

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Загальна мікробіологія та вірусологія

Лабораторний практикум

Навчальний посібник

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за освітньою програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Укладачі: Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, Л. О. Тітова

Електронне мережне навчальне видання

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2022

Рецензент *Михайлова О. Б., к.б.н., ст. наук. співробітник. відділу мікології
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України*

Відповідальний
редактор *Поліщук В. Ю., к.т.н.*

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 6 від 24.06.2022 р.)
за поданням Вченої ради факультету біотехнології і біотехніки
(протокол № 11 від 14.06.2022 р.)*

У навчальному посібнику наведено рекомендації до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Загальна мікробіологія та вірусологія», що передбачають набуття студентами умінь та навичок роботи з мікроорганізмами. Розглянуто методи мікроскопічних досліджень препаратів живих і фіксованих клітин, приготування живильних середовищ та культивування мікроорганізмів, наведені режими стерилізації середовищ та лабораторного посуду. Представлено інформацію про способи отримання чистих культур мікроорганізмів та надано дані щодо методології досліджень їх морфологічних, фізіологічних та біохімічних властивостей.

Лабораторний практикум призначений для здобувачів ступеня бакалавра денної та заочної форм навчання за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».

Реєстр. № НП 21/22-708. Обсяг 4,1 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Перемоги, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022

Зміст

Правила роботи та техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії.....	4
Заняття 1. Мікробіологічна лабораторія	7
Заняття 2. Світловий мікроскоп та основні прийоми мікроскопіювання мікроорганізмів	12
Заняття 3. Приготування препаратів живих клітин	21
Заняття 4. Приготування препаратів фіксованих клітин. Прості методи зabarвлення	25
Заняття 5. Морфологія цвільових грибів та дріжджів	32
Заняття 6. Морфологія бактерій та актиноміцетів	43
Заняття 7. Складні методи забарвлення. Забарвлення бактерій за Грамом ..	54
Заняття 8. Будова бактеріальної клітини	60
Заняття 9. Методи стерилізації	72
Заняття 10. Харчування мікроорганізмів. Приготування живильних середовищ	79
Заняття 11 – 12. Культивування мікроорганізмів	88
Заняття 13. Виділення чистих культур аеробних мікроорганізмів. Частина 1	98
Заняття 14. Виділення чистої культури аеробних мікроорганізмів Частина 2. Вивчення морфолого-цитологічних ознак культури	103
Заняття 15. Виділення чистих культур аеробних мікроорганізмів. Частина 3. Біохімічні властивості виділених культур.....	110
Вимоги до оформлення протоколу лабораторних робіт.....	116
Рекомендована література.....	117
Додатки	118

Правила роботи та техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії

Правила техніки безпеки

1. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі та класти на столи сумки, портфелі та інші особисті речі.

2. У мікробіологічній лабораторії дозволяється працювати тільки у халатах, які захищають одяг від забруднення мікроорганізмами і перешкоджають розповсюдженню їх за межі лабораторії.

3. У лабораторії категорично забороняється вживати їжу. Не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів). Виконання цих вимог попереджує потрапляння сторонніх мікроорганізмів із повітря й ротової порожнини в досліджуваний матеріал.

4. За кожним студентом закріплюють постійне робоче місце і мікроскоп. Робоче місце під час занять повинно утримуватися у цілковитому порядку.

5. У мікробіологічній лабораторії робота проводиться з відкритим полум'ям пальника. Особливу небезпеку становлять рукава халата, які необхідно підвернути або застібнути манжети. Студентам, які мають довге волосся, необхідно зібрати його в пучок або скористатися медичними шапочками. Волосся горить протягом 5 секунд. Не можна нахилятися над пальником. Запалювати пальник потрібно тільки в період роботи з ним.

6. На всіх пробірках і чашках Петрі обов'язково пишуть назву мікроорганізму, дату його посіву, прізвище студента, номер групи.

7. Всі пробірки з культурами мікроорганізмів повинні стояти в штативах. Не можна класти їх на стіл в горизонтальне положення.

8. У ході роботи бактеріологічні петлі та голки, шпателі, скляні палички знезаражуються прожарюванням у полум'ї пальника. Використані шпателі, предметні та покривні скельця, піпетки вміщують у банки з дезінфекційним розчином. Класти на стіл названі предмети категорично забороняється. Це є важливим чинником контамінації (зараження) предметів навколишнього середовища. Після і перед будь-якою маніпуляцією необхідно стерилізувати всі інструменти.

9. У випадку попадання досліджуваного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат або взуття необхідно негайно повідомити про це викладача і під його керівництвом провести дезінфекцію.

10. Після закінчення заняття робоче місце дезінфікується, використаний матеріал та інші предмети здаються лаборантові, миються з милом руки.

11. На кожне заняття в групі призначають чергових. Під час роботи вони слідкують за виконанням кожним студентом правил роботи і поведінки в лабораторії. Після закінчення заняття чергові здають відпрацьований матеріал на стерилізацію, вимикають газові крани, світло та провітрюють приміщення.

Причини пожеж у мікробіологічній лабораторії та способи їх гасіння

Можливість виникнення пожежі у мікробіологічній лабораторії особливо велика, бо постійно доводиться працювати з газовими або спиртовими пальниками, електронагрівальними приладами, легкозаймистими фарбами, фіксаторами, розчинниками, виготовленими на спирті, фенолі, ацетоні і т. ін. При роботі з газовим пальником можливий “проскакування” полум’я, що може привести до загорання гумової трубки або предметів та речовин, які знаходяться поруч. Займання може трапитися під час стерилізації сухим жаром посуду, загорнутого у папір, при неправильному режимі роботи сушильної шафи. Причиною пожеж може стати несправність електричних приладів.

У випадку виникнення пожежі необхідно пам’ятати, що засіб його гасіння залежить від причини, яка викликала загорання і від характеру об’єкта, який горить. Якщо горять дерев’яні предмети, то їх можна гасити водою, піском і за допомогою вогнегасника. Нерозчинні у воді органічні речовини (бензин) не можна гасити водою, бо в цьому випадку пожежа може навіть посилитися. Ці речовини слід гасити піском або ж швидко накрити азбестом. Розчинні у воді органічні речовини (спирт, ацетон) можна гасити водою. Для гасіння усіх вищеназваних речовин можливе використання чотирьоххлористого вуглецю. При зіткненні з вогнем він утворює важкі випари, які витісняють кисень, внаслідок чого горіння припиняється. Найбільш ефективним протипожежним засобом у лабораторії є вогнегасники. На кожному з них є інструкція, з якою повинен бути ознайомлений кожен, хто працює в лабораторії. Таким чином, на випадок пожежі в лабораторії у визначених місцях завжди повинні бути: пожежний рукав, відро або ящик з піском, повстяною тканиною або вовняна ковдра, вогнегасник, чотирьоххлористий вуглець.

При виникненні пожежі всі засоби гасіння, які є під рукою, необхідно негайно використовувати і одночасно викликати пожежну команду.

Невідкладна медична допомога в лабораторії

У лабораторії трапляються випадки, які потребують невідкладної медичної допомоги – порізи рук, опіки гарячими предметами або кислотами і лугами.

При пораненнях склом необхідно перш за все видалити його уламки з рани (якщо вони у ній zostалися) і, упевнившись, що їх там більше нема, змастити рану йодом та перев'язати уражене місце.

При термічних опіках першого та другого ступеня обпечене місце необхідно помістити під струмінь холодної води, а після цього присипати двовуглецевим натрієм або обробити примочками із свіжовиготовлених розчинів питної соди (2%) або марганцевокислого калію (5%). Найкращим розчином для примочок є абсолютний або 96% спирт. Він одночасно знезаражує та знеболює.

При опіках кислотами і лугами уражену ділянку слід швидко промити великою кількістю води. Після цього на обпечене місце слід накласти примочку: при опіках кислотою – з 2%-го розчину соди, при опіках лугом – із слабого розчину оцтової кислоти.

При отруєнні газом потерпілого необхідно вивести на свіже повітря і негайно викликати лікаря або доставити його в медпункт.

Контрольні питання:

1. Які речовини можна гасити водою, а які ні? Поясніть чому.
2. Назвіть порядок дій для надання допомоги при хімічних опіках, спричинених лугами.
3. Назвіть порядок дій для надання допомоги при хімічних опіках, спричинених кислотами.
4. Які речовини можуть бути використані для дезінфекції поверхонь та інструментів? Які ще методи дезінфекції ви знаєте?
5. Чим зумовлено використання чотирьоххлористого вуглецю для гасіння більшості речовин?
6. Які предмети обов'язково повинні бути на випадок пожежі в лабораторії?
7. Яку допомогу необхідно надати при термічних опіках першого та другого ступеня?
9. Як потрібно поводитись при роботі з відкритим полум'ям пальника?

Заняття 1. Мікробіологічна лабораторія

Робота з мікроорганізмами здійснюється в мікробіологічній лабораторії. У навчальних закладах студентам дозволяють працювати з живими непатогенними мікроорганізмами. Однак підчас посіву сапрофітних мікроорганізмів з навколишнього середовища може бути внесена і патогенна мікрофлора. Тому робота в мікробіологічній лабораторії вимагає суворого дотримання техніки безпеки.

Підготовка мікробіологічної лабораторії до роботи

Дезінфекція

Мікробіологічну лабораторію необхідно часто провітрювати. До початку і після закінчення роботи для зниження кількості мікроорганізмів у повітрі й на різних поверхнях у лабораторних приміщеннях застосовують різні способи дезінфекції. Слово «дезінфекція» має значення знезараження. Найчастіше застосовуваний спосіб дезінфекції повітря – опромінення ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі від 200 до 400 нм. Для дезінфекції робочих поверхонь до і після проведення занять їх протирають 0,5 – 3 % розчинами хлораміну, 2 – 5 % розчином лізолу або 70% розчинами етилового чи ізопропілового спиртів. По закінченні роботи необхідно провести профілактичну дезінфекцію рук.

Забруднені патологічним матеріалом або культурою мікробів градуйовані та пастерівські піпетки, скляні шпателі та металеві інструменти відразу після їх використання опускають у скляні банки з дезінфекційним розчином, які знаходяться на столі біля кожного робочого місця.

Обов'язковій дезінфекції підлягають також використані робочі предметні та покривні скельця, бо навіть у фіксованому і забарвленому мазку іноді зберігаються життєздатні мікроорганізми, які можуть стати джерелом внутрішньолaboratorного зараження. Не обробляється дезінфекційними засобами тільки той посуд, у якому вирощувалися мікроорганізми. Його складають у металеві бачки або бікси та здають у стерилізацію.

Спеціальне обладнання для роботи в мікробіологічній лабораторії

Для роботи в навчальній мікробіологічній лабораторії використовується спеціальне обладнання:

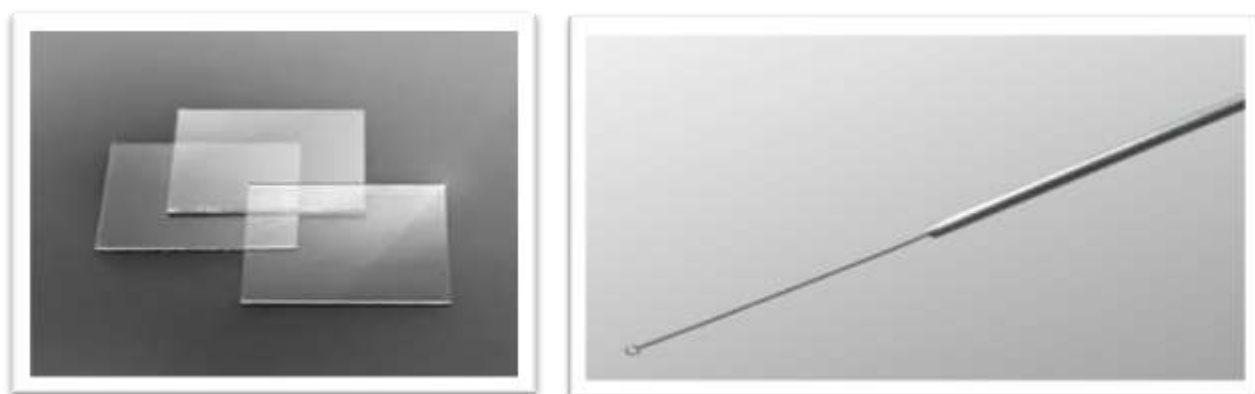
Предметні скельця призначені для приготування мікробіологічних препаратів. Предметні скельця мають розміри 26 × 76 мм. Товщина скла 1,2 –

1,4 мм. Існують різновиди предметних скельць (рис. 1.1). Так **предметне скельце з заточеним краєм** використовується для розтяжки мазків. **Предметне скельце з лункою** призначене для мікроскопії препаратів «висяча крапля».



Рис. 1.1. Предметні скельця

Покривні скельця використовуються для захисту об'єктива мікроскопа при мікроскопії, а також для збереження мікропрепаратів. Товщина скла становить 0,2 мм. Випускаються покривні скельця різних розмірів: 18×18 , 20×20 , 24×24 мм (рис. 1.2 а).



а

б

Рис. 1.2. Покривні скельця (а), мікробіологічна петля (б)

Мікробіологічна петля складається з петлетримача і власне петлі, виготовленої з ніхромової нитки різного діаметру (рис. 1.2 б). Мікробіологічна петля призначена для посіву мікроорганізмів і приготування мазків.

Чашка Петрі, що винайдена в 1877 році німецьким бактеріологом Юліусом Ріхардом Петрі, асистентом Роберта Коха, використовується для культивування мікроорганізмів на щільних живильних середовищах. Діаметр чашок може бути від 50 до 100 мм, висота близько 15 мм (рис. 1.3). Багаторазові чашки Петрі виготовляються з прозорого скла, вони витримують

стерилізацію. Чашки з пластичних матеріалів одноразові і поставляються стерильними в герметичній упаковці.



Рис. 1.3. Чашка Петрі

Шпатель Дригальського призначений для засівання матеріалу на щільні живильні середовища. Випускаються шпателі L- і Т-форми (рис. 1.4).



а



б

Рис.1.4. Шпатель Дригальського
а – Т-форми, б – L-форми

Лабораторні мікроскопи призначені для роботи з об'єктами, які значно менше роздільної здатності людського ока.

За методами дослідження *оптичні мікроскопи* поділяються на мікроскопи:

- **світлого поля** (на світлому фоні виділяється більш темний об'єкт);
- **темного поля** (на темному тлі виділяється світлий об'єкт або його крайові структури);
- **фазового контрасту** (на світло-сірому тлі спостерігається темно-сірий рельєфний об'єкт);
- **люмінесценції** (на темному тлі виділяються яскраві об'єкти або частини об'єкта);
- **поляризованого світла** (спостерігається яскраво забарвлене в різні кольори або відтінки зображення об'єкта).

У мікробіологічній практиці, крім оптичних мікроскопів, використовуються також **електронні мікроскопи**. На відміну від оптичних, в електронних мікроскопах замість світлового потоку використовується пучок електронів. Роздільна здатність електронного мікроскопа в 1000 – 10000 разів перевершує можливості традиційного світлового мікроскопа і для кращих сучасних приладів може бути менше 1 нм.

У мікробіологічній лабораторії найчастіше використовуються світлові **монокулярні** або **бінокулярні** мікроскопи (рис. 1.6).



Монокуляр



Бінокуляр



Тринокуляр

Рис.1.6. Світлові мікроскопи

Монокулярні – складаються тільки з одного окуляра. У бінокулярі – окуляр сконструйований за типом бінокля, що дозволяє спостерігати об'єкт двома очима. Існують і **тринокулярні** мікроскопи (рис. 1.6). Наявність тринокулярної насадки дозволяє виводити зображення на монітор комп'ютера.

Виконання завдання

1. Ознайомитися з основними принципами роботи і оснащенням мікробіологічної лабораторії.

2. Занести в протокол основні види обладнання мікробіологічної лабораторії.

Матеріали та обладнання

Мікроскопи, чашки Петрі, предметні і покривні скельця, бактеріологічна петля, шпатель Дригальського.

Контрольні питання:

1. Яке призначення Чашки Петрі, мікробіологічної петлі, шпателя Дригальського?
2. Яке призначення предметного і покривного скельця?
3. Для виконання якого типу препарату використовується предметне скельце з лункою?
4. З якого матеріалу виготовляють чашки Петрі, які витримують багаторазову стерилізацію?
5. З якого матеріалу виготовляють нитку мікробіологічної петлі?
6. Чим відрізняються оптичні мікроскопи фазового контрасту від оптичних мікроскопів світлого поля?
7. Чим відрізняються оптичні мікроскопи люмінесценції від оптичних мікроскопів поляризованого світла?

Заняття 2. Світловий мікроскоп та основні прийоми мікроскопіювання мікроорганізмів

Світловий мікроскоп дозволяє вивчати морфологію і будову клітин мікроорганізмів, розміри яких вимірюються у більшості випадків мікрометрами ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм}$). Мікроскопи забезпечують збільшення об'єктів у тисячі (світлові мікроскопи) та десятки і сотні тисяч разів (електронні мікроскопи). Найбільш зручними мікроскопами, призначеними для мікробіологічних досліджень, є світлові мікроскопи (рис. 2.1). Світловий мікроскоп складається з трьох частин: оптичної, механічної і освітлювальної.

Механічна частина мікроскопа МБР-1 включає штатив з предметним столиком і тубус.

Верхня частина штатива – тубусотримач (17) – має форму дуги та може переміщуватися на 50 мм обертанням макрометричного (16) та мікрометричного (15) гвинтів, які призначені для грубого та точного фокусування препарату.

Предметний столик (6) може переміщуватися у горизонтальній площині на 8 мм за допомогою двох гвинтів (9), які знаходяться справа та зліва, а також обертатися навколо своєї осі. Це дає можливість встановити будь-яку частину мікроскопічного препарату у центр поля зору. На поверхні столика є дві клеми (18), які затискують препарат. Під предметним столиком закріплено кронштейн конденсора (14), який може переміщуватися у межах 20 мм спеціальним гвинтом (13), розміщеним справа.

У верхній частині тубусотримача знаходиться револьвер (4), який обертається навколо своєї осі. У отвори револьвера вгвинчуються об'єктиви (5) та гніздо для кріплення прямого або похилого тубуса (2). У верхній кінець тубуса вставлений окуляр (1).

Оптична частина мікроскопа складається з об'єктива (5) окуляра (1).

Об'єктиви – найбільш важлива та цінна частина мікроскопа, яка визначає його оптичну потужність. Вони складаються з системи лінз, вміщених у металеву оправу. Біологічні мікроскопи звичайно оснащені трьома змішаними об'єктивами зі збільшенням $8\times$ або $20\times$, $40\times$ і $90\times$ або $100\times$. Перші три називаються сухими, бо при їх використанні між об'єктом і об'єктивом знаходиться шар повітря. При цьому, приймаючи до уваги різницю між показниками заломлення скла препарату ($n = 1,53$) та повітря ($n = 1,0$), частина світлових променів відхиляється і не потрапляє в око спостерігача. Звичайно сухі об'єктиви використовуються при невеликих (400 - 600 разів) збільшеннях.

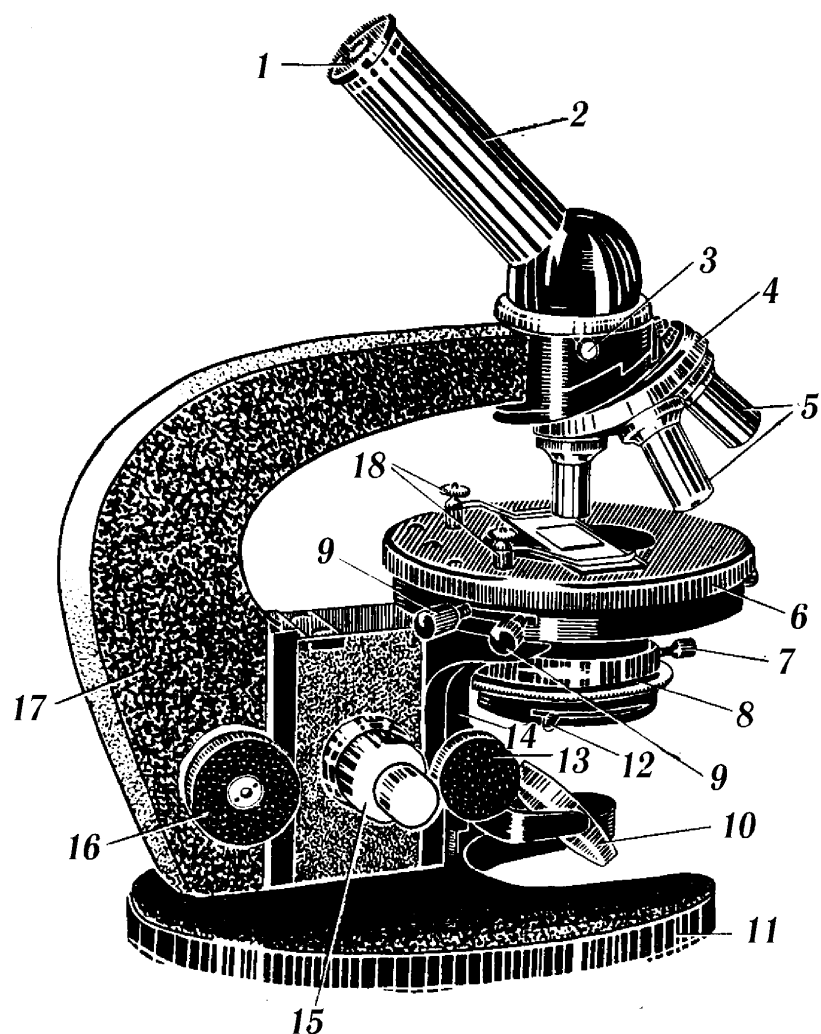


Рис. 2.1. Мікроскоп МБР-1

1 – окуляр; 2 – нахилений тубус; 3 – гвинт для кріплення тубуса; 4 – револьвер; 5 – об'єктиви; 6 – предметний столик; 7 – гвинт для закріплення конденсора у гільзі; 8 – конденсор; 9 – гвинти для переміщення предметного столика; 10 – дзеркало; 11 – підковоподібна основа мікроскопа; 12 – рукоятка ірисової діафрагми конденсора; 13 – рукоятка переміщення конденсора; 14 – кронштейн конденсора; 15 – рукоятка мікрометричного гвинта; 16 – рукоятка макрометричного гвинта; 17 – тубусотримач; 18 – клєми для притискування препарату.

Об'єктиви зі збільшенням $90\times$ та $100\times$ називаються **імерсійними** (лат. *immersio* – занурюю), бо під час роботи вони обов'язково занурюються у імерсійну рідину, котра знаходиться між об'єктивом та об'єктом. У якості імерсійної рідини використовують кедрову олію ($n = 1,52$), гліцерин ($n = 1,4$), воду ($n = 1,3$) або інші речовини, показники заломлення яких близькі до показника заломлення скла. Завдяки цьому усі промені не заломлюються і потрапляють до об'єктиву, що забезпечує добру видимість найдрібніших об'єктів. Імерсійні об'єктиви дають збільшення до 900 - 1350 разів.

Хід променів у сухій та імерсійній системі представлений на рисунку 2.2.

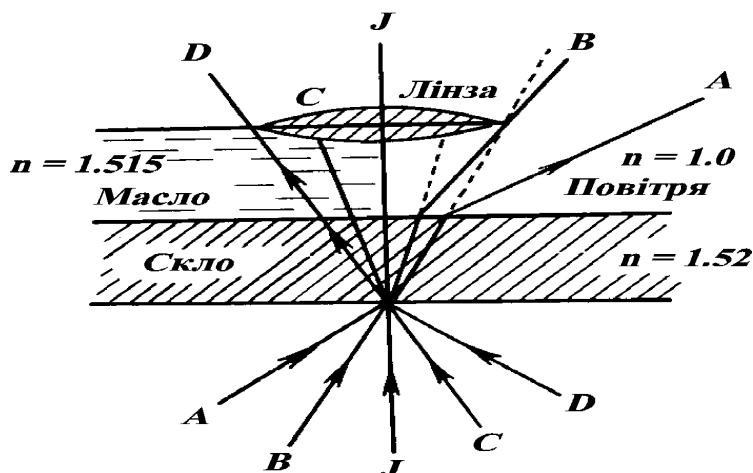


Рис. 2.2. Хід променів у сухій та імерсійній системі
A, B, C, D, J – промені світла

Окуляри (рис. 2.3) мікроскопа слугують для того, щоб роздивлятися зображення об'єкта, збільшеного за допомогою об'єктива. Окуляри збільшують зображення у 5, 7, 10, 15, 20 разів, що показує цифра, вигравірувана на оправі окуляра.



Рис. 2.3. Окуляр мікроскопа зі збільшенням 20×

Освітлювальний апарат складається із дзеркала (10) або вбудованої лампи і конденсора (8).

Дзеркало регулюється, воно закріплене в основі штатива і має дві сторони: увігнуту і плоску. Увігнуте дзеркало збирає та концентрує у площині препарату пучок паралельних променів, які йдуть від джерела світла, тому ним користуються тільки тоді, коли працюють без конденсора, тобто з малими збільшеннями.

При роботі з конденсором слід користуватися тільки плоскою стороною дзеркала. Конденсор складається з двох лінз, за допомогою яких промені, що йдуть від дзеркала, конденсуються і направляються на площину препарату. При мікроскопіюванні з денним світлом конденсор повинен бути піднятий до рівня предметного столика; при штучному освітленні конденсор опускають до тих пір, доки при малому збільшенні зображення джерела світла не з'явиться в площині препарату.

Під конденсором знаходиться ірисова діафрагма (12), за допомогою якої затримують зайві промені світла та зменшують апертуру конденсора (охоплення лінзи).

Мікроскоп має дві найважливіші характеристики:

- величина збільшення зображення;
- величина роздільної здатності мікроскопа.

Збільшення, що дає мікроскоп, визначається добутком збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Так, наприклад, використовуючи окуляр 20× та об'єктив 90×, можна отримати збільшення зображення у 1800 разів. Збільшене зображення може бути як чітким, так і не чітким.

Важливим показником мікроскопа є його **роздільна здатність**, під якою розуміють мінімальну відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншої величини об'єкт можна побачити. Роздільна здатність неозброєного ока – 200 мкм (0,2 мм).

Величина роздільної здатності мікроскопа залежить від довжини хвилі світла, яке використовується, та суми числових апертур об'єктива і конденсора:

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2}, \text{ де:} \quad (2.1)$$

d – роздільна здатність (мінімальна відстань між двома точками);
 A_1 – числова апертура об'єктива;
 A_2 – числова апертура конденсора;
 λ – довжина хвилі світла, яке використовується. При використанні лампи розжарювання довжина світла становить 550 нм (0,55 мкм).

Числова апертура – це “охоплення” лінзи, вона характеризується кількістю променів, які потрапляють у лінзу.

Величина числової апертури кожного об'єктива зазначається на його оправі (рис. 2.4).



Рис. 2.4. Зображення об'єктиву:

20× – лінійне збільшення, 0.40 – числова апертура, 160 – довжина сумісного тубуса (тубусна відстань в мм), 0.17 – товщина покривного скельця, що використовується в мм

При наявності двох об'єктивів – 40× / **0,65** і 40× / **1,3**, що дають однакове збільшення 40× більш чітке зображення об'єкту буде при використанні об'єктива з більшою числовою апертурою 40× / **1,3**. Однак, на малих збільшеннях – 8× важливість числової апертури не настільки велика. На неї варто звертати увагу тільки при виборі об'єктивів понад 40х.

Сухі системи об'єктивів мікроскопа МБР-1 – 8×, 20× і 40× – мають числову апертуру 0,20 0,40 та 0,65 відповідно. Апертура імерсійних об'єктивів 90× та 100× дорівнює 1,25. Залежно від моделі об'єктива всі ці цифри можуть змінюватись, але порядок їх залишається незмінним.

Числова апертура конденсора мікроскопа МБР-1 становить 1.0, але її можна підвищити до 1,20. Для цього необхідно нанести імерсійну олію між верхньою лінзою конденсора і нижньою поверхнею предметного скла.

Простий розрахунок показує, що при освітленні об'єкта світлом з довжиною хвилі 550 нм (0,55мкм), до якого найбільш чутливе око, роздільна здатність мікроскопа для сухої системи (об'єктив 40×) дорівнює:

$$d_{\rightarrow} = \frac{0.55\text{мкм}}{0.65+1} = 0.33\text{мкм} \quad (2.2)$$

Збільшити роздільну здатність мікроскопа можна двома шляхами: або освітлюючи об'єкт світлом ще коротшої довжини хвилі, наприклад ультрафіолетовим, або використовувати імергований конденсор. Тим самим числова апертура конденсора збільшується до 1,20.

При роботі з мікроскопом важливе значення має правильне використання **конденсора**. Довільне поводження з ірисовою діафрагмою,

необґрунтоване підняття та опускання конденсора приводять до різкого погіршення якості та спотворення мікроскопічної картини.

Оптимально числова апертура конденсора повинна бути такою ж, як у об'єктива. У випадку, коли апертура конденсора менша за апертуру об'єктива, остання буде використана не повністю, і роздільна здатність зменшиться. Якщо апертура конденсора більша за апертуру об'єктива, то необхідно дещо прикрити ірисову діафрагму конденсора. Це призведе до усунення розсіяного світла та дасть необхідну контрастність зображення.

Освітлювач – невід'ємна частина мікроскопа. В багатьох сучасних мікроскопах освітлювальний апарат разом із джерелом світла вмонтований у основу мікроскопа. Для мікроскопів, які не мають такого пристрою, вживають спеціальні освітлювачі. Найбільш часто використовується освітлювач який, має низьковольтну лампу розжарювання (8 В, 20 Вт) з короткою товстою ниткою (рис. 2.5). Лампу включають у мережу через знижуючий трансформатор, у корпусі якого є реостат, що регулює розжарювання лампи. Освітлювач встановлюється перед мікроскопом на з'єднувальній планці та встановлюють світло за Келлером.



Рис. 2.5 Освітлювач для мікроскопа

Правила роботи зі світловим мікроскопом з вбудованою системою освітлення

Суха система

1. Мікроскоп встановити на робочому столі, оглянути, витерти від пилу м'якою серветкою об'єктиви, окуляр, освітлювач.
2. Встановити мікроскоп перед собою, трохи зліва. Під час роботи його не рекомендується зрушувати.
3. Включити освітлення.
4. Відкрити повністю діафрагму, підняти конденсор до упору.
5. Роботу з мікроскопом слід починати з малого збільшення. Об'єktiv 8× опустити на відстань 1 см від предметного скла.
6. На предметний столик під об'єktiv покласти препарат.
7. За допомогою макрогвинта, дивлячись збоку, опустити об'єktiv так, щоб відстань між нижньою лінзою об'єктива і препаратом стала приблизно 5 мм. (Не можна опускати об'єktiv, дивлячись в окуляр, так як фронтальна лінза об'єктива може розчавити скло і на ній з'являться подряпини).
8. Дивлячись в окуляр, за допомогою обертання макрогвинта плавно підняти об'єktiv до положення, при якому добре буде видно зображення об'єкта.
9. Для вивчення об'єкта при великому збільшенні потрібно поміняти об'єktiv на 40×, обертуючи револьвер, так щоб він зайняв робоче положення.
10. За допомогою мікрогвинта домогтися гарного зображення об'єкта. При роботі з мікрогвинтом слід знати, що на мікрометричному механізмі є дві рисочки, а на мікрометричному гвинті – точка, яка повинна весь час перебувати між рисками. Якщо точка виходить за межі рисок її необхідно повернути в нормальне положення. При недотриманні цього правила, мікрометричний гвинт може перестати діяти.
11. Після закінчення роботи підняти об'єktiv, зняти з робочого столика препарат, протерти чистою серветкою всі частини мікроскопа, перевести револьвер в нейтральний стан, накрити мікроскоп поліетиленовим пакетом і поставити в шафу.

Імерсійна система

Робота з олійним імерсійним об'єктивом (90× або 100×) вимагає дотримання певних правил.

1. На сухий фіксований пофарбований препарат нанести краплю імерсійної олії (вазелінова, кедрова або розведений фізіологічним розчином гліцерин).

2. Встановити імерсійний об'єктив. Конденсор підняти вгору до упору, а ірисову діафрагму повністю відкрити.

3. Макрогвинтом дуже обережно опустити тубус до занурення об'єктива в олію майже до зіткнення лінзи з предметним склом мікропрепарату. Для того щоб фронтальна лінза не змістилася і не отримала пошкодження опускання тубуса слід контролювати дивлячись збоку, а не в окуляр.

4. Дивлячись в окуляр, дуже повільно обертати макрометричний гвинт на себе і, не відриваючи об'єктив від олії, підняти тубус до появи контурів об'єкта. При цьому слід пам'ятати, що вільна робоча відстань в імерсійному об'єктиві дорівнює 0,1 – 0,15 мм.

5. Фокусування об'єкта зробити мікрометричним гвинтом. Пересуваючи столик бічними гвинтами розглянути в препараті кілька полів зору.

6. Після закінчення роботи з імерсійним об'єктивом підняти тубус, зняти препарат і обережно протерти фронтальну лінзу об'єктива спочатку сухою м'якою бавовняною або паперовою серветкою, потім серветкою, злегка змоченою етиловим або ізопропіловим спиртом.

Виконання завдання

1. Вивчити правила роботи з мікроскопом та основні прийоми мікроскопіювання мікроорганізмів.
2. Роздивитися фіксований та забарвлений препарат бактерій за допомогою сухого та імерсійного об'єктива.
3. Замалювати препарати, що розглядалися при імерсійній системі.
4. Розрахувати збільшення і роздільну здатність мікроскопа з урахуванням всіх об'єтивів. Порівняти роздільну здатність мікроскопа для імерсійної системи при сухому і при імергованому конденсорі.
5. Заповнити таблицю 2.1 і зробити висновки.

Таблиця 2.1. Основні параметри світлового мікроскопа (марка)
при збільшенні окуляра_____ (вказати данні)

№	Збільшення об'єктива	Збільшення мікроскопа	Числова апертура об'єктива	Числова апертура конденсора	Роздільна здатність мікроскопа
1	8×				
2	20×				
3	40×				
4	90×або100× (обрати потрібний)				
5	90× або 100× (обрати потрібний) та імергований конденсор				

Матеріали та обладнання

Мікроскопи, імерсійна олія, фільтрувальний папір, постійні фіксовані препарати бактерій *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus*, *Sarcina flava*, *Acinetobacter calcoaceticus*.

Контрольні питання:

1. Які складові входять до механічної системи мікроскопа?
2. Які складові входять до оптичної системи мікроскопа? Які види об'єктивів використовуються при мікроскопії?
3. Назвати основні характеристики мікроскопа.
4. У чому полягає відмінність у правилах роботи з мікроскопом в імерсійній системі від сухої системи?
5. Що таке роздільна здатність мікроскопу? Яку роздільну здатність має неозброєне око? Яким чином можна збільшити роздільну здатність мікроскопа?
6. Дайте визначення терміну «числова апертура».
7. Для чого використовується конденсор?
8. Яке практичне значення має мікроскопія?
9. Чому об'єктиви зі збільшенням 90× та 100× називаються імерсійними? Чим вони відрізняються від звичайних об'єктивів?

Заняття 3. Приготування препаратів живих клітин

Мікроскопічне дослідження мікроорганізмів проводять у живому або фіксованому забарвленому стані.

Мікроскопія мікробних клітин у живому стані використовується головним чином для вивчення способу рухомості, характеру розмноження та відношення клітин до різних хімічних подразників.

Для спостереження живих мікроорганізмів під мікроскопом необхідно відповідним чином приготувати препарат. Препарати готують на предметних скельцях, товщина яких не повинна перевищувати 1,2 – 1,4 мм. Застосування більш товстого скла приводить до різкого зниження чіткості зображення.

Поверхня скельця повинна бути ретельно очищена та знежирена, щоб крапля рідини рівномірно розпливалася по поверхні. Існує декілька способів знежирення скелець, найбільш надійний спосіб – обробка скелець хромовою сумішшю протягом двох годин разом з наступним обполіскуванням їх водою і спиртом. До знежирення скелець приводить також обпалювання їхньої поверхні у полум'ї пальника або обробка ефіром.

Техніка виготовлення препаратів живих клітин

Спостерігати мікроорганізми у живому стані можна на препаратах “роздавлена крапля” і “вісяча крапля”.

Препарат “роздавлена крапля”

У центр предметного знежиреного скельця піпеткою наносять досліджуваний матеріал – краплю суспензії з мікроорганізмами. Якщо суспензія густа, то потрібно попередньо розбавити її стерильною дистильованою водою. На край краплі ставлять покривне скельце під кутом 45° і, обережно нахиляючи, кладуть його на краплю. Не можна допускати, щоб вода у препараті виступала за край покривного скельця та містила пухирці повітря. Якщо рідина нанесена у надлишку, її видаляють за допомогою фільтрувального паперу.

Для встановлення кількості життєздатних клітин в пробірку з культурою мікроорганізмів вносять невелику кількість метиленового синього. Мертві мікроорганізми легко пропускають барвник всередину клітини, в результаті їхня цитоплазма забарвлюється в блакитний колір, а живі залишаються незабарвленими (рис. 3.1).

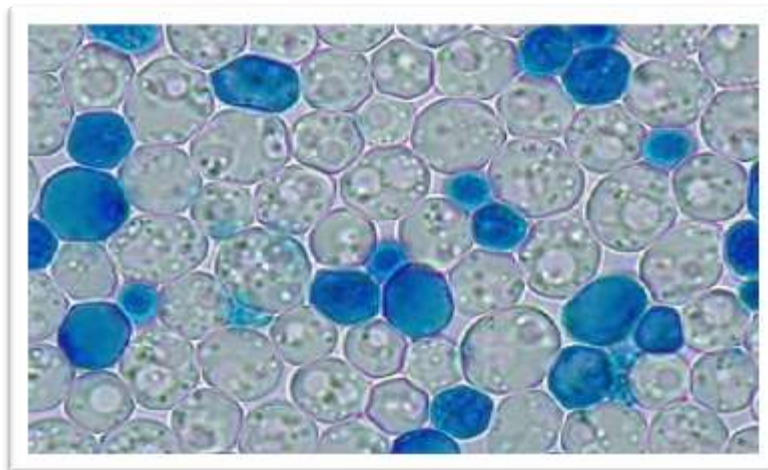


Рис. 3.1. Препарат дріжджів, оброблених метиленовим синім

Препарат “вісяча крапля”

Для приготування препарату невелику краплю суспензії мікроорганізмів наносять на покривне скельце і накладають на нього спеціальне предметне скельце із заглибленням (лункою) у центрі. Краї покривного скельця і лунки попередньо змазують вазеліном, використовуючи скляні палички. Предметне скельце легко притискають до покривного та обережно повертають (рис. 3.2).

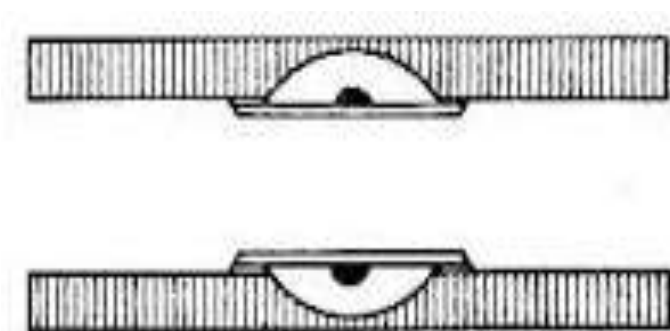


Рис. 3.2. Схема приготування препарату “вісяча крапля”

Препарат поміщають на предметний столик покривним скельцем до об’єктиву. Метод дає можливість спостерігати мікроорганізми тривалий час і стежити за поділом клітин.

Препарати живих клітин розглядають у мікроскопі (рис. 3.3), використовуючи суху та імерсійну системи ірисову діафрагму при цьому звужують для малого і розширюють для великого збільшення.

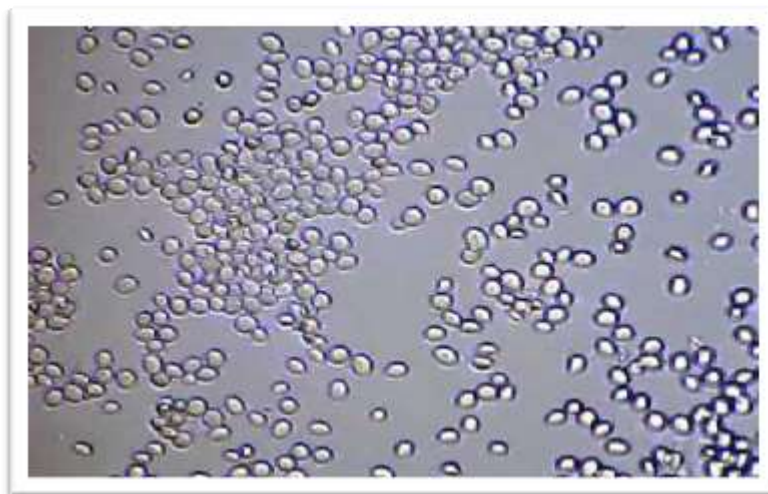
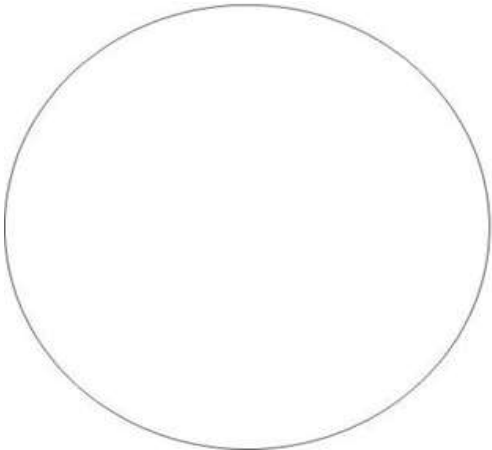


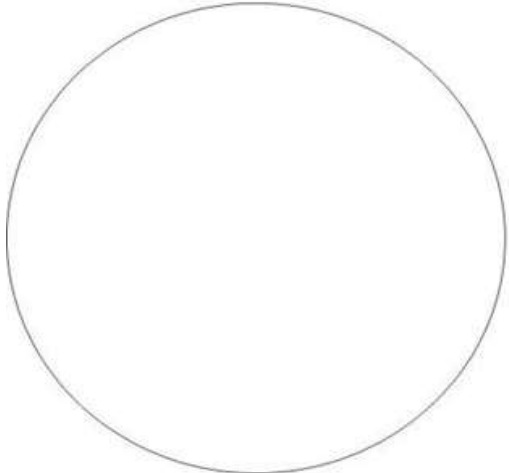
Рис. 3.3. Препарат живих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Виконання завдання

1. Приготувати препарат “роздавлена крапля” дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та розглянути в сухий і імерсійній системах. Визначити наявність живих і неживих клітин.
2. Приготувати препарат “вісяча крапля” *Saccharomyces cerevisiae* та розглянути його в імерсійній системі.
3. Заповнити таблицю 3.1 та зробити висновки.

Таблиця 3.1. Опис препаратів живих клітин

№	Препарат	Наявність неживих клітин +/-	Рисунок
1	2	3	4
1	Роздавлена крапля Культура:		

1	2	3	4
2	Висяча крапля Культура:		

Матеріали та обладнання:

мікроскопи, покривні та предметні скельця, предметні скельця з лункою, вазелін, скляні палички, фільтрувальний папір, добові культури *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, бактеріологічні петлі, сірники, дезінфікуючий розчин, вата, ефір, стерильна вода у пробірках, піпетки Пастера, барвник метиленовий синій.

Контрольні питання:

1. З якою метою використовують препарати живих культур?
2. Які методики приготування препаратів застосовуються для вивчення живих культур мікроорганізмів і в чому їх відмінності?
3. Яким чином можна виявити присутність неживих клітин в препаратах живих культур?
4. Чому живі і неживі клітини мікроорганізмів по різному реагують на фарбування барвником?
5. Яких помилок потрібно уникати при приготуванні живих культур?
6. Які об'єктиви використовуються для розгляду живих культур мікроорганізмів?
7. У якому положенні мають знаходитись конденсор та ірисова діафрагма при роботі з сухими та імерсійними об'єктивами?

Заняття 4. Приготування препаратів фіксованих клітин. Прості методи забарвлення

Для виявлення деяких морфологічних особливостей, кількісного обліку мікроорганізмів, перевірки чистоти культури та іншою метою готують фіксовані забарвлені препарати.

Приготування препаратів фіксованих клітин передбачає проведення фіксації культури мікроорганізмів на предметному склі та її фарбування.

Фіксація препаратів має на меті: вбити мікроорганізми і зробити безпечною подальшу роботу з ними; забезпечити краще прилипання клітин до скла; зробити мазок більш сприйнятливим до забарвлення.

Забарвлення препаратів виконується аніліновими барвниками. За хімічною класифікацією вони поділяються на три групи: кислі, основні та нейтральні.

Кислі барвники містять у своїх молекулах групи $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ і мають властивості кислот. Основні барвники мають у своєму складі аміногрупи, котрі надають їм властивості основ.

Нейтральні барвники не містять у своєму складі кислотних груп та аміногруп і не мають спільних властивостей з кислотами та основами.

Основні барвники, у яких забарвлююча частина молекули заряджена позитивно, виявляють найбільшу здатність забарвлювати бактеріальну клітину, яка несе на поверхні негативний електричний заряд та має у складі цитоплазми у переважаючій кількості кислі компоненти.

Найбільш широко використовуються такі барвники: червоні (фуксин основний, фуксин кислий), сині (метиленовий і толуїдиновий сині), фіолетові (генціан фіолетовий, метиловий фіолетовий, кристалічний фіолетовий), жовто-коричневі (везувін, хризоїдін), зелені (діамантовий зелений, малахітовий зелений).

Розрізняють **прості і диференційні** методи забарвлення. За простого забарвлення використовується один вид барвника, який дає змогу рівномірно забарвити всю клітину, так що добре видна її форма і розмір. Диференційні методи забарвлення передбачають використання кількох барвників для виявлення окремих структур і компонентів клітин.

Приготування фіксованих препаратів з простим методом забарвлення включає наступні етапи:

- **приготування мазка;**
- **висушування;**
- **фіксацію і забарвлення.**

Приготування мазка

Нанесення на предметне скло краплі стерильної води

1. Предметне знежирене скельце акуратно беруть за ребро і наносять номер або найменування бактеріальної культури. Для зручності поміщають його поблизу пальника на чашку Петрі.

2. Запалюють пальник. Беруть петлю в праву руку як олівець і фламбують її в полум'ї пальника до почервоніння спочатку горизонтально, потім вертикально (рис. 4.1/1).

3. Беруть пробірку зі стерильною водою або фізіологічним розчином в ліву руку, як показано на рисунку 4.1/2 і виймають ватно-марлеву пробку (рис. 4.1/3). Горло пробірки обпалюють. Петлею набирають краплю води (рис. 4.1/4) і закривають пробірку (рис. 4.1/5), швидко проносять пробку через полум'я пальника рис. 4.1/6. Закриту пробірку ставлять у штатив.

4. Краплю води петлею вносять в центр предметного скельця (рис. 4.1/7) після чого петлю фламбують і теж ставлять в штатив.

Для дотримання стерильності слід працювати на відстані не більше 15 см від полум'я пальника. З цією ж метою не можна класти пробку на стіл або торкатися руками її нижньої частини, яка занурюється всередину пробірки.

Не можна також відкриту пробірку тримати перпендикулярно поверхні столу. Горлечко відкритої пробірки має бути завжди звернено до полум'я пальника.

Внесення культури мікроорганізмів в краплю на предметне скельце

Внесення культури мікроорганізмів в краплю на предметне скельце відбувається за тим же алгоритмом, що і внесення стерильної води. Однак є і нюанси, які слід пам'ятати.

1. Беруть зі штатива пробірку з культурою, яка виросла на поверхні скошеного агару. Петлю фламбують і відкривають пробірку. Для того, щоб не пошкодити клітини мікроорганізмів петлю попередньо охолоджують о внутрішню стінку відкритої пробірки.

2. Дотримуючись стерильності, акуратно з поверхні середовища знімають невелику кількість мікроорганізмів. Пробірку закривають, а мікроорганізми вносять на предметне скло в краплю води. Не допускається внесення великої кількості культури, бо це погіршує якість препарату.

3. Отриману суспензію петлею розмазують в краплі води тонким шаром по поверхні предметного скельця на площі 1 – 2 см². Після закінчення роботи бактеріальну петлю із залишками культури пропалюють до почервоніння в полум'ї пальника і ставлять в штатив (рис. 4.1/7).

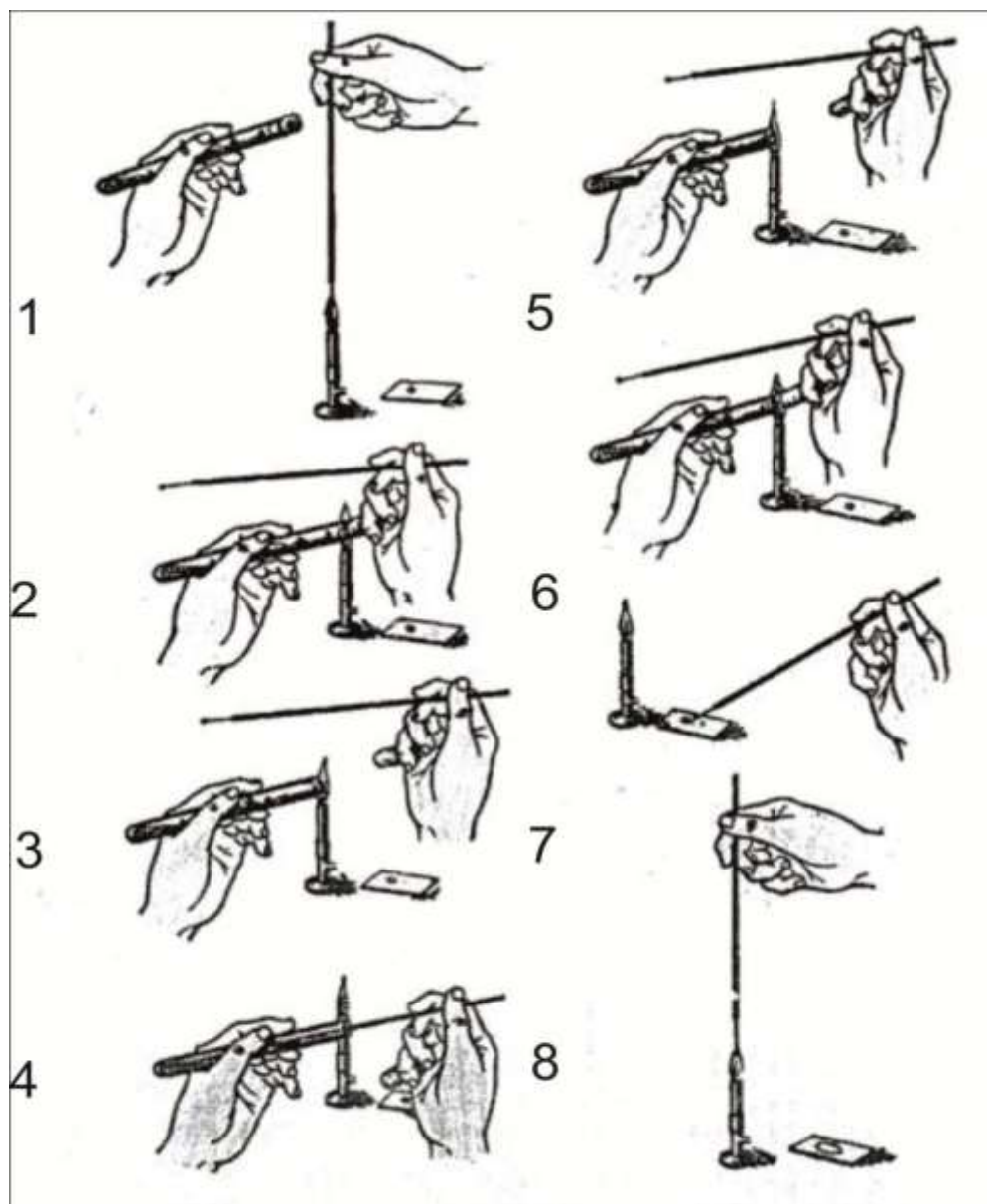


Рис. 4.1. Техніка приготування мазка

Якщо для приготування мазка використовується культура, що знаходиться в рідкому середовищі, то використання дистильованої води або фізіологічного розчину не потрібно.

Висушування мазка

Препарат сушать за кімнатної температури. Для скорочення часу висихання препарату допускається легке нагрівання його над полум'ям пальника у струмені теплого повітря. Скульце необхідно тримати мазком доверху. Не можна допускати перегрівання мазка, бо можлива деформація мікроорганізмів. Щоб не допустити денатурації білків бактерій і порушення їхньої внутрішньої структури ступінь нагрівання контролюють середнім пальцем, який знаходиться під предметним скельцем.

Фіксація

У лабораторній практиці найпоширенішим методом фіксації мазків є фламбування – тобто фіксація в полум'ї газового пальника або спиртівки. При цьому мазок тримають так само, як при висушуванні – мазком доверху і 3 – 4 рази проводять його через полум'я. Весь процес фіксації триває 5 – 6 с, а дія жару – 2 с. Більш тривале фіксування жаром зменшує якість препарату, а недофіксований мазок при наступній обробці змивається і приховує в собі небезпеку зараження.

Для дослідження внутрішньої будови клітини вдаються до фіксації різними хімічними речовинами. У цьому випадку рідину для фіксації наливають на мазок або занурюють препарат у склянку з фіксатором. Для фіксації використовують етиловий спирт (час фіксації 15 – 20 с), метиловий спирт (3 – 5 хв.). Існує цілий ряд інших фіксаторів. Після закінчення фіксації хімічними речовинами препарат відмивають від фіксатора у тонкому струмені водопровідної води та забарвлюють.

Забарвлення

Незабарвлені мікроорганізми, за винятком грибів, погано видно у світловому мікроскопі через їхню малу контрастність. Тому для простого забарвлення клітин мікроорганізмів найчастіше використовують фуксин або метиленовий синій.

Фіксований препарат кладуть мазком доверху на місток з двох паралельних скляних паличок, які з'єднані резиновими трубками і покладені на стінки кювети або кристалізатора (рис. 4.2, а).



а



б

Рис. 4.2. Місток для фарбування (а), промивалка (б)

Піпеткою наносять на мазок 2 – 3 краплини водного розчину барвника (фуксину, метиленового синього, тощо), щоб він покрив увесь мазок. Забарвлення проводять протягом 2 – 3 хв.

Після закінчення забарвлення барвник з препарату змивають водою. Якщо для змиву барвника використовується промивалка (рис. 4.2 б), то для того, щоб не змити препарат предметне скло злегка нахилиють, а струмінь води направляють не на мазок, а на ділянку скла, яка знаходиться вище мазка.

Забарвлений препарат висушують на повітрі або **легко** промокають фільтрувальним папером.

Препарат мікроскопують з об'єктивом 40×, потім 90×. У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а забарвленими виявляються тільки клітини мікроорганізмів (рис. 4.3).

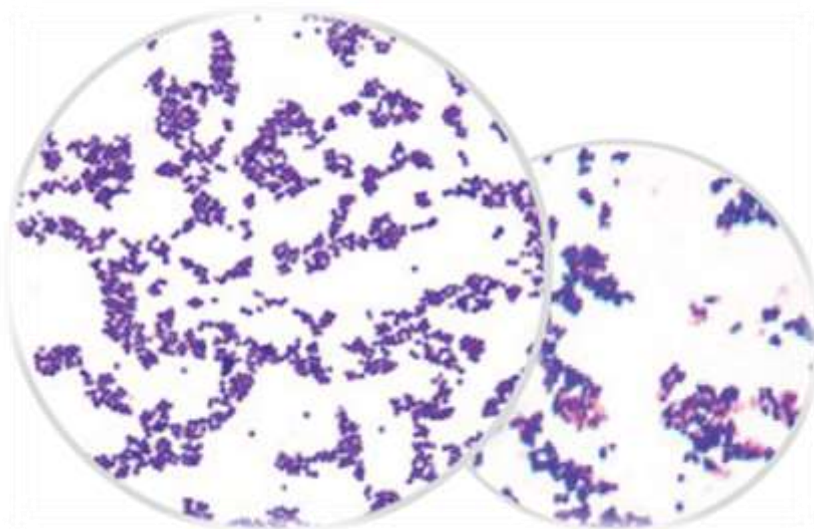
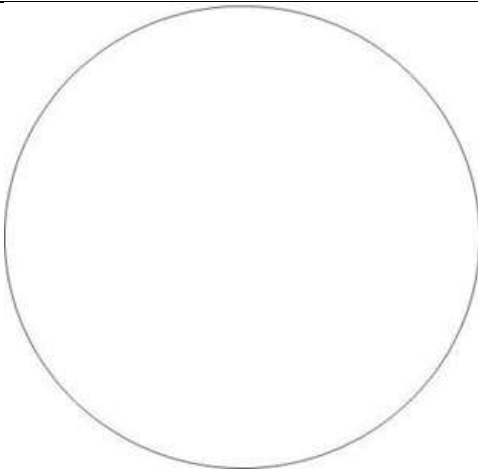
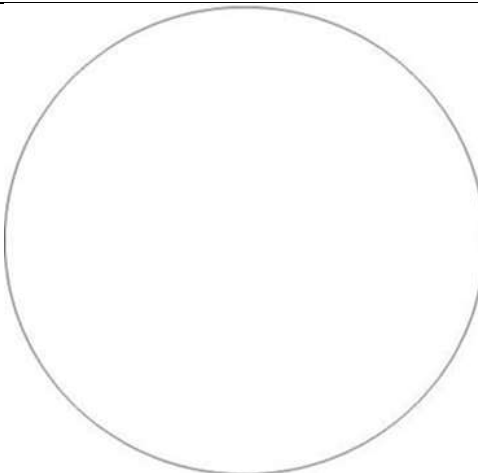


Рис. 4.3. Забарвлений препарат

Виконання завдання

1. Приготувати фіксовані препарати культур мікроорганізмів, які надані кожній бригаді викладачем.
2. Розглянути препарати в імерсійній системі, використовуючи правильне положення конденсора і діафрагми.
3. Препарати замальовати і зробити до них підписи із зазначенням родової і видової назви мікроорганізмів (табл. 4.1).
4. Оформити протокол і зробити висновки, аналізуючи свої спостереження і допущенні при роботі помилки.

Таблиця 4.1. Фіксований препарат клітин в імерсійній системі

№	Барвник, назва культури	Рисунок культури	Аналіз помилок або примітки
1	Фуксин Назва культури:		
2	Метиленовий синій Назва культури:		

Матеріали та обладнання

мікроскопи, предметні скельця, стерильна вода у пробірках, газові пальники, бактеріологічні петлі, барвники: 0,01% розчин метиленового синього, водний розчин фуксину основного, очні піпетки, кристалізатор з підставкою для предметних скелець, фільтрувальний папір, імерсійна олія, дезінфекційний розчин, марлеві серветки. Добові культури *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.

Контрольні питання:

1. Складіть по пунктах коротку схему приготування фіксованого препарату мікроорганізмів, що знаходиться в рідкому живильному середовищі або фізіологічному розчині.

2. З якою метою використовується фіксація мікроорганізмів? Якого режиму фіксації необхідно дотримуватися?
3. Які барвники використовують при фарбуванні препаратів мікроорганізмів?
4. Чому перед тим як набрати культуру петлею її необхідно охолодити о внутрішню стінку пробірки?
5. Яке положення відкритої пробірки з мікроорганізмами необхідно підтримувати, щоб не допустити контамінації (попадання всередину мікроорганізмів) з оточуючого середовища?
6. Чому не можна класти пробку відкритої пробірки на поверхню столу або інші предмети?
7. Чому при фіксації препарату не можна перегрівати культуру?
8. Що необхідно зробити перед тим, як поставити петлю в штатив після закінчення роботи з нею і чому?
9. Чому при приготуванні мазка не можна вносити в краплю води велику кількість мікроорганізмів?

Заняття 5. Морфологія цвільових грибів та дріжджів

Гриби – це клітинні еукаріотичні безхлорофільні організми, для яких характерні гетеротрофний тип живлення та прикріплений спосіб життя. Гриби – одна з найбільших та найрізноманітніших груп живих організмів, що існують на Землі, поряд з тваринами та рослинами, утворюють самостійне царство живого світу ц. **Mycota** або **Fungi**. Серед грибів зустрічаються як багатоклітинні, так і одноклітинні та ценоцитні організми. Вегетативне тіло грибів представлено таломом, який за морфологією поділяється на три типи – амебоїдний, міцеліальний і дріжджіподібний. Розмножуються гриби вегетативним, нестатевим і статевим шляхом. Класифікація грибів базується на особливостях їхньої морфології, онтогенезу, циклів розвитку, генетики, фізіології, біохімії, тощо. За будовою вегетативного тіла гриби поділяються на дві групи – нижчі та вищі гриби.

У групу **нижчих грибів** включені гриби, вегетативне тіло яких утворене неклітинним (ценоцитним) міцелієм. Вона об'єднує **відділи хітридіоміцети** (*Chytridiomycota*) і **зигоміцети** (*Zygomycota*). Хітридієві гриби мають слаборозвинений міцелій. У деяких з них міцеліальні форми відсутні, а вегетативне тіло гриба представлено однією клітиною, яка іноді позбавлена жорсткої клітинної стінки. На відміну від хітридієвих грибів, зигоміцети мають добре розвинений ценоцитний міцелій. *Вегетативне розмноження* нижчих грибів здійснюється неспеціалізованими частинами міцелію, які дають початок новому міцелію. *Безстатеве розмноження* нижчих грибів здійснюється зооспорами і спорангіоспорами, які розвиваються ендогенно, рідше конідіями. Спори у хітридіоміцетів рухомі та мають один джгутик. *Статевий процес* – гаметогамія та гаметангіогамія (зигогамія), котрі завершуються утворенням зиготи або зигоспор. Гаметогамія – це процес злиття гамет, що утворюються в гаметангіях. За гаметангіогамії – злиття двох багатоядерних спеціалізованих структур, вміст яких не диференційовано на гамети.

У групу **вищих грибів** включені гриби, у яких вегетативне тіло складається з септованого, розгалуженого міцелію або представлено одноклітинним дріжджіподібним таломом. Ця група включає **відділи Ascomycota** (сумчасті гриби) і **Basidiomycota** (базидієві гриби). Вищі гриби також розмножуються вегетативним, безстатевим і статевим шляхом. *Вегетативне розмноження* здійснюється неспеціалізованими частинами міцелію, які дають початок новому міцелію або оїдіями – тонкостінними клітинами і хламідоспорами – товстостінними клітинами. *Безстатеве розмноження* вищих грибів здійснюється екзогенно конідіями. *Статевий процес* гаметангіогамія (аскогамія) у аскоміцетів і соматогамія у базидіоміцетів.

Гаметангіогамія по типу аскогамії передбачає злиття двох багатоядерних гаметангіїв, які диференційовані на жіночий – аскогон і чоловічий – антеридій. Соматогамія – це статевий процес, за якого зливаються звичайні соматичні, або вегетативні, гаплоїдні клітини міцелію, статеві органи і гамети відсутні.

Особливу групу грибів складають **мікроміцети**, до яких відносяться дріжджі та цвілеві гриби. Назва групи «Мікроміцети» не має таксономічного значення, тому що об'єднує мікроскопічні гриби як з нижчих, так і вищих грибів.

Цвілеві гриби утворюють характерний пухнастий наліт (плісняву) різного забарвлення на продуктах харчування, плодах, рослинних залишках та інших предметах за відповідних умов: температурі та вологості.

У систематичному відношенні цвілеві гриби неоднорідні і належать як до нижчих грибів (відділ зігоміцети), так і до вищих грибів (відділ аскоміцети). В основу систематики цвілевих грибів покладена будова міцелію та органів розмноження (спор).

Представниками цвілевих гриби з відділу *Zygomycota* є гриби родів *Mucor* та *Rhizopus*.

Рід *Mucor*. Мукорові гриби на щільних живильних середовищах утворюють повстятий наліт. Вегетативне тіло – розгалужений багатоядерний міцелій, який не має перегородок. Від міцелію відходять потужні плодоносні гіфи – спорангієносці з шароподібними спорангіями, у яких утворюються численні ендоспори (рис. 5.1 і 5.2 В).



Рис. 5.1. Спорангієносці з шароподібними спорангіями р. *Mucor*

Види мукора широко розповсюджені у природі, особливо у ґрунті. Серед них є представники, які викликають псування продуктів, а також хвороби різних сільськогосподарських культур. Є серед мукорових грибів види патогенні для людини, що викликають ураження центральної нервової системи

і органів слуху. Багато мукових грибів використовується у промисловості для виробництва органічних кислот та спирту.

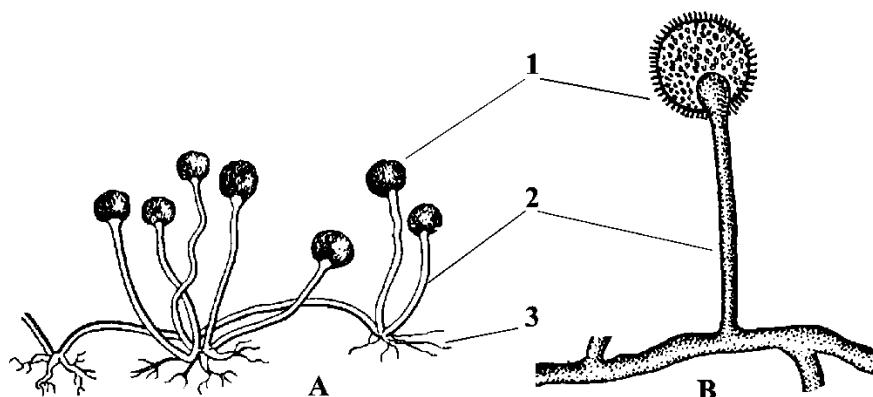


Рис. 5.2. Ризоїди та спорангієносці зі спорангіями
А – р. *Rhizopus*; В – р. *Mucor*. 1 – спорангій; 2 – спорангієносець; 3 – ризоїди.

Рід *Rhizopus*. Різопус – відрізняється від мукора спорангієносцями, котрі розміщуються на міцелії пучками (рис. 5.2 А і 5.3). Різопус розповсюджений на різноманітних органічних субстратах. Деякі види (*Rhizopus betavora*) викликають цвіль і псування насіння, цукрового буряка та інших рослин.



Рис. 5.3. Спорангієносці зі спорангіями *Rhizopus stolonifer*

До вищих грибів відділу **сумчастих (*Ascomycota*)** належать значна кількість цвілевих гриби, таких як пеніцилл (р. *Penicillium*) або кістьовик, аспергілл (р. *Aspergillus*) або лійковий гриб, роди *Alternaria* і *Trichoderma*. Ці гриби мають добре розвинений багатоклітинний розгалужений міцелій. Розмножуються вони звичайно безстатевими конідіальними спорами та іноді утворюють сумчаті плодові тіла, всередині яких розвиваються сумки зі

спорами. Розрізняються ці гриби за будовою органів нестатевого розмноження – конідієносців.

Гриби **роду *Penicillium*** мають розгалужені багатоклітинні конідієносці, які розвиваються з клітин міцелію. На кінці конідієносця утворюються короткі клітини – стеригми, від яких відшнуровуються ланцюжки конідій. Конідієносці, які таким чином утворюються, нагадують китички (рис. 5.4 б і 5.5).

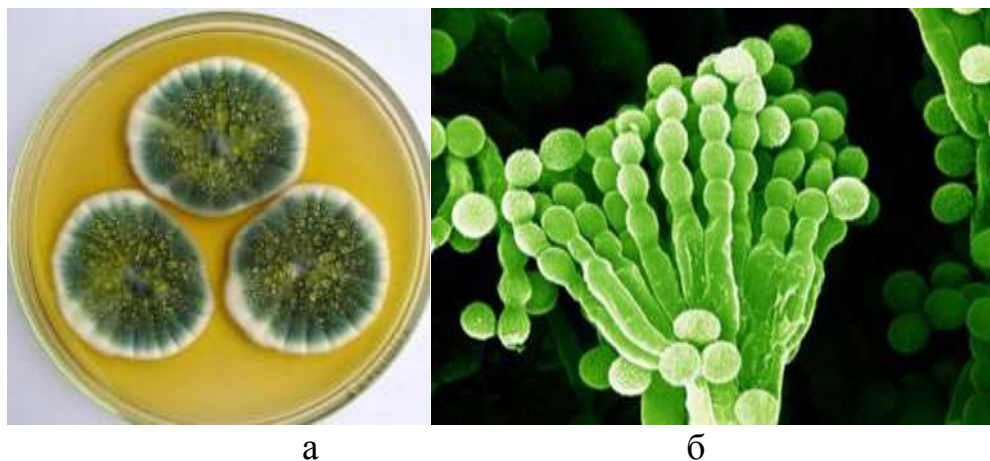


Рис. 5.4. Культура *Penicillium* sp. на живильному середовищі (а) і конідієносець (б)

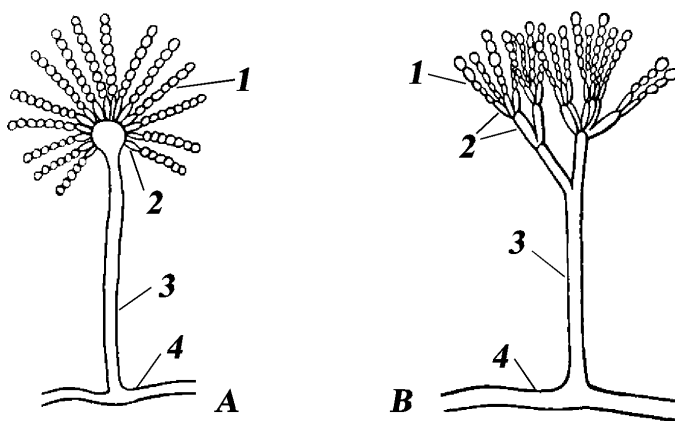


Рис. 5.5. Конідії та спори у цвільових грибів.

A) *p. Aspergillus*; B) *p. Penicillium*. 1 – конідії; 2 – стеригми; 3 – конідіофор; 4 – вегетативні гіфи

До роду *Penicillium* належить майже половина усіх цвілевих грибів. Вони широко розповсюджені у ґрунті, кормах, сирих приміщеннях, викликають псування продуктів і матеріалів. Багато пеніцилів використовуються у промисловості для отримання ліпідів і ферментів. *Penicillium camaberti* бере участь у визріванні деяких сортів сиру (рис. 5.6). Серед грибів роду пеніциліум

25% мають антибіотичну активність. *P. notatum* і *P. crysoginum* використовуються як продуценти пеніциліну.

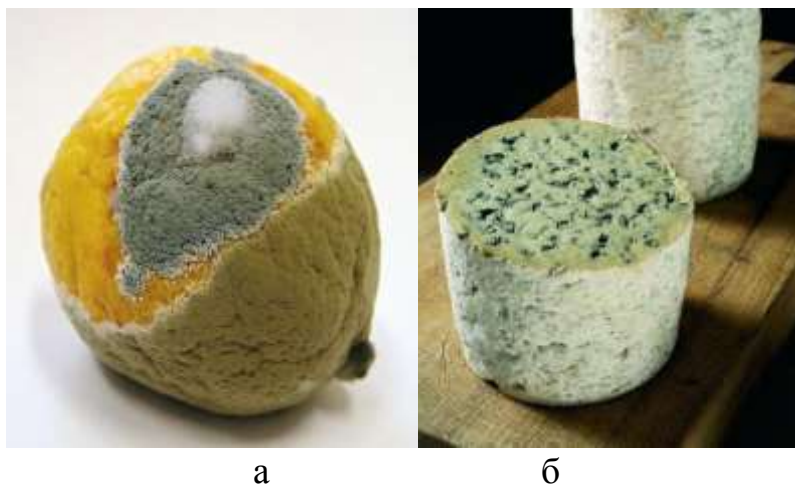


Рис. 5.6. Практичне значення р. *Penicillium*: лимон вражений пеніцілом (а) і сир з благородною пліснявою (б)

Гриби роду *Aspergillus* мають септований міцелій з вертикально розташованими конідієносцями, на верхівках яких утворюються розширення у вигляді булави. На поверхні цього розширення розташовані короткі стеригми, від яких відшнуровуються ланцюжки пігментованих конідій. Конідії розташовані на радіусах сфери і нагадують струмені води, які виливаються з лійки, звідки походить друга назва гриба – лійкова цвіль (рис. 5.5 А і 5.7 в).

Багато представників роду *Aspergillus* мають важливе практичне значення. *Asprgillus niger* застосовують для отримання лимонної кислоти. *A. flavus* використовується для виділення комплексу протеолітичних ферментів.

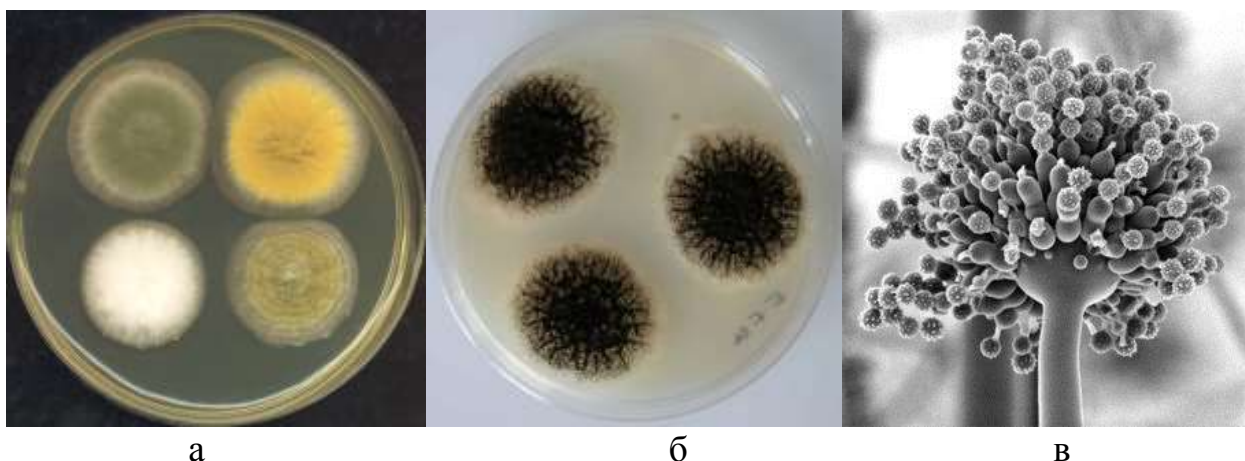


Рис. 5.7. Культура р. *Aspergillus* на живильному середовищі (а, б) і конідієносець (в)

Багато представників роду *Aspergillus* мають важливе практичне значення. *Aspergillus niger* застосовують для отримання лимонної кислоти. *A. flavus* використовується для виділення комплексу протеолітичних ферментів.

Рід *Alternaria* має темнозабарвлений міцелій, темно-димчастого або оливково-чорного кольору. Конідієносці – розгалужені або прості (рис. 5.8). Багатоклітинні конідії з поперечними та повздовжніми перегородками зібрані у ланцюжки по 10 і більше конідій. Найбільш розповсюджений у природі вид мешкає на різних рослинних субстратах, а також викликає захворювання сходів молодих рослин і насіння.



Рис. 5.8. Культура *Alternaria alternata* на живильному середовищі (а) і конідії (б)

Рід *Trichoderma* широко розповсюджений на рослинних залишках і в ґрунті (рис.5.9).

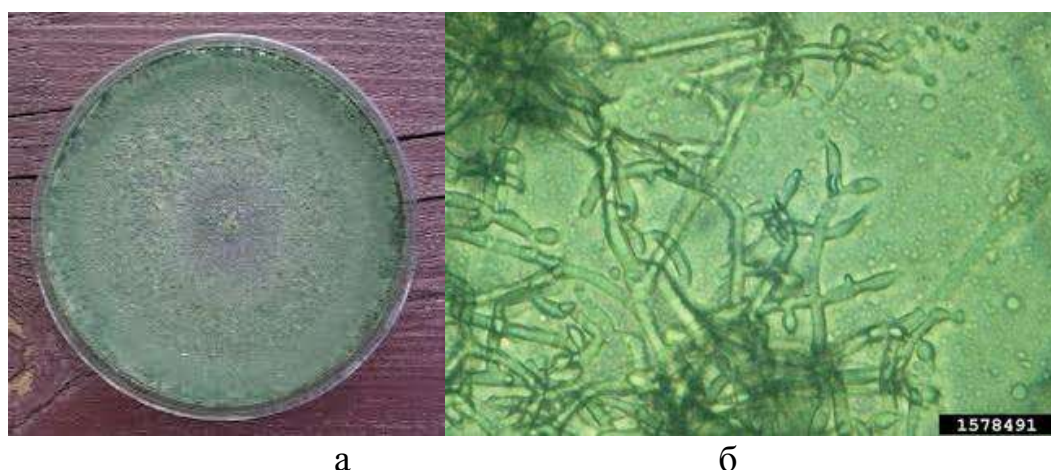


Рис. 5.9. Культура *Trichoderma viride* на живильному середовищі (а) і конідиєносці (б)

Гриби *T. lignorum* і *T. koningi* є руйнівниками клітковини в ґрунті та продуцентами антибіотика – триходерміну, який застосовується в боротьбі з хворобами рослин. *T. lignorum* має безбарвний міцелій, на якому розвиваються

трійчаторозгалужені конідієносці темно-зеленого кольору. Округлі конідії зібрані в головки і розвиваються на стеригмах пляшкоподібної форми.

Дріжджі – одноклітинні гриби, які втратили міцеліальний характер росту. Вони зустрічаються серед вищих грибів аскоміцетів і базидіоміцетів. Більш ніж 50% дріжджів належать до відділу аскоміцетів. Морфологічно дріжджові клітини дуже різноманітні. Серед них зустрічаються округлі, яйцевидні, овальні, стріловидні, серповидні форми. Розміри одиночних дріжджових клітин лежать у межах 1 - 10 мкм, частіше 3 - 7 мкм (рис 5.10).

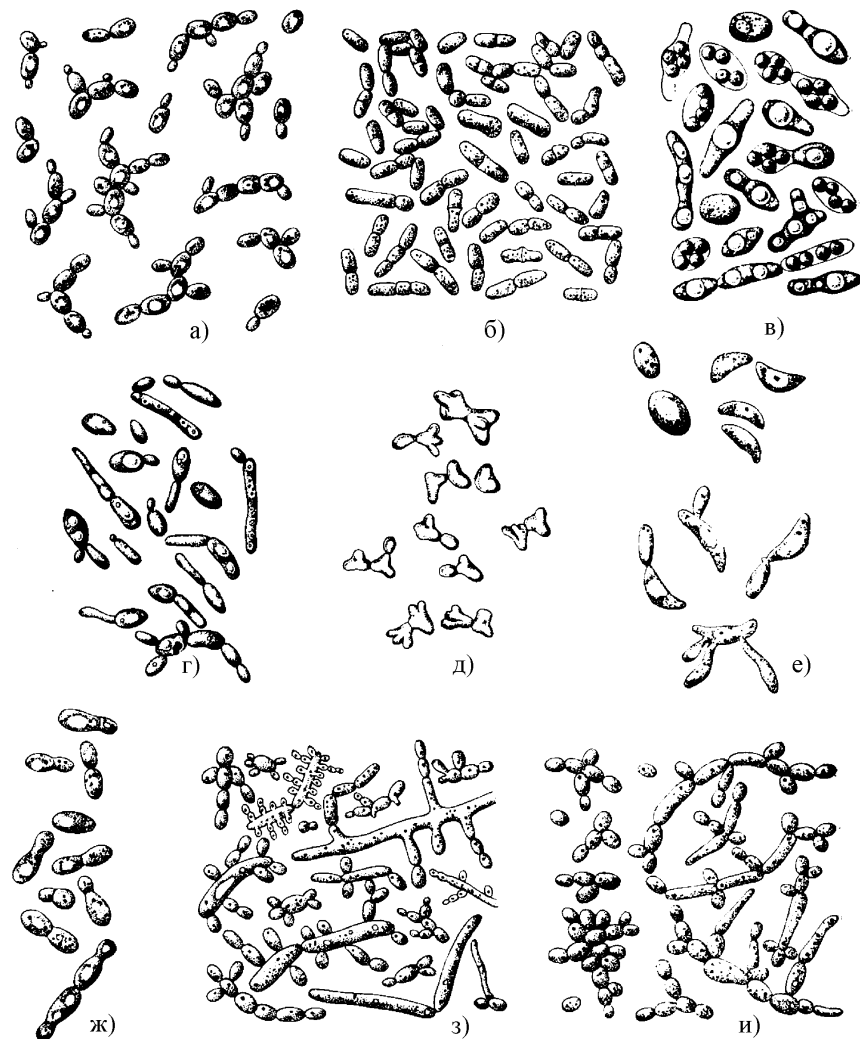


Рис. 5.10. Форми дріжджових клітин

*а – овальна, яйцевидна; б – циліндрична; в – апікулярна, лимоновидна;
г - стріловидна; д – трикутна; е – серповидна; ж – колбовидна;
з, и - подовжена, міцелієвидна.*

Вегетативне тіло дріжджів може перебувати як у гаплоїдній, так і диплоїдній фазі. Розмножуються дріжджі вегетативним, безстатевим і статевим шляхом. Найбільш характерним видом *вегетативного розмноження* є

брунькування. При брунькуванні на поверхні клітини утворюється один чи кілька горбків-бруньок, які ростуть. У бруньку з материнської клітини переходить частина протоплазми та елементів ядра, після чого брунька відшнуровується. У деяких видах дріжджів бруньки зберігають зв'язок з батьківською клітиною, утворюючи скупчення дріжджових клітин. Деякі види дріжджів розмножуються бінарним поділом шляхом утворення однієї чи декількох поперечних перегородок. Такий спосіб розмноження спостерігається у представників роду *Shizosaccharomyces*.

Безстатеве розмноження дріжджів здійснюється за допомогою спеціалізованих клітин – спор. Процес спороутворення звичайно починається за несприятливих умов. Спори у кількості від 2 до 18 утворюються або всередині клітини (ендоспори), або на клітинному вирості – стеригмі (балістоспори). При визріванні балістоспори з силою відстрілюються від батьківської клітини. Утворення спор – це одночасно і процес розмноження, і формування стійких форм.

У багатьох дріжджів, які діляться і брунькуються, спостерігається *статевий процес*, який здійснюється за типом копуляції. Статевий процес у гаплоїдних і диплоїдних дріжджів має ряд відмінностей, які показано на рис.5.11.

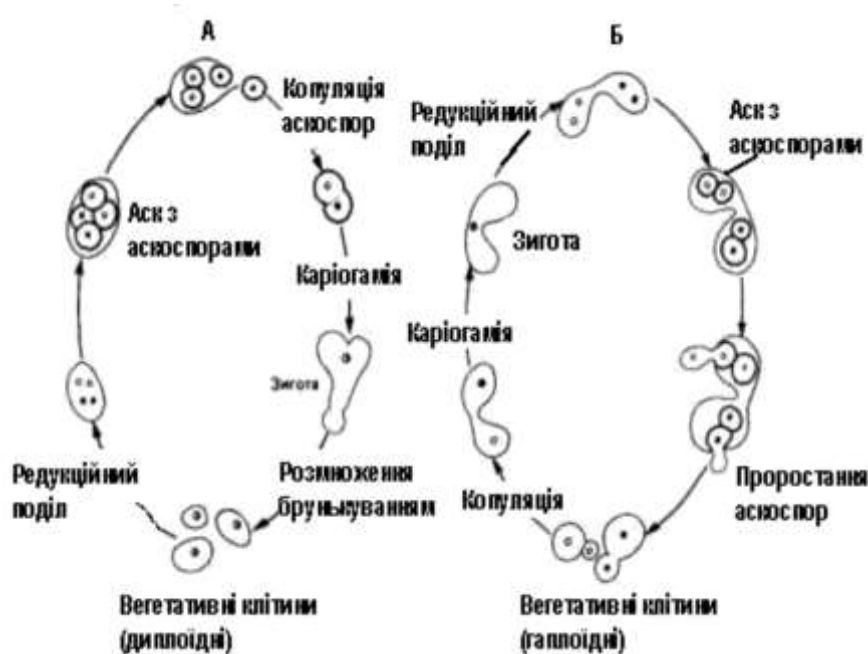


Рис.5.11 Цикл розвитку гаплоїдних і диплоїдних дріжджів

Дріжджі широко розповсюджені у природі. Вони зустрічаються у ґрунті, у воді, на ягодах і фруктах, шкірі людини. Багато дріжджів мають велике практичне значення і використовуються у виробництві хліба, отриманні

білково-вітамінних концентратів, вітаміну D₂, ліпідів, нуклеїнових кислот. Серед дріжджів є патогенні для людини і тварин види.

Окремі представники відділів вищих грибів (аскомицетів і базидіомицетів), у яких не виявлений статевий процес тривалий час виділяли в окрему групу **недосконалих грибів** (*Deuteromycetes* або *Fungi Imperfecti*). Історично дейтероміцети описували в ранзі відділу, підвідділу або класу, але на даний час вони розглядаються як формальна група, що не має таксономічного значення. Дейтероміцети – широко розповсюджена група грибів. До них належать і деякі виробничі штами дріжджів, а також цвілевих грибів р. *Aspergillus* й р. *Penicillium*

Виконання завдання

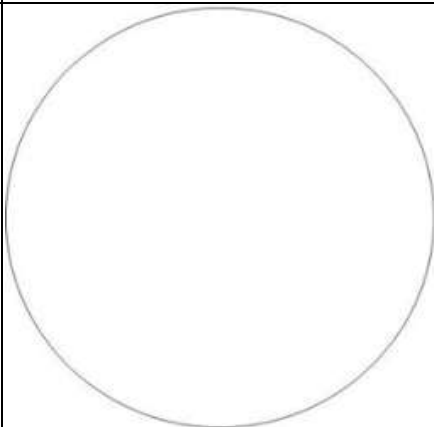
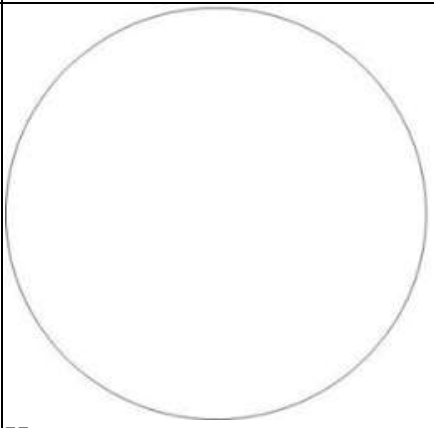
1. Розглянути колонії грибів родів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* і *Trichoderma*, які вирости на сусло-агарі в чашках Петрі під мікроскопом з об'єктивами 8× та 40×.

2. Приготувати з них препарати “роздавлена крапля”. Препарат готують в суміші вода + оцтова кислота (1 : 1) або спирт + гліцерин (1 : 1), бо міцелій грибів погано змочується водою. Препарувальною голкою шматочок міцелію обережно переносять на предметне скло і розтягують його двома препарувальними голками. Препарат накривають покривним склом і роздивляються з об'єктивами 8× і 40×.

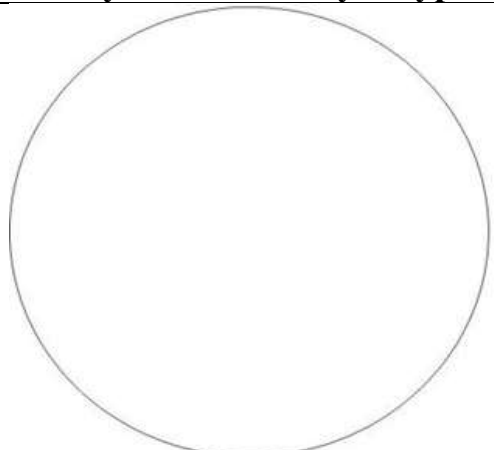
При мікроскопіюванні колонії та препаратів звернути увагу на: тип міцелію; форму спороносців і конідієносців; форму спор, або спорангію; забарвлення вегетативного та спороносного міцелію; дифузію пігменту в середовище. Результати спостережень оформити у таблиці 5.1 і зробити висновки.

3. Приготувати фіксовані препарати дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Результати спостережень оформити у вигляді таблиці 5.2 і зробити висновки.

Таблиця 5.1 Морфологічні особливості міцеліальних грибів

Забарвлення вегетативного міцелію	Забарвлення спороносного міцелію	Тип міцелію септований або несептований	Форма конідієносців або спорангію (замалювати)	Рисунок та назва культури
				 Назва культури
				 Назва культури

Таблиця 5.2 Морфологічні особливості дріжджів

№	Рисунок і назва культури	Опис культури
1	 Назва культури дріжджів	

Матеріали та обладнання

Предметні та покривні скельця, суміш вода + оцтова кислота (1 : 1), водний фуксин, мікроскопи, імерсійна олія, препарувальні голки, марлеві серветки, метиленовий синій в розведенні (1 : 40). Добові культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, 5 – 7-добові культури цвілевих грибів родів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* і *Trichoderma*.

Контрольні питання:

1. Пояснити, що розуміють під терміном «гриби».
2. На яких особливостях грибів базується їх класифікація?
3. На які групи діляться гриби за будовою вегетативного тіла? Дайте характеристику цим групам.
4. Пояснити, яку форму мають спороносці або конідієносці *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.
5. Де застосовуються гриби роду *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*?
6. Порівняйте будову конідієносця грибів роду *Alternaria* і *Trichoderma*.
7. Дайте характеристику способам розмноження дріжджів.
8. На що потрібно звернути увагу при мікроскопіюванні колонії та препаратів грибів?
9. Складіть по пунктах коротку схему приготування препарату цвілевих грибів.

Заняття 6. Морфологія бактерій

Бактерії – прокаріотичні організми, які належать до Домену «Бактерії» і однойменного царства «Бактерії». Більшість бактерій – одноклітинні організми, рідше зустрічаються міцеліальні та багатоклітинні форми з низьким рівнем диференціації клітин.

За способом живлення бактерії поділяють на *авто-* і *гетеротрофи*, а за способом отримання енергії на *фото-* і *хемотрофи*. За відношенням до кисню виділяють *аеробні*, *анаеробні* та *факультативні* мікроорганізми.

В переважній кількості випадків бактерії розмножуються бінарним поділом, рідше брунькуванням або брунькувальним поділом. Як правило, бінарний поділ відбувається в результаті кострикції (інвагінації клітинної стінки) або шляхом утворення в всередині клітки перегородки. У багатьох бактерій клітини після поділу розходяться, у деяких представників залишаються разом, утворюючи різні сполучення. Серед бактерій є представники, котрі як і гриби, можуть розмножуватись спорами, наприклад, актиноміцети. Ряд форм мають складні цикли розвитку.

Серед бактерій є рухливі організми. Рух більшості бактерій здійснюється за допомогою джгутиків. Рідше зустрічаються форми, які володіють ковзаючим рухом, зв'язаним з нерівномірним виділенням слизу усією поверхнею клітини (міксобактерії) або такі, що мають поступово-обертальний рух, який забезпечується скороченням внутрішніх фібрил (аксіальних ниток), як у спірохет.

За несприятливих умов деяким бактеріям властиве утворення морфологічно диференційованих структур. Так деякі грампозитивні бактерії здатні утворювати ендоспори, які не зв'язані з розмноженням, а призначені для збереження виду в умовах, несприятливих для розвитку вегетативних клітин. Деякі грамнегативні бактерії також утворюють морфологічно диференційовані структури – мікроспори, акінети та інші, які також є відповіддю на несприятливі умови зовнішнього середовища.

Порівняно з морфологічною різноманітністю багатоклітинних організмів бактерії морфологічно мало диференційовані. Звичайно розрізняють 5 основних форм бактерій: сферичні, паличкоподібні, звиті, нитчасті та міцеліальні. Зустрічаються і рідкісні форми – зірчасті, трикутні, зіркоподібні та інші, які характерні переважно для архей (рис. 6.1).

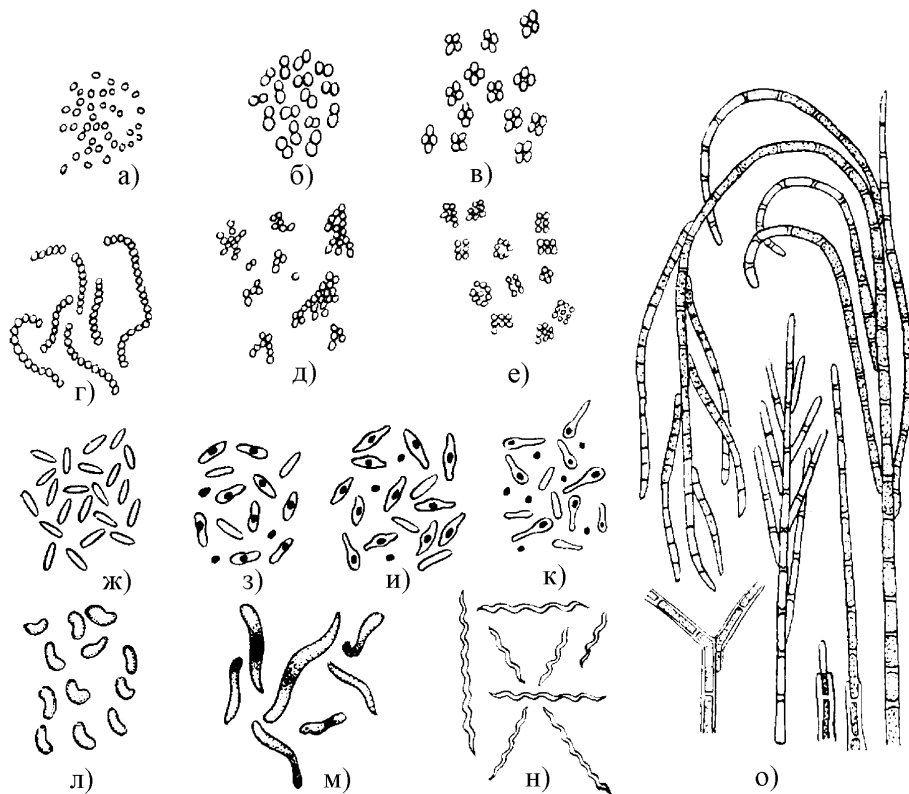


Рис. 6.1 Форми бактерій:

а – мікрококи; б – диплококи; в – тетракоки; г – стрептококи; д – стафілококи; е – сарцини; ж – паличкоподібні бактерії, які не утворюють спор; з – к – паличкоподібні бактерії, які утворюють спори бацилярного (з), клостридіального (и) і плектридіального (к) типів спороутворення; л – вібріони; м – спірили; н – спірохети; о – нитчасті форми.

Більшість бактерій володіє стабільною формою клітини, яка є стійкою видовою ознакою. Однак існують бактерії, яким притаманний плеоморфізм – морфологічна мінливість під дією зовнішніх факторів, яка не пов'язана із зміною спадкових ознак організму. У процесі життя, в залежності від умов, деякі бактерії можуть трансформувати паличкоподібну форму в розгалужене утворення. Плеоморфізм також може бути пов'язаний у деяких бактерій з їхнім складним циклом розвитку.

Сферичні бактерії – коки (від грецького – зерно). Діаметр кокових форм коливається від 1,0 до 2,5 мкм. Переважна більшість кокових клітин не утворюють спор і нерухомі. Морфологічно розрізняють коки правильної сферичної форми, а також овальні, конічні, еліпсоподібні та інші. В залежності від способів ділення коки поділяються на декілька груп (рис. 6.2):

Мікрококи – поодинокі коки. При поділі клітини розходяться.

Диплококи – коки, які діляться в одній площині та утворюють пари клітин.

Стрептококи – ділення клітин відбувається в одній площині з утворенням ланцюжків з трьох і більше клітин.

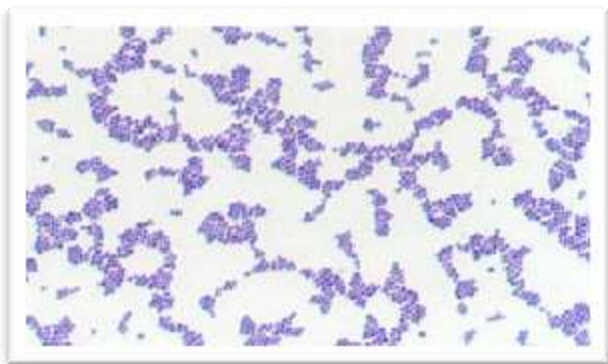
Тетракоки – клітини діляться у двох взаємно перпендикулярних площинах з утворенням груп, які складаються з чотирьох клітин.

Сарцини – клітини діляться в трьох взаємно перпендикулярних площинах і утворюють скупчення кубічної форми з 8, 16, 32 клітин.

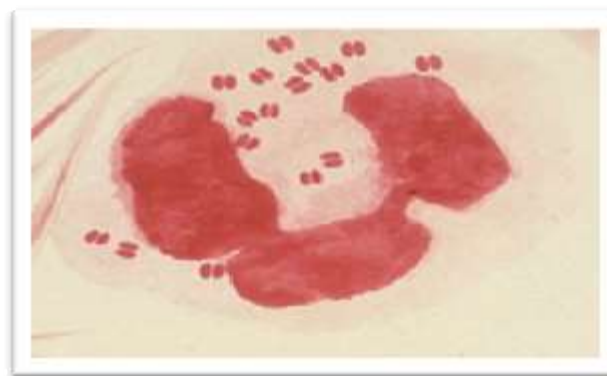
Стафілококи – діляться у декількох площинах і утворюють скупчення, які нагадують формою гроно винограду.



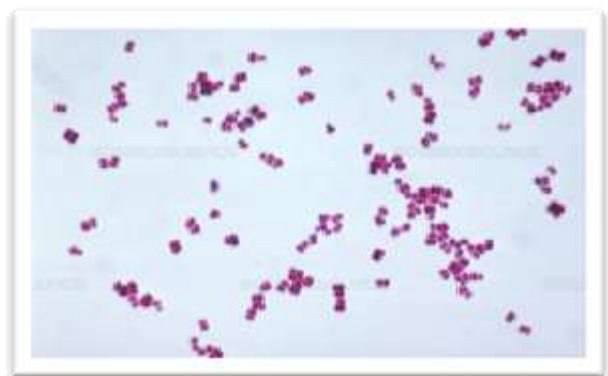
а)



б)



в)



г)

Рис. 6.2. Різновид кокоподібних форм бактерій: а – *Streptococcus mutans*, б – *Staphylococcus aureus*, в – *Neisseria gonorrhoeae* (диплокок), г – *Micrococcus luteus*

Паличкоподібні бактерії – це найбільш чисельна група прокаріотів. Довжина паличкоподібних бактерій у середньому складає 2 – 5 мкм, іноді 10 – 12 мкм. Довжина клітин одного виду залежить від ряду факторів і визначається віком культури і умовами вирощування. Більш стійкою ознакою є товщина клітин, яка коливається у межах від 0,5 до 1 мкм (рис. 6.3).



а)



б)



в)



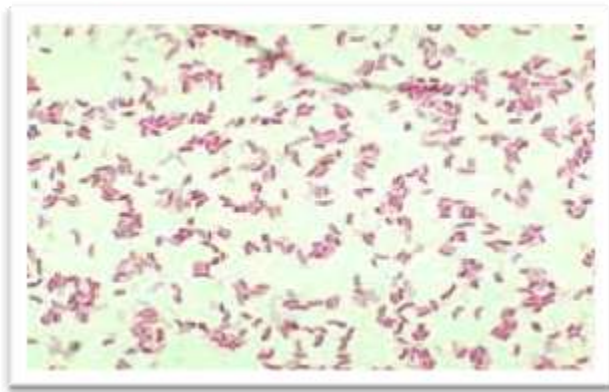
г)

Рис. 6.3. Види паличкоподібних клітин: а – *Escherichia coli* (кишкова паличка), б – *Bacillus anthracis* (збудник сибірської виразки), в – *Clostridium tetani* (збудник правця), г – *Bacillus subtilis* (сінна паличка)

Більшість паличкоподібних бактерій не утворюють ендоспор, але є і спороутворюючі форми. У класифікації спороутворюючі палички називаються бацилами (від латинського *bacillum* – паличка), неспороутворюючі палички отримали назву бактерії (від грецького *bacteria*). Як і сферичні клітини, палички можуть бути об'єднані попарно або в ланцюжки (диплобацили і диплобактерії, стрептобацили і стрептобактерії). Для визначення систематичного положення паличкоподібних бактерій важливою ознакою є форма кінців клітини (округлі, загострені, тупі).

Звиті бактерії мають спіралеподібну форму і розрізняються за довжиною, товщиною нитки та кількістю і характером завитків. Серед звитих бактерій відомі **негнучкі** та **звивисті** форми.

До негнучких бактерій відносять вібріони і спірили. **Вібріони** злегка зігнуті палички, що мають форму коми (рис. 6.4 а). **Спірили** мають великі, але рідкі завитки (рис. 6.4. б).



а)



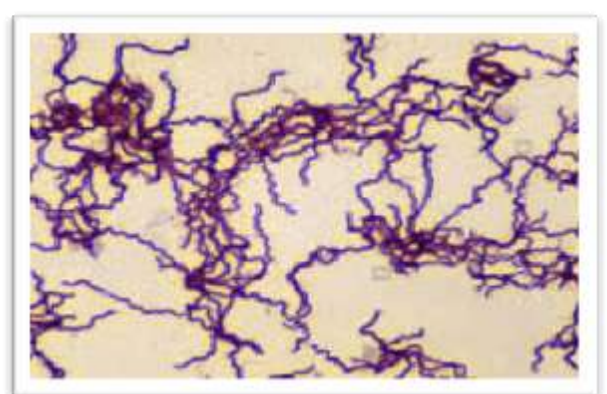
б)

Рис. 6.4. Звивисті бактерії: а – *Vibrio cholerae*, б – *Spirillum volutans*

Звивисті форми зустрічаються серед спірохет (рис. 6.5). Спірохети тонші за спірили і мають велику кількість дрібних завитків, які біжать уздовж клітини. Скорочення завитків пов'язано з особливістю будови спірохет (рис. 6.6).



а)



б)

Рис. 6.5. Спірохети: а – *Borrelia burgdorferi* (збудник захворювання Лайма), б – *Treponema pallidum* (збудник сифілісу)

У периплазматичному просторі клітинної стінки спірохет, знаходиться аксіальна нитка, яка складається з окремих фібрил. Число фібрил аксіальної нитки у різних видів спірохет варіює від 3 – 4 до 30. Пучок фібрил одним кінцем закріплюється на полюсах протоплазматичного циліндра клітини. Протилежними вільними кінцями фібрили тягнуться уздовж протоплазматичного циліндра і обвивають його (рис. 6.6). Хімічний склад фібрил аналогічний складу джгутиків і складається з білка флагеліну. Скорочення флагеліну забезпечує спірохетам поступально-обертальний рух.

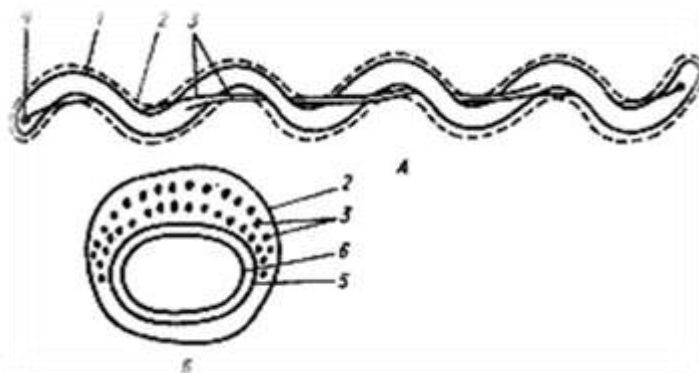


Рис. 6.6. Клітина спірохети в поздовжньому (А) і поперечному (Б) перерізі. А – зображена клітина, яка містить по одній аксіальній фібрилі з кожного кінця; Б – поперечний переріз, що пройшов через середню частину клітини, де показані два пересічних пучка, що складаються з безлічі осьових фібрил: 1 – протоплазматичний циліндр; 2 – зовнішня мембрана клітинної стінки; 3 – аксіальні фібрили; 4 – місце прикріплення осьових фібрил; 5 – пептидоглікановий шар клітинної стінки; 6 – ЦПМ.

Нитчасті форми

Найчастіше нитчасті утворення до 1 мм в довжину формують паличкоподібні клітини, які часто мають загальну оболонку (рис. 6.7). Серед нитчастих мікроорганізмів є як прикріплені, так і вільноживучі форми.

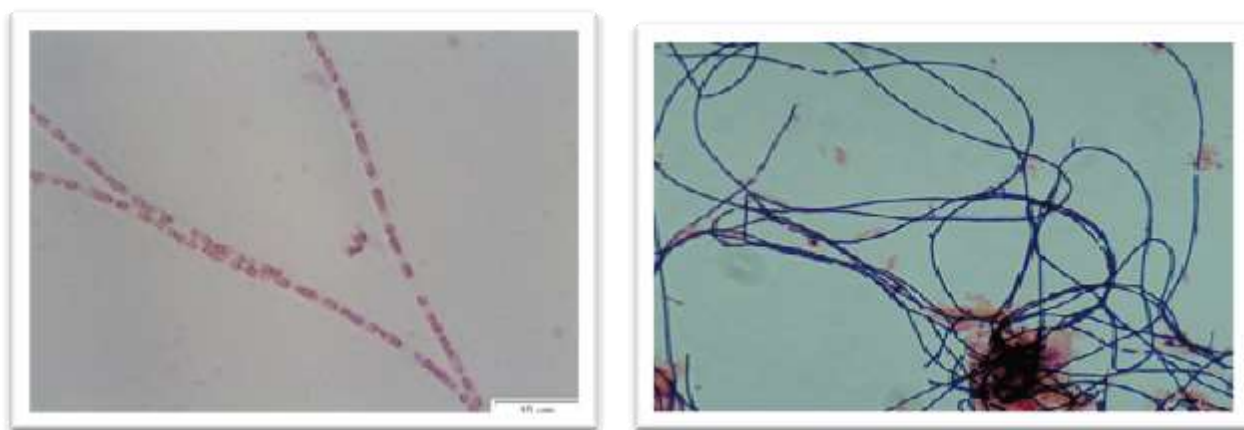


Рис. 6.7. Нитчасті бактерії

Міцеліальні форми зустрічаються серед **актиноміцетів**. Це особлива група G^+ бактерій, яка має схожість з грибами

У природі зустрічаються вищі і нижчі актиноміцети, які мають ряд суттєвих відмінностей один від одного. Клітини вищих актиноміцетів формують міцелій, який нагадує міцелій цвілевих грибів. Проте міцелій актиноміцетів тонший і в діаметрі не більший, ніж 1,2 мкм. У переважній

більшості випадків вищі актиноміцети мають добре розвинений, але несептований міцелій (рис. 6.8 а, рис. 6.9).

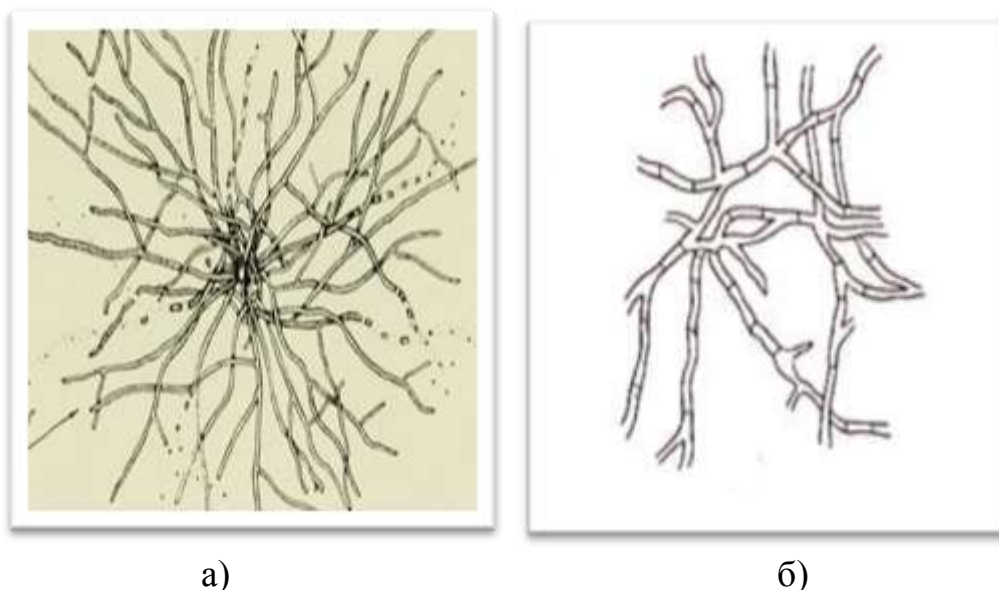


Рис. 6.8. Види міцелію актиноміцетів: а – несептований, б – септований



Рис. 6.9. Незабарвлений препарат вищого актиноміцета р. *Streptomyces*

На щільному живильному середовищі вищі актиноміцети утворюють щільні коркоподібні або бархатисті колонії різного розміру і забарвлення, що погано знімаються бактеріальної петлею. Частина колонії занурюється у субстрат і щільно з ним зростається. З другої частини колонії формується повітряний міцелій, на кінцях якого утворюються спороносні гілки або спороносці, на яких формуються екзоспори (конідії). За допомогою екзоспор відбувається розмноження актиноміцетів. Форма спороносців і спор постійна для кожного виду і використовується для діагностики актиноміцетів (рис. 6.10).

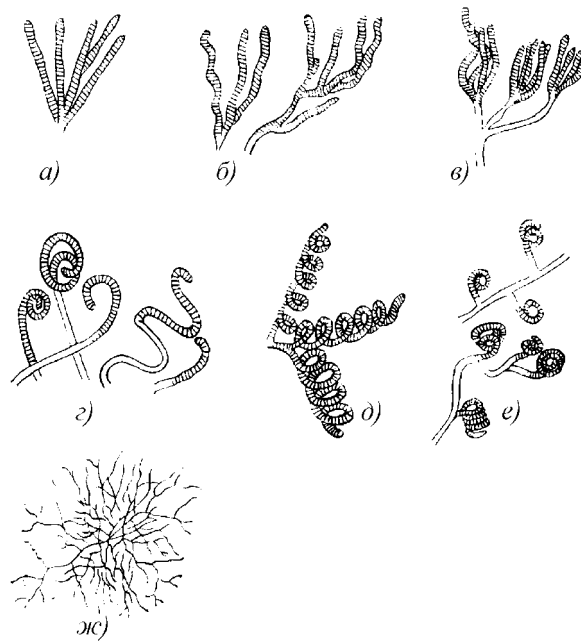


Рис. 6.10. Спороносці актиноміцетів: *а – прямі; б – звивисті; в – пучкоподібні; г – первинні спіралі; д – відкриті спіралі; е – закриті спіралі; ж – міцелій актиноміцет*

Актиноміцети єдина група прокаріот, яка як і гриби здатна розмножуватися спорами. Але на відміну від грибів, актиноміцети не містять в клітинній стінці хітину або целюлози і розмножуються тільки безстатевим шляхом. Також на відміну від колоній грибів, де забарвлюються тільки спори, міцелій актиноміцетів може синтезувати водорозчинні пігменти, які забарвлюють і його, і субстрат. Вищі актиноміцети також можуть розмножуватися поперечним поділом і брунькуванням.

У менш організованих представників актиноміцетів – **нижчих актиноміцетів** міцелій септований, але нестабільний і відносно швидко розпадається на окремі фрагменти (рис. 6.8 б). Під час росту на живильних середовищах їх розгалужені гіфи, діаметр яких близько 1,5 мкм, фрагментуються на паличкоподібні і кокоподібні форми.

На поверхні щільних середовищ нижчі актиноміцети утворюють колонії, які майже не зрощуються з субстратом. Повітряний міцелій у нижчих актиноміцетів утворюється рідко. Розмноження здійснюється фрагментами міцелію. Спори не утворюються.

Найбільше різноманіття видів актиноміцетів представлено в ґрунті. Багато актиноміцетів є продуцентами антибіотиків і ферментів. Деякі представники актиноміцетів викликають захворювання людини, тварин і рослин.

Приготування препарату-відбитка актиноміцетів

Оскільки діаметр міцелію актиноміцетів дуже малий, а спороносці ламкі, то для вивчення архітекτονіки цих організмів готують **препарати-відбитки**. Для цього предметне скельце кладуть на поверхню міцелію в чашку Петрі та злегка притискують для отримання чіткого відбитку. Препарат фіксують жаром, забарвлюють і мікроскопують, використовуючи об'єктив 90х. Фото препаратів-відбитків представлено на рис. 6.11.

В інших випадках, наприклад, для перевірки чистоти культури актиноміцетів готують фіксовані пофарбовані препарати.



а)

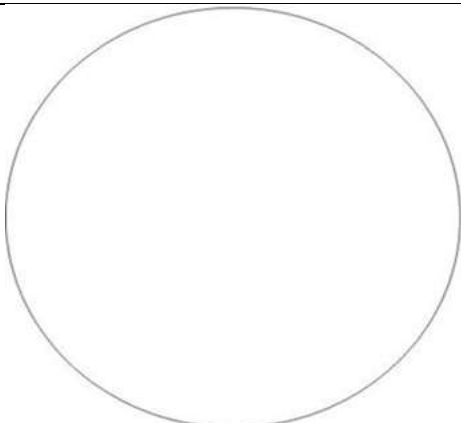
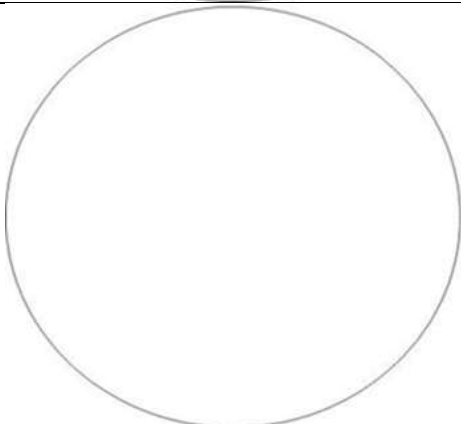
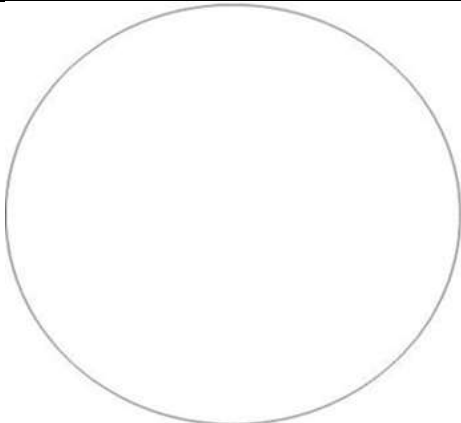
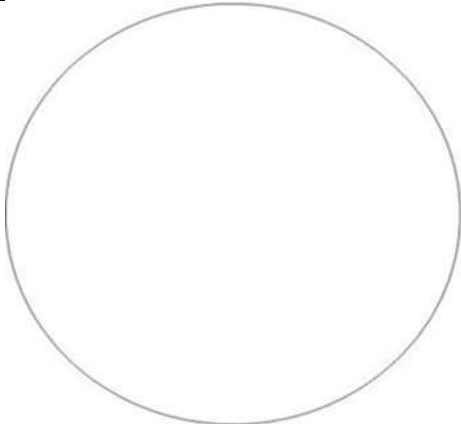
б)

Рис. 6.11. Препарати-відбитки актиноміцетів: а – нижчий актиноміцет (нокардії), б – вищий актиноміцет (стрептоміцет)

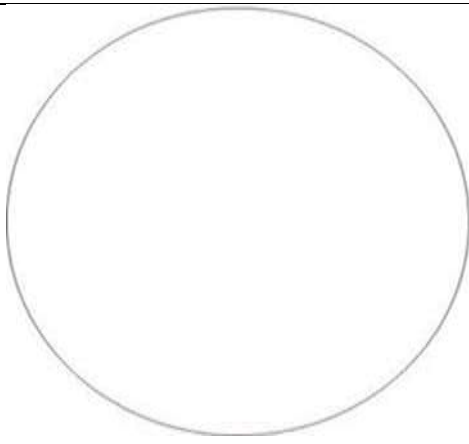
Виконання завдання

1. Приготувати фіксовані препарати 4-х культур бактерій. Роздивитися форму клітин. Препарати замалювати в табл. 6.1.
2. Приготувати препарат-відбиток з культури актиноміцетів. Розглянути будову міцелію і спороносців зі спорами. Препарат замалювати в табл. 6.2.
3. Оформити протокол і зробити висновки.

Таблиця 6.1. Морфологія бактерій

№	Назва культури	Рисунок	Опис культури (форма та тип групування клітин)
1.			
2.			
3.			
4.			

Таблиця 6.2. Морфологія *p. Streptomyces*

№	Назва культури	Рисунок	Опис культури (тип міцелію, форма спороносків)
1	Препарат-відбиток Назва культури:		

Матеріали та обладнання

Предметні скельця, водний розчин фуксину, імерсійна олія, стерильна водопровідна вода, бактеріологічні петлі, мікроскопи, дезінфекційний розчин, готові препарати культур *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *p. Streptomyces*.

Контрольні питання:

1. Які основні морфологічні форми бактерій вам відомі?
2. Назвіть основні відмінності в морфології паличкоподібних форм.
3. Які бактерії називають бацилами?
4. Чим спірили відрізняються від спірохет?
5. Яку форму має холерний вібріон?
6. Як називається тип руху спірохет? З якою клітинною структурою він пов'язаний?
7. Чим нитчасті форми відрізняються від міцеліальних?
8. За якими ознаками вищі актиноміцети відрізняються від нижчих?
9. У чому відмінності актиноміцетів від грибів?
10. З якою метою готують препарати-відбитки актиноміцетів?

Заняття 7. Складні методи забарвлення. Забарвлення бактерій за Грамом

Складні або диференційні методи забарвлення бактерій засновані на особливостях фізико-хімічної будови мікробної клітини. Ці методи використовуються для вивчення клітинних структур, а також для характеристики та ідентифікації мікроорганізмів. На відміну від простих методів забарвлення при використанні складних використовуються **декілька барвників**. До складних методів забарвлення належать забарвлення за Грамом, Цилем-Нільсенем, Нейссером, Романовським-Гімзе та інші.

Найбільш універсальним з усіх складних методів забарвлення є метод Грама. Метод розроблений в 1884 році датським лікарем Гансом Крістіаном Грамом. Цей метод має важливе діагностичне значення при визначенні видів бактерій. Усі бактерії за своїм відношенням до цього методу поділяються на грампозитивні (G^+) та грамнегативні (G^-). В подальшому було показано, що в основі поділу бактерій на G^+ і G^- лежить різниця в будові їхніх клітинних стінок, а отже і різна сприйнятливість їхніх клітин до барвників.

Клітинна стінка грампозитивних бактерій складається з багатошарового пептидоглікана – муреїна, що щільно прилягає до ЦПМ і тейхоевих кислот. У невеликій кількості в структурі клітинної стінки у різних бактерій можуть зустрічатися білки, вуглеводи і полісахариди.

Клітинна стінка грамнегативних бактерій має більш складну будову і включає внутрішній шар, утворений одно- або двошаровим муреїном і зовнішню мембрану. Внутрішній шар відокремлений від ЦПМ і зовнішньої мембрани периплазматичним простором де знаходяться ліпопротеїни і білки.

Зовнішня мембрана сформована фосфоліпідами, ліпополісахаридами і білками. Присутність зовнішньої мембрани, яка є напівпроникною, робить грамнегативні клітини більш стійкими до антибіотиків, отрут і деяких інших токсичних речовин. На різниці в будові клітинної стінки бактерій і ґрунтується забарвлення за Грамом.

Існує кілька модифікацій забарвлення за Грамом, які обумовлені природою барвників і знебарвлюючих розчинів. Метод забарвлення за Грамом включає використання як основного барвника (генціанвіолет, метиловий синій або кристалвіолет), так і додаткового (фуксин – він же розчин Пфейфера або сафранін). Метод передбачає використання також розчину Люголя, основним компонентом якого є йод і 96% етилового спирту або ацетону. **Фарбуються за Грамом тільки попередньо підготовлені фіксовані препарати бактерій.**

Техніка виконання забарвлення за Грамом

1. На попередньо приготований фіксований препарат мікроорганізмів наносять кілька крапель основного барвника генціанвіолета і витримують його протягом 2 хв. На цьому етапі всі клітини фарбуються генціанвіолетом в фіолетовий колір за рахунок фарбування їхньої цитоплазми барвником.

2. Не змиваючи барвник з мазка, вносять в нього розчин Люголя на 2 хв. Мазок повинен почорніти. На цьому етапі в грампозитивних клітин, на відміну від грамнегативних, утворюється міцний комплекс барвника генціанвіолета з йодом.

3. Розчин Люголя зливають і для знебарвлення клітин обробляють мазок 96% етиловим спиртом. Для цього предметне скло з мазком занурюють в склянку зі спиртом на 30 с або промивають скло спиртом з піпетки протягом 30 с до знебарвлення препарату. На цьому етапі відбувається знебарвлення тільки G^- бактерій. Це пов'язане з тим, що у них пептидоглікан одношаровий, рідше двошаровий і не є значним бар'єром на шляху вимивання барвника. Зовнішня мембрана клітинної стінки G^- мікроорганізмів також не є значною перешкодою, бо при обробці спиртом відбувається розчинення і вимивання з неї ліпідів, що значним чином збільшує її проникність. В результаті обробки спиртом у G^- бактерій відбувається екстрагування барвника і повне знебарвлення клітин. На цьому етапі грамнегативні бактерії не можна виявити при мікроскопії.

У G^+ бактерій муреїновий каркас багатшаровий складає до 90 % усієї маси клітинної стінки та щільно прилягає до ЦПМ. При обробці клітин спиртом відбувається розбухання пептидоглікану і зменшення діаметра пор клітинної стінки, що призводить до зниження її проникності для барвника. На цьому етапі при мікроскопії можна побачити тільки пофарбовані в синьо-фіолетовий колір генціанвіолетом грампозитивні бактерії.

4. Для виявлення знебарвлених грамнегативних бактерій мазок ретельно промивають водою від спирту і крапають на нього 0,1%-вий розчин фуксину. Через 2 хв. барвник зливають, скло ретельно промивають водою. Мазок обережно промокають фільтрувальним папером і проводять мікроскопію, використовуючи імерсійний об'єктив.

При правильному забарвленні грампозитивні бактерії забарвлюються генціанвіолетом в синьо-фіолетовий колір, грамнегативні – у рожевий колір фуксином (рис. 7.1).

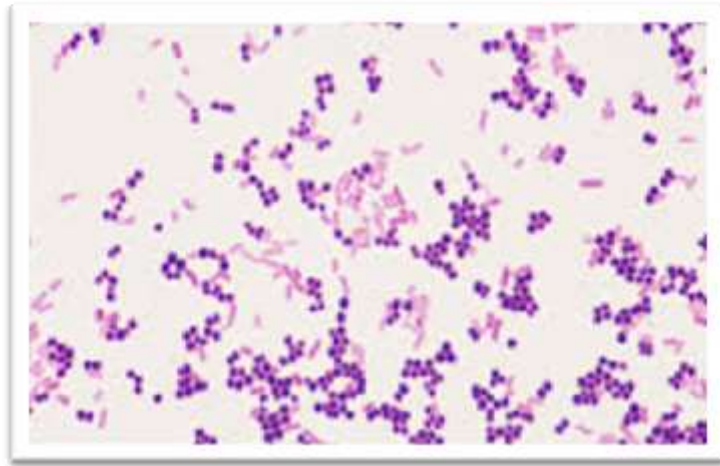


Рис. 7.1. Забарвлення за Грамом. Коки – грампозитивні, паличкоподібні форми – грамнегативні

Здатність клітин забарвлюватися за Грамом залежить від віку культури. Для забарвлення за Грамом доцільно брати молоді – 8 – 24-годинні культури, бо при старінні у популяції збільшується кількість мертвих клітин, які завжди забарвлюються грамнегативно.

Існує і експрес-метод визначення грам-типу мікроорганізмів, який заснований на руйнуванні клітин грамнегативних бактерій в лужному середовищі і визначенні вільної ДНК.

Експрес-метод визначення грам-типу мікроорганізмів

Для виявлення вільної ДНК на предметне скло наносять краплю 3%-вого розчину КОН і вносять в неї 1 петлю 24-годинної досліджуваної культури з агару. Культуру ретельно перемішують в розчині лугу. Через 5 – 7 с при русі петлі вгору у грамнегативних мікроорганізмів утворюється слизовий тяж з ДНК довжиною 1 – 2 см. Якщо слиз не виявляється, то тестована культура відноситься до грампозитивної.

Виконання завдання

I. Виконання забарвлення за Грамом.

1. Приготувати на одному предметному склі три фіксованих мазка бактерій:
 - А. контрольної грамнегативної культури *Serratia marcescens* з одного кінця скла
 - Б. контрольної грампозитивної культури *Micrococcus lysodeikticus* з іншого кінця скла
 - С. досліджуваної культури в центрі скла.

Мазки повинні бути тонкими, клітини бактерій повинні бути рівномірно розподілені на склі, інакше фарбування буде неправильним.

2. Маркером відзначити на предметному склі порядок розташування Γ^+ і Γ^- культур.

3. Мазки зафарбувати за Грамом і розглянути в імерсійній системі.

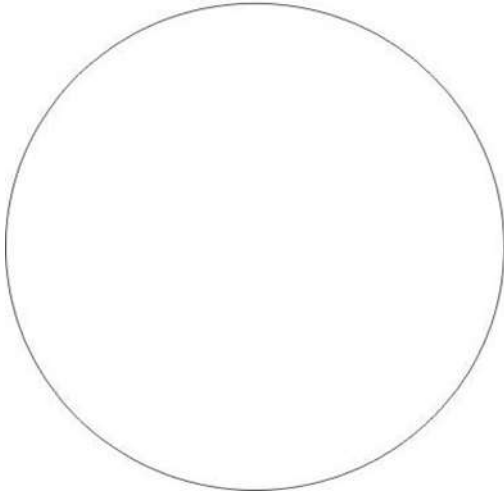
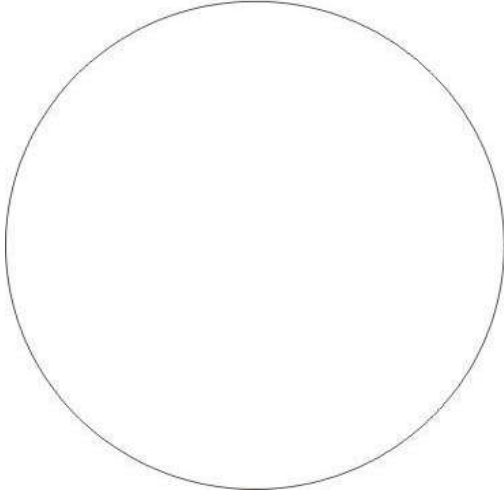
4. Оформити таблицю 7.1 і зробити висновки.

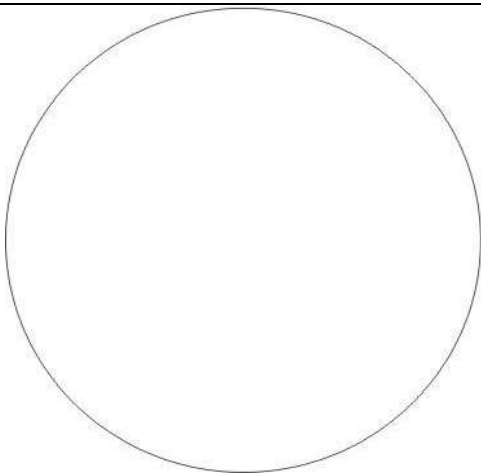
II. Виконати експрес-метод визначення грам-типу мікроорганізмів

1. Визначити грам-тип *B. subtilis* і *E. coli*.

2. Оформити таблицю 7.2 і зробити висновки.

Таблиця 7.1. Забарвлення мікроорганізмів за Грамом

Назва культури	Рисунок	Висновок
1	2	3
Контрольна Γ^-		
Контрольна Γ^+		

1	2	3
Досліджувана культура		

Таблиця 7.2. Експрес-метод визначення грам-типу досліджуваних мікроорганізмів *Bacillus subtilis* і *Escherichia coli*

Назва культури	Опис і висновки
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	

Матеріали та обладнання

Предметні скельця, бактеріологічні петлі, пробірки зі стерильною водопровідною водою, сірники, фільтрувальний папір, кедрова олія, мікроскопи, розчин кислого фуксину, розчин генціанового фіолетового, 96% етиловий спирт, 3% розчин КОН, 12 – 24-годинні культури *Serratia marcescens*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*, *Bacillus subtilis*.

Контрольні питання:

1. На чому засновано поділ мікроорганізмів на грампозитивні та грамнегативні?
2. Чим відрізняються диференційні методи забарвлення бактерій від простих?
3. Як готують препарат клітин до забарвлення за Грамом?
4. З якою метою готують три фіксованих мазка бактерій на одному предметному склі для визначення за Грамом?
5. Обґрунтувати чому Γ^+ бактерії фарбуються у синьо-фіолетовий колір генціанвіолетом.
6. Якого віку культури доцільно брати для забарвлення за Грамом? Пояснити чому?
7. З чим пов'язано, що Γ^- бактерії зафарбовуються у рожевий колір фуксином, при тому, що під час фарбування ми використовуємо два барвники?
8. З якою метою у забарвленні за Грамом використовуються розчин Люголю і 96% етиловий спирт?
9. В чому суть експрес-метода оцінки приналежності мікроорганізмів до групи Γ^+ або Γ^- ?
10. Скласти робочу послідовність дій для виконання забарвлення за Грамом.

Заняття 8. Будова бактеріальної клітини

Бактеріальна клітина має типову прокаріотичну будову і включає поверхневі і цитоплазматичні (внутрішньоклітинні) структури, а також запасні поживні речовини (рис. 8.1).

До обов'язкових внутрішньоклітинних структур належать цитоплазматична мембрана, яка оточує цитоплазматичний матрикс, де розташовані нуклеоїд, рибосоми і включення (запасні поживні речовини). Ці клітинні утворення є у всіх бактерій. Ряд інших внутрішньоклітинних утворень, таких як: газові вакуолі, карбоксисоми, хлоросоми, магнітосоми тощо зустрічаються у окремих видів бактерій.

Зверху протопласта розташовуються *поверхневі структури* клітини: клітинна стінка, капсульні утворення, джгутики і ворсинки (рис 8.1).

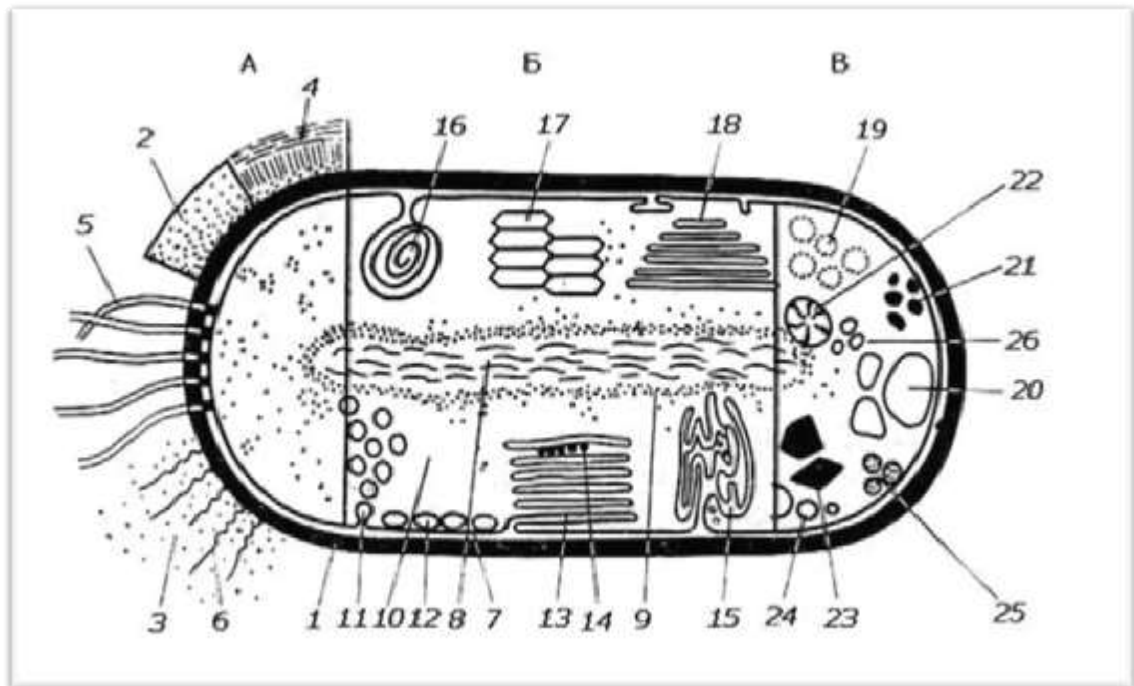


Рис. 8.1 Схема будови клітини бактерій

А – поверхневі структури: 1 – клітинна стінка; 2 – капсула, 3 – слизовий шар; 4 – чохол; 5 – джгутики; 6 – війки;

Б – цитоплазматичні структури: 7 – цитоплазматична мембрана; 8 – нуклеоїд; 9 – рибосоми; 10 – цитоплазма; 11 – хроматофори; 12 – хлоросоми; 13 – пластинчасті тилакоїди; 14 – фікобілісоми; 15 – трубчасті тилакоїди; 16 – мезосоми; 17 – аеросоми; 18 – ламелярні структури;

В – запасні речовини: 19 – полісахаридні гранули; 20 – гранули полі-β-оксимасляної кислоти; 21 – гранули поліфосфатів; 22 – гранули ціанофіцину; 23 – карбоксисоми; 24 – включення сірки; 25 – жирові краплі; 26 – гранули вуглеводів.

Цитоплазматична мембрана обмежує із зовнішнього боку цитоплазму. У хімічному відношенні є білково-ліпідним комплексом. Ліпіди ЦПМ представлені фосфоліпідами, нейтральними ліпідами і вільними жирними кислотами. Фосфоліпіди формують гідрофобний бішар, орієнтований гідрофільними головками назовні і гідрофобними хвостами всередину бішару. Мембранні білки розташовуються дискретно. Топологічно, тобто за розташуванням в ліпідному бішарі, вони поділяються на периферичні, напівінтегральні і інтегральні. Біохімічна класифікація білків заснована на міцності їх взаємодії з ліпідами. Інтегральні і напівінтегральні білки характеризуються більш міцними взаємодіями з фосфоліпідами як на рівні полярних головок, так і всередині бішару. На відміну від них, периферичні білки мають слабкий зв'язок з ліпідним бішаром (рис. 8.2).

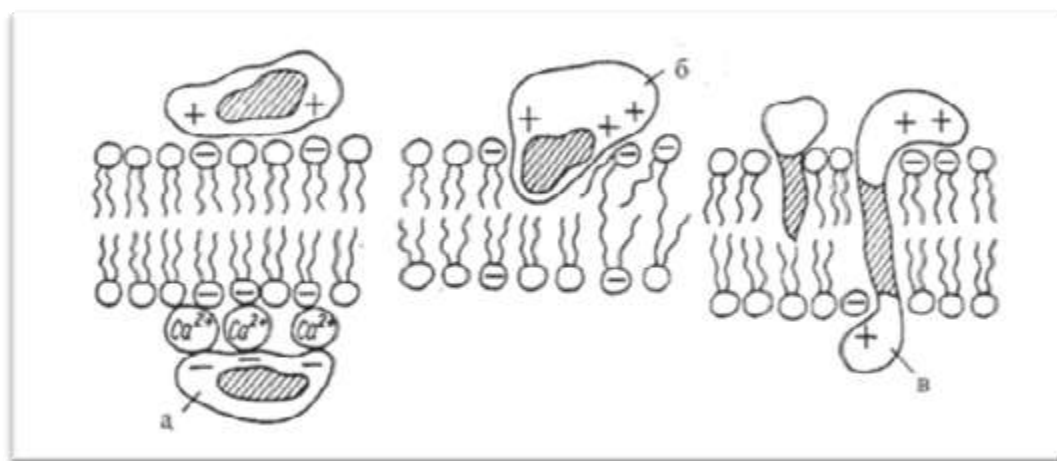


Рис. 8.2. Взаємодія білків з ліпідним бішаром мембрани: *а* – білки поверхневі; *б* – напівінтегральні; *в* – інтегральні. *Заштрихована гідрофобна частина молекули білка*

З цитоплазматичною мембраною пов'язана низка найважливіших клітинних функцій. Виконанням бар'єрної функції ЦПМ забезпечує клітині існування як структурної і функціональної одиниці. Вона також створює і підтримує осмотичний тиск клітини. Енергетична функція пов'язана з розташуванням у ЦПМ окислювально-відновних переносників дихального ланцюга і ферментів окислювального фосфорилування. Цитоплазматична мембрана виконує транспортну функцію, оскільки вона є напівпроникною і забезпечує перенесення різних речовин в клітину і видалення з клітини продуктів метаболізму. ЦПМ містить ферменти, які беруть участь в синтезі клітинної стінки, капсул і інших поверхневих структур тому їй притаманна і

біосинтетична функція. Вона також бере участь в реплікації нуклеоїда і плазмід, діленні клітини, утворенні спор і цист.

Нуклеоїд бактеріальної клітини не має ядерної оболонки і ядерець. Найчастіше нуклеоїд знаходиться у вигляді кільцевої ковалентно замкненої молекули 2л ДНК. Рідко зустрічаються і лінійні форми. Суперспіралізація ДНК забезпечується гістоноподібними білками та іонами кальцію. ДНК є носієм генетичної інформації, записаної у вигляді послідовності нуклеотидів за допомогою генетичного кода. Реплікація ДНК здійснюється за класичним напівконсервативним механізмом за моделлю колеса, що котиться.

Запасні поживні речовини (включення) відкладаються у всіх бактерій. Вони знаходяться в клітині в осмотично інертному стані і накопичуються при надлишку поживних речовин. Включення використовуються клітиною для харчування і енергетичних потреб. Запасні поживні речовини можуть знаходитися в клітині бактерій у вигляді *безазотистих сполук* – полісахаридів (глікоген $(C_6H_{10}O_5)_n$, крохмаль $(C_6H_{10}O_5)_n$, гранульоза) і жироподібних речовин (полі- β -оксимасляна кислота $C_4H_8O_3$). Ці речовини є донорами вуглецю і енергії.

Азотовмістні запасні речовини зустрічаються тільки у ціанобактерій у вигляді ціанофіцінових зерен. У хімічному відношенні ціанофіцінові зерна є сополімерами аргініну і аспарагину та для клітини є джерелами азоту.

Волютин відкладається в клітинах у вигляді гранул. У хімічному відношенні він є поліфосфатом. При нестачі фосфору в середовищі використовується як фосфорне депо. Як джерело енергії грають другорядну роль.

Молекулярна сірка відкладається у сіркобактерій, тіонових бактерій, чий метаболізм пов'язаний з окисненням сірководню. Сірка є джерелом електронів і енергії.

Вапняні тіла – включення карбонату кальцію. Використовуються сіркобактеріями для нейтралізації токсичної дії сірчаної кислоти, яка утворюється у сіркобактерій при окисненні сірководню.

Капсула розташовується на поверхні клітинної стінки. Морфологічно розрізняють: мікрокапсули, що мають шар слизу менше 0,2 мкм; макрокапсули, що товщі 0,2 мкм; слизові шари, що за розмірами перевищують розміри клітин та слизові чохла, які мають неоднорідну будову. У хімічному відношенні капсули можуть бути побудовані на основі гетеро- або гомополісахаридів, іноді мають білкову природу.

Капсули не є обов'язковими компонентами клітини. В межах виду можуть бути як капсульні, та й безкапсульні варіанти. Разом з тим, капсула захищає клітину від механічних пошкоджень і висихання і є джерелом запасних

поживних речовин. Капсула виконують захисну функцію. Вона служить природним бар'єром для проникнення в клітину токсичних речовин і бактеріофагів. Для патогенних бактерій капсула є фактором вірулентності, оскільки капсули перешкоджають фагоцитозу. Капсульні форми деяких мікроорганізмів можуть викликати захворювання на відміну від їх безкапсульних мутантів.

Джгутики – клітинні органели, які забезпечують бактеріям плавальний рух. За розташуванням і кількістю джгутиків на бактеріальній клітині розрізняють:

- **монополярні монотрихи** – мікроорганізми, що мають на одному з полюсів один джгутик. Це найрухливіші бактерії з активним поступальним типом руху;

- **монополярні політрихи (лофотрихи)** – мікроорганізми, що мають на одному з полюсів пучок джгутиків, з яким також пов'язаний поступальний рух;

- **біполярні монотрихи** – мікроорганізми, які мають по-одному джгутику на обох полюсах мікробної клітини;

- **біполярні політрихи (амфітрихи)** – мають пучок джгутиків на обох кінцях. Клітини, що мають такий тип джгутикування, пересуваються безладно;

- **перітрихи** – мікроорганізми, у яких джгутики розташовані по всій поверхні клітини, пересуваються також безладно (рис. 8.3).

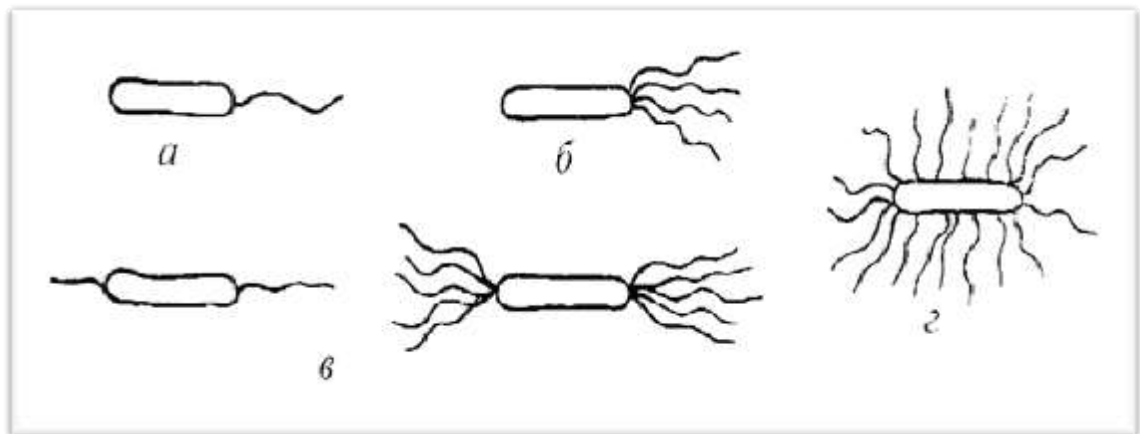


Рис. 8.3. Тип розташування джгутиків бактерій: *а* – монополярний монотрих *б* – монополярний політрих (лофотрих) *в* – біполярний монотрих і біполярний політрих (амфітрих); *г* – перітрих

Джгутик має складну будову і складається з нитки, рухомого гака і базального тіла (рис. 8.4).

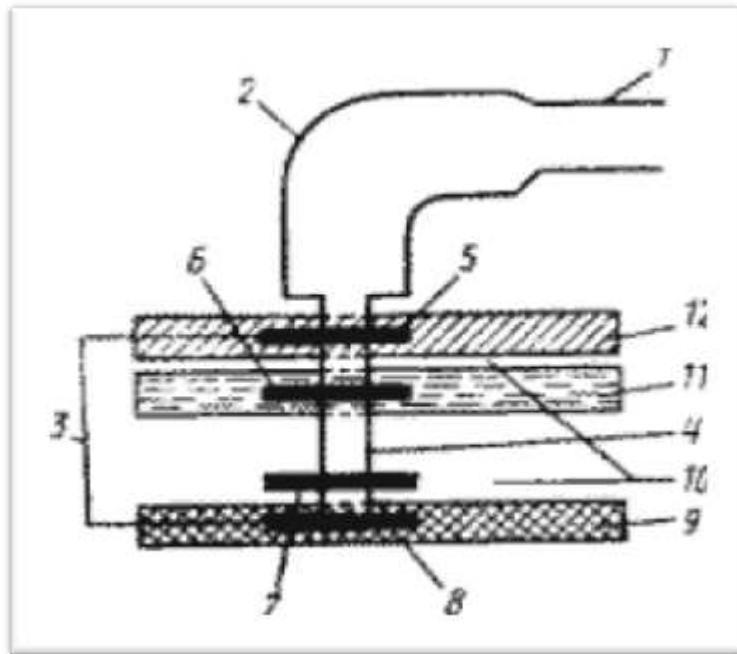


Рис. 8.4. Будова джгутика грамнегативних бактерій: 1 – нитка; 2 – гак; 3 – базальне тіло; 4 – стрижень; 5 – L-кільце; 6 – P-кільце; 7 – S-кільце; 8 – M-кільце; 9 – ЦПМ; 10 – периплазматичний простір; 11 – пептидоглікановий шар; 12 – зовнішня мембрана

Базальне тіло включає стрижень, який пронизує всі поверхневі шари клітини і кільця, розташовані в клітинній стінці і ЦПМ. У грамнегативних мікроорганізмів базальне тіло має 4 кільця (М-кільце; S-кільце; Р-кільце, L-кільце), у грампозитивних 2 – (М-кільце і S-кільце). М-кільце всіх джгутикових організмів розташовано в ЦПМ і є мотором джгутика. Решта кільця використовуються для міцного кріплення в клітинній стінці бактерій. Обертання джгутиків здійснюється за участі енергії мембранного потенціалу.

Фімбрії (вії) різновид пілі. Вони у великій кількості утворюються на поверхні бактеріальної клітини. Фімбрії побудовані на основі білка піліна і мають на кінцях особливі прикріпні структури (адгезини). Фімбрії у деяких мікроорганізмів виступають факторами патогенності. За допомогою фімбрій клітини можуть бути закріплені на поверхні клітин епітелію або агрегують один з одним, утворюючи біоплівки.

Пілі також побудовані на основі білка піліна і мають осьові отвори. Пілі виконують спеціалізовану функцію. Так F-пілі є фактором фертильності. Вони формуються тільки на клітинах, які несуть F-епісому. F-пілі забезпечують передачу генетичної інформації від клітини донора (F+) в клітку реципієнта – (F-). На відміну від фімбрій, F-пілі формуються на клітині в невеликій кількості і існують нетривалий час.

До спеціалізованих пілі відносяться також R-пілі. Вони кодуються R-плазмідками (плазмідки резистентності). R-пілі забезпечують перенесення плазмід резистентності і, тим самим, сприяють поширенню лікарської стійкості серед бактерій.

Ендоспори бактерій не мають відношення до розмноження. Головна функція спор – збереження виду від вимирання за несприятливих умов зовнішнього середовища. Спори – структури, що знаходяться в кріптобіотичному стані з низькою метаболічною активністю, але високою стійкістю до висушування, високої температури, сонячної радіації та інших несприятливих факторів.

Висока резистентність спор пов'язана зі зневодненням білків, накопиченням кальцієвої солі дипіколінової кислоти і утворенням численних оболонок. Розташування і розміри спор у різних мікроорганізмів мають таксономічне значення. За сприятливих умов середовища спори проростають і дають початок новому організму.

Виявлення клітинної стінки

Для спостереження клітинної стінки в світловому мікроскопі застосовують забарвлення, за допомогою якого вдається легко виявити межу між окремими клітинами, розташованими у вигляді щільних ниток або агрегатів.

1. На знежиреному склі роблять мазок клітин досліджуваних бактерій, висушують його на повітрі й фіксують протягом 5 хв. 5%-вим розчином фосфоромолібденової кислоти.

2. Препарат промивають водою і забарвлюють не більше 15 хв. 0,02%-вим розчином кристалвіолета.

3. Знову промивають водою, висушують і проводять мікроскопію з імерсійною системою.

Клітинна стінка забарвлюється в чорний колір, а цитоплазма – в блідо-бузковий. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Виявлення капсул

При звичайних методах забарвлення капсули залишаються безбарвними. Для виявлення капсул застосовують спеціальні методи забарвлення.

Метод Буррі-Гінса

1. Краплю досліджуваної культури *Acetobacter aceti* наносять на край предметного скельця і ретельно змішують з краплиною туші.

2. До краплини досліджуваної рідини під кутом 45° підводять край шліфованого скельця, крапля при цьому розтікається по його краю. Швидким рухом шліфованого скельця готують препарат подібний до мазка крові.

3. Препарат висушують, фіксують у полум'ї пальника (або суміші Нікіфорова: спирт та ефір 1:1).

4. Добарвлюють протягом 2 – 3 хв. фуксином Циля.

5. Забарвлений мазок промивають водою, підсушують на повітрі та мікроскопують за допомогою імерсійного об'єктива.

Туш утворює темний фон препарату, на якому добре видно безбарвні капсули, які оточують забарвлені фуксином бактеріальні клітини. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Виявлення спор у бактерій

Виявлення здатності культури до спороутворення краще проводити на старих культурах. Спори у бактерій можна виявити при мікроскопіюванні препарату “роздавлена крапля” у світловому полі. Спори заломлюють світло сильніше, ніж інша частина клітини, і їх видно у клітині як більш темні включення округлої чи овальної форми.

Проте для виявлення спор краще використовувати складні методи забарвлення клітин. Оболонка спор важко проникна для барвника. Тому всі наявні способи забарвлення спор засновані на тому, що попередньо сильним барвником з прогріванням забарвлюють одночасно і клітину, і спору. Потім протоплазму клітини знебарвлюють, залишаючи забарвленою тільки спору. Додаткове забарвлення цитоплазми найчастіше виконують контрастним до кольору спори барвником. Найбільш розповсюдженим є метод Ожешки.

Метод Ожешки

1. На знежиреному предметному скельці готують тонкий мазок бактерій *Bacillus subtilis*, висушують його на повітрі та, не фіксуючи, заливають 0,5 % розчином HCl.

2. Мазок підігрівають протягом 2 хв. у струмені теплого повітря пальника до появи парів.

3. Кислоту зливають, препарат промивають водою, мазок закривають фільтрувальним папером і заливають карболовим фуксином Циля.

4. Препарат забарвлюють протягом 5 хвилин при нагріванні над полум'ям пальника. В міру випаровування барвника його періодично додають, не даючи препарату підсохнути.

5. Препарат промивають водою та обробляють протягом 2 хв. 1 % розчином сірчаної кислоти для знебарвлення.

6. Препарат знову промивають водою і добарвлюють розчином метиленового синього 1:40 протягом 10 – 15 хв.

7. Барвник зливають і мікроскопують з імерсійною системою.

При правильному забарвленні клітини повинні бути синіми, а спори червоними. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Виявлення жиру і гранул полі- β -оксибутирату

1. На предметне скельце наносять краплину мікробної суспензії *Saccharomyces cerevisiae* з краплиною розчину судана III і накривають покривним скельцем.

2. Мікроскопують з об'єктивом 90 $\times$.

У полі зору мікроскопа видно рожево-червоні краплини ліпідів у безбарвній цитоплазмі. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Виявлення гранул волютину дріжджів

Метод Омелянського

Сутність забарвлення заснована на поганій розчинності метакроматичних гранул у розчинах кислот.

1. Готують фіксований препарат *Saccharomyces cerevisiae*.

2. На мазок наносять фуксин Циля і забарвлюють клітини протягом 30 – 60 с.

3. Промивають препарат водою і наносять на мазок 1% розчин сірчаної кислоти на 20 – 30 с. Клітини знебарвлюються, а стійкий до дії кислот волютин зберігає забарвлення.

4. Препарат промивають водою і додатково контрастно забарвлюють метиленовим синім у розведенні 1:40 протягом 15 – 30 с.

5. Барвник змивають водою, препарат просушують фільтрувальним папером і мікроскопують з об'єктивом 90 $\times$.

У полі зору мікроскопа гранули волютину забарвлюються в червоний колір, цитоплазма клітини – в синій. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Метод Леффлера

1. Тонкий фіксований мазок культури мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* фарбують через смужку фільтрувального паперу метиленовим синім Леффлера. Через 3 хв. знімають фільтрувальний папір, а барвник змивають водою.

2. Не висушуючи мазок додають краплю 1% сірчаної кислоти і накривають покривним склом.

3. Мікроскопують зі збільшенням 40×. Зерна волютини на препараті повинні бути пофарбовані в червонувато-фіолетовий колір, а цитоплазма – безбарвна. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Методика забарвлення включень гранульози

1. На предметне скло наносять краплю досліджуваної культури роду *Clostridium* і додають краплю розчину Люголю.

2. Препарат закривають покривним склом і проводять мікроскопію.

Включення гранульози фарбуються в сіро-синій колір. Замальовують отриману картину в таблицю 8.1.

Виконання завдання

1. Виявити клітинну стінку на моделі культури *Bacillus anthracoides*

2. Приготувати препарат з *Acetobacter aceti* для виявлення капсул.

3. Забарвити ендоспори культури *Bacillus subtilis* за методом *Ожешки*.

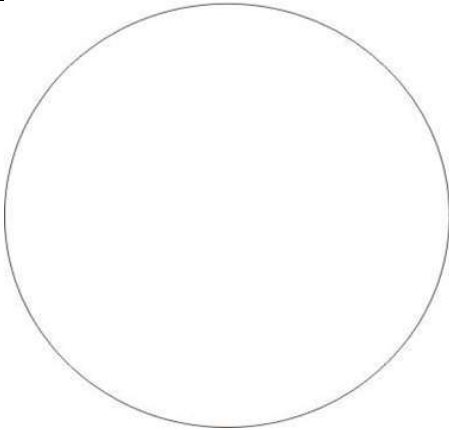
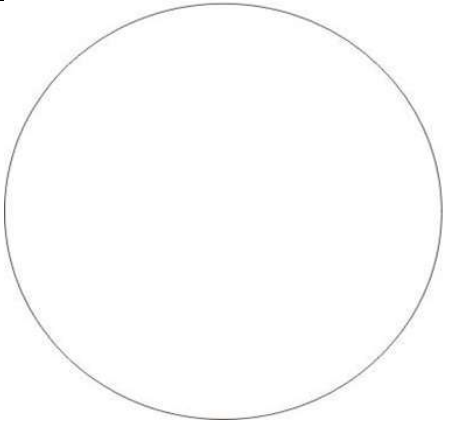
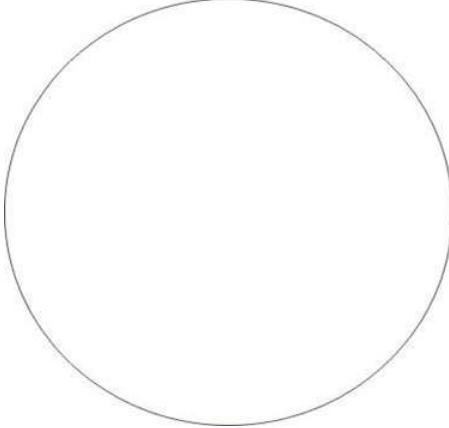
4. Виявити включення жиру і полі β-оксимасляної кислоти в клітинах *Saccharomyces cerevisiae*.

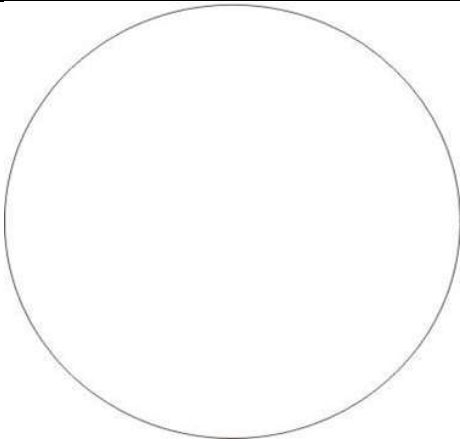
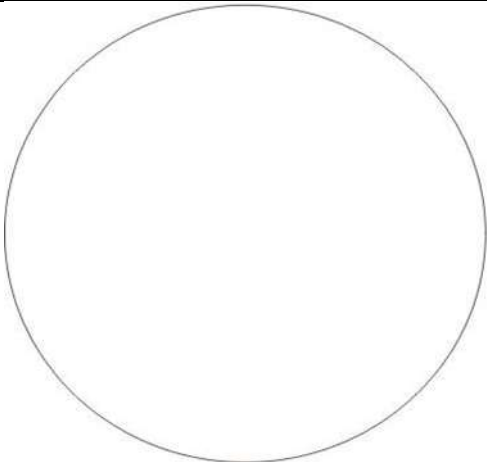
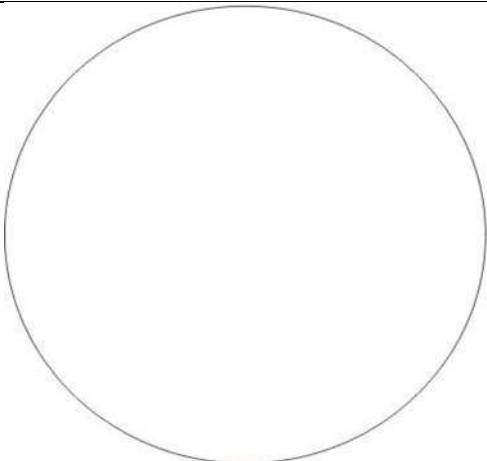
5. Виявити гранули волютину в клітинах *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Виявити включення гранульози у клітин р. *Clostridium*.

7. Заповніть таблицю 8.1 для всіх типів забарвлення і оформити протокол. Зробити висновки.

Таблиця 8.1 Методи забарвлення клітинних структур та включень мікроорганізмів

№	Метод забарвлення і назва культури	Рисунок	Опис та висновки (структура виявлена або не виявлена)
1	2	3	4
1			
2			
3			

1	2	3	4
4			
5			
6			

Матеріали та обладнання

Предметні та покривні скельця, бактеріологічні петлі, пробірки зі стерильною водопровідною водою, сірники, газові пальники, фільтрувальний папір, кедрова олія, фуксин Циля, розчин Судану III, розчин метиленового синього 1:40, розчин туші, 0,5% розчин HCl, 0,5% розчин нейтрального червоного, 1% розчин H₂SO₄, 5%-вий розчин фосфомолібденової кислоти, 0,02%-вий розчин кристалвіолета, розчин Люголю, культури *Bacillus anthracoides*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, р. *Clostridium*, *Acetobacter aceti*.

Контрольні питання:

1. Які структури бактеріальної клітини є поверхневими, а які цитоплазматичними?
2. В чому полягають відмінності нуклеоїду бактеріальної клітини від ядра еукаріотів?
3. Пояснити найважливіші клітинні функції, які пов'язані з цитоплазматичною мембраною.
4. В чому різниця між капсулами, слизовими шарами і слизовими чохлами?
5. Чим відрізняються між собою лофотрихи, амфітрихи та перітрихи?
6. Пояснить будову джгутиків Г⁺ і Г⁻ бактерій.
7. В чому відмінності методів визначення волютину методом Омелянського і методом Леффлера? Для чого бактерії використовують дану запасну поживну речовину?
8. Для яких за віком культур краще проводити мікроскопію спор?

Заняття 9. Методи стерилізації

У мікробіологічній практиці стерилізація є одним з найважливіших і необхідних прийомів. Слово «стерилізація» в перекладі з латинської означає знепліднювання. Стерилізація передбачає повне знищення всіх форм життя як на поверхні об'єкта, що стерилізується, так і всередині нього. Розрізняють стерилізацію **термічну**, з використанням високих температур та **холодну** з використанням бактеріальних фільтрів, хімічних речовин, іонізуючої радіації, ультразвуку тощо. Вибір адекватного методу стерилізації залежить від особливостей виробів, що стерилізуються.

Теплова стерилізація

Відомі різні способи стерилізації з використання високої температури.

Стерилізація у полум'ї. Цей спосіб використовується для стерилізації бактеріологічних петель, голок, предметних та покривних скелець, пінцетів та інших дрібних металевих предметів.

Стерилізація кип'ятінням. Здійснюється у спеціальних стерилізаторах протягом 40 – 50 хв. Метод може бути використаний для стерилізації хірургічних інструментів, шприців, голок, гумових трубок. Для підвищення температури кипіння й усунення жорсткості води додають 1 % бікарбонату натрію. Однак цей спосіб не забезпечує повної стерилізації, бо спори деяких бацил і клостридій можуть витримувати кип'ятіння протягом декількох годин.

Стерилізація гарячим повітрям. Здійснюється у сушильних шафах (рис. 9.1) за температури 165 - 170 °С протягом 2 годин.



Рис. 9.1. Сушильна шафа

Сушильні шафи роблять з термостійких матеріалів – звичайно з металу і азбесту. У шафі з електричним нагрівом є регулятори, які забезпечують підтримання необхідної температури. При стерилізації посуду, загорнутого в паперову упаковку, температуру в сушильній шафі не варто піднімати вище 165°C, оскільки за більш високої температури може відбутись обвуглювання паперу.

Стерилізацію парю проводять двома способами: насиченою парю під тиском (автоклавування) і текучою парю.

Стерилізація насиченою парю під тиском або автоклавування – частіше за все використовується для стерилізації посуду і живильних середовищ. У автоклаві температура пари зростає з підвищенням тиску. Для стерилізації використовується додатковий тиск 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 і 2,5 атм., за якого температура збільшується від 111 до 138 °C (табл. 9.1). Але звичайно для стерилізації живильних середовищ і лабораторного посуду використовують режим надлишкового тиску в межах 0,5 – 1,5 атм.

Таблиця 9.1. Температура насиченої пари за тиску в автоклаві

Тиск пари, за надлишкового атмосферному тиску, атм.	Температура, °C
0	100
0,5	111
0,8	117
1,0	121
1,5	128
2,0	134
2,5	138

Для підтвердження підтримки в автоклаві температурного режиму використовують хімічні речовини з певною температурою плавлення: бензонафтол – 110 °C, антипирин – 115 °C, сірка – 119 °C, бензойна кислота – 120 – 122 °C, манноза і сечовина – 132 – 133 °C. Ці речовини вміщують у скляні трубки і додають в них невелику кількість фуксину або метиленового синього. Трубки запаюють і кладуть між об'єктами, що стерилізуються. Про підтримку відповідної температури свідчить рівномірне забарвлення препарату в колір барвника в трубці після автоклавування.

Вибір режиму автоклавування визначається природою стерилізуемого субстрату:

- скляний посуд та металеві інструменти стерилізуються за 121 °С (1,0атм) протягом 1 години або за 126 °С (1,5 атм.) протягом 40 хв.;
- стерилізація живильних середовищ визначається їх складом. Субстрати, які легко руйнуються за високої температури – молоко, желатинові середовища, а також середовища, які містять вуглеводи, вітаміни і деякі амінокислоти – звичайно стерилізують за 0,5 – 0,8 атм. 30 хв. в попередньо простерилізованому посуді;
- м'ясо-пептонні середовища стерилізують за 1,0 атм. 20 - 30 хв.;
- ґрунт, який містить спороутворюючі бактерії, стерилізують за 2 атм.

Якщо окремі компоненти середовища не можна стерилізувати за одного режиму тиску та температури, то використовують метод *роздільної стерилізації*. Розчини компонентів середовища, простерилізовані різними способами, перед використанням стерильно об'єднують у потрібному співвідношенні.

Автоклав являє собою металевий двостінний резервуар, здатний витримувати високий тиск. За конструкцією лабораторні автоклави розрізняються на *такі, що розміщуються на підлозі та настільні*. За способом завантаження – на *горизонтальні і вертикальні*. За принципом управління – на *автоматичні і ручні*. Також вони розрізняються за обсягами завантаження і додатковими функціями (рис. 9.2).



а)



б)

Рис. 9.2. Види автоклавів: а – автоклав, що розміщуються на підлозі із вертикальним завантаженням; б – автоклав із горизонтальним завантаженням

Розміщувати предмети в автоклав слід не дуже щільно один до одного, щоб пара проходила між ними і нагрівала до потрібної температури. Після закінчення часу стерилізації автоклав слід відкривати тільки тоді, коли стрілка манометра встановиться на нулі. Передчасне відкриття крана автоклава неприпустимо. За різкого зниження тиску нагріті середовища, що знаходяться в колбах, закипають і змочують ватно-марлеві пробки. Це призводить до порушення стерильності матеріалу і неможливості подальшого їх використання. Для уникнення порушення техніки безпеки при роботі з автоклавом до його роботи допускаються тільки спеціально навчені працівники.

Стерилізація текучою парою, або тиндалізація використовується для стерилізації середовищ, які псуються під дією температур вище 100 °С. Цей метод був запропонований англійським вченим Джоном Тиндалем. Стерилізація здійснюється в автоклаві з незагвинченою кришкою в струмені насиченої пари. Обробку текучою парою проводять 3 рази.

Час прогріву відмічається з моменту енергійного виділення пари. У проміжках між 3-ма прогріваннями середовища вміщують у термостат (температура 28 – 30 °С) для пророщування спор бактерій, які можуть там знаходитись. Середовища, які не витримують нагрівання за 100 °С, прогрівають більш обережно за 60 – 80 °С 4 – 5 хвилин.

Пастеризація

Пастеризація (часткова стерилізація). Цей вид стерилізації був запропонований Луї Пастером. Він спрямований на знищення безспорових форм мікробів, переважно патогенних видів. Пастеризація у переважній більшості випадків не забезпечує стерильності субстрату, бо спори зберігають свою життєздатність.

Режим пастеризації визначається стійкістю матеріалу, який стерилізується, до термічної обробки. Звичайно пастеризацію у лабораторних умовах проводять за 60 – 75 °С від 15 – 30 хв. до 1 години, за 80 °С – 10 – 15 хв. Пастеризацію широко використовують у харчовій промисловості для обробки молока, соків, пива, вина та інших продуктів з метою звільнення їх від патогенних бактерій.

Холодна стерилізація

Холодна стерилізація використовується у тих випадках, коли речовина не витримує нагрівання. Холодна стерилізація включає хімічну обробку, фільтрування, використання іонізуючої радіації, ультразвуку, тощо.

Фільтрування, як метод стерилізації використовується у тих випадках, коли компоненти живильних середовищ, або інших рідких матеріалів руйнуються під дією високих температур. Фільтрація через бактеріальні фільтри застосовується також для відділення вірусів від бактерій; виділення форм бактерій, що фільтруються.

Промисловість різних країн випускає найрізноманітніші фільтри, які різняться за матеріалом виготовлення і діаметром пор. Як матеріал для виготовлення фільтрів використовують ацетат, нітроцелюлозу, азбест, фарфор (каоліну й кварцового піску), інфузорну землю (діатоміту або кізельгуру) та інші матеріали. На рис. 9.3 зображені свічки Шамберлана, які виготовляють з каоліну з домішкою кварцу шляхом їх випалювання і фільтри Зейтца, мають фільтрувальні пластини, виготовлені з суміші азбесту і клітковини.

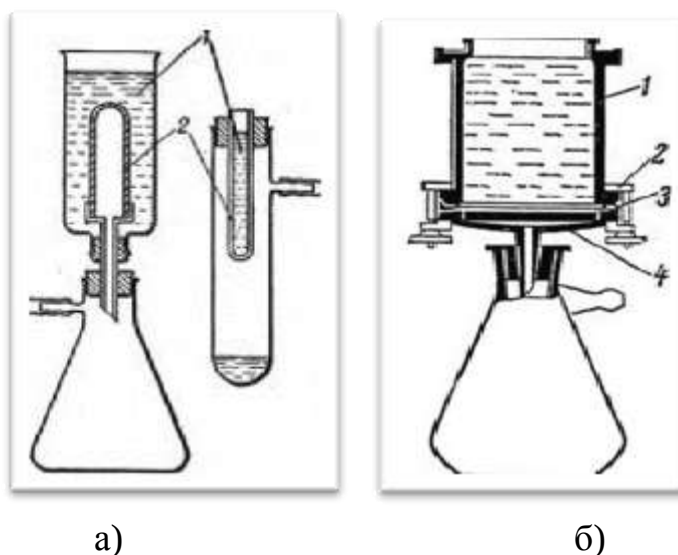


Рис. 9.3. Бактеріальні фільтри: а – свічка Шамберлана (схема): 1 – рідина, що фільтрується; 2 – фільтрувальна свічка. б – апарат Зейтца відкритого типу для фільтрації з розрідженням (схема): 1 – верхня циліндрична частина апарату; 2 – гвинти для збірки апарату і закріплення азбестового фільтра; 3 – азбестовий фільтр; 4 – нижня частина апарату

Для стерилізації рідких матеріалів частіше всього використовують фільтри, діаметр пор яких дорівнює 0,35 мкм.

Стерилізація іонізуючим випромінюванням (γ -промені). Іонізуюче випромінювання використовують для стерилізації предметів одноразового користування, які виготовлені з полімерних матеріалів: чашок Петрі, піпеток, систем переливання крові, шприців та інших тендітних і термолабільних виробів. Здійснюють цей вид стерилізації в спеціальних установках в умовах промислової стерилізації.

УФ-стерилізація. Джерелами УФ-випромінювання є ртутні кварцові (бактерицидні) лампи з довжиною хвилі 253,7 нм (рис. 9.4 а). Бактеріостатична дія УФ-стерилізації заснована на збігу спектра випромінювання лампи і спектра поглинання ДНК мікроорганізмів. При тривалій обробці випромінюванням гине основна частина мікроорганізмів, таких як бактерії і їхні спори, віруси, плісняві гриби і дріжджі.

Метод застосовується для стерилізації обладнання в боксах, а також для стерилізації дистильованої води і знезараження повітря і приміщень.



Рис. 9.4 Бактерицидна лампа (а) і корнцанги (б)

Хімічні методи стерилізації призначені для стерилізації виробів з гумових і полімерних матеріалів. Бактерицидними властивостями володіють фенол, спирти, перекис водню та інші речовини. Тривалість обробки матеріалів залежить від природи контамінантів.

Після стерилізації вироби двічі прополіскують у стерильній дистильованій воді та переносять стерильним затискачем (корнцангом (рис. 9.4 б)) у стерильний бокс.

Газовий метод здійснюється для стерилізації пластмасових виробів, ендоскопічних інструментів, апаратів для штучного кровообігу. Для стерилізації використовують пари формальдегіду, хлороформу, β -пропіолактону, а також озон, окис етилену, окис пропілену, метилбромід. Стерилізацію газом здійснюють в спеціальних камерах. Режим стерилізації визначається природою чинного фактора.

Виконання завдання

1. Виготовлення ватно-марлевих пробок.
2. Виготовлення скляних шпателів Дригальського.
3. Підготовка піпеток, пробірок, колб та чашок Петрі до стерилізації.

Матеріали та обладнання

Вата гігроскопічна, марля, нитки, голки, ножиці, скляні палички, піпетки, колби, чашки Петрі, металеві пінцети, папір, сірники, газовий пальник, мотузка, металеві бікси.

Контрольні питання:

1. Які бувають методи стерилізації?
2. Від чого залежить вибір метода стерилізації?
3. В яких випадках використовують стерилізацію у полум'ї, кип'ятінням і гарячим повітрям?
4. Які є застереження при стерилізації посуду в сушильній шафі?
5. Яким чином при автоклавуванні можна впевнитись в правильності дотримання температурного режиму?
6. Які наслідки передчасного відкриття крана при автоклавуванні, коли стрілка монOMETра ще не встановилася на нулі?
7. Назвіть режими стерилізації посуду і живильних середовищ при автоклавуванні.
8. В якому режимі стерилізують термолабільні живильні середовища?
9. Як поділяються автоклави за способом завантаження і за принципом управління?
10. Які температурні умови пастеризації? Де застосовується пастеризація?
11. Чим тиндалізація відрізняється від пастеризації?
12. За яких умов фільтрування використовується як метод стерилізації?
13. Що покладено в основу стерилізації УФ-випромінюванням?
14. В якому випадку використовуються хімічні та газові методи стерилізації?

Заняття 10. Харчування мікроорганізмів. Приготування живильних середовищ

Живлення є важливою функцією мікроорганізмів, яке необхідне для їх росту і розмноження. Для культивування бактерій застосовують стерильні живильні середовища, які містять у своєму складі усі необхідні поживні речовини і ростові фактори, мають відповідну реакцію рН, а також осмотичний тиск, що відповідає внутрішньоклітинному тиску мікробної клітини.

Основними компонентами будь-якого живильного середовища для культивування мікроорганізмів є джерела вуглецевого і азотного харчування. За потребами у **вуглеці** мікроорганізми прийнято ділити на *автотрофи* і *гетеротрофи*. Автотрофи як джерело вуглецю використовують вуглекислий газ, гетеротрофи користуються готовими органічними продуктами.

Основними джерелами **азотного** харчування є амонійні солі та нітрати. Деякі мікроорганізми здатні використовувати нітрити, які для більшості мікроорганізмів токсичні. Атмосферний азот, як джерело азоту здатна використовувати тільки невелика група азотфіксуючих мікроорганізмів.

Для нормального протікання метаболічних реакцій мікроорганізмам необхідні також інші макроелементи такі як S, яка використовується у вигляді молекулярної сірки або сірководню, а також P, K, Mg, Ca, Fe, що використовуються мікроорганізмами в складі солей.

Одні макроелементи входять до складу амінокислот, коферментів і вітамінів, молекул нуклеїнових і тейхоєвих кислот, АТФ і фосфоліпідів. Інші виконують функціональну роль при стабілізації ЦПМ и нуклеїнових кислот, відіграють роль під час спороутворення. Треті входять до складу гранул запасних поживних речовин (табл. 10.1). Макроелементи вносять у живильні середовища у вигляді солей у необхідній для кожного мікроорганізму кількості.

Важливу роль у обмінних процесах клітин мікроорганізмів відіграють і **мікроелементи** – Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Ni (табл. 10.1). Вони використовуються в складі живильних середовищ у невеликій кількості. Зазвичай потреба в мікроелементах компенсується за рахунок води та інших компонентів живильного середовища.

Багато мікроорганізмів потребують **факторів росту**, до яких належать *вітаміни, пурины, піримідини* і *деякі амінокислоти*. По відношенню до факторів росту мікроорганізми поділяють на – *прототрофи* і *ауксотрофи*.

Таблиця 10.1. Макро- і мікроелементи мікроорганізмів і їх головні функції

Елемент	Функції
Макроелементи	
S	Входить до складу деяких амінокислот, коферментів і вітамінів.
P	Компонент нуклеїнових кислот, тейхоєвих кислот, волютинових зерен, фосфоліпідів та ін.
K	Основний неорганічний катіон в клітині, кофактор деяких ферментів.
Mg	Стабілізує ДНК і мембрану, утворює комплекс з АТФ, є кофактором деяких ферментів.
Ca	Входить в структуру деяких ферментів, відіграє роль в процесі спороутворення, формує хелатний комплекс з дипіколиноювою кислотою.
Fe	Входить в структуру цитохромів, залізорпорфіринових ферментів, магнітосом. Є кофактором деяких ферментів.
Мікроелементи	
Zn, Mn, Na, Cl, Se, Mo, Co, Cu, W, Ni	Містяться в складі окремих ферментів.

Прототрофи можуть забезпечувати себе усіма необхідними факторами росту, тому не потребують додаткового введення цих речовин в живильне середовище. *Ауксотрофам* необхідна наявність в середовищі одного або декількох факторів росту, за якими вони проявляють ауксотрофність. Прикладами сумішей, що містять різні фактори росту, можуть служити дріжджовий екстракт, дріжджовий автолізат, а також кукурудзяний екстракт.

Для вирощування мікроорганізмів використовують живильні середовища, які відрізняються один від одного за *складом, консистенцією і призначенням*.

I. За складом живильні середовища діляться на натуральні, синтетичні та напівсинтетичні.

Натуральні середовища складаються з продуктів рослинного та тваринного походження. Це овочеві або фруктові соки, молоко, картопля або відвари та екстракти, отримані з природних субстратів. Прикладом натуральних середовищ є неохмелене пивне сусло, дріжджове середовище, ґрунтова витяжка та інші.

Синтетичні середовища готують з певних хімічно чистих сполук у точно вказаних концентраціях. Переваги синтетичних середовищ полягають у тому, що їх можна точно повторити. Прикладом синтетичних середовищ є середовище Чапека для цвілевих грибів і актиноміцетів, середовище Ешбі для азотофіксуючих мікроорганізмів та інші.

Напівсинтетичні середовища поряд зі сполуками відомого складу (вуглеводи, фосфати, нітрати) вміщують у себе речовини невизначеного складу – м'ясний відвар, дріжджовий екстракт.

II. За призначенням середовища поділяють на *універсальні* та *спеціальні*.

Універсальні або **загальнонавживані середовища** призначені для вирощування широкого кола мікроорганізмів. Це м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясо-пептонний агар (МПА).

Спеціальні середовища призначені для мікроорганізмів, які погано ростуть на універсальних середовищах. Серед спеціальних середовищ розрізняють *елективні* та *диференційно-діагностичні* середовища.

А. Елективні середовища або **селективні** забезпечують найбільш сприятливі умови для вирощування певних груп мікроорганізмів. Це середовище Чапека (для цвілевих грибів і актиноміцетів), середовище Врублевського, Кітт-Тароцці (для анаеробів), МПА з новобіюцином для сапрофітних стафілококів, стійких до новобіюцину, та інші.

Б. Диференційно-діагностичні середовища (індикаторні) дозволяють швидко відрізнити (диференціювати) один вид мікроорганізмів від інших. Диференційно-діагностичні середовища призначені для ідентифікації бактерій за біохімічними властивостями. В основі використання цих середовищ лежать відмінності в ферментативному складі бактерій і здатності ферментів розщеплювати той чи інший субстрат. Часто з цією метою до складу середовища вводять спеціальні барвники-індикатори, які забарвлюють колонії виявлених мікроорганізмів у певний колір. Прикладом цих середовищ є середовище Ендо до складу якого входить фуксин. Бактерії роду *Escherichia* на цьому середовищі утворюють малинові колонії з металевим блиском (рис.10.1).



Рис.10.1. Ріст *Escherichia coli* на середовищі Ендо

Існують середовища, які використовуються для визначення ферментативної активності бактерій. Так для гліколітичної активності (здатність розщеплювати певні цукри) використовують середовища Гісса, середовища Кліглера й ін. Протеолітичну активність бактерій вивчають на МПБ, середовищах з желатином. Гемолітична здатність бактерій (гемоліз еритроцитів) вивчається на кров'яному агарі тощо. На рис. 10.2 добре видно світлу зону гемолізу еритроцитів навколо колоній. Диференційно-діагностичні середовища особливо широко застосовуються для швидкої ідентифікації певних груп мікроорганізмів.

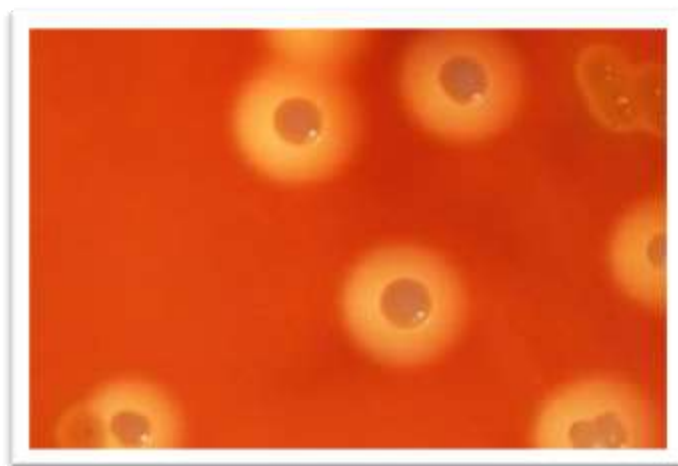


Рис.10.2. Ріст *Streptococcus pyogenes* на кров'яному агарі

III. За консистенцією середовища поділяються на *рідкі*, *щільні*, *напіврідкі* та *сипучі*

Рідкі середовища використовують для вивчення продуктів обміну мікроорганізмів, для виявлення їх фізіолого-біохімічних особливостей, накопичення біомаси.

Щільні середовища використовують для вивчення архітекtonіки колоній бактерій, отримання чистої культури мікроорганізмів, визначення ряду властивостей мікроорганізмів, накопичення біомаси і зберігання культур. Щільні живильні середовища готують з рідких шляхом додавання до них агар-агару, желатину, кремнекислого або поліакриламідного гелю.

Агар-агар – складний полісахарид, отриманий з бурих або червоних водоростей. Він утворює гель з точкою плавлення 96 – 100 °С і температурою застигання близько 40 °С. Як живильне середовище використовується небагатьма мікроорганізмами, тому є найкращою гелеутворюючою речовиною. Для отримання щільного середовища на основі агару необхідно додавати його в середовище в кількості 2 – 3 %.

Желатин – речовина білкової природи. Як ущільнювач середовищ використовується обмежено, бо розріджується за 23 - 25 °С і застигає за 20 °С. У більшості випадків використовується для виявлення протеолітичної активності мікроорганізмів.

Напіврідкі середовища отримують шляхом додавання до рідких середовищ 0,5 – 0,9 % агар-агару. Використовуються для вирощування деяких мікроорганізмів, наприклад аеротолерантних лактобактерій.

Сухі середовища іноді використовують у промисловій мікробіології в колекціях для збереження культур мікроорганізмів або їх спор. До таких середовищ відносять розварене пшоно, висівки, просочені поживним розчином.

В даний час промисловість випускає готові рідкі, щільні і сухі середовища (рис. 10.3).



Рис. 10.3. Живильні середовища для мікроорганізмів: а – агаризовані середовища, б – рідкі середовища, в – сухі суміші

Готові стерильні щільні середовища, на відміну від рідких, перед використанням необхідно розплавити і розлити в стерильний посуд, в якому будуть вирощувати мікроорганізми (чашки Петрі, пробірки, колби).

Сухі суміші для приготування середовищ вимагають приготування, яке включає:

- зважування на аналітичних вагах в кількості, яка визначена інструкцією;
- розчинення в дистильованій або водопровідній воді згідно пропису;
- варка на водяній бані зазначений час;
- встановлення рН з використанням індикаторних паперів;
- фільтрація через ватно-марлеві фільтри для щільних середовищ або великопористі паперові фільтри рідких середовищ (за необхідності);
- живильні середовища відразу після приготування розливають у посуд і віддають на стерилізацію. Режим і спосіб стерилізації визначається складом і консистенцією середовищ (табл. 10.2). Середовища, які стерилізують за 0,5 атм., розливають у попередньо простерилізований посуд.

Таблиця 10.2 Методи і режими стерилізації живильних середовищ

Середовища	Метод стерилізації	Режим стерилізації
1	2	3
Живильне середовище з ґрунтовою витяжкою	Автоклавування	(2 атм.) 40 хв.
Рідке та агаризоване середовище, яке не містить вуглеводів та інших речовин, що розкладаються за 120°C	Автоклавування	(1 атм.) 20 – 30 хв.
Рідке та агаризоване середовища, які містять вуглеводи, амінокислоти та інші термолабільні речовини, що розкладаються за 120°C	Автоклавування	(0,5 – 0,8 атм.) 15 – 30 хв.
Середовище або компоненти середовища, які не витримують нагрівання вище 100 °C	Дробова стерилізація	Текуча пара 3 рази по 15 – 20 хв. через добу

1	2	3
Середовище або компоненти середовища, які не витримують нагрівання	Фільтрування через бактеріальні фільтри	-
Стерилізація порошків і в'язких рідин (гліцерин, вазелінове масло)	Сушильна шафа	160 °С протягом 2 год. або 170 °С – 1 год.

Перед стерилізацією до кожної посудини з середовищем прикріплюють аркуш паперу з зазначенням назви середовища і дати його приготування.

Зберігають живильні середовища у прохолодному, захищеному від світла і вологі місці не більше 1 – 1,5 тижнів.

Виконання завдання

1. Приготувати та простерилізувати наступні живильні середовища:

1. М'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульон (МПБ) приготувати за заводським прописом.

2. Елективне середовище Чапека (г/л):

Глюкоза	– 20,0	FeSO ₄	– 0,1
NaNO ₃	– 2,0	CaCO ₃	– 3,0
K ₂ HPO ₄	– 1,0	агар-агар	– 20,0
MgSO ₄ та KCl	– 0,5	водопроводна вода	- 1 л

3. Диференціально-діагностичне середовище Ендо.

Диференціально-діагностичні середовища випускаються у вигляді сухих порошків. Для приготування цих середовищ 5 г порошку всипають у 100 мл холодної дистильованої води, нагрівають при ретельному перемішуванні до повного розчинення агару і кип'ятять 5 хвилин. Гаряче середовище слід фільтрувати через вату та знову довести до кипіння. Середовище охолоджують до 50 °С і розливають у стерильні чашки Петрі. Застигле середовище підсушують у термостаті. У склад сухого середовища Ендо входять: сухий агар, лактоза, фуксин, фосфорнокислий натрій та сульфат натрію.

4. Середовище Гісса.

При вивченні біохімічних властивостей мікробів можна використовувати напіврідкий строкатий ряд, який являє собою набір живильних середовищ з вуглеводами. Індикатором у таких середовищах

служить суміш водного блакитного (барвник) з розоловою кислотою (індикатор В/Р).

Середовища готують наступним чином: 2 граму порошку всипають у 100 мл холодної дистильованої води, нагрівають при помішуванні до повного розчинення агару. Приготовану суміш розливають у пробірки по 5 мл і стерилізують за 0,8 атм. протягом 20 хв. Рожево-сірий колір середовища при кислотоутворенні змінюється на синій.

5. Розчин глюкози (40% або 50%) – термолабільний вуглевод, який карамелізується за високих температур. Використовується як джерело вуглецевого живлення і енергії. Глюкоза стерилізується за 0,5 атм. 30 хв. Стерильний розчин глюкози вносять в термостабільні живильні середовища після їх стерилізації в потрібній відсоткової концентрації.

6. М'ясо-пептонний желатин – середовище готується на основі МПБ приготованого за заводським прописом з додаванням желатину в концентрації 100 г/л.

2. Здійснити розрахунки необхідної дози концентрованих розчинів термолабільних речовин у готові живильні середовища за запропонованим викладачем завдання.

Приклад розрахунку внесення 50% глюкози.

Умова:

Розрахувати скільки 50% розчину глюкози необхідно додати в 300 мл МПБ, якщо відомо, що кількість глюкози в МПБ згідно пропису має становити 2%.

Дано:

C_1 (глюкози) = 50%

V_2 (МПБ) = 300 мл

C_2 (глюкози) = 2%

Розв'язок

2 г (глюкози) – 100 мл води

x_2 г (глюкози) – 300 мл МПБ

$x_2 = (2 \cdot 300) / 100 = 6$ г

6 г (глюкози) – у мл

Знайти:

50 г (глюкози) – 100 мл води

V_2 (глюкози)?

$y = (6 \cdot 100) / 50 = 12$ мл (50% розчину глюкози)

Відповідь: Потрібно додати 12 мл 50% розчину глюкози до 300 мл МПБ, щоб отримати 2% глюкози в МПБ.

Обладнання та реактиви

Колби з пробками, середовища МПА та МПБ, Ендо, Гісса, реактиви: глюкоза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , KCl , FeSO_4 , CaCO_3 , агар-агар, желатин, мірні

циліндри, ваги з важками (гирками), газовий пальник, водяна баня, сірники, папір.

Контрольні питання:

1. За якими ознаками мікроорганізми поділяються на автотрофи і гетеротрофи?
2. Які речовини використовуються мікроорганізмами як джерела азотного харчування? Які з них найлегше і найважче метаболізуються мікроорганізмами?
3. Які речовини можуть бути факторами росту?
4. Які переваги і недоліки натуральних і синтетичних середовищ? Наведіть приклади.
5. Проаналізуйте відмінності і напрямки застосування елективних і диференційно-діагностичних середовищ. Наведіть приклади.
6. Порівняйте властивості, переваги і недоліки згущувачів щільних середовищ агар-агару і желатину.
7. З якою метою використовуються рідкі, щільні, напіврідкі та сипучі середовища?
8. З якою метою використовують барвники у складі середовищ Ендо і Гісса?
9. За якого режиму стерилізують термолабільні середовища?
10. Скласти блок-схему приготування сухих живильних середовищ.
11. Розрахувати: скільки 50% розчину глюкози необхідно додати в 500 мл МПБ, якщо відомо, що згідно пропису кількість глюкози в МПБ має становити 2%.
12. Розрахувати: скільки 40% розчину сахарози необхідно додати в 400мл МПА, якщо відомо, що кількість сахарози в середовищі має становити 30г/л.

Заняття 11 - 12. Культивування мікроорганізмів

Бактерії використовують **голофітний** і **осмотрофний** типи харчування. Голофітний тип харчування пов'язаний з транспортом поживних речовин всередину клітини через всю клітинну поверхню. Осмотрофний спосіб є різновидом голофітного типу, але з попереднім виділенням з клітки травних ферментів і розщепленням високомолекулярних поживних речовин до низькомолекулярних. У грамнегативних мікроорганізмів ферментативне розщеплення поживних речовин здійснюється також і в периплазматичному просторі клітинної стінки, що також є позаклітинним травленням. Остаточне ферментативне розщеплення у мікроорганізмів здійснюється в середині клітини.

Для життєзабезпечення мікроорганізмів необхідні вода, макроеlementи, мікроelementи і фактори росту. Розвиток мікроорганізмів можливий тільки на середовищах збалансованого складу за оптимальних умов культивування (аерація, кислотність, температура, вологість, тривалість та ін.), які для різних груп мікроорганізмів встановлюються експериментальним шляхом.

Лабораторне культивування мікроорганізмів здійснюється в чашках Петрі, пробірках, колбах або матрацах, у виробничих масштабах використовують ферментери (рис.11.1 та 11.2).



а



б



в



г

Рис. 11.1. Культивування мікроорганізмів: а – в чашках Петрі, б – колбах, в – пробірки зі скошеним агаром, г – матраци з агаром



Рис. 11.2. Культивування мікроорганізмів в ферментерах

І. Методи розливу живильних середовищ

Щільні живильні середовища перед розливом розплавляють на водяній бані та охолоджують до температури 50 – 60 °С. До середовищ, відповідно пропису, додають термолабільні речовини, простерилізовані за більш м'якого режиму.

Живильні середовища розливають безпосередньо з колб і пляшок або за допомогою піпеток. Для забезпечення стерильності розлив середовищ проводять біля полум'я пальника в радіусі не більше 10 – 15 см від його центру.

При розливі середовища **у чашки Петрі** посудину з середовищем беруть у праву руку і, тримаючи її біля вогню, лівою рукою виймають пробку, затиснувши її мізинцем. Обпалюють горлечко посудини і, злегка відкривши лівою рукою кришку чашки, вводять під неї горлечко, не торкаючись до краю чашки. У кожную чашку наливають 15 – 20 мл середовища (шаром 2 – 3 мм), розподіляючи середовище рівномірно по дну чашки. Чашки закривають і поміщають на рівну поверхню столу. Після застигання середовища чашки Петрі перевертають дном доверху й поміщають на добу в термостат.

У пробірки розливають середовища по 3 – 5 мл або по 10 мл. Для приготування скошеного агару пробірки зі стерильним розплавленим агаровим середовищем укладають у нахиленому положенні, приблизно під кутом 20°, щоб середовище не заходило за 2/3 висоти пробірки, інакше воно може змочити пробку (рис. 11.3). Після того, як середовище застигне, пробірки ставлять вертикально та дають стекти конденсату.

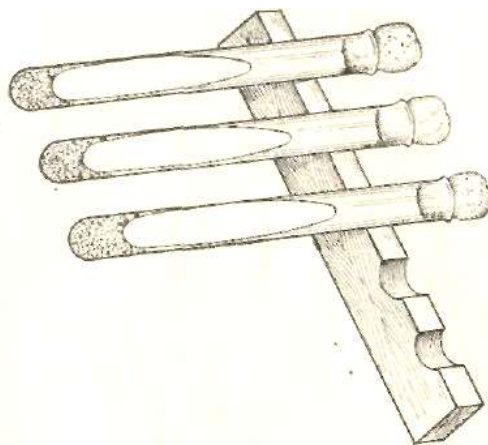


Рис. 11.3. Приготування скошеного агарового середовища у пробірках

У **колби, матраці та пляшки** середовища розливають на 1/3 або на 2/3 їх ємності в залежності від його призначення.

Розлите в посуд стерильне середовище для перевірки стерильності розливу встановлюють в термостат і витримують не менше 12 годин за температури 37°C. Середовище, в якому є ріст мікроорганізмів відбраковують, решта – використовується для посіву.

II. Методи посіву мікроорганізмів

У залежності від характеру посівного матеріалу та середовищ існують різні методи посіву. Усі вони переслідують одну мету: посіяти матеріал таким чином, щоб з оточуючого середовища у нього не потрапили сторонні мікроорганізми. Тому під час посіву не можна робити різких рухів та розмовляти. Найкраще проводити посіви у спеціальних приміщеннях – боксах.

Посів з пробірки в пробірку. Пробірку з посівним матеріалом і пробірку з середовищем тримають трохи нахилено у лівій руці між великим і вказівним пальцями так, щоб краї пробірок були на одному рівні, а їх основи знаходилися поверх кисті. Петлю вертикально фламбують, тримаючи правою рукою, у полум'ї пальника. Пробки з пробірок виймають правою рукою, затискаючи їх між мізинцем і долонею.

Вийнявши пробки, обпалюють краї пробірок у полум'ї пальника. Прожарену петлю вводять через полум'я пальника у пробірку з посівним матеріалом, охолоджують і, набравши невелику кількість посівного матеріалу, обережно переносять його у пробірку з середовищем.

При посіві на рідке середовище петлю злегка занурюють у рідину та розтирають посівний матеріал по стінці пробірки, після чого змивають його середовищем. При посіві на скошений агар матеріал розтирають по поверхні

середовища зигзагоподібними рухами з середини на зовні, починаючи від межі конденсаційної води.

Якщо посів проводиться на агарові або желатинові середовища, розлиті у пробірки стовпчиком, то петлею з посівним матеріалом проколюють стовпчик до дна, проводять так званий посів уколом. Після посіву петлю виймають з пробірки, краї пробірок обпалюють і, провівши пробки через полум'я пальника, пробірки закривають, а петлю прожарюють (рис. 11.4).

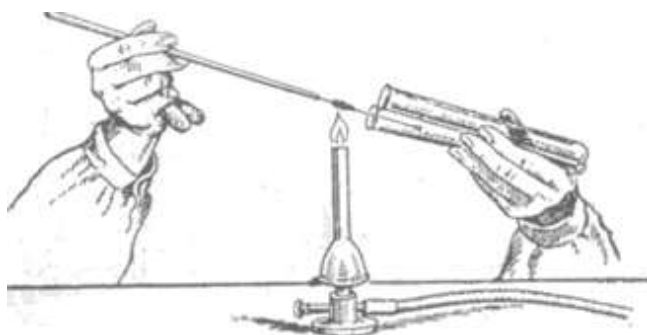


Рис. 11.4. Посів уколом

Посів рідкого матеріалу можна проводити стерильними пастерівськими або градуйованими піпетками. Крім того, для посіву можна використовувати тампон з досліджуваним матеріалом. При посіві на рідкі середовища тампон занурюють у середовище та декілька секунд ополіскують у ньому.

Пересів на пробірки з чашки Петрі. Великим та вказівним пальцями лівої руки злегка відкривають кришку та вводять під неї прожарену петлю. Набравши посівний матеріал, петлю виймають з чашки і закривають її (рис. 11.5). У ліву руку беруть пробірку з середовищем. Посів проводять так само, як з пробірки в пробірку штрихами, використовуючи всю поверхню середовища у пробірці.

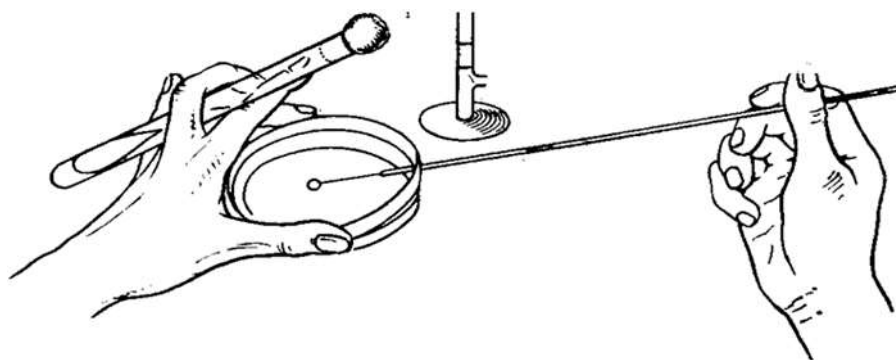


Рис. 11.5. Посів на пробірки з чашки Петрі

Посів шпателем на чашки Петрі з агаром. Піпеткою, петлею або скляною паличкою наносять на поверхню середовища посівний матеріал і ретельно втирають його круговими рухами шпателя доти, доки шпатель не перестане вільно ковзати по поверхні агара (рис. 11.6). Лівою рукою при цьому притримують кришку та одночасно обертають чашку. Після закінчення посіву скляний шпатель опускають у дезінфікуючий розчин, а металевий – прожарюють у полум'ї пальника. Засіяну чашку перевертають дном доверху.

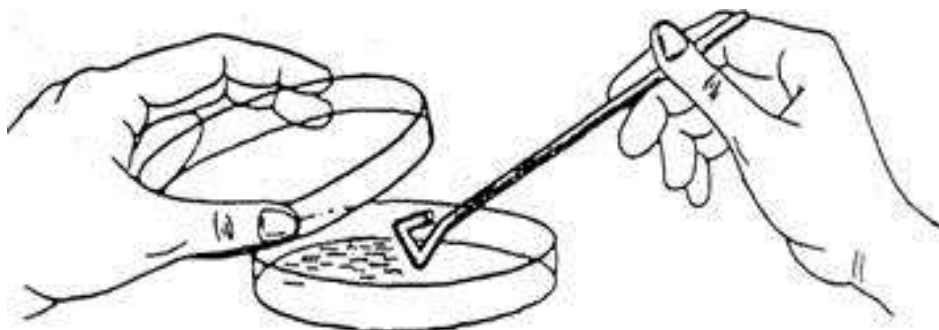


Рис. 11.6. Посів шпателем

Посів петлею на чашки Петрі з агаром. Невелику кількість посівного матеріалу зигзагоподібними рухами розподіляють по всій поверхні чашки Петрі (рис. 11.5). Після закінчення посіву закривають чашку та пропалюють петлю. Засіяну чашку перевертають дном доверху.

Посів на сектори. Чашку зі сторони дна розкреслюють на сектори. Посів проводять зигзагоподібними рухами від краю чашки до центру. При цьому необхідно слідкувати, щоб штрихи не заходили на сусідній сектор. Чашку закривають та перевертають дном доверху (рис. 11.7, б). Промисловість випускає також готові 3-х і 4-х секційні чашки Петрі.



Рис. 11.7. Посів на сектори: а – чашка Петрі з поділом на сектори, б – посів культур на сектори

Посів на агарові середовища тампоном. Злегка відкривши кришку, вносять у чашку тампон та рухами по колу втирають його вміст у поверхню середовища, обертаючи при цьому тампон і чашку. Засіяну чашку закривають і перевертають дном доверху (рис. 11.8).

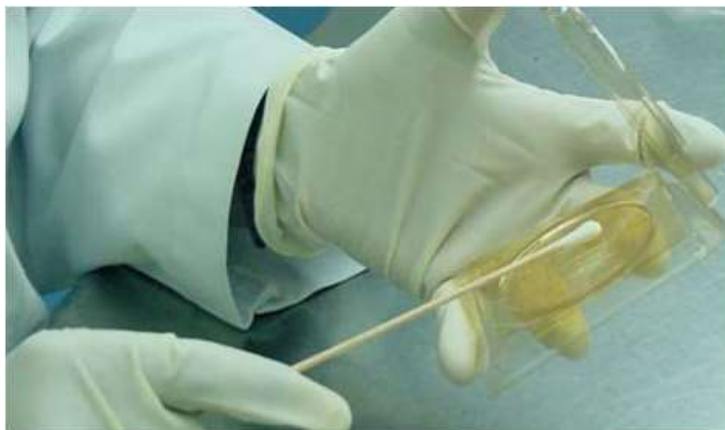


Рис. 11.8. Посів тампоном

Посів в товщу щільного середовища. Культуру, вирощену в рідкому середовищі, або суспензію мікроорганізмів вносять піпеткою в склянку з розтопленим та охолодженим до 45 °С агаровим середовищем, перемішують та виливають у стерильну чашку Петрі. Після застигання агару чашки перевертають дном доверху.

Для посіву в товщу агару можна також внести посівний матеріал у порожню стерильну чашку Петрі та залити 15 - 20 мл охолодженого до 45 °С агарового середовища. Для перемішування вмісту чашки її злегка похитують або обертають. Після застигання середовища чашку повертають дном доверху.

Посів у флакони, колби, матраци та пляшки проводять приблизно так само, як в пробірки, тільки спочатку набирають посівний матеріал, а потім відкривають пробку в посудині з середовищем. Після посіву чашки, флакони підписують: пробірки – у верхній частині, чашки – зі сторони дна.

Посів на агарові середовища газоном. Приблизно 1 мл рідкої культури (якщо культура вирощена на щільному середовищі її емульгують у фізіологічному розчині або бульйоні) наносять піпеткою на поверхню агару та ретельно розподіляють рідину по поверхні середовища (рис. 11.9). Чашку злегка нахиляють і піпеткою відсмоктують надлишок культури і виливають його у дезінфекційний розчин. Після закінчення роботи піпетку занурюють у дезінфекційний розчин.



Рис. 11.9. Чашка Петри, засіяна газоном з дисками з антибіотиками

Засіяні середовища розміщують в умови, які забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів. До таких умов відносяться температурний режим, аерація, значення рН середовища, освітленість та інші фактори.

Вирощування мікроорганізмів проводять в термостатах або термостатованих кімнатах, у яких підтримується відповідна температура.

Більшість мікроорганізмів належать до *мезофілів*, які розвиваються за оптимальної температури 25 – 37 °С. Нижня межа температури для них складає +20 °С, а верхня досягає 38 – 45 °С.

Існує група холодолюбних мікроорганізмів – *психрофілів*, які розвиваються у межах від – 20 до +20 °С.

Для теплолюбних організмів – *термофілів* – оптимальною температурою є температура 45 – 65 °С. Деякі з них витримують нагрівання до 90 °С.

Бактерії відносяться до вологолюбних мікроорганізмів. При вмісті вільної води в живильному середовищі менше 20 % зростання бактерій припиняється. Тому тривале зберігання культур на щільних середовищах як за кімнатної температури, так і в холодильнику небажано, бо це приводить до підсихання середовища та загибелі мікроорганізмів.

Більшість мікроорганізмів не потребує освітлення при культивуванні. Світло необхідно при вирощуванні фототрофних мікроорганізмів, які використовують енергію світла в процесах обміну речовин. Фототрофні мікроорганізми зазвичай вирощуються у фотобіореакторах, де використовуються штучні джерела освітлення: лампи розжарювання, металогалогенні, люмінесцентні та інші.

Тривалість зростання всіх мікроорганізмів залежить від їх виду, складу середовища та умов культивування. Більшість бактерій за оптимальних умов культивується за температури 37 °С ростуть протягом 18 – 24 годин. Актиноміцети за температури 28 – 30 °С ростуть 3 – 5 діб. Еукаріотичні мікроорганізми – дріжджі ростуть протягом двох діб за температури 28 – 30 °С.

Культивування анаеробних мікроорганізмів

При вирощуванні анаеробних мікроорганізмів вплив кисню повинно бути виключено або зведено до мінімуму. Вирощування анаеробів в лабораторних умовах здійснюється як на рідких, так й на щільних середовищах.

Вирощування у високому шарі середовища. Рідкі середовища наливають в пробірки або колби високим шаром. Перед посівом середовище кип'ятять або прогрівають на киплячій водяній бані 30 – 40 хв. для видалення розчиненого кисню. Відразу після охолодження середовища засівають мікроорганізмами.

Вирощування в товщі щільного середовища. Посівний матеріал вносять у пробірки з розплавленим і охолодженим агаровим середовищем, ретельно перемішують. Для обмеження доступу кисню поверхню середовища заливають парафіном.

Вирощування в анаеростатах. Анаеростати – вакуумні металеві або скляні камери, забезпечені манометром. З анаеростату насосом відкачують повітря. У деяких випадках заповнюють анаеростат газовою сумішшю, що складається з азоту і вуглекислоти до тиску 0,5 – 0,7 атм. Надмірний тиск виключає можливість дифузії кисню (рис. 11.10).



Рис. 11.10. Анаеростат

Виконання завдання

1. Опанувати техніку розливу живильних середовищ у колби, чашки Петрі, пробірки.
2. Опанувати основні методи посіву мікроорганізмів
 - у чашки Петрі бактеріологічною петлею;
 - шпателем на чашки Петрі;
 - на сектори на чашки Петрі;
 - тампоном на чашки Петрі;
 - у пробірки зі щільним живильним середовищем;
 - у пробірки піпеткою в рідке живильне середовище.

Матеріали та обладнання

МПА в колбах, МПБ в колбах, середовище Чапека, стерильні чашки Петрі, пробірки, піпетки, бактеріологічні петлі, культури мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, сірники, спирт, шпателі, тампони, газовий пальник.

Контрольні питання:

1. Який тип харчування притаманний для мікроорганізмів?
2. Де здійснюється ферментативне розщеплення поживних речовин у грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів?
3. Проаналізуйте особливості розливу живильних середовищ в пробірки.
4. З якою метою розлите в посуд стерильне середовище встановлюють в термостат?
5. Як забезпечується стерильність під час посіву?
6. Чому після розливу живильного середовища і посіву в чашки Петрі їх перевертають дном доверху?
7. За допомогою яких інструментів і посуду здійснюють посів?
8. Скласти блок-схему для двох найбільш складних для Вас способів посіву.
9. Чому в пробірки, колби, матраці і пляшки наливають 1/3 або 2/3 об'єму живильного середовища?
10. Наведіть температурні межі росту мезофілів, психрофілів, термофілів.
11. Які методи використовуються для культивування анаеробних мікроорганізмів у лабораторних умовах?
12. Чим відрізняється вирощування аеробних мікроорганізмів від анаеробних?
13. Від яких факторів залежить тривалість росту мікроорганізмів на живильних середовищах?
14. Які мікроорганізми потребують освітлення при культивуванні?
15. З якою метою розлите в посуд стерильне середовище витримують у термостаті не менше 12 годин?

Заняття 13. Виділення чистих культур мікроорганізмів

Вивчення властивостей мікроорганізмів можливе тільки за використання чистих культур. **Чистою культурою** називають культуру одного виду мікроорганізмів, які мають однакові морфологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні та інші ознаки характерні для виду.

Виділення чистої культури мікроорганізмів здійснюється в три етапи:

1. отримання накопичувальної культури;
2. виділення чистої культури;
3. визначення чистоти виділеної культури.

Отримання накопичувальної культури

Накопичувальними називаються культури, у яких переважають представники одного виду мікроорганізмів. Кращим матеріалом для отримання накопичувальних культур є зразки, отримані з природних осередків мешкання мікроорганізмів, які необхідно виділити. Це може бути ґрунт, водойма, повітря, хвора людина тощо.

Для виділення накопичувальної культури необхідно створити елективні умови, які забезпечують сприятливі умови розвитку мікроорганізмів, що виділяються. Враховуючи, що різні мікроорганізми мають неоднакові харчові потреби, найчастіше елективні умови створюють шляхом підбору *живильних середовищ*.

Важливими факторами, що впливають на отримання накопичувальної культури, є також умови культивування: *температура, рН середовища, наявність або відсутність O_2* , внесення у середовище антибіотиків. Так, культивування мікроорганізмів за температури 45 - 75 °С забезпечує ріст термофілів. Збільшення кислотності середовища гальмує ріст бактерій і створює умови для росту дріжджів і міцеліальних грибів. Пеніцилін пригнічує ріст G^+ мікроорганізмів, що є важливим для виділення G^- бактерій. Ністатин пригнічує розмноження дріжджів, але не спричиняє впливу на бактерії.

Для отримання накопичувальної культури з природних зразків роблять висіви на елективні середовища в чашки Петрі або пробірки на скошений агар. Накопичувальну культуру вирощують у термостаті. Температура і тривалість її культивування визначається властивостями мікроорганізму, що виділяється. По закінченні культивування накопичувальну культуру мікроскопують для підтвердження присутності мікроорганізмів.

Виділення чистої культури

Чисті культури мікроорганізмів отримують з накопичувальної культури різними методами. Загальним принципом цих методів є те, що чисту культуру виділяють з окремої колонії, яка є потомством однієї клітини, або *клоном*.

Метод виснажувального штриха (посів петлею штрихом)

Існує багато модифікацій методів виділення чистих культур шляхом посіву штрихом в чашки Петрі, але тільки деякі з них майже завжди дозволяють отримати ізольовані колонії навіть за відсутності навичок у експериментатора.

Метод односекторного посіву. За цього метода посіву розведена накопичувальна культура петлею ретельно розтирається частими штрихами, що не перетинаються, спочатку на 1/3 чашки Петрі, а потім штриховими рухами з відстанню 0,5 см петлею робиться посів на її поверхні, яка залишилась. Посів можливо продовжити за необхідності на другій чашці Петрі. За такого способу посіву матеріал, що знаходиться на петлі, використовується поступово, і за лініями, нанесеним у кінці посіву, виростають ізольовані колонії мікроорганізмів (рис. 13.1).



Рис. 13.1. Односекторний посів штрихом

Працюючи з анаеробами, чашковий штриховий посів слід проводити на середовищах, які отримані протягом перших 4 годин після їх автоклавування, щоб уникнути накопичення розчиненого в них кисню. Після посіву «штриховані чашки» з анаеробною культурою інкубують в анаеростаті.

Метод 3-х секторного посіву. Цей метод передбачає посів мікроорганізмів на чашках Петрі по секторах.

Із зовнішнього боку чашки Петрі денце ділять маркером на три сегмента Т-подібної форми, як показано на рисунку 13.2 а.

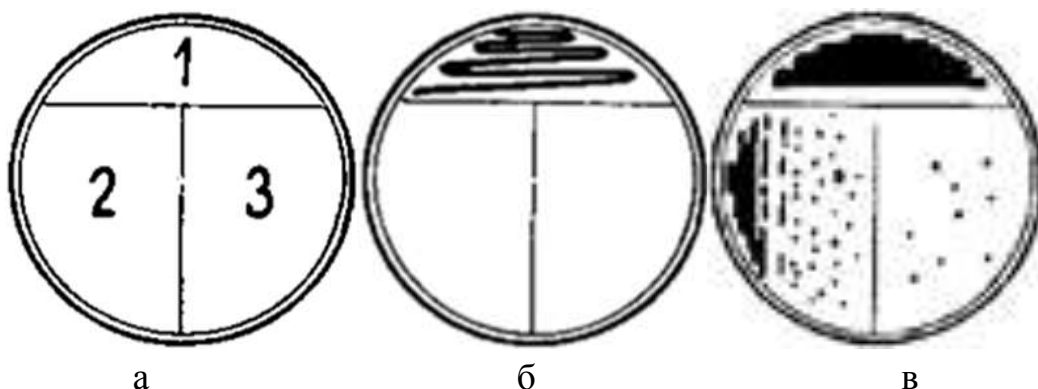


Рис. 13.2. Схема метода виснажувального штриха

З накопичувальної культури, отриманої на першому етапі, роблять суспензію в пробірці зі стерильною водопровідною водою. Дотримуючись умов стерильності, петлею набирають отриману суспензію і, не виймаючи петлю з пробірки, струшують з неї зайву кількість рідини. Пробірку закривають і ставлять у штатив.

Трохи відкривають кришку чашки Петрі і здійснюють петлею посів штрихами, що не перетинаються, в першому секторі (рис. 13.2 б). Після нанесення штриха кришку чашки закривають. Всі маніпуляції здійснюють із дотриманням асептичних умов.

Після посіву в першому секторі петлю прожарюють і охолоджують протягом 10 – 15 с. Не пошкоджуючи поверхню середовища, петлею легкими рухами захоплюють невелику область посіву першого сектора і здійснюють посів паралельними штрихами на відстані 0,5 см один від одного у другому секторі. Петлю знову прожарюють, охолоджують і здійснюють аналогічний посів штриховим методом у третьому секторі. Основна задача метода виснаженого штриха зниження концентрації мікроорганізмів по лінії посіву і отримання ізольованих колоній (рис. 13.2 в).

Після посіву чашки Петрі поміщають у термостат дном доверху. Це необхідно для того, щоб конденсат з кришки чашки не потрапив на поверхню агара і не розмив колонії.

Облік результатів для більшості мікроорганізмів здійснюють через добу. Якщо вирощують культуру, що росте повільно, то облік результатів здійснюють через час, який необхідний для проростання її колоній. При правильному посіві в 1 секторі виростає значна кількість колоній, або відмічається суцільний ріст культури. В секторах 2 і 3 з'являються окремі добре ізольовані колонії.

При виділенні чистої культури методом виснажувального штриха можливо аналогічно використовувати **4-ох секторний** посів, за схемою зазначеною на рисунку 13.3.

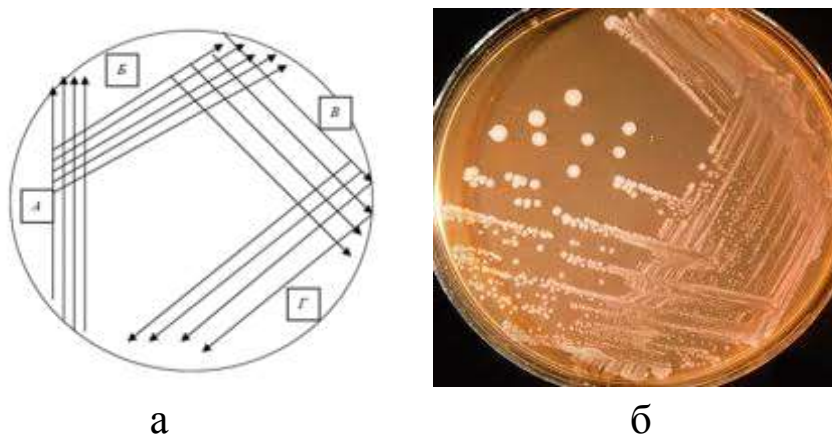


Рис. 13.3. Використання 4-х секторів чашки Петрі для виділення чистих культур: а – схема посіву, б – облік результатів

Метод Дригальского (посів шпателем)

Ізольовані колонії можливо отримати з використанням шпателя за методом Дригальского.

Для посіву шпателем обережно відкривають кришку чашки Петрі, дотримуючись правил стерильності, і на поверхню щільного живильного середовища наносять краплину накопичувальної культури, попередньо розведеної в стерильній воді. Краплину ретельно розподіляють шпателем по всій поверхні середовища в чашці Петрі. Цим же самим шпателем виконують посів послідовно на другій і третій чашках Петрі.

Після закінчення посіву шпатель занурюють у дезінфекційний розчин або у розчин спирту і прожарюють у полум'ї пальника. Чашки підписують і вміщують у термостат дном доверху. Звичайно в першій чашці Петрі після інкубації спостерігається “суцільний” ріст мікроорганізмів, а у двох наступних у результаті зменшення концентрації клітин на шпателі утворюються ізольовані одна від одної колонії.

Метод Коха (розсів у глибині середовища)

Метод передбачає отримання ізольованих колоній у товщі агарового середовища. Для цього 3 пробірки, які містять по 15 мл МПА, розплавляють на водяній бані й охолоджують до температури 43 – 45 °С. В першу пробірку вносять одну бактеріальну петлю накопичувальної культури, попередньо

розведеної на стерильній воді. Засіяну пробірку ретельно перемішують, обертаючи її декілька разів між долонями. Прожареною і охолодженою петлею вміст 1-й пробірки переносять у 2-у і, таким же чином, з 2-ї в 3-ю пробірки.

Приготовані розведення мікроорганізмів виливають з пробірок у стерильні чашки Петрі. Чашки підписують, зазначаючи номер пробірок з розведеннями культури. Після застигання середовища засіяні чашки перегортають дном доверху і поміщають в термостат. Після культивування, відбирають ізольовані колонії, які виросли всередині агарової пластини.

Виконання завдання

1. Приготувати мазок за Грамом накопичувальної культури (завіса *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus*).
2. Для отримання ізольованих колоній *E. coli* та *S. aureus* одним з методів виснажувального штриха зробити посів накопичувальної культури на чашки Петрі.
3. Чашки Петрі поставити у термостат на добу. Температура культивування 37 °C.
4. Облік результатів здійснюється на занятті 14.

Матеріали та обладнання

Мікроскоп, фуксин, фільтрувальний папір, просочений розчином генціанвіолету, розчин Люголю, імерсійна олія, пробірки зі стерильною водопровідною водою, бактеріологічні петлі, суспензії добових культур *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus*, сірники, газовий пальник, фільтрувальний папір, чашки Петрі з МПА.

Контрольні питання:

1. Дайте поняття терміну «чиста культура мікроорганізмів».
2. Які існують способи виділення чистих культур?
3. Що таке клон клітин та чому його можна вважати чисто культурою?
4. Які особливості отримання чистої культури аеробів та анаеробів?
5. Скласти повну блок-схему виділення чистих культур.

Заняття 14. Виділення чистої культури аеробних мікроорганізмів. Частина 2. Вивчення морфолого-цитологічних ознак культури

Вивчення властивостей чистих культур мікроорганізмів і подальшу їх ідентифікацію проводять на основі вивчення їхніх морфолого-цитологічних, культуральних, біохімічних, генетичних, серологічних та інших ознак.

Морфолого-цитологічні ознаки вивчаються на основі мікроскопічних методів дослідження.

На фіксованих препаратах визначається розмір клітин бактерій, їх форму і взаємне розташування.

З використанням складних методів фарбування препаратів досліджується наявність капсул, джгутиків, природа включень, здатність клітин до спороутворення. У забарвленні за Грамом визначають тип будови клітинної стінки.

З використанням препаратів живих культур визначають здатність клітин до руху, фототаксису й ін.

До **культуральних** або макроморфологічних властивостей відносяться характерні особливості росту мікроорганізмів на щільних, напіврідких і рідких живильних середовищах.

При посіві на *щільні середовища* вивчаються властивості колоній. **Колонії** – це ізольовані скупчення клітин одного виду, які вирости в більшості випадків з однієї клітини. Вивчаються розміри колонії, її форма, пігментація, густина росту й інші властивості.

При рості культури на *рідких середовищах* враховується характер росту мікроорганізмів (поверхневий, придонний, плівкоутворювальний тощо), ступінь і характер помутніння бульйону. В пробірках на щільних середовищах визначають характер росту по лінії уколу (ріст поверхневий, глибинний або вдовж лінії посіву).

Біохімічна активність вивчається з використанням *диференційно діагностичних середовищ*. Визначається здатність бактерій виділяти окремі групи ферментів і розщеплювати білки, жири, вуглеводи, а також можливість відновлювати або окиснювати різні сполуки. Визначають відношення мікроорганізмів до кисню, вуглекислоти тощо.

Антагонізм мікроорганізмів визначається методом відстроченого антагонізму при використанні тест-мікроорганізмів щодо яких досліджується антагонізм.

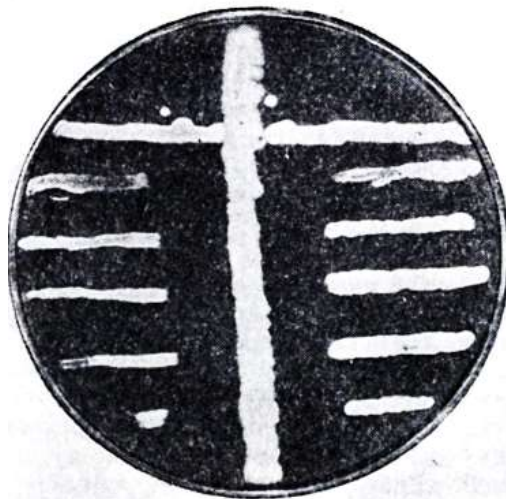


Рис.14.1. Пригнічення росту тест-культур (горизонтальні лінії посіву) продуктами метаболізму досліджуваної культури (культура в центрі)

Антигенну структуру мікроорганізмів вивчають в серологічних реакціях – аглютинації, преципітації, зв'язування комплементу та ін.

Здатність бактерій продукувати **бактеріюцини** визначають на основі методу фаготипування.

Патогенність вивчають на лабораторних тваринах.

На підставі вивчення всіх властивостей, використовуючи визначники мікроорганізмів, встановлюють приналежність мікроорганізму до родини, роду і виду.

Виконання завдання

Для вивчення виділених на минулому занятті чистих культур мікроорганізмів виймають їх посіви з термостата. Чашки Петрі повертають дном до себе і розглядають колонії *у прохідному світлі*. При наявності двох різних видів ізольованих колоній їх нумерують і вивчають культуральні та морфолого-цитологічні ознаки бактерій.

1. Вивчення культуральних ознак. Оскільки посів мікроорганізмів проводився на МПА, вивчається ріст мікроорганізмів на щільному живильному середовищі. Обрані колонії уважно розглядають і в протоколі відмічають такі дані:

- **розмір колоній** (велика, 4 – 5 мм і більше, середня, 2 – 4 мм, дрібна, 1 – 2 мм, карликова, менше 1 мм);
- **форму обрисів колоній** (кругла, неправильної форми, амебоїдна, ризоїдна, міцеліальна та інші (рис. 14.2);
- **оптичні властивості** (прозора, напівпрозора, непрозора).

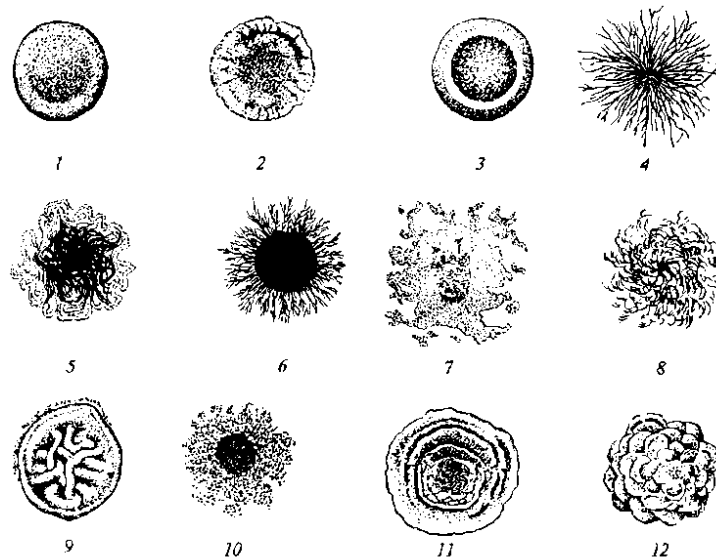


Рис. 14.2 Форма колоній: 1 – колоподібна, 2 – колоподібна с фістончатим краєм, 3 – колоподібна з валком по краю, 4,5,6 – ризоїдні, 7 – амебоїдна, 8 – ниткоподібна, 9 – складчаста, 10 – неправильна, 11 – концентрична, 12 – складна.

- У відбитому світлі з боку кришки розглядають колонії, відмічають:
- **колір колоній** та субстрату під колоніями (безбарвна, колір пігменту – білий, сіро-білий, жовтий, лимонний, оранжевий інші) рис. 14.3;
 - **поверхню колоній** (гладка, блискуча, матова, зморшкувата, суха);
 - **профіль колоній** (рис. 14.4) (плаский, випуклий, кратероподібний, конусоподібний).

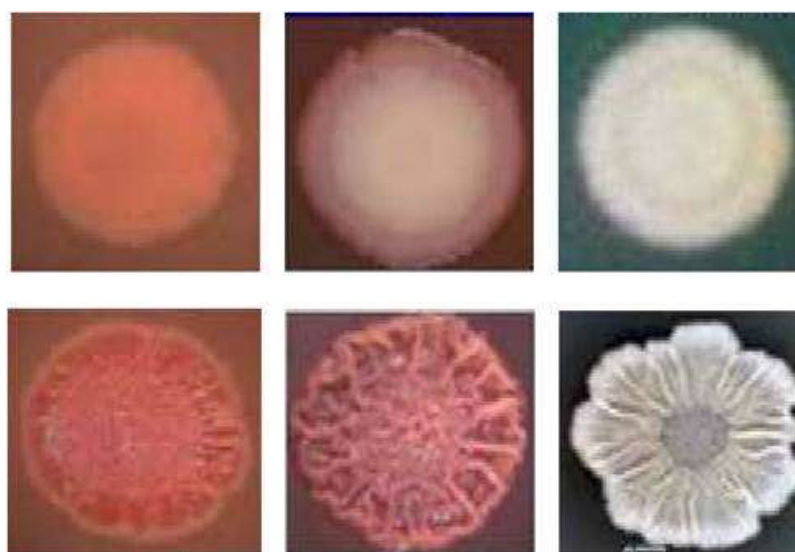


Рис. 14.3. Колір колоній <https://lifelib.info/microbiology/basics/10.html>

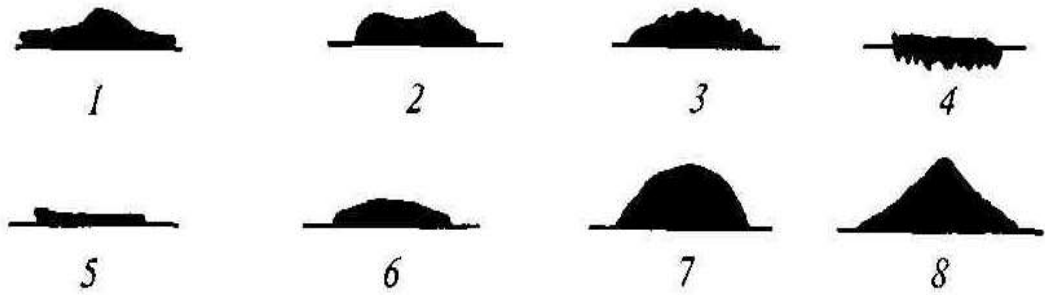


Рис. 14.4. Профіль колонії: 1 – вигнутий, 2 – кратероподібний, 3 – бугристий, 4 – такий, що вростає в субстрат, 5 – плоский, 6 – опуклий, 7 – краплеподібний, 8 – конусоподібний

При малому збільшенні мікроскопа вивчають структуру та краї колоній. Для цього чашку Петрі встановлюють на предметному столику мікроскопа, опускають конденсор, освітлюють поле зору дзеркалом і за допомогою об'єктива 8× вивчають структуру і краї колоній:

- **характер краю** колоній (рис. 13.5) (гладкий, хвилястий, зубчастий, лопатевий, неправильний, війчастий, нитчастий, ворсинчастий, гільчаста);
- **структура колоній** (рис. 13.6) (однорідна, дрібнозерниста, крупнозерниста, волокниста);
- **консистенція** (доторкаються до поверхні петлею) – щільна, м'яка, слизоподібна, тягуча, тістоподібна.

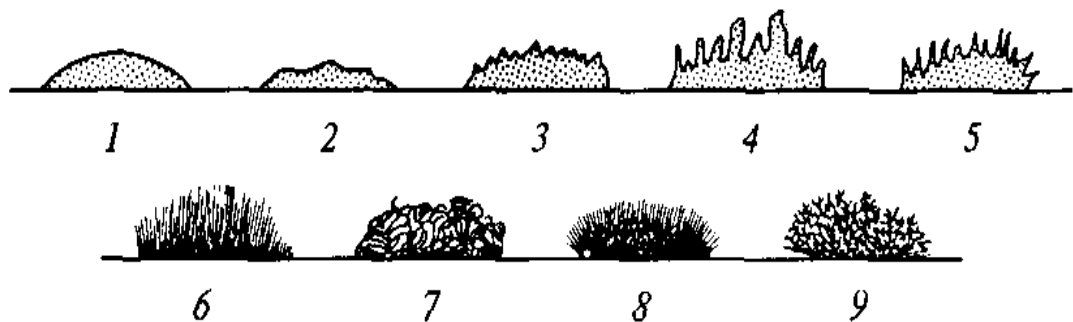


Рис. 14.5. Характер краю колонії: 1– гладкий; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – гільчаста.

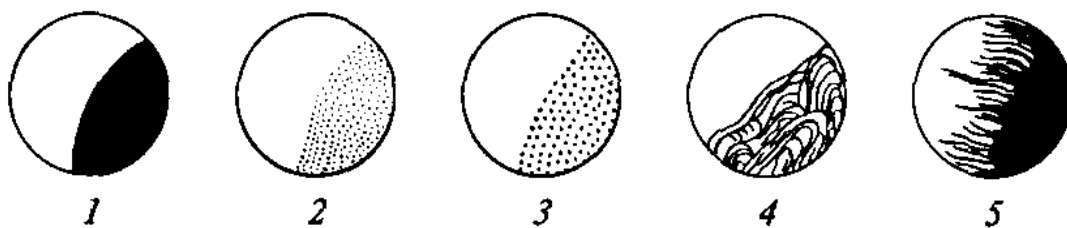


Рис. 14.6. Структура колонії: 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – грубозерниста; 4 – струмениста; 5 – волокниста.

2. Вивчити морфолого-цитологічні властивості 2-х різних виділених чистих культур. Занотувати опис колоній і малюнок мазка у таблицю 14.1.

Для вивчення морфолого-цитологічних ознак відбирають частину ізолюваної колонії, готують з неї мазок, забарвлюють за Грамом і розглядають у мікроскоп. Відзначають тип будови клітинної стінки (Γ^+ або Γ^-) і чистоту культур. Чисті культури багатьох бактерій, як правило, морфологічно однорідні, допустиме лише деяке варіювання розмірів клітин.

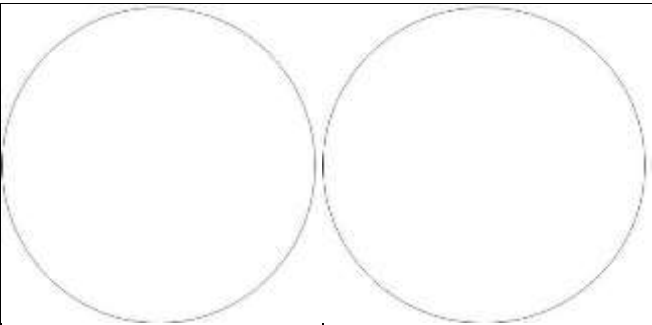
3. Відсіяти чисті колонії, які були перевірені на чистоту культури на скошеному агарі для накопичення чистих культур.

При наявності однорідної культури другу частину колонії, яка залишилася в чашки Петрі, відсівають у пробірку на поверхню скошеного агаризованого середовища (МПА) для отримання у достатній кількості чистої культури. Пробірки з посівами підписують і вміщують в термостат на 18 – 24 години за температури 37 °С.

Таблиця 14.1. Морфолого-цитологічні ознаки виділених культур

Властивості	Ознаки	Колонія 1	Колонія 2
1	2	3	4
Розглядають колонії у <i>прохідному світлі</i> зі сторони дна чашки Петрі та відмічають			
Розмір колонії	Крупна (4 - 5 мм і більше), середня (2 - 4 мм), дрібна (1 - 2 мм), карликова (менше 1 мм)		
Форма обрисів колоній	Кругла, неправильної форми, амебоїдна, ризоїдна, міцеліальна		
У <i>відбитому світлі</i> з боку кришки розглядають колонії та відмічають			
Колір колоній	Безбарвна, білий, сіро-білий, жовтий, лимонний, оранжевий, інший		

Продовження табл. 14.1

1	2	3	4
Колір субстрату під колоніями	безбарвний, білий, сіро-білий, жовтий, лимонний, оранжевий, інший		
Поверхня колонії	Гладка, блискуча, матова, зморшкувата, суха.		
Профіль колоній	Плоский, випуклий, кратероподібний, конусовидний		
При малому збільшенні мікроскопа вивчають структуру і краї колоній			
Характер краю колоній	Рівний, хвилястий, лопатевий, бахромчатий		
Консистенцію (доторкаються до поверхні петлею)	Щільна, м'яка, слизиста, тягуча, тістоподібна		
Морфолого-цитологічні ознаки при мікроскопії мазка колонії			
Мікроскопія (імерсійна система)	Рисунок, або фото мазка		
Форма клітин	Коки, палички, міцеліальні, нитчасті, звивисті інші.		
Розміри клітин	Великі, дрібні.		
Забарвлення за Грамом	G^+ або G^-		
Взаємне розташування клітин	Одиночні, зібрані в ланцюжки тощо.		
Інформація про чистоту культури	Культура чиста або культура містить клітини різних видів.		

Матеріали та обладнання

Мікроскоп, лупа, предметні скельця, бактеріологічна петля, набір реактивів для забарвлення за Грамом, фільтрувальний папір, МПА зі скошеним агаром, газовий пальник, сірники.

Контрольні питання:

1. Яким методом можна перевірити чистоту культури мікроорганізмів?
2. Які ознаки вивчають під час дослідження морфолого-цитологічних ознак бактерій?
3. Які морфолого-цитологічні ознаки досліджують на фіксованих препаратах, а які на препаратах отриманих з використанням складних методів фарбування?
4. Які ознаки вивчають під час дослідження культуральних ознак бактерій?
5. Які властивості колонії вивчають у прохідному світлі?
6. Чим відрізняється дослідження колоній у відбитому і прохідному світлі?
7. Яким чином встановлюють консистенцію колонії?
8. В чому полягають особливості роботи з мікроскопом під час дослідження структури і краю колонії?

Заняття 15. Виділення чистих культур аеробних мікроорганізмів. Частина 3. Культуральні та біохімічні властивості виділених культур

Посіви з чистою культурою, виконані на попередньому занятті, перевіряють на чистоту як візуально, так і мікроскопіюванням. Необхідно продивитися ріст культури по всьому штриху. Для подальшої роботи залишають тільки ті культури, ріст яких виявиться однорідним. Однорідність культури підтверджується також забарвленням за Грамом.

Для ідентифікації мікроорганізмів та встановлення їх таксономічного положення не можна обмежитися тільки культуральними та морфолого-фізіологічними ознаками, які були виконані на попередньому занятті. У ряді випадків необхідно вивчити також фізіолого-біохімічні ознаки.

При вивченні **фізіолого-біохімічних** ознак встановлюють відношення мікроорганізмів до різних джерел вуглецю та азоту, потребу в кисні, температурні межі росту, солестійкість, чутливість до антибіотиків, ферментні тести. Рекомендується також враховувати додаткові ознаки: серологічні, фагостійкість, хімічний склад клітинних стінок, вміст окремих нуклеотидів в ДНК тощо.

Найчастіше при ідентифікації мікроорганізмів використовують такі **фізіолого-біохімічні ознаки**:

Потреба в кисні. Для виявлення відношення виділеної культури до кисню виконують її посів уколом у стовпчики агару. Ріст мікроорганізмів на поверхні стовпчика або в глибині уколу визначає рівень їх потреби у кисні.

Виявлення ферментів, які розщеплюють джерела вуглеводного харчування. Сахаролітичні властивості мікроорганізмів, тобто здатність розкладати вуглеводи та багатоатомні спирти з утворенням кислоти, а іноді і газу, вивчають на середовищах Гісса. До складу цих середовищ входять те чи інше джерело вуглеводного харчування (цукор – глюкоза, лактоза, сахароза, багатоатомний спирт – манніт, дульцит) та індикатор для виявлення зміни рН середовища.

В даний час випускаються середовища Гісса з різними індикаторами. Так *бромтимоловий синій* в нейтральному середовищі дає синьо-зелене забарвлення, а при зсуві рН в кислоту сторону стає жовтим. *Індикатор В/Р* представлений сумішшю розолової кислоти та водного блакитного барвника у кислому середовищі має інтенсивно синій колір, у лужному – від слабко-рожевого до червоного. Наявність газу, який утворюється в результаті

метаболізування вуглеводів виявляють за утворенням пухирців у товщі середовища (рис. 15.1).

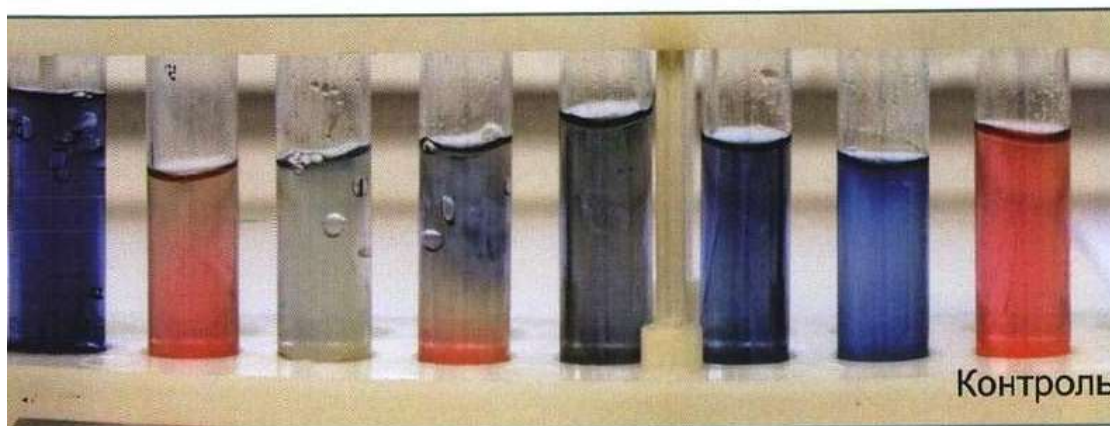


Рис. 15.1. Середовища Гісса з індикатором В/Р

Виявлення протеолітичних ферментів у бактерій здійснюють посівом мікроорганізмів на середовища, що містять білки – желатин, молоко і пептони.

Посіви в стовпчик на *желатин* витримують за кімнатної температури (20 - 22 °С) протягом декількох днів. Відмічають не тільки наявність розрідження середовища, але і його характер. Розрідження може бути різної форми – пошарове (синьогнійна паличка), у вигляді цвяха (холерний вібріон) тощо (рис. 15.2).

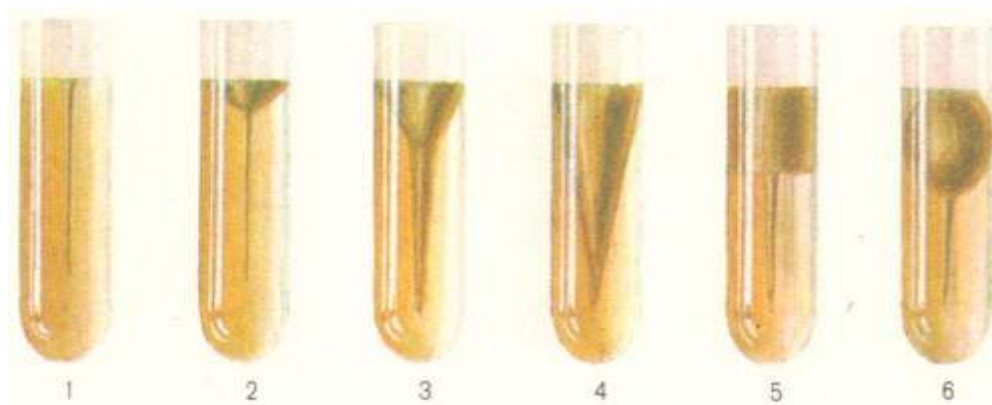


Рис. 15.2. Характер розрідження желатину: 1 – у формі цвяха, 2 – у формі чашечки; 3 – воронкоподібне; 4 – у формі трикутника; 5 – пошарове; 6 – мішкоподібне.

При посівах *на молоко* відмічають його *пептонізацію* або *зсідання*. Молоко містить білки (казеїн) і вуглевод (лактозу). Мікроорганізми, які розкладають казеїн, викликають пептонізацію молока, що надає йому

жовтуватого кольору. Мікроорганізми, які розщеплюють лактозу, приводять до зсідання субстрату.

Показником більш глибокого **розщеплення білка** є виділення газів – індолу, аміаку, сірководню та інших. Для виявлення цих газоподібних сполук виконують петлею посіви мікроорганізмів у *бульйон* або в *пептонну воду*. Посіви витримують у термостаті протягом 1 - 3 днів.

Для виявлення **індолу** за методом Морелля в пробірку з бульйоном, засіяним бактеріями вміщують тонку смужку фільтрувального паперу, змоченого розчином щавлевої кислоти. Індикаторний папір розміщують між стінкою пробірки і пробкою так, щоб вона не доторкалася до засіяного середовища. При виявленні індолу на 2 - 3 день нижня частина смужки паперу, внаслідок сполучення індолу з щавлевою кислотою, набуває рожевого кольору (рис.14.3, б).

Наявність **аміаку** визначають за посинінням *лакмусового папірця*, поміщеного між стінкою і пробкою пробірки.

Сірководень виявляють за почорнінням індикаторного паперу, просоченого *оцтовокислим свинцем*, який також розміщують між стінкою пробірки і пробкою. Папір чорніє внаслідок утворення сірчастого свинцю (PbS) (рис. 14.3, а).

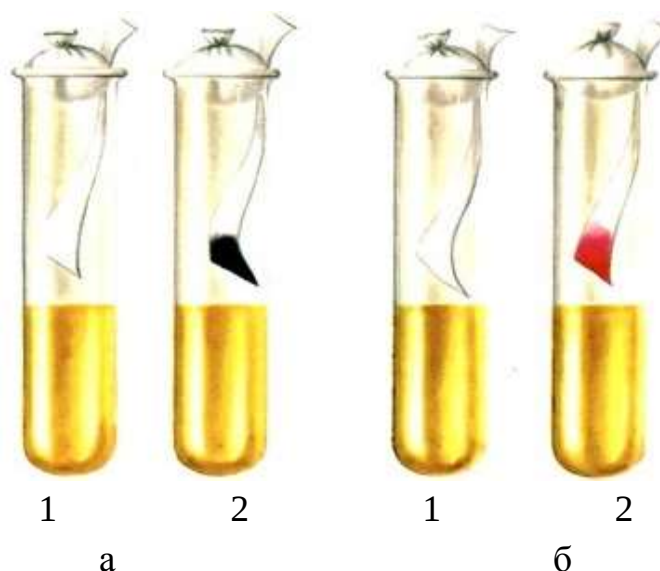


Рис. 15.3. Виявлення протеолітичних ферментів при рості на МПБ: а – утворення H_2S ; б – утворення індолу; 1 – негативний результат, 2 – позитивний результат.

Деякі мікроорганізми мають здатність утворювати фермент **каталазу**, який розщеплює H_2O_2 з утвореннями H_2O та O_2 . Для визначення каталази на поверхню 24-годинної агарової культури, що виросла на скошеному агарі,

наливають 1 – 2 мл 1% розчин перекису водню. Утворення **пухирців газу** свідчить про позитивну реакцію на каталазу.

Перевірити здатність утворювати каталазу можна також на предметному склі. Для цього на предметне скло наносять краплю перекису водню і вносять в неї петлею невелику кількість культури з пробірки. При утворенні пухирців газу реєструється позитивна реакція на каталазу.

Ріст на рідких середовищах (МПБ) (рис. 15.4). Після вирощування культури на МПБ відмічають:

- **інтенсивність росту** мікроорганізмів (*багатий, бідний*), характер помутніння середовища (*легке, середнє, сильне або відсутність помутніння*);
- **утворення плівки** на поверхні середовища (*тонка, товста, зморшкувата, складчаста, слизиста*);
- **наявність пристінного кільця** (*вузьке, широке, сіре, синювате*).

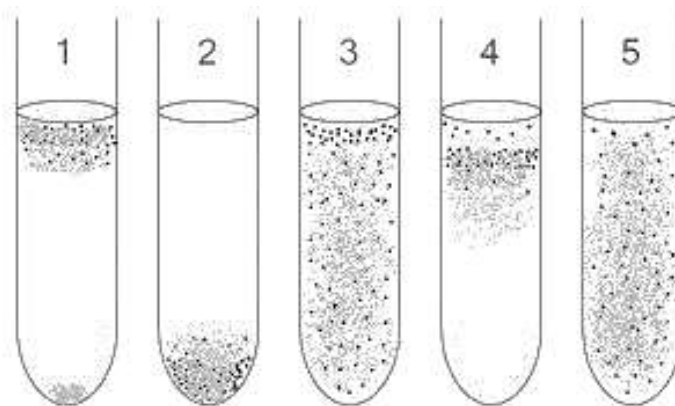


Рис. 15.4. Ріст бактерій на МПБ: 1 – *поверхневий ріст – утворення плівки, скупчення на поверхні середовища*; 2 – *придонний ріст, утворення осаду*; 3 – *ріст біля стінки, утворення пластівців, прикріплених до стінок пробірки*; 4 – *поверхневий ріст, утворення скупчення на поверхні середовища*; 5 – *ріст бактерій з рівномірним помутнінням середовища*

Виконання завдання

1. Вивчити фізіолого-біохімічні властивості культур.
2. Результати досліджень занести у таблицю 15.1.

Таблиця 15.1 Фізіолого-біохімічних ознаки виділеної чистої культури (приклад)

Властивості, що досліджуються	Ознаки	Властивості виділеної культури
Культура мікроорганізмів.	назва	
МПА (посів уколом)	Ріст в пробірці	<i>Ріст вздовж лінії посіву</i>
МПБ	Характер росту	<i>Помутніння середовища, невеликий, сірого кольору, осад, що легко розбивається</i> <i>Утворення пристінкового кільця.</i>
	H ₂ S	+
	NH ₃	+
	індол	-
Посів на середовище Гісса. Сахаролітичні Властивості.	глюкоза	<i>КГ</i>
	сахароза	-
	мальтоза	<i>КГ</i>
	лактоза	<i>КГ</i>
Протеолітичні властивості	Ріст на желатині	-
	Ріст на молоці	<i>Утворення згустку</i>
Каталаза	H ₂ O ₂	+

Примітка:

К – утворення кислоти, Г – виділення газу, (+) – позитивна реакція, (-) – негативна реакція.

Матеріали та обладнання

Посіви попереднього заняття, бактеріологічні петлі, мікроскопи, набір барвників для забарвлення за Грамом, фільтрувальний папір, пробірки з живильними середовищами (МПА, МПБ, МПЖ, середовище Гісса, молоко), предметні скельця, стерильні піпетки, 1 % розчин перекису водню, піпетки (1 - 2 мл), газовий пальник, сірники, вода.

Контрольні питання:

1. Яким чином підтверджується однорідність чистої культури?
2. Як проводити дослідження потреби мікроорганізмів у кисні? Яким чином трактують результати цього дослідження?
3. Наведіть склад середовища Гісса. Побудуйте таблицю, в якій треба зазначити як барвник у середовищі Гісса змінює свій колір при нейтральному і кислому значенні рН.
4. Які результати можна очікувати при посіві мікроорганізмів на молоко і желатин?
5. Які є тести на синтез мікроорганізмами каталази?
6. Які результати можливо отримати при рості мікроорганізмів на МПБ?
7. Обґрунтувати зміну кольору лакмусового папірця при виявленні аміаку та індолу.
8. Запишіть хімічні реакції, що відбуваються при виявленні індолу та сірководню.
9. Складіть схему постановки та обліку результатів виявлення глибокого розщеплення білка мікроорганізмами на МПБ.

Вимоги до оформлення протоколу лабораторних робіт

1. Протоколи лабораторної роботи оформлюються в зошиті кожним студентом індивідуально.

2. Кожна лабораторна робота повинна містити такі структурні елементи:

- найменування лабораторної роботи;
- короткий опис роботи;
- завдання;
- результати роботи: при мікроскопічному дослідженні препаратів мікроорганізмів результати заносять у протокол у вигляді малюнків з повною назвою об'єкта латиницею. Латинська назва мікроорганізмів визначається курсивом, наприклад : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*;
- висновки: студент робить загальний висновок за результатами дослідження, аналізуються помилки, які були зроблені в ході проведення досліджень і їх причини.

3. Протокол лабораторної роботи надається в кінці кожного заняття на підпис викладачеві.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології: навч. посібник. К. : Либідь, 2001. 144 с.
2. Климнюк С. І., Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. Практична мікробіологія: Посібник. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 440 с.
3. Люта В. А., Кононов О. В. Практикум з мікробіології: навч. посібник. К. : ВСВ «Медицина», 2011. 184 с.
4. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Основи мікробіології косметичних засобів» для студентів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / укладачі: Т. О. Овсяннікова, С. В. Жирнова, А. П. Білінська, В. В. Анан'єва, О. О. Варанкіна. Харків : НТУ «ХПІ», 2018. 49 с.
5. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія» / уклад. О. В. Ващенко. Харків : НТУ «ХПІ», 2008. 72с.
6. Мікробіологія з основами вірусології : метод. вказівки до лаб. занять для студентів хім. ф-ту / Г. В. Ямборко Н. О. Єлинська, О. Ю. Зінченко, Н. Ю. Васильєва. Одеса : Одес. нац. ун-т ім І. І. Мечникова, 2018. 52 с.
7. Мікробіологія : підручник / М. Г. Сергійчук, В. К. Позур, Т. М. Фурзікова та ін. К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. 541 с.
8. Мікробіологія : підручник / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. 360 с.

Додаток

1. Мікроорганізми, що використовуються у лабораторному практикумі

- *Saccharomyces cerevisiae*,
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*
- *Bacillus megaterium*
- *Serratia marcescens*
- *Micrococcus lysodeikticus*
- *Sarcina flava*
- *Acinetobacter calcoaceticus*
- цвільові гриби родів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*
- *Acetobacter aceti*

2. Прописи деяких живильних середовищ, використаних в лабораторних роботах

М'ясо-пептонний бульйон із глюкозою (МПБ)

МПБ можна приготувати за прописом на упаковці або зробити наважки наступних компонентів: пептон – 10,0 г; натрію хлорид – 5,0 г; глюкоза – 1,0 г; м'ясна вода – 1000 см³.

М'ясна вода: 500 г м'яса, без кісток, жиру і сухожилля, дрібно нарізають або пропускають крізь м'ясорубку, заливають 1000 см³ водопровідної води і залишають за кімнатної температури на 12 год. або в термостаті при 30 °С на 6 год., а при 37 °С – на 2 год. Потім м'ясо віджимають через марлю, а отриманий фільтрат кип'ятять протягом 30 хв. При цьому згортаються білки. Після охолодження фільтрат пропускають ще раз крізь ватяний фільтр і доливають водою до 1000 см³.

У м'ясній воді розчиняють усі компоненти, нагрівають, після повного розчинення всіх компонентів, доводять рН 7,3, фільтрують крізь ватно-марлевий фільтр, розливають у колби й стерилізують за температури 121 °С протягом 15 хв. Зберігають за температури 4 – 10 °С.

Агаризоване середовище Ендо

Середовище Ендо можна приготувати за прописом на упаковці або зробити наважки наступних компонентів. До 100 см³ агару, дотримуючи правила асептики, додають замість глюкози 1 г лактози, розчиненої в 5 см³ стерильної води, і підігрівають на киплячій водяній бані протягом 5 хв. В окрему пробірку наливають 1,0 см³ насиченого спиртового розчину фуксину основного, до якого додають свіжоприготовлений водний розчин натрію сірчистокислового масовою концентрацією 10 % до знебарвлення фуксину (блідорожевий колір). Отриману суміш додають у розплавлений агар з лактозою, перемішують, уникаючи утворення піни, і розливають у чашки Петрі. Зберігають за температури 4 – 10 °С не більш 5 діб.

Синтетичне середовище Чапека для грибів можна приготувати за прописом на упаковці або зробити наважки наступних компонентів: сахароза або глюкоза – 30 г; дигідрофосфат калію – 1,0 г; нітрат натрію – 2,0 г; сульфат магнію – 0,5 г; хлорид калію – 0,05 г ; сульфат заліза – 0,1 г; агар мікробіологічний – 20 г.

Компоненти попередньо розчиняють в 1000 см³ дистильованої води, додають наважку агару, прогрівають текучою парою, установлюють рН 4,0 – 5,5 10 %-вим розчином лимонної кислоти або гідроксиду натрію. Фільтрують, розливають у пробірки й стерилізують дробно текучою парою по 30 хв. 3 доби.

Середовище Гісса з маннітом або мальтозою

Приготування середовища за прописом на упаковці або зробити наважки наступних компонентів: пептон – 10,0 г; натрію хлорид – 5,0 г; маніт або мальтоза – 10,0 г; феноловий червоний – 0,025 г; агар мікробіологічний – 13,0 г; вода дистильована – 1000 см³.

Усі компоненти розчиняють у воді, вносять 2,5 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,6±0,2, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розплавлювання, фільтрують крізь ватно-марлевий фільтр. Стерилізують під тиском за температури 121 °С протягом 15 хв. Зберігають за температури 4 – 10 °С не більш 14 діб.

3. Приготування фізіологічного розчину для прокаріотів і еукаріотів

Фізіологічний розчин (ізотонічний 0,85%-ий розчин хлористого натрію) 0,85 г хлористого натрію розчиняють в 100 см³ дистильованої води й стерилізують за температури 121 °С протягом 15 хв.

Отриманий розчин зберігати за кімнатної температури не більш 14 діб.

4. Техніка фарбування за Грамом в модифікації А. В. Синьова

1. На предметному склі готують фіксований мазок досліджуваної чистої культури.

2. Мазок фарбують барвником генціанвіолетом через смужку фільтрувального паперу. Можна також використовувати заздалегідь приготовлені фільтрувальні папірці, змочені 1 %-м спиртовим розчином кристалвіолету й висушені (метод Грама в модифікації А. В. Синьова). У цьому випадку папірці поміщають на фіксований мазок і змочують декількома краплями води. Тривалість фарбування препарату – 2 – 3 хв.

3. Фільтрувальний папір знімають із мазка, фарбу зливають і наносять на мазок розчин Люголю на 2 хв.

4. Розчин Люголю зливають із мазка і крапають 96 %-ий спирт протягом 30 – 60 с. Потім препарат промивають водою й підсушують фільтрувальним папером.

5. Мазок фарбують барвником фуксином 2 – 3 хвилини, другий раз промивають водою й підсушують фільтрувальним папером.

Препарат мікроскопіюють в імерсійній системі з максимальним освітленням.

5. Приготування барвників для забарвлення за Грамом

Генціанвіолет. Для забарвлення мікроорганізмів використовують такий пропис: генціанвіолет – 1 г; спирт 96 ° – 10 см³; 5 % розчин фенола – 100 см³.

Для приготування спирто-водного розчину 1 г сухого генціанвіолету розчиняють у 10 см³ спирту, розтираючи у ступці з гліцерином та кристаликами фенолу (2 %), потім додають дистильовану воду. Щоб уникнути утворення осаду при зберіганні розчину, листи фільтрувального паперу просочують насиченим спиртовим розчином фарби, висушують на повітрі, нарізають дрібними смужками або квадратами і зберігають у темній банці з притертою пробкою.

Розчин Люголя: йодид калію 2 г; йод кристалічний 1 г; вода дистильована 300 см³. Спочатку йодид калію розчиняють у невеликій кількості води, потім всипають кристалічний йод, після розчинення якого додають дистильовану воду до 300 см³.

Фуксин Пфейфера готують із концентрованого фенолового розчину цього барвника, розводячи його в 10 разів дистильованою водою. Необхідно використовувати лише свіжовиготовлений барвник.