембранні фільтри.

Для прискорення фільтрації на фільтрі, зазвичай, створюють перепад тисків, якого найчастіше досягають відкачуванням повітря з допомогою вакуумного насоса чи компресора.

Серйозним недоліком цього способу стерилізації є те, що фільтрування через будь-який фільтр, окрім видалення з розчину суспендованих у ньому частинок, може також призвести до різкої зміни властивостей фільтрату. Так, при фільтруванні може змінюватись рН незабуференого розчину, у фільтрат можуть потрапляти різного роду іони, гліцерин тощо.

Практичне завдання:

Простерилізувати різними методами рідке живильне середовище та оцінити якість стерилізації.

Хід роботи.

Свіжовиготовлений м’ясний бульйон розлити у 12 стерильних пробірок. Чотири пробірки кип’ятити 30 хв. Інші чотири – простерилізувати в автоклаві 15 хв. при 1 атмосфері. Останні чотири пробірки залишити без обробки. Після цього всі пробірки помістити у термостат при температурі 28⁰–30⁰С і спостерігати за ними протягом 4–5 діб, відмічаючи зміни, які відбуваються в пробірках. Результати досліджень свідчать, що тільки після автоклавування живильне середовище надовго залишається стерильним. При інших методах обробки у пробірках спостерігається утворення плівок та каламуті внаслідок розмноження бактерій.

Мікроскоп складається з двох частин – механічної та оптичної (рис.2).

Механічна частина мікроскопа складається зі штатива, предметного столика і тубуса. Під предметним столиком на штативі закріплений кронштейн конденсора, який пресується в межах 20 мм за допомогою спеціального гвинта. Верхня частина штатива (тубусотримач) може рухатися за допомогою макрометричного і мікрометричного гвинтів, призначених для грубого і точного фокусування. При обертанні гвинтів за годинниковою стрілкою тубус опускається в напрямку до препарату, при обертанні проти неї – від препарату.

Предметний столик, на який поміщають препарат, може рухатися у взаємоперпендикулярних площинах за допомогою гвинтів. В його центрі знаходиться отвір для освітлення препарату. На столику вмонтовані два затискачі для закріплення препарату.

Оптична частина мікроскопа складається з освітлювального апарату, об'єктивів і окуляра. До освітлювальної системи, яка знаходиться під предметним столиком, входять дзеркало і конденсор. Один бік дзеркала плоский, інший – увігнутий. Конденсор призначений для фокусування паралельних променів, які йдуть від джерела світла, в площині препарату. Тому при роботі з конденсором слід користуватись тільки плоским дзеркалом. Увігнутим дзеркалом користуються при роботі без конденсора з об'єктивами малих збільшень. Лінзи конденсора вмонтовані в металеву оправу, сполучену з механізмом, який дозволяє рухати конденсор по вертикалі. Для регулювання інтенсивності освітлення в конденсор вмонтована ірисова (пелюсткова) діафрагма, яка складається зі сталевих серпоподібних пластинок. Для отримання чіткішого зображення досліджуваного об'єкту важливо відрегулювати ступінь розкриття діафрагми. Зафарбовані препарати краще розглядати при майже повністю відкритій діафрагмі, незафарбовані – при зменшеному отворі діафрагми.

Об'єктив мікроскопа це багатолінзова короткофокусна система. Зовнішня лінза, яка обернена до препарату плоским боком, називається *фронтальною*. Вона забезпечує збільшення. Інші лінзи об'єктива переважно відповідають за корекцію оптичних недоліків, які виникають під час дослідження препаратів. Об'єктиви бувають сухими та імерсійними. Під час роботи із *сухими об'єктивами* між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом дослідження знаходиться повітря. При роботі з імерсійною системою об'єктив занурюється у краплю рідкого однорідного середовища. Працюючи із сухим об'єктивом частина світлових променів відхиляється і не потрапляє в око спостерігача внаслідок різниці показника заломлення скла (1,52) та повітря (1,0). Використання *імерсійної системи* дає можливість збільшити показник заломлення середовища на межі з фронтальною лінзою і наближає його до показника заломлення скла (H_2O – 1,3, гліцерин – 1,47, кедрова олія – 1,52), що підвищує розрізняючу здатність мікроскопа. Імерсійні об'єктиви мають на оправі чорне кільце.

На оправі також є позначення збільшення об'єктива. Крім того, кожен об'єктив характеризується певною величиною робочої відстані. Так, у об'єктивів з малим збільшенням відстань від фронтальної лінзи об'єктива до препарата більша, ніж у об'єктивів з великим збільшенням. В залежності від цього необхідно пильно слідкувати яким гвинтом макрометричним чи мікрометричним слід користуватись при фокусуванні об'єктива. Об'єктиви зі збільшенням $8\times$, $40\times$, $90\times$ відповідно мають робочі відстані 13,8; 0,6 та 0,12 мм. У об'єктивів з малими збільшеннями не тільки більші робочі відстані, але й більші поля зору. Тому дослідження препарату рекомендується починати з невеликого збільшення.

Основними технічними характеристиками мікроскопа є збільшувача та розрізняюча здатності. **Коефіцієнт збільшення мікроскопа** визначається добутком величини збільшення окуляра та збільшення об'єктива. Теоретично мікроскоп може давати збільшення в $2000\times$ та більше разів. Проте слід розрізняти корисне збільшення та безкорисне. Межі корисного збільшення зазвичай становлять $1400\times$. При перевищенні цих меж виникає дифракція та інші явища, зумовлені хвильовою природою світла, що є непомітними в межах корисного збільшення, але спричиняють оптичні помилки при перевищенні цих меж. Тому слід правильно підбирати об'єктиви та окуляри. Наприклад, для об'єктиву $40\times$ треба брати окуляр $15\times$, щоб отримати загальне збільшення в межах корисного. Якби при цьому сильніші окуляри не використовувались, виявити тонші структури не вдасться. Крім того, використання окуляра з великим збільшенням призведе до зменшення кількості світла, яке потрапляє до спостерігача, і виникнення спотворень. Збільшення, які виходять за межі корисного, можуть використовуватись тільки при підрахунку дрібних частинок у полі зору, якщо при цьому не вимагається вивчення їхньої структури.

Розрізняюча здатність мікроскопа визначається найменшою відстанню між двома точками на препараті, які можна побачити окремо. Якщо збільшувальна здатність мікроскопа залежить від об'єктива та окуляра, то розрізняюча здатність визначається об'єктивом і конденсором.

Мікроскопія в темному полі

В основі методу лежить явище Тиндаля – освітлення об'єкта косими променями світла (рис. 3).

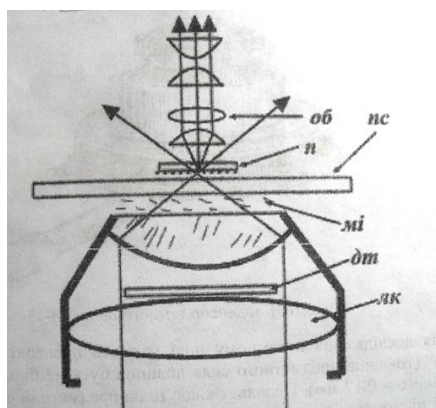


Рис. 3. Хід променів при мікроскопії у темному полі:

об – об'єктив, п – препарат, мі – масляна імерсія, лк – лінза конденсора, дт – діафрагма темного поля, нс – предметне скло.

Ці промені, не потрапляючи в об'єктів, залишаються невидимими для ока, тому поле зору виглядає темним. В той же час оптично неоднорідні клітини, що знаходяться в полі зору і потрапляють в зону проходження променів, відхиляють їх так, що промені попадають в об'єктів. Оскільки промені світла ідуть саме від об'єктів, спостерігач бачить їх в темному світлі такими, що інтенсивно світяться. Метод використовується при дослідженні живих клітин мікроорганізмів. Особливо він корисний для функціонально-морфологічного вивчення великих об'єктів, таких як дріжджі.

Фазово-контрастна мікроскопія

Людське око розрізняє тільки довжину (колір) і амплітуду (інтенсивність, контрастність) світлової хвилі, але не вловлює фазових відмінностей (хроматичної та сферичної аберації). Суть *хроматичної аберації* полягає у тому, що складне біле світло, проходячи через лінзу, яку можна уявити як систему призм, розкладається на спектр, завдяки чому зображення, що формується, стає кольоровим. *Сферична аберация* полягає в тому, що промені світла, потрапляючи на різні частини лінзи, заломлюються неоднаково, в залежності від товщини лінзи. В результаті проєкція (зображення) точки виникає не у вигляді точки, а у вигляді шару розсіяння.

Метод фазово-контрастної мікроскопії розроблено для спостереження за прозорими об'єктами. Він ґрунтується на перетворенні невидимих для людського ока фазових змін світлової хвилі, які відбуваються при її проходженні через об'єкт, у видимі амплітудні з допомогою спеціального оптичного пристрою. Об'єктиви для фазового контрасту мають пластинку у вигляді кільця, яку отримують в результаті розпилення спеціальної речовини, що утворює шар у кілька десятків мікромметра. На конденсорі теж вмонтовують діафрагму, яка має затемнене і світле кільце. При цьому світле кільце має такі розміри, щоб зображення, яке передається через конденсор, повністю вкладалося на фазове кільце об'єктива (рис. 4).

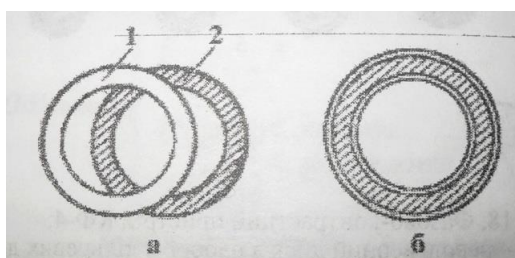


Рис. 4. Центрування кільцевої діафрагми і фазової пластинки:

1. зображення джерела світла;
 2. фазова пластинка;
- а – неправильне положення;
б – правильне положення.

Метод застосовують для дослідження живих клітин мікроорганізмів, контрастність яких досягається оптичним шляхом без втручання в фізіологічні процеси об'єктів, що вивчаються.

Люмінесцентна або флуоресцентна мікроскопія

Деякі біологічні об'єкти здатні поглинати світло і потім випромінювати промені з іншою довжиною хвилі. При цьому клітини немов би світяться жовто-зеленим або оранжевим світлом. Це так звана власна, або первинна, люмінесценція.

Нелюмінесцентні об'єкти можна обробити спеціальними флуорохромами (акридином жовтим, акридином оранжевим, аураміном, примуліном, тіофлавіном, конго червоним, тетрацикліном) і також спостерігати люмінесценцію. Це, так звана, наведена або вторинна люмінесценція.

Люмінесцентна мікроскопія у порівнянні зі звичайною дозволяє: поєднувати кольорове зображення і контрастність об'єктів; вивчати морфологію живих і мертвих клітин мікрорганізмів у живильних середовищах і тканинах тварин та рослин; досліджувати клітинні мікроструктури, які вибірково поглинають різні флуорохромні; визначати функціонально-морфологічні зміни клітин; використовувати флуорохромні при імунологічних реакціях і підрахунку бактерій в зразках з невисоким їх вмістом.

Електронна мікроскопія

За схемою будови електронний мікроскоп аналогічний світловому, але на досліджуваній об'єкт подається не світло, а потік електронів. Роздільна здатність сучасних електронних мікроскопів – 0,2-0,4 нм, робоче збільшення в середньому – 100 000 разів.

Розрізняють трансмісивний та скануючий електронні мікроскопи. У **трансмісивному** джерелом електронів слугує так звана «електронна гармата», що являє собою вольфрамовий термокатод, який при нагрівання до 3000 °С при подачі постійної напруги 100 кВ випускає вільні електрони. В якості «лінз», що фокусують електрони, використовують електромагнітні котушки, що формують електромагнітне поле. Промені електронів, що проходять через досліджуваній об'єкт, відхиляються під різними кутами в результаті різної товщини та електронної щільності різних ділянок мікроскопічного об'єкта і потрапляють в об'єктивну лінзу (де формується перше корисне збільшення об'єкта), а потім проміжні лінзи, що служать для плавного збільшення зображення. Зображення направляється на флуоресціюючий екран.

Скануючий, або растровий, електронний мікроскоп дає об'ємне зображення досліджуваного об'єкта. Контрастність забезпечується напиленням об'єкта важкими металами (хромом, золотом, паладієм) чи обробкою контрастуючими речовинами типу фосфорно-вольфрамової кислоти і уранілацетату. В скануючих мікроскопах рухомий тонкий електронний промінь дуже швидко і послідовно обігає поверхню досліджуваного зразка по квадратному растру і передає отриману інформацію на електронно-променевою трубку, покриту люмінофором, який світиться під дією електронів

Практичне завдання:

Розглянути морфологію готових забарвлених препаратів мікроорганізмів.

Хід роботи***Порядок роботи зі світловим мікроскопом.***

1. Підготувати мікроскоп до роботи. Протерти лінзи окуляра і об'єктива м'якою серветкою, розмістити лампу та мікроскоп так, щоб було зручно для роботи.

2. Підняти конденсор у максимальне верхнє положення, закрити ірисову діафрагму, вивести світлофільтр. Поставити у робоче положення об'єктив 8×.

3. Вийняти окуляр і, дивлячись через тубус у мікроскоп, встановити дзеркало так, щоб джерело світла було чітко видно в центрі поля зору.

4. Встановити окуляр, пересуваючи тубус мікроскопа за допомогою макрометричного гвинта, знайти чітке зображення джерела світла. Ввести світлофільтр і відкрити ірисову діафрагму.

5. При роботі з об'єктивами 8×, 40× та 90× конденсор залишити у максимальному верхньому положенні. Ступінь освітлення слід регулювати ірисовою діафрагмою.

6. Покласти предметне скло з препаратом на столик мікроскопа, затиснути його клемми.

7. При роботі з об'єктивом 40× спочатку знайти зображення об'єкта, користуючись об'єктивом 8× і прикриваючи ірисову діафрагму. Потім, не піднімаючи тубус мікроскопа, перевести в робоче положення об'єктив 40×, злегка відкрити діафрагму і знайти зображення об'єкта, користуючись макрометричним і мікрометричним гвинтами.

8. При роботі з об'єктивом 90× на препарат нанести краплю кедрової олії чи гліцерину. Відкрити повністю ірисову діафрагму.

9. Дивлячись збоку, обережно за допомогою макрогвинта опустити тубус мікроскопа так, щоб лінза об'єктива занурилась в імерсійну рідину і злегка доторкнулась поверхні скла. Слід пам'ятати, що при різкому опусканні об'єктива можна роздушити фронтальну лінзу і вивести мікроскоп з ладу.

10. Дивлячись в окуляр, дуже повільно піднімати тубус за допомогою макрогвинта, поки в полі зору не з'явиться зображення досліджуваного об'єкта. Якщо зображення не знайдено, повторити операцію 9 і 10.

11. Поліпшити видимість препарату за допомогою мікрометричного гвинта.

12. Після завершення роботи зняти серветкою кедрову олію чи гліцерин з лінзи об'єктива 90×. Перевести мікроскоп на мале збільшення, дзеркало встановити у вертикальне положення.

Лабораторна робота №3 ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: провести мікроскопію живих та фіксованих препаратів мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметові та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; кедрова олія; бактеріальні культури; культури мікроскопічних грибів, барвники: метиленовий синій та фуксин нейтральний.

Теоретичні відомості

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

Для того, щоб добре роздивитись форму багатьох (особливо мілких та слабо забарвлених) мікроорганізмів, їх необхідно пофарбувати. Для цього використовують **фіксовані забарвлені препарати**. Такі препарати готують у декілька етапів: виготовлення мазка, висушування, фіксація та забарвлення. Більшість барвників, які застосовуються у мікробіологічній практиці, є сполуками бензолу та його гомологів, які отримують або шляхом хімічного синтезу, або з кам'яновугільної смоли. Вони можуть бути лужними, кислими чи нейтральними.

У мікробіологічній практиці найчастіше застосовуються наступні барвники:

- | | |
|---|---|
| ✓ червоні – фуксин лужний та фуксин кислий, нейтральний червоний, конго червоний, еозин К, еритрозин; | ✓ фіолетові - генціан фіолетовий та гематоксилін; |
| ✓ сині – метиленовий синій та толуїдиновий синій; | ✓ коричневі — лужний коричневий та хрізоїдин; |
| ✓ зелені – малахітовий зелений та брильянтовий зелений; | ✓ жовті – пікринова кислота, флуоресцеїн; |
| | ✓ чорні – нігрозин водорозчинний, судан-3 і т.п. |

тощо.

Але крім простих, у мікробіології досить широко застосовуються і складні методи фарбування, зокрема фарбування за Грамом. Цей метод фарбування має важливе діагностичне значення. По відношенню до фарбування за Грамом всі мікроорганізми діляться на дві групи: грампозитивні (G^+ , фірмікутні) та грамнегативні (G^- , грацилікутні). Існує також група грамваріабельних мікроорганізмів, у яких відношення до

фарбування за Грамом змінюється впродовж росту та розвитку клітин (наприклад, коринеподібні бактерії).

При виготовленні препаратів мікроорганізмів зазвичай мають справу з чистими та накопичувальними культурами.

Чисті культури – це популяція мікроорганізмів одного виду. Накопичувальні культури містять тільки переважно клітини одного виду. Їх використовують для дослідження морфологічних, фізіологічних і біологічних властивостей мікроорганізмів.

При роботі з чистою культурою важливо не допустити її забруднення іншими мікроорганізмами. Щоб не заразити чисті культури сторонніми мікроорганізмами, при виготовленні препаратів і пересівах необхідно дотримуватись наступної послідовності дій:

1. Запалити газовий пальник (спиртівку).
2. Пробірку з культурою взяти в ліву руку так, щоб було видно поверхню середовища з нальотом мікроорганізмів.
3. У праву руку взяти бактеріологічну петлю і прожарити її у верхній частині полум'я пальника. Металеву частину держака повільно пронести через вогонь два-три рази.
4. Не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притиснути ватний корок до долоні, витягнути його з пробірки і тримати, не торкаючись оточуючих предметів.
5. Край відкритої пробірки пронести через полум'я пальника.
6. Ввести в пробірку стерильну петлю, охолодити її, торкаючись поверхні агару, а потім взяти петлею невелику кількість мікробної маси.
7. Шийку пробірки і ватний корок одночасно провести через верхню частину полум'я пальника і закрити пробірку корком.
8. Пробірку поставити в штатив, а відібрану петлею бактеріальну масу використати для виготовлення препарату або посіву.
9. Залишки бактерій на петлі обпалити в полум'ї пальника.

Для спостереження за мікроорганізмами готують їх живі або мертві (фіксовані) препарати.

Виготовлення живого препарату “роздушена крапля”

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

Практичне завдання:

Розглянути морфологію пекарських дріжджів.

Хід роботи

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.
2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.
3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
4. Розглянути препарат при збільшенні 40×. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

Виготовлення фіксованого забарвленого препарату

Фіксація це обробка мікроорганізмів, яка дає можливість швидко припинити перебіг життєвих процесів, зберігаючи при цьому тонку структуру клітини. Внаслідок фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще фарбуються. Фіксація є обов'язковою при роботі з патогенними мікробами (для безпеки).

Практичне завдання:

Розглянути морфологію забарвлених метиленовим синім та фуксином препаратів пекарських дріжджів та кишкової палички.

Хід роботи

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

Лабораторна робота №4

ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ БАКТЕРІЙ ТА ЦВІЛЬОВИХ ГРИБІВ

Мета роботи: ознайомитися з морфологією живих та фіксованих препаратів бактерій та цвільових грибів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметові та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; кедрова олія; культури мікроскопічних грибів, барвники: метиленовий синій та фуксин нейтральний.

Теоретичні відомості

I. Морфологія бактерій.

Бактерії за формою діляться на кілька груп: сферичні, циліндричні, спіральні, нитчасті і незвичайної форми (рис. 5).

Сферичні бактерії – коки мають форму правильної кулі. Їх розміри знаходяться в межах 1,2-5,0 мкм. Переважно це нерухомі клітини, які не утворюють ендоспор. Вони поділяються на наступні групи.

Мікрококи в природі зустрічаються у вигляді поодиноких клітин (*Micrococcus agilis*).

Диплококи – подвійні коки (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Azotobacter chroococcum*).

Тетракоки – угруповання чотирьох коків (*Tetracoccus casei*, *Tetracoccus mycodermais*, *Pediococcus acidilactici*).

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

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

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

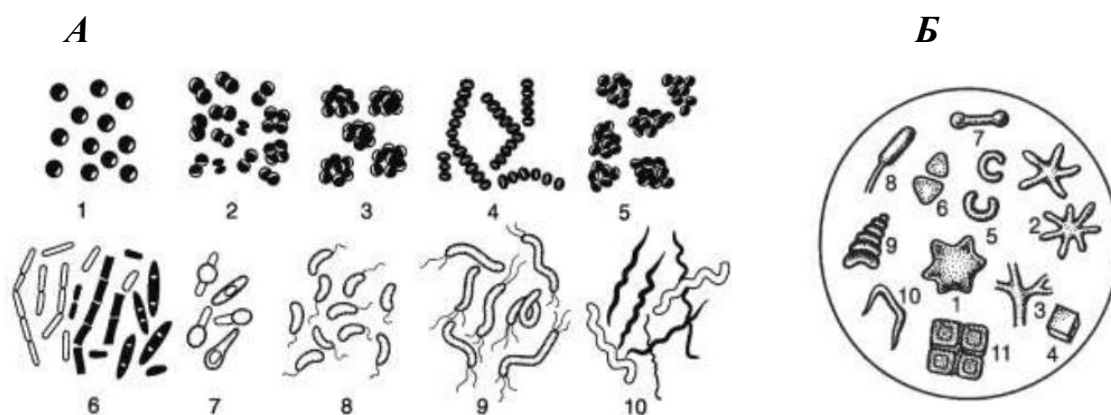
Всі коки за винятком *Streptococcus lactis* зручно мікроскопіювати за допомогою фіксованих та забарвлених фуксином препаратів.

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

Бактерії та бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді диплобактерій (диплобацил) та стрептобактерій (стрептобацил) – **нитчасті форми**. У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин можуть бути вкриті спільною оболонкою (піхвою) і утворювати трихом (*Thiotryx*

nivea, *Beggiatoa alba*, *Beggiatoa gigantea*). Нитчасті форми розповсюджені в намулах, ґрунті і водоймах, особливо з високим вмістом заліза. У водоймах найчастіше зустрічається залізобактерії роду *Leptothrix*, які окислюють закисні форми заліза в окисні. При цьому накопичується гідроксид заліза, який надає бактеріям жовтувато-бурого забарвлення.

Рис. 5. Основні (А) та рідко зустрічні (Б) морфологічні форми бактерій:



А: 1 – монококи; 2 – дипло- та тетракоки; 3 – сарцини; 4 – стрептококи; 5 – стафілококи; 6,7 – паличкоподібні бактерії; 8 – вібріони; 9 – спірили; 10 – спірохети;

Б: 1 – бактерії, подібні до шестикутної зірки; 2 – бактерії, які утворюють вирости (простеки); 3 – бактерії, які галузяться; 4 – пластинчасті клітини архебактерій; 5 – тороїди; 6 – трикутні; 7 – гантелеподібні бактерії; 8 – стебельцеві бактерії; 9 – трихоми нециліндричні; 10 – червоподібні бактерії; 11 – клітини, з'єднані в пластинки.

Звивисті форми. В залежності від ступеня звивистості розрізняють вібріони, спірили і спірохети.

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

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

Вібріони і спірили зручно розглядати на фіксованому і зафарбованому фуксином препараті, виготовленому із гною. На такому препараті багато клітин різних видів мікроорганізмів, і серед них часто зустрічаються вигнуті форми.

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

бактерій можна приготувати фіксований фарбований препарат із зубного нальоту. Зубні спірохети надзвичайно тонкі, майже волосоподібні.

Практичне завдання:

Зробіть мазок зубного нальоту, забарвте його метиленовим синім та розгляньте під мікроскопом різні форми бактерій (рис. 6).

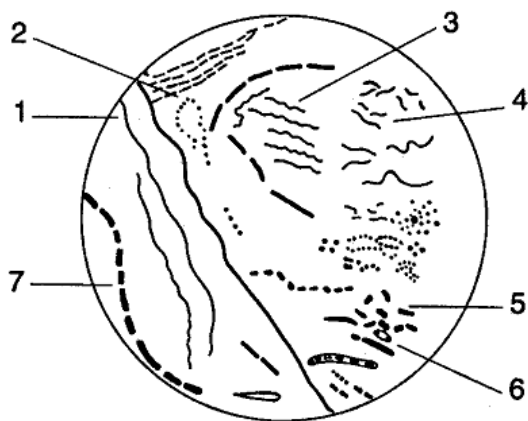


Рис. 6. Мікрофлора зубного нальоту (за Зіковим та співавт., 1997):

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

II. Морфологія цільових грибів

Об'єктами мікробіології є також і багато видів мікроскопічних грибів. Гриби відносяться до еукаріотів. Їх тіло складається із мицелію чи грибниці – сплетення тонких галузистих гіфів, за допомогою яких гриби прикріплюються до субстрату.

Зигоміцети – нижчі гриби, мають добре розвинений галузистий одноклітинний мицелій. Розмножуються як статевим шляхом, так і безстатевим, тобто за допомогою спор (рис. 7). Представник класу – мукор (*Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*) розвивається у вигляді білого чи сірого нальоту на продуктах рослинного походження.

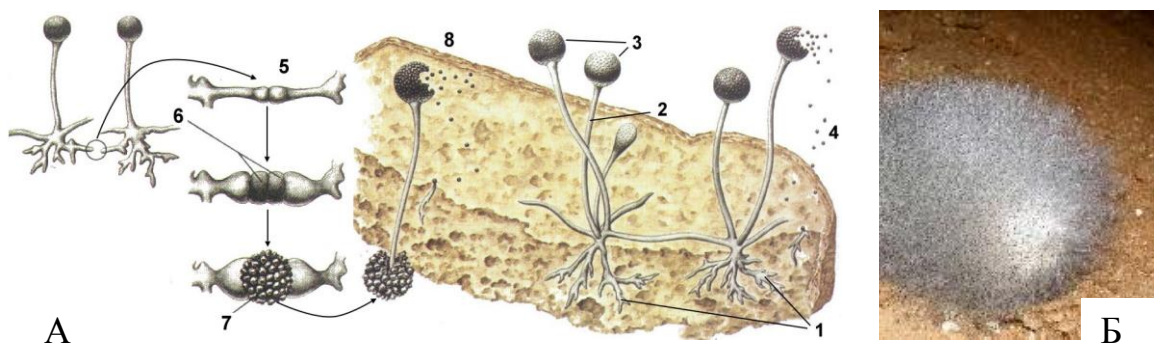


Рис. 7. Мукор: А – схема розмноження, Б – зовнішній вигляд

1 – мицелій гриба; 2 – спорангієносії; 3 – спорангії; 4 – спори безстатевого спороношення; 5 – утворення гаметангіїв; 6 – відокремлення гаметангії мукура; 7 – багатоядерна зигота; 8 – спори статевого спороношення

Міцелій мукових грибів пронизує субстрат і частково стелиться по його поверхні. Догори від нього відходять особливі повітряні гіфи – спорангієносці, на кінцях яких утворюються спорагії. Спорангії відокремлюються від спорангієносців перетинкою, і в них безстатевим шляхом утворюються чисельні спорангіоспори – ендоспори.

Аскоміцети (сумчасті гриби) гриби з багатоклітинним або членистим міцелієм, які утворюють спори в сумках – асках. Вони включають представників еуаскоміцетів (справжні аскоміцети), у яких сумки зі спорами утворюються в результаті статевого процесу на поверхні або всередині плодових тіл, сформованих переплетенням гіфів міцелію і геміаскоміцетів, у яких плодові тіла відсутні. До геміаскоміцетів відносяться більшість дріжджів, зокрема пекарські (рис. 8).

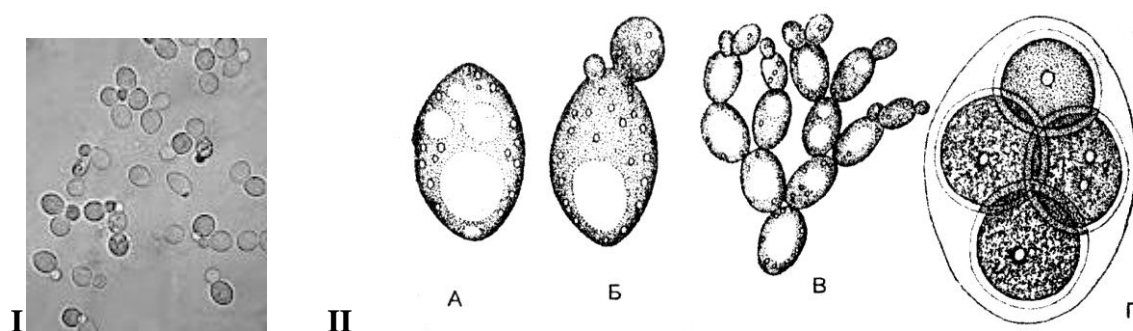
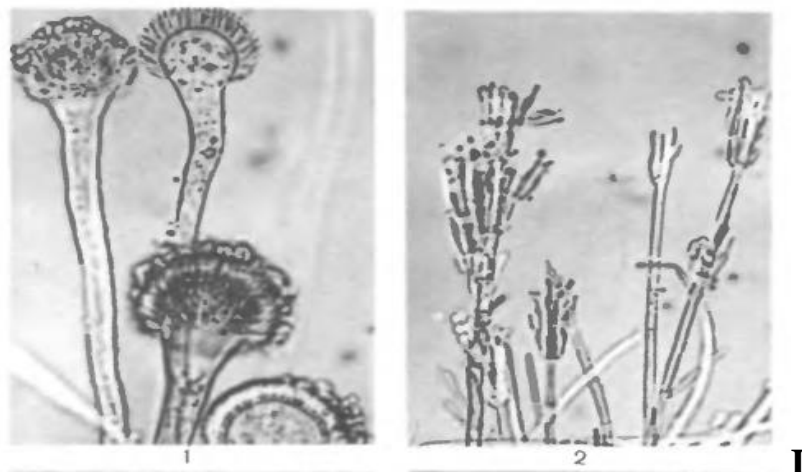


Рис. 8. Дріжджові гриби *Saccharomyces cerevisiae*: I – фото під мікроскопом, II – схематичне зображення. А – вегетативна клітина; Б – клітина, що брунькується; В – псевдоміцелій; Г – аск з аскоспорами

Еуаскоміцети включають два важливих роди ґрунтових грибів *Penicillium* і *Aspergillus* (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*). Пеніцили і аспергіли мають добре розвинений багатоклітинний міцелій. Розмножуються конідіальними спорами (конідіоспорами) (рис. 9). Зустрічаються у вигляді нальоту блакитного, зеленого, сірого, рідше інших кольорів на продуктах рослинного походження. Поширені у верхніх шарах ґрунту.



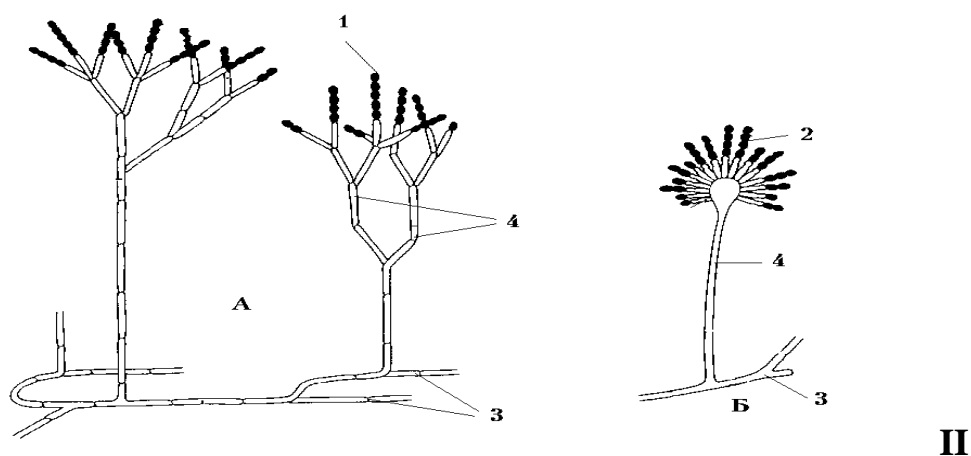


Рис. 9. Еуаскоміцети: I – фото під мікроскопом (1 – аспергіл, 2 - пеніцил); II – схематичне зображення (А – пеніцил, Б – аспергіл). 1 – конідії у вигляді китиці, 2- ланцюжки конідій, 3 – міцелій, 4 – конідієносці.

Несправжні гриби мають багатоклітинний міцелій, але у них немає статевого процесу і досконалої стадії спороношення. Розмножуються безстатевим шляхом за допомогою конідій чи вегетативно – ділянками гіфів. У природі широко розповсюджені представники родів *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Зустрічаються на рослинних рештках, плодах, насінні і в ґрунті.

Практичне завдання:

Виготовте і розгляньте під мікроскопом препарат представника роду *Mucor*.

Хід роботи

1. Для розгляду слід обережно взяти препарувальною голкою найбільшу кількість міцелію і другою голкою зняти його на сухе предметне скло.

2. Препарат спочатку розглядають без покривного скла при малому збільшенні мікроскопа. Видно спорангієносці і круглі темні кульки на їх кінцях – спорангії. Переважно вони вкриті тонкими кристаликами оксалату кальцію.

3. Потім на поверхню препарату наносять краплю води, накривають його покривним склом. Оболонка спорангію при цьому руйнується і спори вивільнюються.

4. Препарат розглядають послідовно при малих і великих збільшеннях.



Рис. 10. Представники роду мукор під мікроскопом (8х).

Лабораторна робота № 5 ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ЗА ГРАМОМ

Мета роботи: освоїти складні методи фарбування мікроорганізмів і за отриманими зразками вміти робити висновок про приналежність мікроорганізмів до певної таксономічної групи.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметові скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; кедрова олія; набір реактивів для фарбування за Грамом (водний фуксин, розчин Люголя, спирт 96⁰, генціан-віолет); фільтрувальний папір, промивалки; стерильна вода; пробірки з культурами бактерій на МПА.

Теоретичні відомості.

Метод фарбування бактерій був запропонований датським вченим Х. Грамом у 1884 р. Він ґрунтується на відмінностях у хімічному складі клітинних оболонок мікроорганізмів. Суть його полягає в тому, що у одних видів мікроорганізмів у клітині утворюється комплекс йоду і барвника генціану фіолетового, який не вимивається спиртом, а у інших видів цей комплекс вимивається з клітини спиртом. Бактерії першої групи називають грамозитивними, а другої – грамнегативними. Останні для виявлення потребують додаткового фарбування. Відношення бактерій до фарбування за Грамом використовується як одна з таксономічних ознак при вивченні виду. Фарбування за Грамом є важливою таксономічною ознакою, з якою пов'язані й багато інших характеристик бактерій.

Слід пам'ятати, що на здатність фарбуватись чи ні за методом Грама впливає не тільки вид мікроорганізмів, а й такі фактори, як склад середовища культивування, фаза росту мікроорганізмів, ступінь їх життєздатності. Так, в старих культурах мертві клітини завжди фарбуються як грамнегативні. Деякі коринібактерії, протей можуть фарбуватись варіабельно, тобто частина клітин – як грамозитивні, а частина – як грамнегативні.

Практичне завдання:

Визначте відношення досліджуваної культури бактерій до фарбування за Грамом. Замалуйте препарати в зошиті.

Хід роботи

1. На знежирене спиртом чи ацетоном предметне скло нанести три тонких мазки різних культур мікроорганізмів (два з них з відомим наперед відношенням до фарбування за Грамом). Мазки висушити, зафіксувати над полум'ям.

2. Препарат накрити смужкою фільтрувального паперу, змоченого 1% спиртовим розчином генціану фіолетового. Нанести на нього кілька крапель води. Витримати препарат під барвником 2 хв.

3. Зняти смужку фільтрувального паперу пінцетом і, не промиваючи препарат, залити його розчином Люголя (J_2 в KJ) до повного почорніння. Скло у цьому та інших випадках краще тримати в нахиленому положенні.

4. Препарат, не промиваючи водою, занурюють у склянку з 96% етиловим спиртом на 30-60 сек. Увага! Слід ретельно дотримуватись вказаного часу, оскільки при недостатній витримці препарату у розчиннику грамнегативні бактерії можуть продемонструвати позитивний ефект, і навпаки – при збільшенні часу обробки етиловим спиртом – барвник може бути вимитий із грампозитивних бактерій.

5. Промити препарат водою і знебарвлені мазки зафарбувати додатково водним розчином фуксину (2 хв). Фарбу злити, ретельно промити препарат водою і висушити.

6. Розглянути препарат в імерсійній системі мікроскопа.

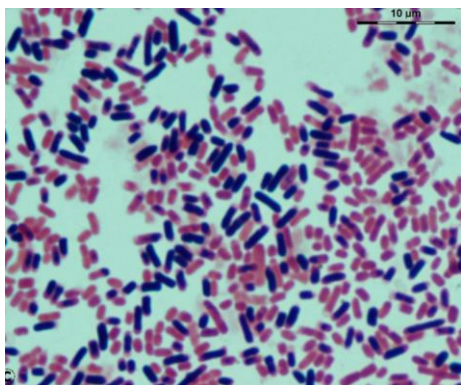


Рис. 11. *Bacillus subtilis* (грам-позитивні) та *Escherichia coli* (грам-негативні) – препарат зафарбовано за Грамом.

Лабораторна робота №6
ВИГОТОВЛЕННЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: навчитися готувати поживні середовища для культивування мікроорганізмів з різноманітними харчовими потребами.

Матеріали та обладнання: волове м'ясо; м'ясорубка; технічні та торсійні терези; шпателі для відбору реактивів; стакани з термостійкого скла на 250 мл; мірні циліндри на 250 та 500 мл; лійки; вата, марля, фільтрувальний папір; скляні палички для перемішування; стерильний посуд для розливу середовищ; індикаторний папір для доведення рН; агар-агар; пептон; дистильована вода; водогінна вода; 30% розчин NaOH; 10% розчин HCl.

Теоретичні відомості

У лабораторних умовах мікроорганізми культивують на живильних середовищах, які повинні мати всі речовини, необхідні для їх росту. Конструктивні і енергетичні процеси у мікроорганізмів дуже відрізняються. Тому так само відрізняються їх потреби у живильних речовинах. Універсальних середовищ, однаково придатних для росту всіх без винятку мікроорганізмів, не існує. Відомо дуже багато живильних середовищ (ще в 1930 р. було класифіковано більше 2000 середовищ). В той же час число інгредієнтів, які становлять основу живильних середовищ, невелике.

Основними компонентами будь-якого живильного середовища для культивування мікроорганізмів є сполуки вуглецю і азоту. Вони і визначають специфічність більшості живильних середовищ.

Автотрофні мікроорганізми можуть використовувати вуглекислоту як єдине джерело вуглецю, тому в середовище вносять гідрокарбонат натрію або продувають повітря, збагачене вуглекислим газом.

Гетеротрофні мікроорганізми здатні використовувати різні вуглецьвмісні органічні сполуки – кислоти, спирти, вуглеводи, ароматичні сполуки тощо.

Потреби мікроорганізмів в азоті задовольняються за рахунок азотовмісних сполук, в яких азот має різний ступінь окислення (амонійні солі, нітрати, амінокислоти і молекулярний азот, а інколи білки та пептони).

Багато мікроорганізмів потребує наявності в середовищі так званих факторів росту (вітамінів, пуринів, піримідинів, амінокислот), які додають до середовища у вигляді чистих сполук чи у складі дріжджового або кукурудзяного екстрактів.

Крім джерел вуглецю та азоту і факторів росту для побудови речовин клітині необхідні сірка, фосфор та інші елементи, а також мікроелементи. Всі вони повинні входити до складу живильного середовища у доступній для мікроорганізмів формі. Останнім етапом у приготуванні живильного середовища є доведення рН розчину до необхідного.

Середовища, які використовуються в мікробіології, поділяють на групи за такими критеріями: походження, консистенція, призначення (Табл. 1).

Натуральними зазвичай називають середовища, які складаються з продуктів тваринного або рослинного походження, і мають складний невизначений хімічний склад. До них належать овочеві чи фруктові соки, м'ясо, кров, молоко, відвари або екстракти, отримані з м'яса, риби, ґрунту, гною чи овочів. Натуральні середовища непридатні для вивчення фізіології обміну речовин мікроорганізмів, оскільки вони не дають можливості визначити використання окремих компонентів середовища, а з іншого боку, з'ясувати, які речовини утворюються мікроорганізмами. Тому такі середовища використовують, головним чином, для підтримування культур мікроорганізмів, накопичення біомаси та їх діагностики. До числа натуральних середовищ, які часто використовують у лабораторній практиці, відносять м'ясо-пептонний бульйон і неохмелене пивне сусло.

Таблиця 1

Класифікація поживних середовищ

Консистенція				Склад та походження			Призначення	
Рідкі	Напіврідкі	Щільні	Сипучі	Натуральні	Синтетичні	Напівсинтетичні	Загального призначення	Спеціального призначення
								Елективні

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Основою для його виготовлення служить м'ясна вода, яку готують таким чином: пропущене через м'ясорубку волове м'ясо, попередньо звільнене від жиру, кісток і сухожил'я заливають подвійним об'ємом водопровідної води та витримують 2-4 год при температурі, близькій до кипіння, або при кімнатній температурі протягом 13-15 год. Настій кип'ятять 1 год з м'ясом або без нього, і фільтрують через кілька шарів марлі. До 1 л отриманої м'ясної води додають 10 г пептону і 1-5 г хлориду натрію, доводять рН до значення 7,0. Для отримання м'ясо-пептонного агару (МПА) до МПБ додають 1,5-2,0 % агару. МПБ і МПА стерилізують при 1 атм. протягом 20 хв.

Солодове (неохмелене) сусло – добре середовище для культивування молочнокислих і оцтовокислих бактерій, дріжджових, мікроскопічних грибів та інших гетеротрофних мікроорганізмів.

Пивне сусло готують на пивоварних заводах з ячмінного солоду. До нього входять вуглеводи (мальтоза, декстрини), азотовмісні сполуки, а також вітаміни групи В, органічні кислоти і мінеральні солі.

Для усунення білків сусло фільтрують, за допомогою сахариметра визначають у ньому концентрацію вуглеводів у градусах Балінга ($^{\circ}\text{B}$), які приблизно відповідають відсотковому вмісту цих речовин. Для культивування дріжджів і грибів використовують сусло з концентрацією $6-8^{\circ}\text{B}$, для молочнокислих бактерій – $8-12^{\circ}\text{B}$.

Для приготування сусло-агару до сусла додають $1,5-2,0\%$ агару. Гарячий сусло-агар розливають у колби або пробірки і стерилізують при $0,5$ атм. протягом $20-30$ хв.

Дріжджовий екстракт. 1 кг пресованих дріжджів розводять в 1 л води, кип'ячать протягом 1 год, кілька разів фільтрують і стерилізують при $0,5$ атм протягом 30 хв.

Дріжджовий автолізат. Дріжджові автолізати є цінними стимуляторами росту дріжджів. Вони містять комплекс вітамінів і ферментів, синтезованих клітиною в процесі росту.

Автоліз в присутності хлориду натрію. Сушені дріжджі (клітинна оболонка сушених дріжджів більш проникна, що полегшує автоліз) розмочують у воді у співвідношенні $1:4$ і рівномірно перемішують до однорідної маси, після чого додають NaCl ($2,5\%$ відносно до маси сухих дріжджів) і витримують у термостаті при температурі $48-52^{\circ}\text{C}$ протягом $12-18$ год. По закінченні автолізу рідину кип'ячать протягом 1 год.

Автоліз у присутності суперфосфату. Дріжджі розмішують у витяжці суперфосфату ($1:1$) і поміщають у термостат на 48 год при температурі 45°C . По закінченні автолізу середовище кип'ячать. Витяжку суперфосфату готують при розведенні однієї частини суперфосфату у двох частинах води.

Комплексний дріжджовий ферментний препарат готують з промитих дріжджів шляхом обробки суспензії концентрацією $6-7\%$ від сухої речовини на ультразвуковому пастеризаторі з гідравлічним випромінювачем 35 кГц. За доли секунд досягається відмирання дріжджових клітин при цьому ферменти зберігають свою активність.

Термін зберігання дріжджового препарату у вигляді пасти до 20 діб при температурі $2-4^{\circ}\text{C}$. Комплексний дріжджовий ферментний препарат слугує біологічним каталізатором біохімічних реакцій і біостимулятором мікроорганізмів.

Синтетичні середовища – це середовища, до складу яких входять певні хімічні сполуки, взяті у точно вказаній кількості. Синтетичні середовища широко використовують при дослідженні метаболізму мікроорганізмів. Існує багато прописів синтетичних середовищ, які забезпечують ріст різних мікроорганізмів.

Поряд з натуральними і синтетичними виділяють так звані **напівсинтетичні середовища**. Основним їх компонентом є синтетичні середовища, до яких додають у невеликій кількості речовини невизначеного складу: пептон (джерело азотного живлення), дріжджовий автолізат (джерело вітамінів групи В, піримідинових і пуринових основ),

гідролізат казеїну (джерело амінокислот). Напівсинтетичні середовища широко застосовуються в мікробіологічній промисловості для отримання вітамінів, антибіотиків, амінокислот тощо.

Селективні середовища забезпечують переважний розвиток певної групи мікроорганізмів, для якої характерні подібні культуральні потреби. Ці середовища дозволяють вирощувати окремі види мікроорганізмів без попередньої стерилізації. Вони призначені для виділення мікроорганізмів з місць їх природного існування і отримання накопичувальних культур. Наприклад, для стафілококів використовують жовчно-сольовий агар і телуритові середовище, а для сальмонел – середовище Мюллера та селенітове середовище.

Диференційно-діагностичні середовища дають можливість швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших, або виявити деякі їх особливості. До них належать: середовище Ендо – для виявлення бактерій кишкової групи, Сабуро – для виявлення патогенних дріжджів роду *Candida* та інших.

За консистенцією розрізняють рідкі, сипкі і тверді середовища.

Рідкі середовища широко застосовують для накопичення біомаси чи продуктів обміну мікроорганізмів, для підтримки і збереження колекції культур мікроорганізмів, які погано розвиваються на твердих середовищах.

Сипкі середовища застосовують у мікробіологічній промисловості для культивування деяких продуцентів фізіологічно активних сполук, нарощування міцелію грибів. До таких середовищ відносять розварене пшоно, висівки, ячмінь, пшеницю, жито тощо.

Тверді середовища використовують для виділення чистих культур, з діагностичною метою для опису колоній, характеру росту мікроорганізмів, для визначення кількості мікроорганізмів, їх біологічної активності, для збереження культур у колекціях тощо. Для ущільнення середовищ використовують агар або желатин.

Агар - складний полісахарид, який отримують з морських водоростей. Він здатний утворювати гелі, які плавляться при температурі приблизно 100°C і стають твердими при 45°C. Агар не розщеплюється під дією більшості мікроорганізмів. За необхідності його можна використовувати кілька разів після кількакратного промивання дистильованою водою і наступного фільтрування.

Желатин – білок, який отримують виварюванням кісток, хрящів, сухожилів, луски. Желатин плавиться при температурі 25°C, яка нижча за звичайну температуру інкубації багатьох мікроорганізмів (30-37°C). Ця властивість желатину обмежує його застосування для ущільнення середовища. Желатин використовують, головним чином, для виявлення протеолітичної активності мікроорганізмів. Його додають до рідких середовищ у кількості 15-20%. Желатинові середовища стерилізують при 0,5 атм 15 хв.

Практичне завдання:

1. Розрахуйте наважки компонентів для приготування 150 мл середовища наступного складу: джерело вуглеводів – 2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,3%; KH_2PO_4 – 0,2%; K_2HPO_4 – 0,015%; NaCl – 0,015%; KCl – 0,007%; MgSO_4 – 0,005%; FeSO_4 – 0,001%.

2. Приготуйте м'ясо-пептонний агар (МПА) для наступних лабораторних робіт.

Лабораторна робота № 7 МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: оволодіти технікою культивування мікроорганізмів на різноманітних поживних середовищах.

Матеріали та обладнання: термостат; стерильні пробірки та чашки Петрі; електроплитка; бактеріологічні петлі та гачок; препарувальні голки; шпатель Дригальського; стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); культури дріжджів на МПА; ґрунтова бовтанка; культура цвілевих грибів.

Теоретичні відомості

Вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах називається **культивуванням** (lat. *cultus* – вирощування), а вирощені мікроорганізми – культурою. При вирощуванні мікроорганізмів у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при вирощуванні на твердому середовищі – колонії. **Колонія** – це потомство однієї клітини, яка потрапила на агаризоване середовище. За виглядом колоній іноді можна розрізнити окремі види мікроорганізмів (рис. 12).

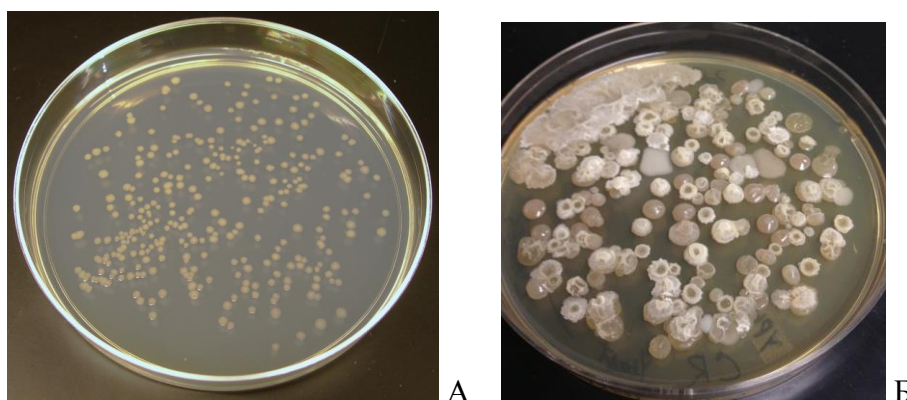


Рис. 12. Зовнішній вигляд колоній кишкової (А) та сінної (Б) паличок на м'ясо-пептонному агарі (час інкубації 24 год, t^0 – 37⁰С).

На рідких середовищах колонії розрізнити неможливо. Рідке

середовище із клітинами, що там ростуть називається **культуральною рідиною**.

Внесення клітин мікроорганізмів чи іншого дослідного матеріалу (зразки ґрунту, проби води) в стерильне живильне середовище для отримання накопичувальної культури називається **посівом**. Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища до іншого (стерильного) називається **пересівом**. Культивування мікроорганізмів за певної температури називають **інкубуванням** (лат. *incubatio* – вирощування за штучно створеної температури).

Вирощують мікроорганізми у скляному посуді: пробірках, колбах, чашках Петрі.

В пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на твердих середовищах. Для вирощування аеробних культур пробірки зазвичай заповнюють рідким середовищем на 1/3, для анаеробних – на 2/3 об'єму. Для приготування твердого середовища пробірки заповнюють середовищем на 1/3-1/4 об'єму. Після стерилізації пробірки з не застиглим середовищем, яке містить агар, розташовують під невеликим кутом для отримання скошеної поверхні. Це так звані скошені середовища. На них ростуть аеробні культури (рис. 13А). Тверде середовище, яке застигло при вертикальному положенні пробірки, називають стовпчиком. У стовпчик петлею здійснюють глибинний посів, здебільшого для анаеробів (рис. 13Б).

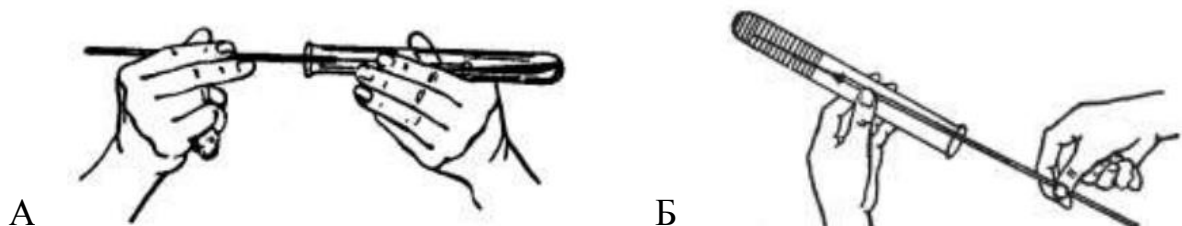


Рис. 13. Посів мікроорганізмів у пробірку на скошений агар (А) та у стовпчик (Б).

Мікроорганізми **в колбах** культивують переважно в рідких живильних середовищах. І при посіві аеробних організмів колбу з культурою треба весь час струшувати на качалці.

В чашках Петрі мікроорганізми вирощують тільки на твердих середовищах. При цьому посів на чашку здійснюють як петлею (методом виснажуючого штриха по поверхні), так і шпателем (певний об'єм рідини розвозять шпателем Дригальського по всій поверхні середовища) (рис. 14).

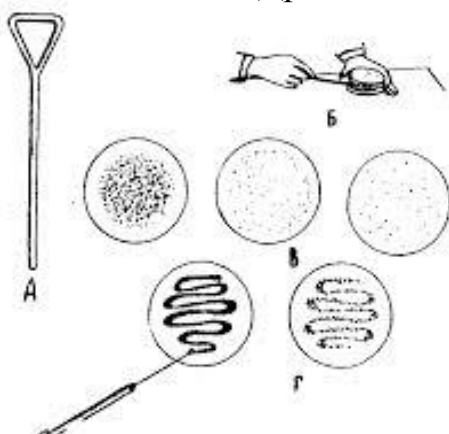


Рис. 14. Методи посіву мікроорганізмів на чашку Петрі: А – шпатель Дригальського, Б – посів шпателем по всій поверхні при різних розведеннях культуральної рідини (В), Г – посів петлею методом штриха.

Для посіву мікроскопічних грибів у чашку Петрі, чашку необхідно перевернути догори дном і в такому вигляді відкрити в межах стерильної зони. Кінчиком гачка, на якому містяться спори, конідії або грибний міцелій, потрібно доторкнутися до центру агарового диску. Чашку Петрі у перевернутому вигляді помістити в термостат і культивувати в такому вигляді з метою запобігання осідання грибних конідій та спор на поверхню агару).

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі, шпателі, які виготовляють з платинового дроту або ніхрому.

При тривалому зберіганні мікроорганізмів у лабораторних умовах може відбутися зміна певних фізіолого-біохімічних чи морфологічних характеристик. Тому необхідно здійснювати пересів культур на свіжі середовища з певною частотою залежно від виду, середовища, умов культивування. При такому зберіганні не можна допускати пересихання середовища. Існують й інші способи зберігання культур: під шаром стерильного вазелінового масла, в рідкому азоті, в ліофілізованому стані тощо.

Практичне завдання:

Навчитися культивувати мікроорганізмами шляхом використання різних методів для їх посіву.

Хід роботи

1. Розлити розплавлене агаризоване середовище на косяк, стовпчик та три чашки Петрі.
2. Після застигання середовища уколом пересіяти культуру дріжджів у стовпчик та штрихом на скошене середовище.
3. Розсіяти ґрунтову бовтанку (0,2 мл) шпателем Дригальського по поверхні чашки Петрі з МПА.
4. Розсіяти ґрунтову бовтанку методом виснажуючого штриха на поверхню чашки Петрі.
5. В стерильну маленьку чашку Петрі в центр гачком посіяти цвілевий гриб.
6. Залити стерильною піпеткою 2 мл МПБ в стерильну пробірку і далі в це рідке середовище засіяти культуру дріжджів з косяка.
7. Спостерігати за ростом мікроорганізмів та зробити висновок про відношення дріжджів до кисню за характером їх росту в різних умовах.

Лабораторна робота №8
**ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЖИВИХ ТА ЖИТТЄЗДАТНИХ КЛІТИН
 МІКРООРГАНІЗМІВ**

Мета роботи: навчитися розрізняти живі (спроможні і неспроможні до репродукції) та мертві клітини мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: культура дріжджів на МПБ; стерильні пробірки і піпетки; камера Горяєва; стерильні чашки Петрі; стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); шпатель Дригальського; барвник метиленовий синій.

Теоретичні відомості

Для визначення загальної кількості клітин зазвичай під мікроскопом досліджують суспензію бактерій, поміщену в рахункову камеру відомого об'єму. Здебільшого використовують камеру Горяєва – це товсте предметне скло, розділене борозенками (рис. 15). На центральну частину скла нанесена сітка (рис. 16). Заглиблення із сіткою покривають спеціальним шліфованим покривним склом і притирають до появи веселкових кілець Ньютона. Після цього камеру заповнюють суспензією мікроорганізмів. Суспензію вносять через борозенку камери мікропіпеткою. Підрахунок клітин починають через 3-5 хв після заповнення камери, коли клітини осіли. Зазвичай підраховують клітини в 10 великих або 20 маленьких квадратах сітки, розміщених по діагоналі.

Кількість клітин у 1 мл досліджуваної суспензії підраховують за формулою:

$$M = (a \cdot 10^3 \cdot n) / hS, \text{ де:}$$

M – кількість клітин у 1 мл суспензії, a – середня кількість клітин у квадраті сітки, h – глибина камери в мм (вказується на предметному склі), S – площа великого (чи 16 маленьких) квадратів сітки в мм^2 , 10^3 – коефіцієнт переведення см^3 в мм^3 , n – розведення досліджуваної суспензії.

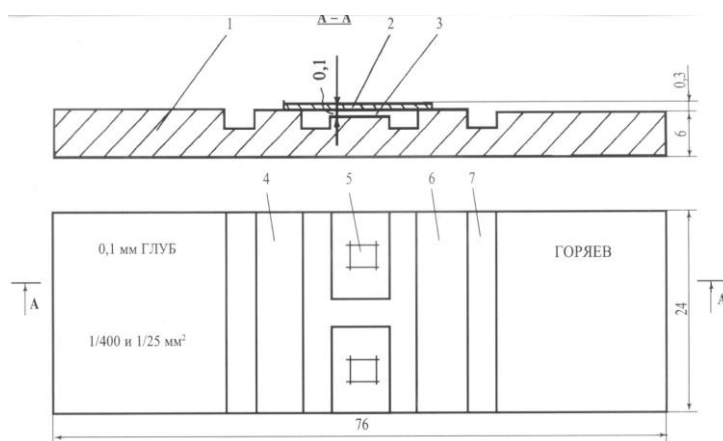


Рис. 15. Камера Горяєва: схематичний вигляд збоку та зверху. 1 –

предметне скло, 2 – покривне скло, 3 – відділення для заповнення суспензією, 4,6 – площадки для покривного скла, 5 – сітка для підрахунку, 7 – прорізи для введення суспензії мікроорганізмів.

Для підрахунку кількості живих мікроорганізмів часто використовують метод підрахунку кількості мертвих клітин, в яких при

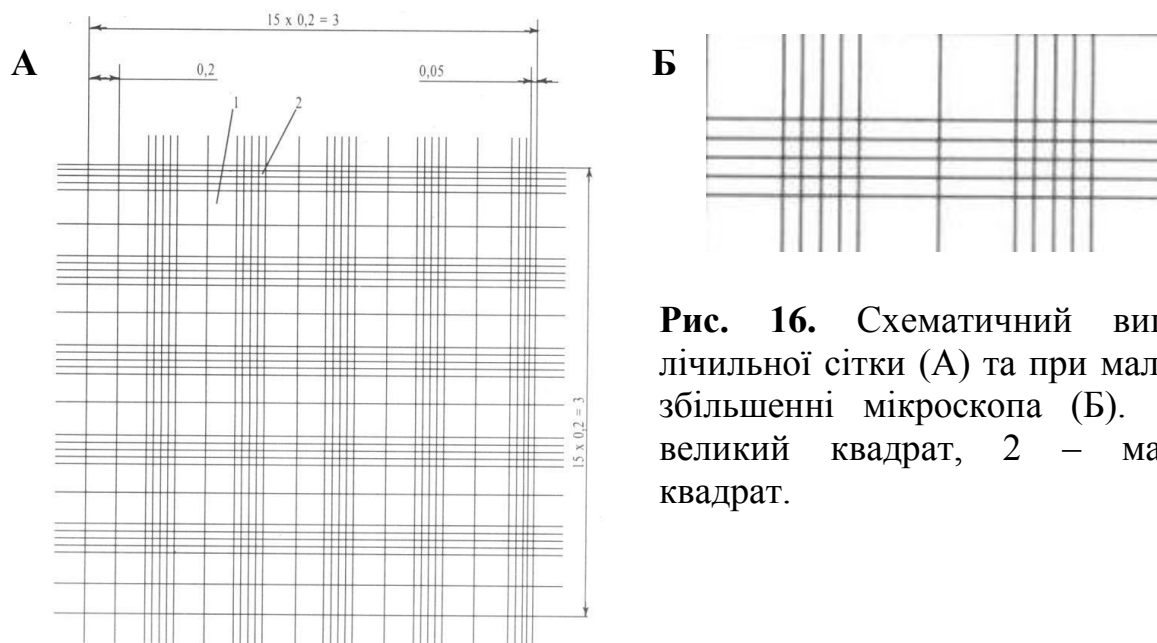


Рис. 16. Схематичний вигляд лічильної сітки (А) та при малому збільшенні мікроскопа (Б). 1 – великий квадрат, 2 – малий квадрат.

обробці живої культури барвником зафарбовується внутрішній вміст клітини (наприклад, зафарбовані метиленовим синім клітини пекарських дріжджів) (рис.17), від загальної кількості мікроорганізмів в суспензії.



Рис. 17. Зовнішній вигляд клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, оброблених метиленовим синім

Для підрахунку кількості життєздатних мікроорганізмів найчастіше використовують метод підрахунку колоній, оскільки не всі живі за зовнішнім виглядом клітини здатні до розмноження. Принцип цього методу полягає в тому, що на поживний агар вносять посівний матеріал певного об'єму з таким розрахунком, щоб колонії, які утворюються кожною бактеріальною клітиною, знаходились на певній відстані одна від

одної. По їхній кількості визначають кількість життєздатних мікроорганізмів у вихідній культурі.

Для того, щоб отримати окремі колонії, бактеріальні суспензії доводиться, як правило, розводити. Зазвичай, користуючись певним постійним постійним коефіцієнтом розведення, отримують серію розведень, кількості клітин в яких утворюють геометричну прогресію. Наприклад, при коефіцієнті розведення 10 з вихідної кількості клітин 5×10^8 на 1 мл отримують серію, яка складається із 7 розведень з концентраціями 5×10^7 , 5×10^6 , ... 5×10 на 1 мл. У досліді краще користуватися одним і тим самим коефіцієнтом розведення, оскільки при великій кількості підрахунків зменшується ймовірність помилки.

Якщо ж мікроорганізми таких розмірів, що їх неможливо полічити у камері Горяєва і про їх число немає навіть орієнтовної уяви, слід приготувати велику кількість близьких один до одного розведень і для посіву взяти по невеликій кількості проб від кожного розведення. В такому випадку при якомусь одному розведенні обов'язково буде отримана кількість колоній зручна для підрахунку (коректно здійснювати підрахунки, коли кількість колоній знаходиться в межах від 30 до 300 колоній на чашці). Знаючи кількість колоній на чашці і враховуючи здійснені розведення, можна обчислити кількість життєздатних клітин мікроорганізмів в 1 мл суспензії.

Практичне завдання:

Визначити загальну кількість клітин у суспензії з *Saccharomyces cerevisiae*, а також кількість у цій суспензії живих та життєздатних клітин

Хід роботи

1. Приготувати розведення попередньо вирощеної суспензії дріжджів, використовуючи стерильну дистильовану воду і стерильний посуд.
2. За допомогою камери Горяєва і барвника метиленового синього полічити у суспензії загальну кількість клітин та кількість мертвих.
3. Розлити стерильне агаризоване живильне середовище у чашки Петрі.
4. 100 мкл суспензії вибраних розведень посіяти на чашки із середовищем, які потім помістити у термостат при температурі 30°C на 48 год.
5. Підрахувати кількість колоній і розрахувати кількість життєздатних мікроорганізмів у 1 мл вихідної суспензії.

Лабораторна робота № 9

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІСТ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитися з основними групами мікроорганізмів, що різняться по відношенню до температури, концентрації водневих іонів та кисню в середовищі.

Матеріали та обладнання: термостати, пробірки зі стерильним 0,9% розчином NaCl; стерильний м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) з різним значенням рН; культури бактерій та дріжджів.

Теоретичні відомості

Одним з найважливіших факторів, які впливають на розмноження мікроорганізмів, є концентрація водневих іонів (рН). рН середовища зумовлює доступність для організму багатьох метаболітів та неорганічних іонів, підтримує стабільність і функції макромолекул в біологічних процесах. Кожен вид мікроорганізмів характеризується оптимальним значенням рН для нормального розвитку. Більшість мікроорганізмів розвивається при нейтральних значеннях рН (**нейтрофіли**), характерних для багатьох природних середовищ. Дуже високі (кисла реакція) і дуже низькі (лужна реакція) концентрації водневих іонів токсичні для значної кількості мікроорганізмів. Проте існують кислотолюбні (**ацидофільні**) та лужнолюбні (**алкалофільні**) мікроорганізми. Більшість грибів і дріжджів, а також деякі бактерії краще розвиваються в слабокислих та кислих середовищах, холерний вібріон – у лужних.

Іншою важливою умовою культивування мікроорганізмів є температура. За відношенням до цього фактора мікроорганізми поділяються на такі групи: **психрофіли** розвиваються в межах від 0°C до 20°C, верхня межа – 35-45°C; для **мезофілів** оптимальною є температура 25-37°C, верхня межа – 38-45°C; для **термофілів** оптимальна температура для росту 45-65°C, верхня межа – 60-70°C. Проте виявлено екстремальні термофіли, які розвиваються при температурах, вищих від 100°C. Зсуви температури відносно оптимуму гальмують розвиток мікроорганізмів.

У цій роботі як середовище використовують м'ясо-пептонний бульйон з різними значеннями рН: 2; 7; 11. Кислотність середовища регулюють додаванням 10%-них розчинів NaOH або HCl і перевіряють за допомогою рН-метра або паперових індикаторів. Середовища з різними значеннями рН розливають у пробірки по 5 мл, закривають ватними корками і стерилізують при 1 атм 20 хв.

Практичне завдання:

Оцініть інтенсивність росту досліджуваних культур при різних значеннях температури і рН середовища, результати досліду занесіть до

таблиці. Зробіть висновок про вплив цих факторів на ріст дослідних культур.

Хід роботи

1. У пробірці зі стерильним фізіологічним розчином (0,9% розчин NaCl) приготувати суспензію досліджуваної культури бактерій чи дріжджів. У середовище з різними значеннями рН внести по 2 краплі суспензії мікроорганізмів. Пробірки підписати, поставити в термостат з температурою 30°C. Одночасно засіяти тією ж суспензією три пробірки (рН середовища 7,0), які помістити в термостати з температурою 20°C, 30°C, 37°C і 45°C на добу.

2. Візуально оцінити ріст досліджуваної культури в пробірках. Умовно позначити відсутність росту “ - “, незначний ріст “ + “, середній ріст “ ++ “, значний ріст “ +++ “. Результати спостережень занести до таблиці:

Назва культури	рН середовища	Ріст	Температура, °C	Ріст
	2,0		18	
	7,0		28	
	11,0		37	
			45	

Лабораторна робота № 10 ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: освоїти методики проведення тестів для визначення окремих фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: культури бактерій і дріжджів; стерильні чашки Петрі з середовищем у якому є певне джерело Карбону; мікробіологічні петлі; маркери; пробірки із МПБ; лакмусові папірці; розчин Люголя; стерильне середовище, що містить крохмаль та м'ясо-пептонну желатину; стерильні пробірки; електрична плита; лінійка; термостати.

Теоретичні відомості

I. Використання сполук Карбону.

Мікроорганізми відрізняються за потребами щодо джерел вуглецевого живлення. Крім фототрофних та хемолітрофних бактерій, які є автотрофами і використовуються як джерело карбону CO₂, всі інші

мікроорганізми – гетеротрофні. Вони отримують вуглець з різноманітних органічних сполук: вуглеводів (моно-, ди- і полісахаридів), багатоатомних спиртів, органічних кислот, білків, амінокислот, ліпідів та вуглеводів.

Органічні вуглецьмістні сполуки використовуються мікроорганізмами не лише у біосинтетичних процесах, але й задовільняють енергетичні потреби клітини. Тому значна частина карбону органічних субстратів направляється тими шляхами метаболізму, які забезпечують клітину енергією і виводяться з клітини у вигляді CO_2 (основний продукт аеробного обміну), або у вигляді суміші CO_2 і органічних сполук (кінцеві продукти бродіння).

Здатність мікроорганізмів використовувати різні сполуки карбону для конструктивного та енергетичного обміну вивчають на рідких або твердих живильних середовищах. Зазвичай готують основне середовище без джерел вуглецю, яке за всіма іншими компонентами задовольняє потреби мікроорганізмів під час росту.

Основні середовища мають такий склад (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; MgSO_4 – 0,5; NaCl – 0,1; CaCl – 0,1; дріжджовий автолізат – 10 мл; мікроелементи – 1 мл; пептон – 0,5 (для деяких бактерій), агар – 10 г.

Вуглеводи, спирти та інші сполуки, які досліджують як джерела вуглецю і енергії, готують переважно у вигляді 10%-них водних розчинів, які стерилізують окремо (0,5 атм 20 хв) і вносять в тепле стерильне середовище в кількості 1 г на 100 мл. При дослідженні органічних кислот їх беруть у вигляді солей натрію або калію. Для контролю росту культури на основному середовищі джерела вуглецю не вносять.

Практичне завдання:

Визначте ріст досліджуваних культур бактерій або дріжджів на середовищах з різними джерелами вуглецю. За результатами дослідів складіть загальну таблицю, зробіть висновки.

Хід роботи

1. Отримати штатив з досліджуваними культурами мікроорганізмів (рекомендується використати такі культури бактерій і дріжджів: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* тощо) та чашки Петрі зі стерильним агаризованим середовищем, у якому є певне джерело карбону: глюкоза, сахароза, лактоза, розчинний крохмаль. Як контроль використати середовище, яке не має джерела вуглецю. Поділити чашки маркером на 3 сектори і пронумерувати.

2. Кожну з досліджуваних культур бактерій (дріжджів) посіяти на відповідному секторі чашки петлею, проводячи радіальний штрих. Чашки підписати і поставити в термостат з температурою 30°C на добу.

3. Візуально оцінити інтенсивність росту по штриху кожної досліджуваної культури бактерій (дріжджів) на середовищі з тим чи іншим

джерелом вуглецю. Порівняти цей ріст з ростом культури на основному середовищі. Умовно позначити відсутність росту “ - “, незначний ріст “ + “, середній ріст “ ++ “, значний ріст “ +++ “.

4. Результати спостережень занести до таблиці:

Назва культури	Ріст на середовищі з різними джерелами вуглецевого живлення				
	контроль	глюкоза	лактоза	ксилоза	крохмаль

II. Використання сполук Нітрогену.

Мікроорганізми також відрізняються між собою за своїми потребами в сполуках азоту. Більшість гетеротрофних організмів засвоює нітрогенвмісні органічні сполуки (білки, пептон). У процесі ферментативного гідролізу білків звільняються амінокислоти, які можуть бути асимільовані клітиною безпосередньо в процесі біосинтезу або підлягають розщепленню на більш прості сполуки. Тому розщеплення білків мікроорганізмами завжди супроводжується утворенням певних продуктів: аміаку (який виділяється при дезамінуванні амінокислот), сірководню (утворюється при руйнуванні сірковмісних амінокислот), індолу (утворюється при розпаді триптофану) тощо.

Практичне завдання:

Провести реакцію на утворення аміаку мікроорганізмами при використанні сполук нітрогену.

Хід роботи

1. Стерильний м'ясо-пептонний бульйон розливають у пробірки по 8-10 мл;
2. середовище засівають клітинами досліджуваного мікроорганізму;
3. під ватними корками закріплюють лакмусовий папірець (рис. 18), так, щоб він не торкався середовища. (Попередньо смужки лакмусового паперу кладуть у чашки Петрі й стерилізують у автоклаві при 0,5 атм). Корок рекомендують обгортати фольгою чи плівкою, щоб запобігти випаровуванню аміаку.
4. При утворенні аміаку червоний лакмусовий папірець набуває синього кольору.



Рис. 18. Реакція на утворення аміаку мікроорганізмами.

III. Утворення позаклітинних ферментів.

Макромолекули, які не здатні проникати через мембрану мікроорганізмів, піддаються гідролізу, який здійснюють екзоферменти. Якщо клітини виділяють екзоферменти, які гідролізують певну сполуку, то колонії оточені зонами з продуктами гідролізу.

Практичне завдання:

Дослідити амілолітичну та протеолітичну активність бактерій роду *Bacillus*.

Хід роботи

1. Амілолітична активність.

Вуглевод крохмаль підлягає гідролітичному розщепленню під дією амілаз. Готують середовище наступного складу (г/л): пептон – 10,0; K_2HPO_4 – 5,0; розчинний крохмаль – 2,0; агар – 15,0. рН середовища -6,8-7,0. Середовище стерилізують і розливають в чашки Петрі. Досліджувані культури висівають штрихом у різні сектори і культивують протягом 2-10 діб. На колонії, що вирости, наносять розчин Люголя. Середовище, що містить крохмаль забарвлюється у синій колір, а зона гідролізу залишається незабарвленою або набуває червоно-бурого кольору, якщо крохмаль гідролізував до декстринів. Зону гідролізу крохмалю вимірюють у міліметрах.

2. Протеолітична активність.

Готують м'ясо-пептонну желатину: до 100 мл МПБ додають 10-15 г желатину, залишають на 20-30 хв, щоб набухло, а потім нагрівають на водяній бані до повного розчинення. Середовище розливають у пробірки і стерилізують при 0,5 атм протягом 15 хв. Посів здійснюють уколом. Тривалість культивування 7-10 діб. Розрідження желатину відмічають візуально.

Лабораторна робота № 11

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ПРИРОДІ

Мета роботи: оволодіти підходами та методиками, за допомогою яких виділяють мікроорганізми з різноманітних середовищ існування. Навчитися проводити санітарний аналіз повітря, ґрунту, води.

Матеріали та обладнання: стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильне середовище Ендо (див. хід роботи), стерильний посуд: стаканчики, чашки Петрі, пробірки, колби; шпателі Дригальського; бактеріологічні петлі; скляні градуйовані піпетки; пальники; фарфорова ступка з товкачиком; технічні терези та важки; дезінфікуючий розчин для інвентарю; гумові груші; мембранні фільтри; фільтрувальний папір;

шпателі для відбору ґрунтових зразків; спеціальні флакони для відбору зразків води.

I. Аналіз мікрофлори повітря

Теоретичні відомості

Повітря не є середовищем, сприятливим для існування і розвитку мікроорганізмів. Потрапляючи в повітря, вони швидко гинуть внаслідок висихання, дії сонячних променів і нестачі поживних речовин. Склад мікрофлори повітря дуже різноманітний. Він залежить від ступеню забрудненості повітря мінеральними та органічними речовинами, температури, вологості тощо. Серед мікроорганізмів, які найчастіше виявляються в повітрі, переважають спороносні бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, цвільові гриби, які найбільш стійкі до висихання, а також пігментовані бактерії родів *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, які стійкі до дії ультрафіолетових променів. Мікроорганізми у повітря потрапляють, головним чином, з ґрунту.

Людина в середньому за добу вдихає 12 000-14 000 л повітря, при цьому 99,8% мікробів, які містяться в повітрі, затримуються у дихальних шляхах. У повітрі закритих приміщень виявляють бактерії, які виділяються зі слизових оболонок верхніх дихальних шляхів людини при чханні, кашлі, розмові. Від хворих у повітря виділяються поряд з умовно-патогенними мікроорганізмами (стафілококами, стрептококами) патогенні мікроби (гемолітичні стрептококи, бактерії дифтериту, кашлюку, мікобактерії туберкульозу та інші). При дослідженні повітря закритих приміщень важливим є метод вловлювання мікроорганізмів із повітря. Залежно від цього розрізняють *седиментаційні, фільтраційні та аспіраційні* методи дослідження повітря.

В основі усіх методів лежить однаковий принцип підрахунку бактерій. Вважають, що кожна бактерія, яка потрапила на агаризоване живильне середовище, розмножується, утворюючи колонію, яку можна побачити неозброєним оком. За кількістю підрахованих колоній розраховують кількість бактерій, вловлених про аналізі повітря.

Метод вловлювання повітря рідинами належить до фільтраційних методів. Певний об'єм повітря продувають через певний об'єм рідини (стерильна вода, буфер, рідке живильне середовище). По 0,1 мл цієї рідини висівають у чашки Петрі на тверде живильне середовище. Чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, що виростили на чашках. При обчисленні кількості мікроорганізмів у повітрі враховують об'єм рідини-поглинача та об'єм повітря, яке пройшло через рідину.

Аспіраційний метод з використанням апарата Кротова. Конструкція апарата Кротова ґрунтується на принципі ударної дії струменя повітря. Апарат складається з трьох частин: вузла для відбору проб повітря, мікроманометра та електромотора. Апарат може пропускати від 25 до 50 л повітря за хвилину.

“Засіяні повітрям” чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, які вирости на них. Результати аналізу виражають найчастіше мікробним числом – кількістю мікроорганізмів у 1 м³ повітря.

Метод осадження Коха належить до седиментаційних. Метод дає можливість виявити лише 35-60% мікробів повітря і дозволяє тільки орієнтовано оцінити чистоту повітря. Принцип методу полягає в тому, що мікроорганізми повітря досліджуваного приміщення разом з пилом осаджуються на поверхню поживного агару в чашці Петрі. Час осадження залежить від забрудненості повітря. “Засіяні повітрям” чашки інкубують у термостаті, а через 2-3 дні підраховують кількість колоній на них.

Розрахунки мікробного числа виконують за формулою Омелянського:

$$x = \frac{n \times 5 \times 10^4}{t \times \pi r^2},$$

де: x – кількість мікроорганізмів в 1 м³ повітря;

n – кількість колоній мікроорганізмів, які вирости у чашці Петрі;

t – час осадження, хв;

πr^2 – площа чашки Петрі, см²;

5 і 10^4 – коефіцієнти для перерахунку кількості мікроорганізмів у 1 м³.

Для визначення загального мікробного забруднення проби повітря “висівають” на МПА. Для виявлення у повітрі дріжджів та цвілей використовують сусло-агар. Патогенні мікроорганізми виявляють на відповідних диференційно-діагностичних живильних середовищах, зокрема, гемолітичні стрептококи та стафілококи – на кров’яному агарі.

Офіційних стандартів чистоти повітря не розроблено, але прийнято такі показники оцінки ступеня мікробного забруднення приміщень:

Число мікроорганізмів у 1 м³ повітря

Оцінка чистоти повітря	Літній період		Зимовий період	
	всього мікроорганізмів	гемолітичні бактерії	всього мікроорганізмів	гемолітичні бактерії
чисте	<1500	<16	<4500	<36
забруднене	>2500	>36	>7000	>124

Практичне завдання:

Проведіть облік мікрофлори повітря різних приміщень навчального корпусу факультету.

Хід роботи

1. Розплавлений стерильний МПА розлити у чашки Петрі. Після застигання середовища чашки відкрити у досліджувальному приміщенні на 10 хв. Чашки підписати і помістити у термостат з температурою 30°C на дві доби.

2. Підрахувати кількість колоній, що вирости на чашках. Щоб не помилитись при підрахунку, кожену колонію треба відмічати з дна чашки маркером. Заміряти діаметр чашки за допомогою лінійки. Обчислити мікробне число за формулою Омелянського. Оцінити якісний склад бактерій повітря досліджувальних приміщень. Результати внести до таблиці:

Досліджуване приміщення	Кількість мікроорганізмів у 1 м ³ повітря

3. Розглянути колонії мікроорганізмів з повітря під біокулярою лупою, замалювати їх.

II. Аналіз мікрофлори ґрунту.

Теоретичні відомості

Існує багато методів виявлення гетеротрофних мікроорганізмів. Найбільш розповсюджений – метод серійних (граничних) розведень (рис. 18).

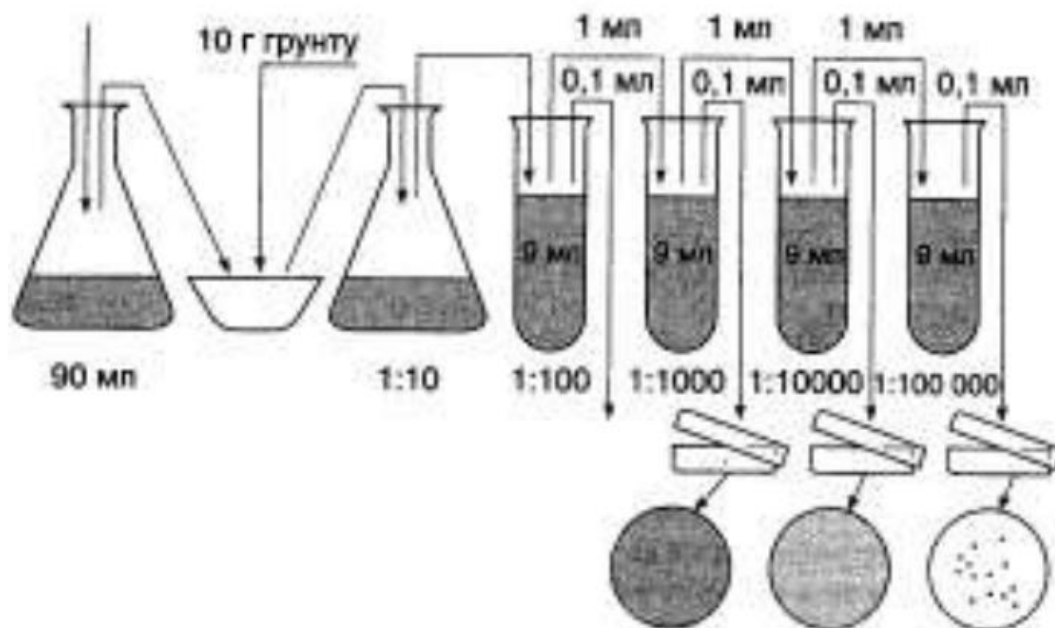


Рис. 18. Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової бовтанки у чашки Петрі.

Для цього наважку ґрунту (10 г) розтирають пестиком у фарфоровій ступці у 90 мл стерильної води. Переносять зразок в 100 мл колбочку і після цього послідовно проводять ґрунтову бовтанку через ряд пробірок, розводячи пробу. Паралельно таку ж наважку ґрунту ставлять на 2 год. на висушування до сушильної шафи на 105⁰С до постійної ваги. Потім ґрунтова суспензія з останньої пробірки об'ємом 0,1 мл наноситься на поверхню чашки Петрі з МПА і розтирається шпателем Дригальського по всій поверхні чашки. Через 3-5 діб ведеться підрахунок окремих колоній, які виростили на чашці та перераховується кількість бактерій на 1 г сухого ґрунту.

Наприклад, із пробірки № 4 на чашці виростило 43 колонії (це означає, що в 1 мл бовтанки пробірки № 4 знаходиться 430 мікробних клітин).

Отже, у пробірці № 3 в 1 мл знаходиться 4 300 клітин мікроорганізмів;

у пробірці № 2 — 43 000 клітин;

у пробірці № 1 — 430 000 клітин;

а у колбочці — 4 300 000 клітин.

Таким чином, в 1 г ґрунту містилося 43 000 000 клітин мікроорганізмів.

Практичне завдання:

Проведіть облік мікрофлори ґрунту різних зразків за описаним вище протоколом.

III. Аналіз мікрофлори води.

Теоретичні відомості

Аналіз води поділяється на 2 етапи:

1) Вивчення водних мікроорганізмів-сапротрофів. Для обліку цієї групи мікроорганізмів користуються також методом серійних розведень із висівом на МПА. Чим більше у воді сапрофітних мікробів, тим вона брудніша.

2) Санітарно-гігієнічний аналіз води – це аналіз на виявлення у воді збудників таких захворювань як дизентерія, черевний тиф, холера (тобто, кишкових захворювань). Пряме виявлення збудників цих захворювань у воді дуже складне і займало б дуже багато часу, тому про їх наявність судять то наявності у воді санітарно-показового мікроорганізму — *Escherichia coli*.

E. coli, подібно до збудників кишкових захворювань, потрапляє у водоймища (річки, озера) з фекальними масами та побутовими стічними водами, її наявність свідчить про забруднення води фекальними масами, а значить є ймовірність перебування там збудників кишкових захворювань.

Подібно до хвороботворних кишкових бактерій, *E. coli*: а) Г-негативна; б) аероб або факультативний анаероб; в) росте на фуксино-сульфітному агарі з лактозою (середовище Ендо), утворюючи там характерні темно-червоні колонії з металевим блиском.

Колі-індекс – це кількість колі-бактерій у 1л води, а **колі-титр** – кількість мл води, у яких нараховується 1 колі-бактерія.

Наприклад, у воді виявлено 20 кишкових паличок у 1 л води. Тоді, колі-індекс такої води – 20, а колі-титр – 50, тобто 1 колі-бактерія знаходиться у 50 мл води.

Практичне завдання:

Проведіть санітарно-гігієнічний аналіз фекального забруднення води.

Хід роботи

1. Приготувати, простерилізувати та розлити у чашки Петрі стерильне **середовище Ендо**. Готове препаративне порошкоподібне середовище Ендо згідно інструкції виробника розчиняють у воді і стерилізують. У іншому випадку готують за наступною схемою:

100 мл 1,2% поживного агару розтоплюють і охолоджують до 70 °С. Додають 1 г хімічно чистої лактози, попередньо розчиненої в невеликій кількості прокип'яченої дистильованої води. В окремих пробірках готують:

- 2-3 мл спиртового насиченого розчину фуксину основного;

- 10 мл 10% розчину сульфату натрію Na_2SO_4 (якість сульфату суттєво впливає на середовище Ендо: а) сульфат повинен бути безводним; б) якщо сульфат некристалічний, його необхідно перекристалізувати або прожарити у сушильній шафі. В останньому випадку сульфат у вигляді аморфного порошку добре зберігається, але при приготуванні середовища його беруть у 20% розчині).

У стерильну пробірку відмірюють 1 мл розчину фуксину і доливають розчин сульфату натрію до знебарвлення фуксину (слабо рожевий колір). Приготовлену суміш вливають у розплавлений агар, ретельно перемішують (не допускаючи утворення піни) і розливають у чашки Петрі.

2. Із попередньо відібраних дослідних зразків води стерильною піпеткою відібрати 1 мл і внести у чашки Петрі із середовищем Ендо. Після цього воду внесеного зразка ретельно розтерти шпателем Дригальського по всій поверхні середовища.

3. Чашки помістити у термостат при 37 °С на 1-2 доби.

4. Підрахувати кількість темно-червоних колоній з металевим блиском.

5. Розрахувати колі-титр та колі-індекс для кожного дослідного зразка води та зробити висновок про фекальне забруднення води у цих пробах.

Лабораторна робота №12

ДОСЛІДЖЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЗАБРУДНЕНOSTІ ДЕЯКИХ ЧАСТИН ТІЛА ЛЮДИНИ

Мета роботи: оволодіти підходами та методиками, за допомогою яких виділяють мікроорганізми з різноманітних середовищ існування. Навчитися проводити аналіз забрудненості частин тіла людини.

Матеріали та обладнання: стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильні чашки Петрі, пробірки; бактеріологічні петлі; предметні скельця; барвник метиленовий синій; мікроскопи.

Теоретичні відомості

Мікроорганізми, які населяють організм здорової людини, формують його нормальну мікрофлору. Вона виникла як результат взаємного пристосування мікро- і макроорганізмів у процесі еволюції.

Значні кількості мікроорганізмів виявлені на різних ділянках шкіри, особливо вкритих волоссям. Розвиток мікроорганізмів відбувається там за рахунок відмерлих клітин епідермісу, виділень сальних і потових залоз. Переважають там грампозитивні бактерії родів *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*. На шкірі однієї людини може знаходитись до 1 212 000 000 особин. При контакті тіла людини з ґрунтом її одяг та шкіра може забруднюватись спорами різних видів мікроорганізмів (кlostридій правцю, газової анаеробної інфекції тощо).

На слизовій ротовій порожнині, в якій є ферменти, амінокислоти, білки, вуглеводи, неорганічні речовини, також виникають сприятливі умови для росту мікроорганізмів. Це забезпечує розвиток близько 160 видів різних мікроорганізмів. Постійними "мешканцями" ротової порожнини є стрептококи *Streptococcus salivarius* (поверхня щік, язика) та *Streptococcus mutans*, який спричиняє карієс зубів, *Treponema microdentium* (слина, зубний наліт), ацидофільна паличка, диплококи, мікрококки. Крім того, у ротовій порожнині часто виявляються тимчасові мікроорганізми, які потрапляють разом з їжею, водою та повітрям.

Переважна більшість мікроорганізмів, які вдихаються людиною з повітрям, затримується в носовій порожнині, незначна частина потрапляє у бронхи. Альвеоли легень і кінцеві шляхи бронхів при цьому залишаються стерильними. У верхніх дихальних шляхах знаходяться зазвичай білі стафілококи, стрептококи, пневмококи, дифтероїди тощо. При послабленні захисних сил організму внаслідок переохолодження, недостатності вітамінів, травм постійні мешканці дихальних шляхів можуть стати причиною різних захворювань.

У порожнині носа здорової людини кількість мікроорганізмів незначна: її слизова продукує речовини бактерицидної дії – муцин та лізоцим. Постійно у носовій порожнині виявляють мікрококи, стафілококи, грамнегативні бактерії.

Різноманітною є мікрофлора **кишково-шлункового тракту людини** – більше 260 видів мікроорганізмів, серед яких переважають анаеробні форми (бактерії родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*), значно менше факультативно анаеробних бактерій (лактобацили, ентерококи, бактерії колі-групи). У різних частинах кишково-шлункового тракту здорової людини виявляється різна кількість мікроорганізмів: найменша у шлунку, більша – у дванадцятипалій і тонкій кишках, найбільша – у товстому кишківнику. Мікрофлора кишківника має антагоністичні властивості у відношенні до багатьох, в тому числі, і патогенних мікроорганізмів, продукує вітаміни, необхідні організму людини, виробляють травні ферменти тощо.

Порушення видового складу нормальної мікрофлори людини за різних умов (захворювання, неправильне використання антибіотиків тощо) призводить до дизбактеріозу і, як результат, - ускладнень типу диспепсії, токсикоінфекції, катарів, пневмонії, кандидозів тощо).

Практичне завдання:

Закладіть у чашку з МПА дослід по виявленню мікрофлори різних частин тіла людини. Виготовте і розгляньте під мікроскоп препарати з окремих колоній бактерії. Охарактеризуйте їхні морфологічні ознаки.

Хід роботи

1. Стерильний МПА розлити у чашки Петрі. Після застигнення середовища чашку розділити олівцем на чотири сектори. На перший сектор покласти декілька волосинок, на другий штрихом висіяти наліт з кутних зубів, взятий прожареною і охолодженою бактеріальною петлею. На третьому секторі зробити відбиток будь-якого пальця немитої руки. Потім добре помити руки милом і щіткою, витерти чистим рушником і цим же пальцем зробити відбиток у четвертому секторі.

2. Чашки підписати і поставити в термостат з температурою 37°C на дві доби.

3. Візуально оцінити розвиток мікроорганізмів у різних секторах чашки, порівняти кількість колоній, що виростили у 3-4 секторах (відбитки пальців митої і немитої руки). З колоній, які переважають в тому чи іншому секторі чашки, виготовити забарвлені фуксином фіксовані препарати і розглянути їх в імерсійній системі мікроскопа.

Лабораторна робота №13 ОТРИМАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНОЇ КУЛЬТУРИ ЗБУДНИКІВ МАСЛЯНОКИСЛОГО БРОДІННЯ

Мета роботи. Навчитися виділяти з природних джерел в селективних умовах різні фізіологічні групи бактерій.

Матеріали та обладнання: колби; пробірки; газовивідні трубки; водяна баня; термостат; предметні та покривні скельця; мікроскопи; фільтрувальний папір; лушпиння картоплі; CaCO_3 ; 96% етиловий спирт; концентрована сірчана кислота; 5% розчин хлориду заліза (III).

Теоретичні відомості

Накопичувальними називають культури, в яких переважають представники однієї групи або одного виду мікроорганізмів. Метод накопичувальних культур введений у практику мікробіологічних досліджень С.М. Виноградським і М. Беєринком. Суть його полягає у створенні селективних тобто вибіркового умов, які забезпечують переважно розвиток потрібних мікроорганізмів із змішаних популяцій. При створенні селективних умов необхідно знати фізіологічні особливості мікроорганізмів, які мають бути накопиченими. Селективні умови створюють найчастіше, підбираючи відповідні середовища. Наприклад, на середовищі, яке не містить азоту, переважно розвиваються азотфіксатори або олігонітрофіли. Накопичувальні культури автотрофних організмів одержують на середовищах, в яких єдиним джерелом вуглецю є вуглекислота. При створенні селективних умов необхідно враховувати неоднакове відношення різних мікроорганізмів до аерації, температури, рН середовища та ін.

Через складність культивування не всі мікроорганізми виділено в чисту культуру, тому їх досліджують в накопичувальних культурах (багато видів ціанобактерій, сіркобактерій).

Бродіння – ферментативне розщеплення вуглецьвмісних сполук в анаеробних умовах, яке супроводжується утворенням АТФ. Усі основні типи бродіння починаються гліколітичним розщепленням вуглеводів і проходять однаково до утворення піровиноградної кислоти та НАДН. Для регенерації останнього мікроорганізми відновлюють піруват або інші сполуки. Внаслідок цього в середовище виділяються різні відновлені продукти: спирти (етиловий, бутиловий тощо). За характером основного продукту, який утворюється при бродінні розрізняють бродіння спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропіоновокисле, ацетонове тощо.



Рис. 19. Збудники маслянокислого бродіння: А – *Clostridium pasteurianum*; Б – *Clostridium pectinovorum*; В – *Clostridium felsinerum*.

Процеси бродіння широко використовують у практичній діяльності людини: для випікання хліба, у виробництві пива, вина, квашенні овочів, силосуванні кормів, у виробництві кисломолочних продуктів, твердих сирів тощо.

Збудниками маслянокислого бродіння є бактерії роду *Clostridium*, широко розповсюджені в ґрунті, гної, забруднених водоймах, на поверхні рослин, у молоці та інших субстратах (рис. 19).

Маслянокислі бактерії – облигатноанаеробні палички, грампозитивні, спороносні майже нерухомі. Енергію для процесів життєдіяльності отримують за рахунок збродження моно- і дисахаридів, декстринів, крохмалю, органічних кислот і спиртів. Як джерело азоту маслянокислі бактерії використовують різні азотисті сполуки (пептон, амінокислоти, аміачні солі), а деякі навіть здатні фіксувати молекулярний азот. Оптимальний розвиток бактерій відбувається при значеннях рН 7,0-7,4 і температурі 35°C. Маслянокисле бродіння (бродиння глюкози, крохмалю) здійснюється за рівнянням:



Крім масляної кислоти під час бродіння в значних кількостях утворюється оцтова кислота, а при рН 5,5 – бутанол, ацетон, ізопропанол.

Практичне завдання:

1. Накопичте культуру маслянокислих бактерій.
2. Виготовте, розгляньте і замалуйте препарат культури маслянокислих бактерій.
3. Проведіть якісні реакції на масляну кислоту.

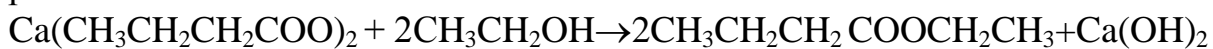
Хід роботи

1. Пробірку на 1/3 об'єму наповнити карпопляним лушпинням (джерело крохмалю і маслянокислих бактерій), внести приблизно 1 г CaCO₃ для нейтралізації масляної кислоти, яка утворюється в процесі бродіння. Пробірку залити на 2/3 об'єму водопровідною водою і закрити гумовим корком з газовивідною трубкою. Пробірку поставити у водяну баню і витримати 10 хв при температурі 80°C. При цій температурі гинуть всі безспорові форми мікроорганізмів. Після пастеризації пробірку помістити в термостат з температурою 30°C на 2-3 доби.

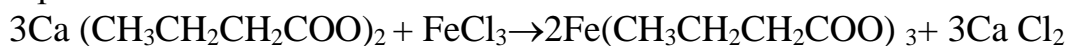
2. Мікроскопіювання маслянокислих бактерій. Після закінчення бродіння краплю зброженої рідини перенести на предметне скло і змішати з краплею розчину Люголя, накрити покривним склом, надлишок рідини відтягнути фільтрувальним папером. Препарат розглянути під мікроскопом при збільшенні 15×40 або 15×90. Знайти булавовидні потовщені палички *Clostridium*, у клітинах яких видно спори.

3. Якісні реакції на масляну кислоту. Масляна кислота має характерний запах загірклого коров'ячого молока. Проте при взаємодії зі спиртами утворює складні ефіри з приємним запахом:

- Одержання масляноетилового ефіру (ананасової есенції). Для одержання ефіру до 4-5 мл зброженої рідини додати 0,5 мл 96%-ного етилового спирту і 1-2 мл міцної сірчаної кислоти. При нагріванні з'являється характерний запах ефіру. Реакція відбувається згідно з рівнянням:



- Реакція з хлоридом заліза (III). Нейтральні розчини бутиратів при нагріванні з FeCl_3 дають коричневе забарвлення. Реакція відбувається за таким рівнянням :



У пробірку налити приблизно 5 мл культуральної рідини і додати 2 мл 5%-ного розчину FeCl_3 . При нагріванні отримують коричневе забарвлення внаслідок утворення бутирату заліза.

Лабораторна робота №14 ОТРИМАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНОЇ КУЛЬТУРИ ОЦТОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Мета роботи. Ознайомитися із основними групами мікроорганізмів, які використовуються в біотехнологічних процесах.

Матеріали та обладнання: колби Ерленмеєра; ватні корки; пробірки; градуйовані піпетки; предметні скельця; термостат; фуксин водний; пиво; оцтова кислота; 1н NaOH; фенолфталеїн; 96% етиловий спирт; концентрована сірчана кислота.

Теоретичні відомості

Оцтовокислі бактерії здатні утворювати органічні кислоти (оцтову, глюконову, пропіонову, масляну тощо) шляхом неповного окислення цукрів та спиртів киснем повітря.

Оцтовокислі бактерії – безспоріві, грамнегативні, малорухливі палички з перитрихальним (рід *Acetobacter*) або полярним (рід *Gluconobacter*) розташуванням джгутиків.

Оцтовокислі бактерії розвиваються тільки в аеробних умовах. Як субстрат для окислення вони можуть використовувати етанол, який окислюють до оцтової кислоти, а також інші спирти і цукри. Деякі оцтовокислі бактерії (група *peroxydans*) здатні накопичувати оцтову кислоту як проміжний продукт, який піддається подальшому окисленню. Інші бактерії (група *suboxydans*) накопичують оцтову кислоту як кінцевий продукт. До першої групи належить *Gluconobacter oxydans*, до другої – *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum*, *A. xylinum*.

Оцтовокислі бактерії відрізняються розмірами клітин, характером утворення плівки та її хімічним складом, стійкістю до спирту і оцтової кислоти. Оптимальна температура їхнього розвитку знаходиться в межах

20-35°C. Для отримання накопичувальної культури оцтовокислих бактерій використовують слабкоалкогольні напої (пиво, сухе вино). Розвитку оцтовокислих бактерій сприяє наявність у середовищі спирту і утворення оцтової кислоти, яка знижує рН середовища й, таким чином, пригнічує ріст інших мікроорганізмів.

Практичне завдання:

1. Виготовте, розгляньте і замалюйте препарат оцтовокислих бактерій.
2. Визначте кількість утвореної оцтової кислоти і проведіть якісну реакцію на оцтову кислоту.

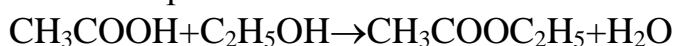
Хід роботи

1. У колби Ерленмеєра об'ємом 100 мл налити 20 мл пива, підкисленого оцтовою кислотою. Зазвичай додають 15% (за об'ємом) оцтової кислоти. Титруванням контрольної проби визначити початкову кислотність середовища. Для цього 10 мл підкисленого оцтовою кислотою пива відтитрувати 1 н розчином NaOH в присутності фенолфталеїну. Колби закрити ватними корками і помістити в термостат з температурою 30°C на дві доби.

2. Після закінчення досліду 10 мл культуральної рідини відтитрувати 1 н розчином NaOH в присутності фенолфталеїну. За різницею об'ємів NaOH, які пішли на титрування на початку і в кінці досліду, визначають кількість утвореної оцтової кислоти (1 мл 1 н NaOH відповідає 0,06 г оцтової кислоти). Розрахувати відсотковий вміст ацетату.

3. Мікроскопіювання оцтовокислих бактерій. З плівки виготовити зафарбований фуксином мазок. Розглянути його під мікроскопом при збільшенні 15×90.

4. *Якісна реакція на оцтову кислоту.* До 4-5 мл культуральної рідини додати 0,5 мл етилового спирту і 2-3 мл концентрованої сірчаної кислоти. При нагріванні з'являється запах оцтовокислого ефіру. Реакція відбувається за рівнянням:



Лабораторна робота №15

ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи. Оволодіти методами виділення чистих культур мікроорганізмів та визначення їхньої чистоти.

Матеріали та обладнання: стерильний посуд: чашки Петрі, пробірки, колби; шпателі Дригальського; бактеріологічні петлі; водяна баня; мікроскопи, предметні скельця; культури бактерій: *Escherichia coli*,

Sarcina flava, *Bacillus subtilis*; м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильна водогінна вода; набір реактивів для забарвлення за Грамом (див. лаб. робота № 5).

Теоретичні відомості

Мікробна культура, яка містить мікроорганізми лише одного виду називається **чистою культурою**. Чисті культури мікроорганізмів необхідні для правильної уяви про їх морфологічні і фізіолого-біохімічні особливості; для визначення видової приналежності мікробів; для генетичних досліджень.

Одержання чистих культур суттєво посунулось вперед після введення в мікробіологічну практику твердих живильних середовищ. Лише на твердих середовищах утворюються колонії, які є потомством однієї клітини. Тобто, умовно кожна колонія являє собою чисту культуру, але так буває не завжди. Справа в тому, що на поверхню середовища в місце утворення колонії могли потрапити дві (або більше) різні клітини. В такому випадку колонію сформує той вид мікроорганізму, який росте швидше за інші, внаслідок того, що умови культивування були оптимальними саме для цього виду. Якщо на чашках Петрі ми бачимо колонії, які виростили там після посівів з повітря, води або ґрунту, то простий пересів такої колонії в пробірку не дає гарантії, що культура буде чистою. Процедура ізоляції чистої культури є більш багатоступеневим і складним процесом.

Виділення чистих культур деяких мікроорганізмів полегшується їх особливими культуральними ознаками. Окремі види мають дуже характерні і добре відомі мікробіологам колонії. Наприклад, *Bacillus mycoides* має колонії, подібні до переплетених гіф мікроскопічних грибів. Вид *Pseudomonas aeruginosa* (синьогнійна паличка) середовищах, які містять білок, виділяє навкруги своїх колоній синьо-зелений екзопігмент. Вид *Sarcina flava* виділяється, головним чином, з повітря і характеризується припіднятими яскраво-жовтими колоніями. Вид *Proteus vulgaris* здатний до активного руху. Його легко виділити з зіпсованого м'яса, так як він здатен просуватися вверх по поверхні скошеного середовища у вигляді ніжної сіруватої плівки.

Практичне завдання.

1. Виділити чисту культуру *Escherichia coli* із суміші клітин *Escherichia coli* та *Sarcina flava*.
2. Виділити чисту культуру *Bacillus subtilis* із суміші *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*.

Хід роботи

1. Одержати від викладача суспензію суміші клітин *Escherichia coli* та *Sarcina flava*. Суспензію методом виснажуючого штриха розсівають по

МПА в чашках Петрі. Через 1–2 доби термостатування, ретельно розглядають колонії, що вирости окремо по ходу штриха. Колонії *E. coli* мають сірий колір, а *S. flava* – жовтий. З окремої колонії одного виду петлею роблять пересів на скошений в пробірках МПА. Після того, як бактерії виростуть, з них (з використанням стерильної водогінної води) готують суспензії кожної культури окремо і знову виснажуючим штрихом розсівають по поверхні МПА. Розсів із розведеної суспензії можна робити як петлею (методом виснажуючого штриха), так і за допомогою шпателью Дригальського. Процедуру пересівів повторюють 2–3 рази. Нарешті, з окремої колонії на чашці роблять пересів на скошений агар в пробірку. Після того, як бактерії виростуть, контролюють їх чистоту, забарвлюючи мазок 1–2-добової культури за Грамом. Чиста культура *E. coli* в мазку буде мати вигляд однорідних коротеньких паличок рожевого кольору, а *S. flava* – пакетів коків синьо-фіолетового кольору.

2. Одержати від викладача суспензію суміші бактерій *E. coli* та *B. subtilis*. Для виділення чистої культури спорових бактерій, суміш необхідно пропастеризувати, витримавши суспензію 10 хв. на водяній бані з температурою 80°C. Внаслідок пастеризації всі вегетативні клітини мають загинути, а термостійкі спори *B. subtilis* – зберегтися. Після прогрівання роблять висів із суспензії петлею виснажуючим штрихом або шпателем на чашки Петрі. Чашки вміщують в термостат до утворення на них колоній. Якщо колонії, які виростуть, будуть відрізнятися між собою морфологічно, – це означає, що пастеризація була проведена неякісно. Якщо ж усі колонії морфологічно однакові – з однієї робимо пересів на скошений агар у пробірку і отримуємо, таким чином, чисту культуру *B. subtilis*. Чистоту культури підтверджують мікроскопіюванням мазка, забарвленого за Грамом.

Лабораторна робота №16 **ВИДІЛЕННЯ АЗОТФІКСУЮЧИХ БАКТЕРІЙ З ҐРУНТУ**

Мета роботи: освоїти метод отримання накопичувальної культури азотфіксуючих бактерій.

Матеріали та обладнання: стерильне середовище Ешбі (див. хід роботи); стерильні: чашки Петрі, пінцети; термостат; бактеріологічні петлі; предметні скельця; барвник фуксин; мікроскопи; зволожений ґрунт.

Теоретичні відомості

Асиміляція живими організмами молекулярного азоту атмосфери називається біологічною азотфіксацією. Серед азотфіксаторів розрізняють симбіотичні бактерії (*Rhizobium*, *Frankia*, *Bradyrhizobium*) та вільноживучі азотфіксатори (*Clostridium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azotomonas*, *Derxia*), ціанобактерії (*Nostoc*, *Anabaena*, *Nodularia*).

До роду *Rhizobium* належать бактерії, які викликають утворення бульбочок у бобових рослин. Це грамнегативні палички, строгі аероби. Бульбочкові бактерії характеризуються специфічністю – здатністю утворювати бульбочки тільки на коренях певних видів рослин. За специфічністю по відношенню до рослин розрізняють такі види: *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. meliloti*, *Rh. trifolii*, *Rh. phaseoli*, *Rh. lupini*, *Rh. japonicum* тощо). Бульбочковим бактеріям властиві також вірулентність (здатність проникати через кореневі волоски в коріння рослин і утворювати там бульбочки) та активність. Активність пов'язана з наявністю у них леггемоглобіну – необхідного фактору симбіотичної азотфіксації. Окрім бульбочкових бактерій здатність до симбіотичної фіксації азоту мають й інші мікроорганізми (актиноміцети, стрептоміцети), які утворюють бульбочки більш, ніж на 200 видах рослин (вільха, береза, гінго, обліпіха тощо).

До вільноживучих азотфіксаторів належать *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter fluorescens*. Біологічна фіксація азоту є ферментативним процесом відновлення молекулярного азоту. Азотфіксатори, незважаючи на їхню різноманітність (вільноживучі, симбіотичні, фотосинтетики, гетеротрофи, аероби, анаероби), мають одну й ту ж ферментативну систему – нітрогеназу. Нітрогеназа активує молекулу азоту. Нітрогенази всіх відомих азотфіксаторів складаються з двох білків: азоферредоксину (містить залізо) та молібдоферредоксину (містить молібден). Особливістю нітрогеназної системи є те, що вона інактивується в присутності кисню. Тому навіть аеробні азотфіксатори, маючи специфічні пристосування для захисту від високих концентрацій кисню, здійснюють процес асиміляції азоту в анаеробних умовах. Так, *Azotobacter* утворює велику кількість слизу, який перешкоджає дифузії кисню в клітини.

Практичне завдання:

1. Накопичте культуру вільноживучих азотфіксаторів.
2. Визначте чисельність азотфіксаторів у даному зразку ґрунту.
3. Виготовте і замалюйте препарати азотфіксаторів.

Хід роботи

Для виділення азотфіксуючих вільноживучих бактерій використовують агаризоване **середовище Ешбі**, до складу якого входить: маніт – 20%, K_2HPO_4 – 0,2%, NaCl – 0,2%, $MgSO_4$ – 0,2%, K_2SO_4 – 0,1%, $CaCO_3$ – 1%, дистильована вода – 1 л. Середовище автоклавують при 1 атм. протягом 20 хв.

1. Стерильне, охолоджене до 50°C, середовище Ешбі розлити в стерильні чашки Петрі. Після застигнення середовища на його поверхню обережно помістити за допомогою стерильного пінцета до 20 грудочок зволоженого ґрунту. Чашки підписати й поставити у термостат при

температурі 30°C на 5-7 діб. В аеробних умовах на чашках Петрі зазвичай виростають бактерії роду *Azotobacter*, які утворюють навколо грудок ґрунту слизисті колонії різного забарвлення. *A. chroococcum* – буро-коричневі, *A. agilis*, *A. beijerinckii* – жовті, *A. indicum* – буро-червоні.

2. Підрахувати кількість колоній, які утворились навколо грудочок ґрунту.

3. Із слизистих колоній виготовити фіксований, зафарбований фуксином препарат, розглянути його під мікроскопом при збільшенні 90×

Лабораторна робота №17 СПИРТОВЕ БРОДІННЯ

Мета роботи: вивчити біохімічні процеси та використання ферментів у харчових технологіях.

Матеріали та обладнання: реагенти для синтетичного середовища (див. хід роботи); колби Ерленмеєра; гумові корки з газовивідними трубками; терези; термостат; концентрована сірчана кислота; 1% розчин біхромату калію.

Теоретичні відомості

Близько 80% харчових виробництв так чи інакше пов'язані із використанням мікробіологічних процесів. У багатьох виробництвах вони використовуються ще з сивої давнини. Такими стародавніми біотехнологіями є хлібовипічка, виноробство, пивоваріння, що основані на спиртовому бродінні. Відбір та вдосконалення технологій в цих виробництвах здійснювалися на протязі тисячоліть.

Спирт (етанол) – один з найрозповсюдженіших продуктів зброджування вуглеводів мікроорганізмами. Збудники спиртового бродіння широко розповсюджені в природі – особливо у середовищах з високим вмістом вуглеводів. Спиртове бродіння здійснюють деякі види бактерій: *Sarcina ventriculi* – грампозитивні анаеробні нерухливі коки, накопичують в середовищі також ацетат і лактат, виділяють молекулярний водень; *Zytoponas mobilis* – факультативні анаероби, грамнегативні короткі і рухливі палички, які розкладають глюкозу до пірувату шляхом Етнера-Дудорова (в Мексиці використовуються для виготовлення національного спиртного напою пульке); *Erwinia amylovora* – грамнегативні рухливі палички, факультативні анаероби, відносяться до ентеробактерій, є патогенами для рослин. Етанол продукується також дріжджами (роди *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*), цвільовими грибами (рід *Mucor*). Найбільше застосування в промисловості мають штами *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini*, *Schizosaccharomyces pombe*. Вони витримують високі концентрації спирту в середовищі (до 14%), утворюють мало побічних продуктів при бродінні.

Дріжджі зброджують вуглеводи (моно- і дисахариди) за рівнянням:

$$C_6H_{12}O_6 + 2AD\Phi + 2\Phi_H \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2AT\Phi + 2H_2O$$

Як джерело азоту дріжджі використовують пептони, амінокислоти, солі амонію. Найкращий розвиток цих мікроорганізмів спостерігається в кислому або слабкокислому середовищі (рН 4,0-6,0) і при температурі 25°C-30°C. Селективні умови створюються за рахунок високої концентрації цукру (до 10%), низького рН середовища та спирту, який виділяється в процесі бродіння.

Практичне завдання:

1. За кількістю виділеного CO₂, виділеного внаслідок спиртового бродіння дріжджів, обчисліть кількість утвореного спирту та кількість зброженої сахарози.
2. Проведіть якісну реакцію на етиловий спирт.

Хід роботи

1. Виготовити **синтетичне середовище** такого складу: сахароза – 10 г, пептон – 1 г, KН₂РO₄ – 0,1 г, MgSO₄ – 0,03 г, вода – 300 мл. У колбу Ерленмейера об'ємом 100 мл внести 40 мл середовища (рН 5,5) і близько 1 г пресованих пекарських дріжджів. Колбу закрити гумовим корком з газовивідною трубкою, зважити на вазі з точністю до 0,1 г і помістити в термостат з температурою 30°C на три доби.

2. Кількість вуглекислоти, яка виділяється при бродінні, визначити зважуванням колб перед бродінням і після його закінчення. Знаючи кількість виділеної вуглекислоти, за рівнянням реакції обчислити кількість утвореного спирту і зброженого цукру.

3. До 1-2 мл бражки додати 1-2 мл концентрованої сірчаної кислоти і по краплях 1%-го розчину біхромату калію, поки оранжеве забарвлення цього реактиву не зміниться на синьо-зелене внаслідок взаємодії біхромату з етанолом за рівнянням:



Лабораторна робота №18 **МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МОЛОКА І КИСЛОМОЛОЧНИХ** **ПРОДУКТІВ**

Мета роботи: визначення якості молока і кисломолочних продуктів за мікробіологічними показниками.

Матеріали та обладнання: стерильний посуд: пробірки, чашки Петрі, градуйовані піпетки; стерильна дистильована вода; предметні скельця; мікроскопи; середовище Буліра (див. хід роботи); м'ясо-пептонний агар (МПА); сусло-агар; 2,5% розчин метиленового синього; 0,1

н NaOH; фенолфталеїн; фенольний реактив; суміш Нікіфорова; досліджуване молоко та кисломолочний продукт; термостат, водяна баня, термометр.

I. Мікробіологічний аналіз молока

Теоретичні відомості

Коров'яче молоко містить 83-89% води і 11-17% сухих речовин, у складі яких 2-5% жиру, 2-4% білків та 4-5% вуглеводів. Молоко також багате на мінеральні речовини (кальцій, натрій, фосфор, калій, магній) і вітаміни (А, Е, Д, групи В, РР, С). Тому воно є прекрасним середовищем для росту мікроорганізмів.

За своєю природою свіжовидоєне молоко – стерильна біологічна рідина. Проте отримати стерильне молоко практично неможливо. Джерела забруднення різні: посуд та обладнання, повітря, вода, корми.

Нормальну мікрофлору молока складають молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*) і молочнокислі палички. Деякі з них в процесі своєї життєдіяльності продукують антибіотики і, таким чином, гальмують розвиток інших бактерій.

Санітарний стан молока визначають за вмістом у ньому бактерій групи кишкової палички (БГКП), а також спороутворюючих анаеробних бактерій, дріжджів. При дотриманні санітарно-гігієнічного режиму можна отримати молоко з відсутністю БГКП в 0,1 мл молока.

При інфекційних захворюваннях тварин у молоко можуть потрапити збудники туберкульозу, бруцельозу, сибірки, ящура, сальмонельозу, лептоспірозу та ін.

У навчальних лабораторіях найчастіше визначають загальну кількість мікроорганізмів у молоці (мікробне число) та колі-титр. Визначення в молоці патогенних мікробів проводять в спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

Практичне завдання:

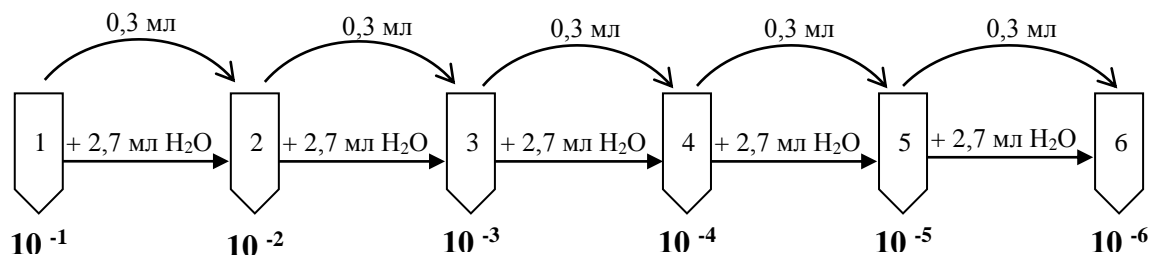
1. Визначте загальне мікробне число молока, колі-титр та редуцтазну пробу у молоці.
2. На основі отриманих даних зробіть висновок про якість досліджуваного продукту.

Хід роботи

1. Визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці

За шкалою оцінки якості молоко поділяється на 4 класи. До першого класу належить молоко, в 1мл якого налічується до 5×10^5 клітин мікроорганізмів, до другого – від 5×10^5 до 4×10^6 , до третього – від 4×10^6 до 2×10^7 і до четвертого понад 20 мільйонів. Якість молока першого класу вважається доброю, другого – задовільною, третього – сумнівною, четвертого – незадовільною.

Беруть 0,3 мл молока і змішують з 2,7 мл стерильної води. З цієї проби готують ряд послідовних розведень молока за наступною схемою:



Для визначення кількості бактеріальної флори 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі із м'ясо-пептонним агаром. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24 год, після чого підраховують кількість утворених колоній.

Для визначення дріжджів, 1 мл відповідного розведення вносять в стерильну чашку Петрі з сусло-агаром. Посіви інкубують при 30 °С протягом 72 год, після чого підраховують кількість утворених колоній.

2. Визначення колі-титру молока

Колі-титром називається найменший об'єм або маса продукту, в якому виявлена хоча б одна кишкова паличка. Для визначення колі-титру молока засівають 6 пробірок із **середовищем Буліра** (у 1 л нейтрального МПБ додають 2,5 г маніту і водного розчину нейтрального червоного до вишнево-червоного кольору і стерилізують 15 хв) молоком у об'ємі 3мл, 2мл, 1 мл, 0,5 мл, 0,3 мо та 0,1 мл. Посів в усі пробірки проводиться стерильними піпетками. Проби культивують при 43 °С протягом 24 год. Результати враховують за зміною кольору середовища з вишневого на оранжевий та утворенням газу в поплавках. Якщо зміни не відбуваються, то говорять про відсутність кишкової палички в молоці. При виявленні газоутворення і помутніння середовища проводять оцінку якості молока. **Бродильним титром** називається найменша кількість молока, яка викликала бродіння. Відповідно до ГОСТу, граничний титр кишкової палички в молоці групи «А» – 3 мл, групи «Б» – 0,3 мл.

3. Визначення якості молока за редуктазною пробою

Проба на редуктазу застосовується для швидкого визначення бактеріальної чистоти молока, не враховуючи точного числа бактерій. Принцип методу – бактерії, розмножуючись у молоці, виділяють у середовище фермент редуктазу (один із відновлюючих ферментів). Кількість ферменту, що виділяється, може бути різною і залежить від виду бактерій та їх віку. Однак деякий паралелізм між кількістю бактерій у молоці і його відновлюючою здатністю помічається.

У стерильні пробірки вносять 1 мл 2,5% розчину метиленового

синього та 10 мл попередньо нагрітого до 38-40 °С досліджуваного молока, пробірки закривають гумовими корками. Ретельно перемішують вміст пробірок і поміщають їх в термостат з температурою 38-40 °С (оптимальна для дії редуказит температура). Спостереження за знебарвленням спостерігають через 20 хв, 2 год і 5,5 год слідкуючи, щоб пробірки не струшувались. Верхній шар молока у пробірках може бути синім, але це не береться до уваги. Проба на редуктазу вважається завершеною, коли настає повне знебарвлення молока. Залежно від часу знебарвлення та зміни кольору молоко відносять до певного класу (див. табл.).

Характеристика класів молока

Найменування показників	I	II	III	IV
Час відновлення (знебарвлення)	більше 5 год 30 хв	від 5 до 2 год	від 2 год до 20 хв	менше 20 хв
Якість молока	добра	середньої якості	погане	дуже погане
Кількість мікроорганізмів в 1 мл	менше 500 тис.	500 тис. – 4 млн	4–20 млн	більше 20 млн

II. Аналіз якості кисломолочних продуктів.

Теоретичні відомості

Молочнокислі продукти – добре середовище для розвитку мікроорганізмів. Тут містяться білки, невелика кількість пептону, вільні амінокислоти, вітаміни тощо. Молочнокисле бродіння, в залежності від накопичення кінцевих продуктів (молочної кислоти, оцтової кислоти, етилового спирту та інших органічних сполук), поділяють на гомоферментативне та гетероферментативне. Перший тип бродіння здійснюють, в основному, молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. bovis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*) і лактобацили (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. helveticus*), другий – лактобацили (*L. fermentum*, *L. brevis*), а також *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides* та інші (рис. 20).

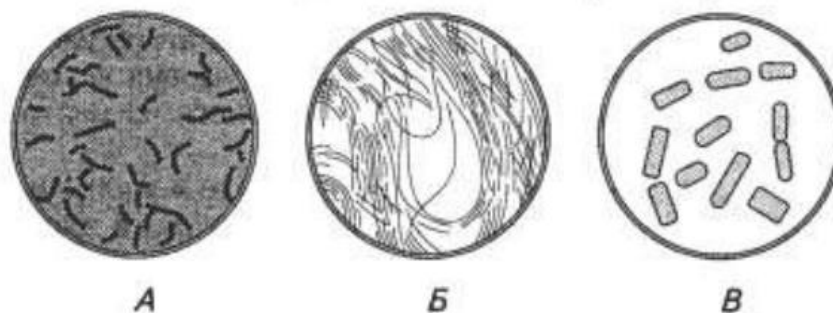


Рис. 20. Мікрофлора молочнокислого бродіння: А – молочний стрептокок (*Streptococcus lactis*); Б – болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*); В – молочна цвіль (*Oidium lactis*).

Молочнокислі бактерії об'єднані в родину *Lactobacteriaceae*. Ця група морфологічно є досить гетерогенною (довгі і короткі палички, коки). Всі вони є грампозитивними, не утворюють спор (за виключенням *Lactobacillus inulinus*) і в більшості випадків є молорухливими. Молочнокислі бактерії є анаеробами або мікроаерофілами, у них немає гемопротеїдів, але вони здатні рости в присутності кисню. Якщо певна бактерія здатна рости аеробно, але не має каталазної активності, то швидше за все, це молочнокисла бактерія. Інша особливість молочнокислих бактерій – потреба в багатьох ростових факторах, тому культивують їх на складних живильних середовищах (дріжджовий екстракт, молочна сироватка, томатний сік, кров). Оскільки внаслідок розвитку молочнокислих бактерій накопичується молочна кислота і, як наслідок, суттєво зростає кислотність середовища, то його слід добре забуферювати. Для цього часто використовують крейдовий агар. За рахунок складних потреб для росту молочнокислі бактерії практично ніколи не зустрічаються в ґрунті, водоймах. У природних умовах вони зустрічаються:

- в кишківнику, а також на деяких слизових людини та тварин (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium*; *Streptococcus faecalis*, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*; *Pneumococcus*);

- на рослинах та їх рештках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrückii*, *L. fermenti*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*).

Молочнокислі бактерії, які мешкають на рослинах, відіграють суттєву роль при запасанні кормів для худоби. Для виготовлення силосу рослинну масу пресують, додають органічні або мінеральні кислоти, солі, щоб створити сприятливі умови для розвитку молочнокислих бактерій.

Квашена капуста також є продуктом, в приготуванні якого беруть участь молочнокислі бактерії. “Природними” накопичувальними культурами молочнокислих бактерій є кисломолочні продукти (кефір, кисле молоко, йогурт, сметана, ряжанка, сир). У промисловому виробництві кисломолочні продукти отримують за допомогою спеціальних заквасок. Це переважно чисті або змішані культури молочнокислих бактерій, деякі закваски містять лактозасвоюючі дріжджі. При тривалому зберіганні молочнокислих продуктів на їх поверхні утворюється біла плівка. Така ж плівка може утворюватися при квашенні огірків, капусти тощо. Це молочна цвіль *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), яка є частим і небажаним супутником молочнокислого бродіння. Вона окислює молочну кислоту, яку продукують молочнокислі бактерії, до CO₂ та H₂O. При цьому знижується кислотність, що створює сприятливі умови для розвитку гнилісних бактерій. Показниками якості молочнокислих продуктів є наявність активної мікрофлори та молочної кислоти.

Практичне завдання:

1. Визначте кількість молочної кислоти та кислотність різних кисломолочних продуктів.

2. Проведіть якісну реакцію на молочну кислоту.
3. Виготовте, розгяньте і замалюйте препарати мікроорганізмів з різних кисломолочних продуктів.

Хід роботи

1. Визначення кількості молочної кислоти. У хімічну склянку налити 10 мл кисломолочного продукту і відтитрувати його 0,1 н NaOH у присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Визначити процентний вміст молочної кислоти та кислотність продукту в градусах Тернера (°Т). Обчислення проводити, враховуючи, що 1 мл 0,1 н NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, а 1 мл 0,1 н NaOH, що йде на титрування 100 мл продукту, відповідає 1°Т. Оцініть якість кисломолочного продукту (кислотність солодкого молока 15-18°Т, кисломолочних продуктів 65-95°Т).

2. Якісна реакція на молочну кислоту. У фарфорову чашку внести 5-10 крапель кисломолочного продукту або його сироватки і додати по краплях фенольний реактив, який складається з суміші 5%-них розчинів карболової кислоти і хлориду заліза (III) (1:2), розведених подвійною кількістю води. При наявності молочної кислоти спостерігається зміна забарвлення із синього на жовтий внаслідок утворення лактату заліза.

3. Мікроскопіювання молочнокислих бактерій. З кисломолочного продукту на предметному склі виготовити мазок, висушити і зафіксувати протягом 5-10 хв у суміші Нікіфорова (5% етиловий спирт і диетиловий ефір, 1:1) для усунення жиру. Це полегшує фарбування та мікроскопіювання бактерій. Фіксований препарат зафарбувати метиленовою синькою (5 хв) і розглянути в імерсійній системі мікроскопа.

Лабораторна робота №19 МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ М'ЯСА

Мета роботи: визначення якості м'яса за мікробіологічними показниками.

Матеріали та обладнання: стерильна дистильована вода; м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильний посуд: піпетки, чашки Петрі, пробірки, фарфорова ступка; предметні скельця; проби м'яса; барвники для фарбування за Грамом (див. лаб. роб. №5); кварцовий пісок; скальпелі; пальники; мікроскопи.

Теоретичні відомості

М'ясо забійних тварин є сприятливим поживним середовищем для розвитку багатьох мікроорганізмів. Воно містить достатньо води (50-75%), білкових речовин (14-21%, має рН 5,9-6,2.

На свіжому м'ясі, що отримують при забої здорових тварин з дотриманням відповідних технологічних інструкцій і санітарно-гігієнічних вимог виробництва, мікроорганізми знаходяться тільки на поверхні у кількості 10^3 - 10^6 клітин. Видовий склад мікрофлори свіжого м'яса дуже різноманітний. Це переважно стафілококи, мікрококи, бактерії групи кишкової палички і протея, клостридії, молочнокислі бактерії, дріжджі, актиноміцети та гриби. М'ясо може бути інфіковане і патогенними мікроорганізмами, такими як *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, сальмонеллами, ентерококами.

Практичне завдання:

1. Проведіть мікроскопічне дослідження м'яса та визначте загальну кількість мікроорганізмів у м'ясопродуктах.
2. На основі отриманих даних зробіть висновки про якість досліджуваних продуктів.

Хід роботи

1. Мікроскопічне дослідження м'яса.

Для мікроскопічного дослідження з проб м'яса стерильним скальпелем вирізають не менше трьох дослідних зразків. Перший – з поверхневого шару, другий – з глибини 2-2,5 см, третій – з глибини 3-3,5 см. Відрізані шматочки притискають до предметного скла (препарат відбиток), препарати підсушують на повітрі, фіксують в полум'ї пальника і фарбують за Грамом. Фарбовані препарати розглядають з імерсією не менше п'яти полів зору. Результати досліджень співставляють з даними, наведеними в таблиці.

Таблиця. Ознаки свіжості м'яса

Якість м'яса	Результати мікроскопії
Свіже	Препарати, як правило, погано забарвлюються. В полі зору препаратів-відбитків з верхніх шарів м'яса виявляються поодинокі грам позитивні коки, рідше палички. В середніх шарах мікроорганізми найчастіше зовсім не виявляються.
Сумнівної свіжості	В поверхневих шарах виявляється декілька десятків мікроорганізмів; у мазках з глибоких шарів не більше 20-30 клітин, домінують кокові форми. Виявляються, як грампозитивні, так і грамнегативні мікроорганізми. Помітні сліди розпаду м'язової тканини.

Несвіже	Велика кількість мікроорганізмів, переважають палички, здебільшого грамнегативні. Велика кількість розкладеної м'язової тканини.
---------	--

2. Визначення загального мікробного числа.

Занурити 100-150 г зразка досліджуваного м'яса на 1-2 хв у кип'яток (щоб вбити мікроорганізми на його поверхні). Із середовища вирізають шматочок масою 1г. Дослідний шматок поміщають у стерильну фарфорову ступку, додаючи 3-5 г стерильного піску та ретельно розтирають. Одночасно поступово додають 10 мл стерильної води та готують ряд послідовних розведень згідно схеми, наведеної у протоколі лабораторної роботи №18.

Готові розведення залишають на 1-2 хв для відстоювання. Потім 0,1 мл суспензії висівають на чашку Петрі з МПА. Культивують протягом 24 год при 37 °С. По закінченні інкубації підраховують кількість колоній, що виростили на поживному середовищі та перераховують їх на 1 кг м'яса, враховуючи розведення.

Лабораторна робота №20 МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ЯЄЦЬ

Мета роботи: визначення якості яєць за мікробіологічними показниками.

Матеріали та обладнання: стерильні дистильована вода, м'ясопептонний агар (МПА); середовище Кеслера (див. хід роботи); стерильний посуд: піпетки, пробірки; пінцети чи скальпелі; предметні скельця; барвники для фарбування за Грамом (див. лаб. роб. №5); пальники; мікроскопи; 96%етилловий спирт; ватні тампони; яйця.

Теоретичні відомості

Мікроорганізми потрапляють до яйця здебільшого під час кладки. Внутрішній вміст яйця здорової птиці довго залишається без мікробів завдяки лізоциму (наявний всередині продукту) і надшкарлуповій та підшкарлуповій оболонкам, які перешкоджають проникненню мікробів всередину. У процесі зберігання захисні сили яйця слабшають через руйнування оолонок. Мікроби (кишкова паличка, протей, стафілококи, цвілеві гриби) через пори проникають в яйце, піддаючи його псуванню. В процесі останнього часто простежується гниття білка з виділенням неприємного запаху (аміак, сірководень), а також пліснявіння з появою чорних плям під шкаралупою.

У хворої птиці, часто водоплавної, в кишечнику можуть міститися сальмонели. Зараження яйця відбувається всередині птиці ще під час його

закладки і формування. Таке яйце зачасту викликає у людей захворювання - сальмонельоз.

Практичне завдання:

1. Визначте наявність кишкової палички та бактерій роду протей (*Proteus*) у яєчному білку.

Хід роботи

Яйця перед дослідженням протирають стерильним тампоном, або тампоном, змащеним спиртом, а потім обпалюють. Яйце пробивають пінцетом чи скальпелем і стерильною піпеткою відбирають його вміст (окремо білок і жовток).

1. Визначення титру кишкової палички

Білок у об'ємі 0,3 мл розводять 2,7 мл стерильної води. Далі готують ряд послідовних розведень досліджуваного продукту у стерильній дистильованій воді (за схемою, описаною у лаб. роботі №18). Після цього 0,5 мл розведень 10^{-1} , 10^{-4} засівають у пробірки з 4,5 мл середовища Кесслера, яке готують напередодні. Культивують при 43 °С протягом 24-48 год. Якщо у пробірках не відмічається газоутворення, то говорять про відсутність бактерій групи кишкової палички.

Приготування **середовища Кесслера**: до 1 л води додати 10 г пептону і 50 мл жовчі великої рогатої худоби. Кип'ятити протягом 30 хв при постійному перемішуванні. Середовище фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Додають 2,5 г глюкози, доводять об'єм до 1 л, встановлюють рН 7,4-7,6. Далі сюди вносять 2 мл 1% водного розчину генціанвіолету. Середовище розливають у пробірки, стерилізують протягом 10 хв.

2. Виявлення бактерій роду *Proteus*

З нативного досліджуваного матеріалу та з розведень 10^{-1} і 10^{-3} петлею засівають зразки у конденсаційну воду на дні пробірок із скошеним МПА. Посіви культивують протягом 24 год при 37 °С. Далі спостерігають за наявністю чи відсутністю росту бактерій на скошеній поверхні. Відомо, що бактерії роду *Proteus* здатні швидко пересуватись вздовж поверхні поживного середовища. У випадку наявності росту з поверхні МПА відбирають мікроби і виготовляють препарати для мікроскопії (забарвлені за Грамом). Грам-негативні рухливі палички, які видно в полі зору мікроскопа, відносять до бактерій роду *Proteus*.

Лабораторна робота №21 ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитися з антибіотичною дією певних видів мікроорганізмів та навчитися оцінювати її активність.

Матеріали та обладнання: стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильні: чашки Петрі, пінцети; свердло; термостат; бактеріологічні петлі; культури мікробів-антагоністів та тест-мікроорганізмів; лінійка.

Теоретичні відомості

Антибіотики – хімічні речовини біологічного (мікробного, рослинного, тваринного), напівсинтетичного чи синтетичного походження, які в малих концентраціях викликають затримку росту або загибель чутливих до них мікроорганізмів чи пухлинних клітин у внутрішньому середовищі тваринного організму. Серед антибіотиків є речовини ациклічної, гетероциклічної, ароматичної, тетрациклінової структури, а також макроліди, хіноліни, аміноглікозиди, поліпептиди тощо.

Найактивнішими продуцентами антибіотичних речовин серед мікроорганізмів є актиноміцети, стрептоміцети, міцеліальні гриби, спороутворюючі бактерії. За направленістю інгібуючої дії розрізняють протибактеріальні, протигрибкові, противірусні, протипротозойні, протипухлинні антибіотики. Деякі антибіотики (пеніцилін, бацитрацин та інші) пригнічують розвиток обмеженого числа видів мікроорганізмів. Інші (тетрацикліни, хлорамфенікол, еритроміцин, карбоміцин та інші) пригнічують ріст багатьох грампозитивних та грамнегативних бактерій, рикетсій.

В залежності від важливості мішеней для життєвих функцій мікроорганізмів, зворотності пошкоджень, а також концентрації і умов дії антибіотики справляють мікробоцидну (призводить до загибелі) або мікробостатичну (гальмуючу) дію. В останньому випадку відбувається призупинення росту і розмноження мікроорганізмів. Після видалення антибіотика із середовища або втрати ним антимікробних властивостей ріст і розмноження мікроорганізмів відновлюються.

Пошуки і виділення культур мікробів-антагоністів проводять різними методами. Одним з них є метод агарових блоків. Чисту культуру мікроорганізму, антибіотичну активність якого досліджують, попередньо висівають на агаризоване середовище і культивують до утворення "газону". Потім стерильним свердлом для корків (діаметр 6-8 мм) вирізають агаровий блок і переносять в іншу чашку на поверхню живильного середовища. Тест-мікроорганізми за допомогою бактеріологічної петлі висівають від блоку штрихом по радіусах чашки.

Практичне завдання:

Оцініть антибіотичну активність досліджуваної культури методом агарових блоків.

Хід роботи

1. Стерильний розплавлений МПА розлити в чашки Петрі.
2. З агарової пластинки, на якій попередньо добре виросла культура досліджуваного мікроорганізму, вирізати стерильним свердлом блок. Помістити його за допомогою охолодженого профламованого пінцету на середину чашки в живильне середовище, яке ще не до кінця застигло.
3. Коли агар застигне, по радіусах чашки висіяти штрихом тест-мікроорганізми: грам негативні – *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*; грам позитивні – *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*.
4. Чашки підписати і помістити в термостат з температурою 30°C на ніч.
5. Чутливість тестів-мікроорганізмів до мікроба-антагоніста оцінити, вимірюючи відстань штриха тест-культури від агарового блоку. Результати вимірів занести до таблиці:

Тест-культура Культура-антагоніст	Довжина штриха тест-культури, мм				

Лабораторна робота №22 ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

Мета роботи: освоїти метод визначення чутливості бактерій до антибіотиків.

Матеріали та обладнання: стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА); стерильні: чашки Петрі, піпетки; шпатель Дригальського; індикаторні диски з антибіотиками; культура бактерій; лінійка.

Теоретичні відомості

Природна чутливість мікроорганізмів до антибіотиків пов'язана з наявністю у їхньому складі мішеней, структур, на які антибіотики справляють пошкоджуючу дію або етапів метаболізму, які вони блокують, а природна стійкість – з відсутністю у мікроорганізмів таких мішеней або їх слабкою спорідненістю до антибіотика. Найчастіше мішенями для дії антибіотиків є клітинна стінка (пептидоглікан), цитоплазматична мембрана або ферменти, локалізовані у ній (пермеази), рибосоми, генетичні структури чи окремі етапи синтезу білка, нуклеїнових кислот, ліпідів.

Зміна мішеней для дії антибіотика призводить до розвитку стійкості мікроорганізмів до антибіотика, яка може поширюватися й на інші

антибіотики з аналогічним механізмом дії (*перехресна стійкість*). **Набута стійкість** до антибіотиків може бути зумовлена синтезом ферментів, які руйнують антибіотики (β -лактамаза руйнує β -лактамне кільце пеніцилінів), обмеженням доступу антибіотика до мішені, зниженням метаболічної цінності мішені, винесенням молекул антибіотика з бактеріальної клітини спеціалізованою системою, гіперпродукцією молекул мішені. Набута стійкість може бути пов'язана зі зміною фенотипу або генотипу мікроорганізму. При **фенотиповій стійкості** відбувається підвищення стійкості до антибіотика більшості особин популяції. Стійкість у цьому випадку має адаптивний тимчасовий характер і є результатом репресії-дерепресії генів хромосоми або плазмід. **Генотипова стійкість** виникає внаслідок одно- чи багатоступеневої мутації в хромосомі або R-плазмідах, а також внаслідок передачі шляхом кон'югації, трансдукції, трансформації або транслокації генів стійкості транспозонами R-плазміди чи ділянки хромосоми, яка відповідає за стійкість.

Перенесення генетичного матеріалу зазвичай зумовлюють появу стійкості до одного-двох антибіотиків, передача R-плазміди часто супроводжується формуванням стійкості до багатьох антимікробних речовин, появою так званих **множинно-стійких штамів**. У чутливій до антибіотика популяції спочатку з'являються одиничні стійкі мутанти або рекомбінанти, які на селективному середовищі, яке містить відповідний антибіотик, швидко займають домінуюче положення. Поява стійких до антибіотиків популяцій мікробів може бути зумовлена занесенням у популяцію та селекцію у ній стійких особин з інших популяцій, що часто спостерігається в лікарнях.

Спільний вплив двох або трьох антибіотиків в залежності від механізмів їхньої дії може справити сумарний (адитивний), нижче сумарного (антагоністичний) або вищий від сумарного (синергічний) ефект.

Антибіотики мікробного походження мають широке застосування в медичній практиці. Для вибору антибіотика, необхідного для лікування певного захворювання, використовують метод індикаторних дисків. Принцип методу полягає в тому, що паперові диски, насичені розчинами різних антибіотиків, поміщають на живильне агаризоване середовище, засіяне досліджуваною культурою. Антибіотик на вологій поверхні дифундує в агар і припиняє ріст мікроорганізмів, якщо вони чутливі до нього і навколо диску утворюється "стерильна зона" (рис. 21).

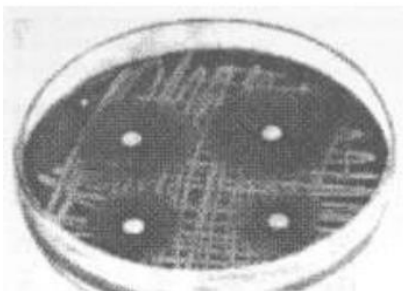


Рис. 21. Визначення чутливості бактерій до різних антибіотиків

Ступінь чутливості бактерій до антибіотика визначається розміром стерильної зони (чим вона більша, тим чутливіші бактерії до досліджуваного антибіотика).

Для зручності в роботі паперові диски з антибіотиками випускають різнокольоровими або з підписами. Так, індикаторні диски пеніциліну зелені (Пен); стрептоміцину – фіолетові (Стр); левоміцетину – сині (Лев); тетрацикліну – жовті (Тет); неоміцину – темно-фіолетові (Нео); канаміцину – оранжеві (Кан).

Практичне завдання:

Визначте чутливість досліджуваних культур до антибіотиків.

Хід роботи

1. Роплавлене живильне середовище розлити в стерильні чашки Петрі. Кілька крапель суспензії досліджуваної бактеріальної культури перенести стерильною піпеткою на поверхню твердого середовища. Для одержання рівномірного росту розтерти суспензію бактерій по поверхні середовища в чашці стерильним шпателем (посів “газоном”).

2. Індикаторні диски покласти на поверхню МПА профламбованим пінцетом. На кожную чашку помістити не більше 4-6 різних індикаторних дисків.

3. Чашки підписати і поставити у термостат з температурою 30°C на ніч.

4. Розглянути чашки і відзначити наявність стерильних зон навколо індикаторних дисків. Виміряти лінійкою діаметр стерильних зон. Результати занести до таблиці:

Досліджувана культура бактерій	Діаметр стерильної зони, мм				
	Диски антибіотиків				

Високочутливими до досліджуваного антибіотика вважають мікроорганізми, зона затримки росту яких навколо індикаторного диску перевищує 25 мм, чутливими – 15-25 мм, малочутливими – 11-15 мм.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**Основна література:**

1. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
2. Гудзь С.П. Мікробіологія: Підручник: [для студ. вищ. навч. закл.] / С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш, І.С. Білінська. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. – 360 с.
3. Малигіна В.Д. Мікробіологія та фізіологія харчування. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів I-IV рівня акредитації. К.: Кондор, 2009. – 242 с.
4. Фурзікова Т.М., Сергійчук М.Г., Власенко В.В., Швець Ю.В., Позур В.К. Мікробіологія. Практикум.: – Київ: Фіосоціоцентр, 2006. – 210 с.
5. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія: Посібник // Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 449с.
6. Пирог Т.П., Решетняк Л.Р., Поводзинський В.М., Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв / За ред. Т. П. Пирог. Навчальний посібник. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 464 с.

Додаткова література:

1. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. К.: Либідь, 2001. – 312 с.
2. Шлегель Г. Микробиология. М.: Мир, 1987, 1969.
3. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією. К.: Вища школа, 1992. – 431 с.
4. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1988. – 392 с.
5. Власенко В.В., Власенко І.Г. Фізіологія та гігієна харчування. Вінниця: ТОВ «Меркюрі Поділля», 2012. – 300 с.

Зміст

Вступ	1
Мікробіологічна лабораторія та правила роботи в ній	2
<i>Лабораторна робота №1</i> Методи стерилізації	3
<i>Лабораторна робота №2</i> Мікроскоп та техніка мікроскопіювання. Морфологія мікроорганізмів	8
<i>Лабораторна робота №3</i> Виготовлення впрепаратів мікроорганізмів	14
<i>Лабораторна робота №4</i> Дослідження морфології бактерій та цільових грибів	17
<i>Лабораторна робота № 5</i> Фарбування бактерій за Грамом	22
<i>Лабораторна робота №6</i> Виготовлення живильних середовищ для мікроорганізмів	23
<i>Лабораторна робота №7</i> Методи культивування мікроорганізмів	28
<i>Лабораторна робота №8</i> Визначення кількості живих та життєздатних клітин мікроорганізмів	31
<i>Лабораторна робота № 9</i> Вплив умов культивування на ріст мікроорганізмів	34
<i>Лабораторна робота № 10</i> Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів	35
<i>Лабораторна робота № 11</i> Розповсюдження мікроорганізмів у природі	38
<i>Лабораторна робота №12</i> Дослідження бактеріальної забрудненості деяких частин тіла людини	44
<i>Лабораторна робота №13</i> Отримання накопичувальної культури збудників маслянокислого бродіння	45
<i>Лабораторна робота №14</i> Отримання накопичувальної культури оцтовокислих бактерій	48
<i>Лабораторна робота №15</i> Виділення чистих культур мікроорганізмів	49
<i>Лабораторна робота №16</i> Виділення азотфіксуючих бактерій з ґрунту	51
<i>Лабораторна робота №17</i> Спиртове бродіння	53
<i>Лабораторна робота №18</i> Мікробіологічний аналіз молока і Кисломолочних продуктів	54
<i>Лабораторна робота №19</i> Мікробіологічний аналіз м'яса	59
<i>Лабораторна робота №20</i> Мікробіологічний аналіз яєць	61
<i>Лабораторна робота №21</i> Визначення антибіотичної активності мікроорганізмів	62
<i>Лабораторна робота №22</i> Визначення чутливості бактерій до антибіотиків	64
Рекомендована література	67
Зміст	68