

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування
Навчально-науковий інститут агроекології та землеустрою
Кафедра екології, технології захисту навколишнього
середовища та лісового господарства

05-02-320М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з навчальної дисципліни

«Мікробіологія»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського)
рівня за освітньо-професійною програмою «Технології
захисту навколишнього середовища» спеціальності 183
«Технології захисту навколишнього середовища»
денної і заочної форм навчання

Рекомендовано науково-
методичною радою з
якості ННІ агроекології та
землеустрою
Протокол № 4 від
28.12.2020 р.

Рівне – 2021

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Мікробіологія» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Технології захисту навколишнього середовища» спеціальності 183 «Технології захисту навколишнього середовища» денної і заочної форм навчання [Електронне видання] / Борщевська І. М. – Рівне : НУВГП, 2021. – 44 с.

Укладач: Борщевська І. М., канд. с.-г. наук, доцент кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства.

Відповідальний за випуск – Клименко М. О., доктор с.-г. наук, професор, завідувач кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства.

Керівник групи забезпечення спеціальності 183 «Технології захисту навколишнього середовища» Прищеп А. М.

© І. М. Борщевська, 2021
© НУВГП, 2021

Зміст

Лабораторна робота № 1.	Загальні правила роботи в мікробіологічній лабораторії	4
Лабораторна робота № 2.	Будова мікроскопа і техніка мікроскопування	10
Лабораторна робота № 3.	Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів	18
Лабораторна робота № 4.	Ультраструктура прокаріотичної клітини	22
Лабораторна робота № 5.	Морфологія мікроорганізмів	26
Лабораторна робота № 6.	Морфологія вірусів і бактеріофагів	32
Лабораторна робота № 7.	Вивчення культуральних властивостей мікроорганізмів	36
Лабораторна робота № 8	Вивчення мікрофлори організму людини	40
Література		44

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета роботи: Ознайомитись із загальними правилами роботи в мікробіологічній лабораторії

О с н о в н і п о н я т т я

Приміщення лабораторії або кабінету, де проводяться заняття з мікробіології, має бути сухим і світлим. У ньому треба дотримувати чистоти, оскільки в повітрі й на різних предметах завжди є велика кількість різних мікроорганізмів. Щоб приміщення лабораторії завжди було чистим, його необхідно провітрювати і щодня проводити в ньому вологе прибирання із використанням дезінфікуючих розчинів (найчастіше для цього використовують 3 %-й розчин соди) або опромінювання бактерицидними лампами, яке вбиває як вегетативні клітини бактерій, так і їх спори.

Лабораторія має бути обладнана витяжною шафою і стерилізаційним боксом.

Підлога і робочі столи доцільно вкрити лінолеумом або іншим покриттям, яке б дозволяло зручно проводити дезінфекцію. Із обладнання та приладів у навчальній мікробіологічній лабораторії повинні бути: автоклав, термостат, дистильатор, холодильники, сушильні шафи, водяні бані, апарат для виготовлення ватно-марлевих корків, центрифуги, мікроскопи, апаратура для фільтрування, терези (аналітичні, торсійні, технічні), набори інструментів тощо.

Робочі місця в лабораторіях перед початком і після роботи треба протирати ганчіркою, змоченою 0,5—1 %-м розчином хлораміну або 1 %-м розчином карболової кислоти.

Лабораторний посуд також має бути стерильним. Для цього після занять його заливають на 1—2 год теплою мильною водою, потім прополіскують, висушують і стерилізують. На робочих столах розміщують: мікроскопи, спиртівки (при відсутності газових горілок), кристалізатори, крапельниці з

дистильованою водою, пінцети, бактеріологічні петлі, шпатель, предметні й накривні скельця та інші інструменти (рис.1).

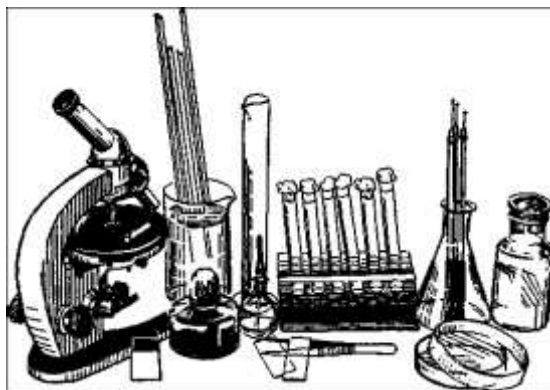


Рис. 1. Інвентар, необхідний для проведення лабораторних робіт.

Бактеріологічні голки, шпатель та петлі, за допомогою яких роблять посіви мікробів з колоній та суспензій досліджуваних культур, виготовляють із платинової дротини, яку закріплюють у спеціальних металевих держачках або впаюють у скляні палички (рис. 2).

Голки, петлі, шпатель та інші інструменти після роботи слід стерилізувати. Чисті знежирені предметні та накривні скельця необхідно закривати у банках з притертим корком. У мікробіологічних лабораторіях дозволяється працювати тільки в чистих халатах і шапочках. Забороняється швидко ходити, знімати одяг, їсти і курити. По закінченню занять поживні середовища з посівами вміщують у термостати, музейні культури — у холодильники, прибирають робочі місця, старанно миють руки, а при необхідності обробляють їх дезінфікуючим розчином.

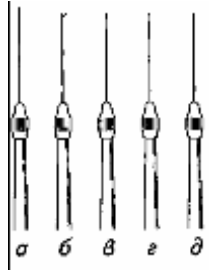


Рис. 2 Бактеріологічні голка, шпатель та петлі: а — голка; б — шпатель; в—д — петлі (в —правильно зроблені; з, д — неправильно зроблені)

МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ СЕРЕДОВИЩ, ПОСУДУ ТА ІНСТРУМЕНТІВ

Стерилізацією називається повне знищення мікробів та їхніх спор у поживних середовищах, посуді, на інструментах тощо. Серед методів стерилізації розрізняють *фізичні, хімічні, механічні*. Фізичні ґрунтуються на дії високої температури і ультрафіолетового опромінювання, хімічні — на використанні хімічних антисептичних речовин. Фільтрування рідин через бактеріальні фільтри належить до механічних методів стерилізації. У мікробіологічній практиці найчастіше застосовують стерилізацію за допомогою високої температури (так звана *термічна стерилізація*).

Прожарювання на полум'ї. Цей метод дає добрі результати при стерилізації невеличких за розмірами лабораторних інструментів. Обпалюванням або прожарюванням на полум'ї спиртівки стерилізують бактеріологічні петлі, препарувальні голки, ланцети, пінцети, предметні та накривні скельця, скляні палички, ножиці, шпатель тощо.

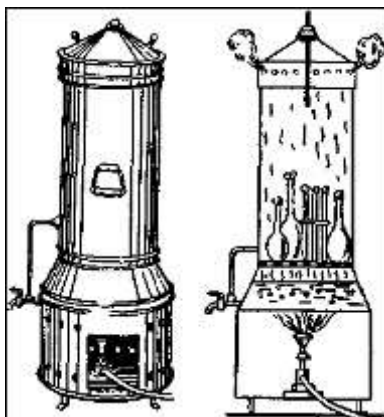


Рис. 3 Апарат Коха: А — зовнішній вигляд; Б — внутрішня будова

Стерилізація сухим жаром. Чисті колби, чашки Петрі, пробірки, піпетки, різний скляний посуд, загорнутий в папір, стерилізують у спеціальній сушильній шафі при температурі 160—170 °С протягом 2 год. Стерильні предмети виймають з сушильної шафи, коли температура знизиться до кімнатної.

Стерилізація кип'ятінням. Шприци, голки, гумові предмети, хірургічні інструменти стерилізують кип'ятінням у спеціальних стерилізаторах протягом 30 хв. Для зменшення жорсткості води та підвищення температури кипіння у стерилізатори додають 1—2 %-й розчин NaHCO_3 .

Стерилізація текучою парою, або тиндалізація. Цей метод застосовується для стерилізації речовин, що руйнуються або змінюють властивості при нагріванні (деякі поживні середовища, сироватки, вітаміни тощо).

Стерилізацію текучою парою проводять в автоклаві з відкритим паровідвідним краном або використовують апарат Коха (рис.3). Вона проводиться при температурі 56—58°С по 30 хв протягом 5—6 днів поспіль.

Стерилізація парою під тиском. Найбільш надійним способом стерилізації поживних середовищ, посуду і матеріалів є стерилізація парою під тиском в автоклавах (рис. 4).

При звичайному атмосферному тиску температура водяної пари дорівнює 100 °С. При підвищенні тиску пари температура її. Значно підвищується (табл.1). Спільна дія високої температури і тиску пари спричинюють швидку загибель не тільки вегетативних клітин мікробів, а й їхніх спор.

Таблиця 1

Співвідношення між температурою, тиском і часом стерилізації в автоклаві

Тиск пари, атм.	Температура, °С	Час стерилізації, хв
0	100	30-60
0,5	111	20-30
1,0	121	15-20
1,5	127	15-20

Пастеризація. Метод, запропонований Л. Пастером, застосовується для знезараження харчових продуктів: молока, соків, пива, вина тощо. При цьому матеріал нагрівається при температурі 50—65 °С протягом 15—30 хв або при 70—80 °С — 5—10 хв. Цей метод використовують для знищення не спороносних мікробів. Він може проводитися в термостаті або на водяній бані. При роботі з автоклавом треба дотримуватися правил техніки безпеки.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. З цією метою використовують бактерицидні лампи. Метод застосовується для стерилізації повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах, операційних, а також деяких предметів і матеріалів. Час опромінення — 20 хв.

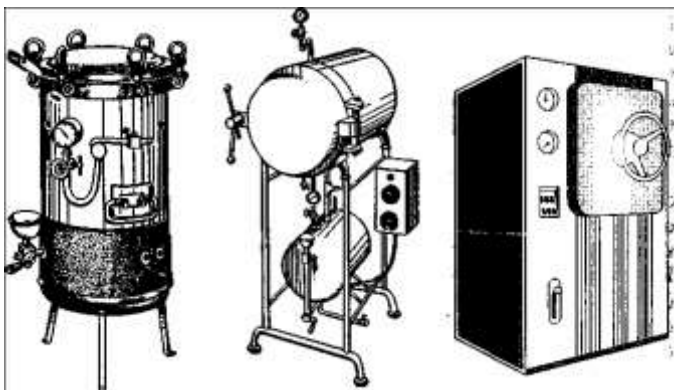


Рис. 4. Автоклави:
 А — вертикальний АВ-1; Б — горизонтальний АГ-1; В —
 автоматичний АШ-250

Під *хімічною стерилізацією, або дезінфекцією* розуміють знезаражування матеріалів, предметів тощо за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують розчин *карболової кислоти* (3—5 %),

лізолу (1—3 %),

формаліну (4 %),

хлораміну (1—5 %),

хлорного вапна (10—20 %) та інші.

Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як *консерванти* при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин тощо.

До *механічної* стерилізації належить фільтрування. Найчастіше стерилізацію фільтруванням застосовують для рідин, що змінюють свої властивості при нагріванні (сироватки, деякі поживні середовища, що містять білки тощо).

Фільтрування рідин проводять через *спеціальні дрібнопористі фільтри* (свічки Шамберлана, що їх виготовляють із каоліну, піску і кварцу, фільтри Беркефельда — з інфузорної землі, фільтри Зейтца — із азбесту, а також мембранні фільтри, виготовлені з нітроклітковини)

Пори таких фільтрів пропускають рідину, а бактерії затримують.

Питання для самоконтролю

1. Назвіть обладнання мікробіологічної лабораторії.
2. Які прилади і обладнання розміщені на столах в мікробіологічній лабораторії?
3. Назвіть методи стерилізації середовищ, посуду та інструментів.
4. Що називають дезінфекцією?
5. За допомогою яких речовин здійснюють дезінфекцію?

Лабораторна робота № 2

БУДОВА МІКРОСКОПА І ТЕХНІКА МІКРОСКОПУВАННЯ

Мета роботи: вивчити будову мікроскопа та ознайомитись із технікою мікроскопування.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскоп; 2) предметні та накривні скельця; 3) кедрова олія.

О с н о в н і п о н я т т я

Серед різноманітних приладів, що використовуються в практиці мікробіологічних досліджень, найважливіше місце належить мікроскопу.

Мікроскопом називається прилад з певним розташуванням лінз у ньому, за допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні й тисячі разів. Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об'єкти у світлі, що проходить через лінзи, називаються *світловими* або *біологічними*.

Промисловість випускає чимало різних моделей біологічних мікроскопів, які відрізняються лише за конструкцією деяких деталей. З навчальними цілями широко

використовуються біологічні мікроскопи серії «Біолам», які виготовляються в різних варіантах. Мікроскоп цієї серії має механічну та оптичну системи. У *механічній* системі основними частинами є прямокутна основа (штатив), коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик, тубусотримач з макрогвинтом, тубус, револьвер з отворами для об'єктивів (рис.1).

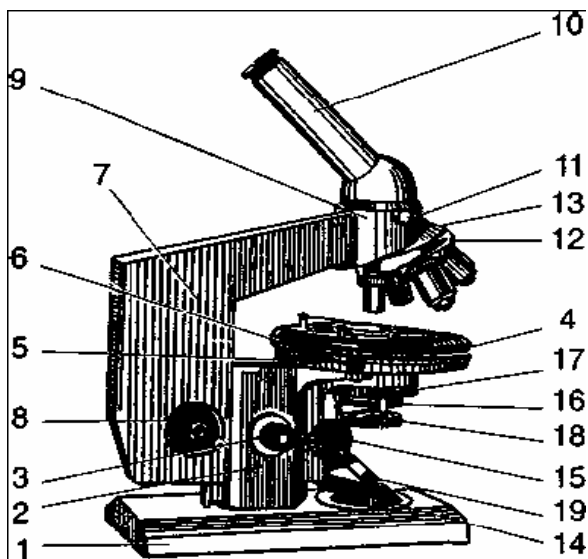


Рис. 1. Біологічний мікроскоп «БИОЛАМ»

1 — основа; 2 — коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3 — рукоятка мікрогвинта; 4 — предметний столик; 5 — гвинт для фіксування диска предметного столика; 6 — регулювальні гвинти; 7 — тубусотримач; 8 — рукоятка макрогвинта; 9 — головка; 10 — насадка; 11 — гвинт для закріплення насадки; 12 — револьвер; 13 — гвинт фіксування револьвера; 14 — кронштейн конденсора; 15 — рукоятка конденсора; 16 — циліндрична гільза конденсора; 17 — гвинт; 18 — додаткова лінза (відкидна); 19 — дзеркало.

Рух системи забезпечується обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів.

Оптична система, складається з об'єтивів, окулярів та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач). Основною частиною оптичної системи є об'єтив, що характеризує *основні якості* мікроскопа: власне збільшення, роздільну здатність і чіткість зображення.

Об'єктив — це система лінз у металевій оправі. Передня, найголовніша лінза об'єктива, називається фронтальною. Вона дає зображення об'єкта, що розглядається, із сферичною і хроматичною аберациями. Останні усуваються розміщеними вище в об'єктиві корегуючими лінзами. Розрізняють *сухі та імерсійні* об'єктиви. У сухому об'єктиві між фронтальною лінзою і об'єктом міститься повітря. Найчастіше користуються сухими об'єктивами при збільшенні досліджуваного об'єкта від 56 до 600 разів. Імерсійні (ОИ-90 або МИ-90) об'єктиви застосовують при вивченні дуже дрібних об'єктів (бактерій, грибів тощо). В імерсійних об'єктивах між фронтальною лінзою і досліджуваним об'єктом міститься крапля імерсійної олії, найчастіше кедрової. У цій однорідній системі промені світла не заломлюються, а потрапляють в об'єktiv, не змінюючи свого напрямку, оскільки показники заломлення скла і кедрової олії майже однакові: 1,52 і 1,515 відповідно. Часто використовують також синтетичні продукти, які за оптичними властивостями не поступаються кедровій олії (рис.2).

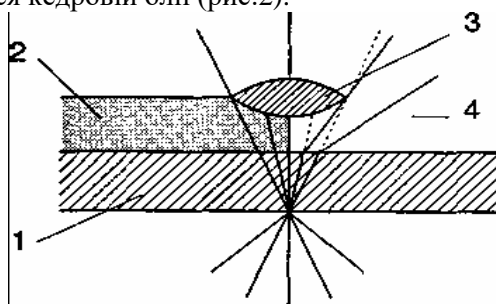


Рис. 2. Хід променів в імерсійній системі:

- 1 — предметне скельце, $n=1,520$; 2 — імерсійна олія, $n=1,515$;
3 — фронтальна лінза імерсійного об'єктива; 4 — повітря, $n=1,0$.

Власне збільшення будь-якого об'єктива залежить від фокусної відстані його фронтальної лінзи. Його визначають за формулою:

$$V = \frac{L}{F},$$

де V — власне збільшення об'єктива; L — відстань між фокальною площиною об'єктива і площиною зображення (для різних об'єктивів вона становить 128—180 мм); F — фокусна відстань об'єктива. У найсильніших об'єктивах фокусна відстань фронтальної лінзи дорівнює 1—3 мм, а у найслабкіших — 50—60 мм.

До оптичної системи мікроскопа також належить окуляр, який складається з двох плоско-опуклих лінз: верхньої очної і нижньої — збірної. Очна лінза збільшує дійсне зображення, одержане об'єктивом, подібно до звичайної лупи. Цифри на металевій оправі окуляра (5x, 7x, 10x, 15x, 20x) вказують на його власне збільшення, яке визначається за такою формулою:

$$K = -\frac{L}{F},$$

де K — власне збільшення окуляра; L — відстань найяснішого поля зору для нормального ока, яка дорівнює 25 см; F — фокусна відстань лінз окуляра.

Як і об'єктиви, окуляри також бувають різних типів. Вибір того чи іншого залежить від об'єктива. Наприклад, для роботи з ахроматичними об'єктивами малого і середнього збільшення найчастіше використовують окуляри Гюйгенса або ортоскопічні окуляри. Для роботи з апохроматичними, планахроматичними і ахроматичними об'єктивами великого збільшення використовують компенсаційні окуляри (АМ-27 15x та інші). У разі тривалої роботи з мікроскопом користуються бінокулярною насадкою, яка має власне збільшення близько 1,5x і обладнана корекційними лінзами. Праця з цими насадками зберігає зір.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Наприклад, при використанні окуляра 15x і об'єктива 90x матимемо збільшення зображення у 1350 разів.

Основними складовими частинами освітлювального пристрою, розміщеного під предметним столиком, є конденсор і дзеркало. Конденсор складається з двох лінз у металевій оправі та ірисової діафрагми. Він призначений для збирання пучка світла від дзеркала. Дзеркало має плоску і вгнуту поверхні. Воно спрямовує пучок променів на об'єкт, що досліджується. При денному освітленні користуються плоскою стороною дзеркала, при штучному освітленні (а також при відсутності конденсора) — вгнутою.

Оптичні якості мікроскопа визначаються такими основними показниками: власним збільшенням, роздільною здатністю і чіткістю зображення. Власне збільшення мікроскопа перебуває в оберненій залежності від фокусної відстані фронтальної лінзи об'єктива: чим більшою є фокусна відстань, тим меншим є збільшення фронтальної лінзи.

Роздільна здатність мікроскопа — це здатність об'єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих на препараті точок. Іншими словами це та мінімальна відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об'єкт можна побачити. Роздільна здатність мікроскопа є тим більшою, чим вищою є нумерична апертура об'єктива.

Нумерична апертура визначає здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла, її визначають за такою формулою:

$$A = \eta \cdot \sin \frac{\alpha}{2},$$

де A — нумерична апертура; μ — показник заломлення світла у середовищі між об'єктом і об'єктивом; α — половина отвірного кута, що утворюється двома крайніми променями, які потрапляють в об'єктив.

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

$$L = \frac{\lambda}{A_1 + A_2},$$

де L - роздільна здатність; λ — довжина хвилі світла; A_1 — нумерична апертура об'єктива; A_2 — нумерична апертура конденсора. Наприклад, якщо у мікроскопі «Биолам 70-Р» нумерична апертура об'єктива 40х дорівнює 0,65, а конденсора — близько 1, то в цьому випадку роздільна здатність мікроскопа при використанні світла з довжиною хвилі 0,55 мкм дорівнюватиме $L=0,33$ мкм.

Максимальна роздільна здатність світлового мікроскопа складає 0,2 мкм. Чим більшою є величина λ , тим вищою є числова апертура і роздільна здатність об'єктива. Щоб підвищити цю величину при використанні імерсійного об'єктива, необхідно максимально підвищити конденсор, оскільки цим визначається його світлозбиральна функція.

Чіткість зображення. Чітке зображення об'єкта під мікроскопом утворюється при загальному збільшенні об'єктива та окуляра, яке не перевищує нумеричну апертуру більш ніж у 500 разів. Чіткість зображення залежить від ступеня усунення в об'єктиві явищ сферичної і хроматичної абераций. З цією метою використовують планахроматичні і планapoхроматичні об'єктиви.

Хід роботи

Основні правила користування світловим мікроскопом

1. Перед початком роботи вибирають місце подалі від прямого сонячного світла і встановлюють мікроскоп перед собою так, щоб було зручно дивитися в окуляр.
2. Револьвер треба перевести у таке положення, в якому проти тубуса міститься об'єктив з найменшим збільшенням (8х). При роботі з бінокулярною насадкою спочатку необхідно відрегулювати віддаль між окулярами відповідно до відстані між очима спостерігача так, щоб поля зору обох окулярів злилися в одне.
3. Потім регулюють освітлення. Для цього, дивлячись лівим оком в окуляр, повертають плоску поверхню дзеркала,

щоб світло сонця або електричної лампи, відбиваючись від поверхні дзеркала, яскраво і рівномірно освітлювало все поле зору. Аби домогтися цього, треба повністю підняти конденсор, опустити об'єктив (8x) на відстань 0,5—1 см від предметного столика, вийняти окуляр і, дивлячись у тубус, повертанням дзеркала вловити зображення джерела світла. Після цього знову вставити окуляр і починати вивчення досліджуваного об'єкта.

4. Під час роботи з освітлювачем кращі результати отримують при встановленні освітлення за системою Келлера. Для цього освітлювачі типу ОИ-9, ОИ-19 (або інших марок) встановлюють на відстані 25—30 см від мікроскопа за допомогою спеціальної планки. На предметний столик вміщують препарат, встановлюють об'єктив малого збільшення (8x). Конденсор піднімають угору та повністю відкривають діафрагму. Користуються плоскою поверхнею дзеркала. Препарат у полі зору фокусують з відкритими діафрагмами освітлювача і конденсора. Потім прикривають діафрагму освітлювача. На дзеркало кладуть кружечок білого паперу і сфокусовують на нього різке зображення спіралі лампи освітлювача. Дивлячись в окуляр, легенько повертають дзеркалом, щоб знайти в полі зору зображення країв діафрагми освітлювача. Зображення матиме вигляд світлої плями з нечіткими краями. При такому освітленні фокусують препарат. Після цього повільно опускають конденсор до появи чіткого зображення країв діафрагми освітлювача у площині препарату. За допомогою дзеркала переводять зображення цієї світлої плями в центр поля зору. Коли освітлення встановлено, відкривають діафрагму освітлювача так, щоб світла пляма рівномірно зайняла все поле зору.

5. Препарат спочатку розглядають у сухій системі. Для цього, користуючись макрометричним гвинтом, регулюють чіткість зображення і вибирають потрібну для вивчення ділянку. Потім, не піднімаючи тубуса, повертаючи револьвер по осі, встановлюють об'єктив з великим збільшенням (40x), і легким рухом мікрогвинта в той чи інший бік домагаються найкращого зображення об'єкта.

Користування імерсійною системою

1. В мікробіологічній практиці найчастіше вивчення бактерій та інших мікроорганізмів здійснюють за допомогою імерсійних об'єктивів (ОИ-90X та інших). За цього випадку спочатку встановлюють дзеркало плоскою стороною і піднімають конденсор. Фіксований або живий препарат вміщують на предметний столик, на центральну ділянку препарату наносять краплину імерсійної олії. Після цього, під контролем зору, обережно опускають тубус у краплю так, щоб фронтальна лінза не торкалася препарату і, повільно обертаючи макрогвинт до себе, піднімають тубус до появи в полі зору зображення.

2. Останнє фокусують обертанням мікрогвинта, яким користуються протягом усього часу вивчення об'єкта. Після закінчення роботи треба підняти тубус, зняти препарат й обережно витерти фронтальну лінзу спочатку фільтрувальним папером, а потім злегка змоченою у бензині батистовою ганчіркою.

Питання для самоконтролю

1. Який прилад називається мікроскопом?
2. Назвіть складові механічної та оптичної систем мікроскопа.
3. Дайте визначення об'єктива мікроскопа.
4. Назвіть основні показники оптичних якостей мікроскопа.
5. Яка речовина використовується у імерсійних об'єктивах мікроскопа?

ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитися з інгредієнтами, що використовуються для поживних середовищ; навчитися готувати поживні середовища для культивування мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: 1) сухі поживні середовища, рідкі (МПБ, пептонна вода), щільні (МПА), напіврідкі середовища, спеціальні, елективні; 2) спиртівка; 3) термостат з температурою 37⁰С; 4) фільтрувальний папір; 5) дистильована вода.

О с н о в н і п о н я т т я

Мікроорганізми культивують у лабораторних умовах на спеціально виготовлених поживних середовищах. За походженням їх поділяють на *природні* (молоко, картопля, морква, горох, пивне сушло тощо) та *штучні*, виготовлені за певними рецептами. Вони бувають рослинного і тваринного походження, за консистенцією – рідкі, тверді та напіврідкі, а за призначенням – *звичайні* або універсальні - м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), на яких ростуть різні види мікроорганізмів, та *спеціальні*. Останні поділяються на селективні, на яких ростуть тільки окремі види, диференційно-діагностичні – для визначення біохімічних, гемолітичних і редукуючих властивостей та збагачувальні (середовища нагромадження).

Поживні середовища повинні відповідати таким вимогам: бути стерильними, ізотонічними, мати достатню кількість азотистих речовин, вуглеводів та вітамінів, мати оптимальну рН. Рідкі середовища повинні бути прозорими (окрім молока), а тверді – мати достатню вологість.

Хід роботи

За рецептами приготувати деякі поживні середовища.

М'ясо-пептонний бульйон.

Для виготовлення найуживаніших поживних середовищ — м'ясо-пептонного бульйону (МПБ), м'ясо-пептонного агару (МПА), м'ясо-пептонного желатину (МПЖ) та інших — насамперед треба приготувати м'ясну воду, оскільки вона є основою всіх цих середовищ. З цією метою свіжу телятину або яловичину звільняють від жиру, сухожилків і пропускають через м'ясорубку. До 0,5 кг фаршу додають у два рази більше води, розмішують і настоюють протягом 2 год при температурі 37—39 °С. Одержаний настій проціджують через марлю і кип'ятять 20 хв до зсідання білків. Потім його фільтрують через вату або паперовий фільтр і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 120 °С і тискові 1 атм.

До 1 л м'ясної води додають 5 г кухонної солі, 10 г пептону і кип'ятять до повного розчинення пептону. Додають насичений розчин бікарбонату натрію до слабколужної реакції і знову піддають кип'ятінню протягом 20 хв. Потім доливають водою до початкового об'єму і фільтрують, розливають в колби і пробірки та стерилізують протягом 20 хв в автоклаві при температурі 120 °С. Готовий бульйон повинен бути прозорим і мати янтарно-жовтий колір. Для скорочення часу це середовище часто виготовляють із готових бульйонних кубиків.

2. М'ясо-пептонний агар виготовляють із м'ясо-пептонного бульйону, додаючи 2—2,5 % подрібненого промитого агару. Суміш кип'ятять до повного розчинення агару, помішуючи її. Потім гарячий розчин фільтрують через ватяно-марлевий фільтр і стерилізують протягом 5 хв при температурі 115 °С у колбах, закритих ватними пробками.

3. М'ясо-пептонний желатин. До 1 л м'ясо-пептонного бульйону додають 100—150 г желатину і залишають для розбухання, підігрівають до повного розчинення желатину. Встановлюють слабколужну реакцію і кип'ятять протягом 5 хв. Далі розчин охолоджують до 40—50 °С, додають змішаний з водою білок курячого яйця і знову підігрівають. При цьому

білки випадають в осад і середовище стає прозорим. Його фільтрують гарячим і стерилізують текучою парою (метод тиндалізації).

4. Бобовий агар. 100 г білої квасолі або бобів заливають 1 л води і обережно кип'ятять, уникаючи розтріскування бобів і перетворення крохмалю на клейстер. Гарячий відвар фільтрують і додають 2 % агару. Агар розплавляють в автоклаві, осаджують колоїдні частинки. Одержане середовище фільтрують і стерилізують так само, як і при виготовленні інших агарових середовищ.

5. Картопляне поживне середовище. З неушкоджених бульб картоплі вирізають плоскі шматочки, поверхню яких натирають крейдою для нейтралізації кислої реакції клітинного соку, і розкладають їх у чашки Петрі на зволожений фільтрувальний папір. У разі застосування пробірок краще вирізувати із бульб циліндричні шматочки за допомогою коркового свердла. Чашки і пробірки з картопляним середовищем стерилізують в автоклаві протягом 10 хв при тискові 0,5 атм. На цьому середовищі добре вирощуються картопляна паличка та інші гетеротрофні мікроорганізми.

6. Сусло-агар. До пивного сусла додають 2 % очищеного агару. Середовище розварюють в автоклаві з відкритим вентиляем і використовують для вирощування молочнокислих бактерій і дріжджів. Щоб приготувати поживне середовище із молока, збиране молоко розливають у пробірки приблизно по 10 мл, закривають ватними тампонами і стерилізують методом тиндалізації. В молочному середовищі містяться всі поживні речовини, необхідні для гетеротрофних мікроорганізмів.

7. Сухий поживний агар. У навчальних мікробіологічних лабораторіях найчастіше виготовляються поживні середовища з порошку сухого поживного агару або інших видів сухих поживних середовищ (залежно від мети занять), що випускаються мікробіологічною промисловістю. Для цього беруть 5 г порошку сухого поживного агару на 100 мл холодної дистильованої води, старанно розмішують і нагрівають, помішуючи, до повного розчинення агару. Якщо розчин мутний,

його фільтрують, а потім розливають у пробірки і стерилізують в автоклаві протягом 20 хв при 120 °С.

Розливання поживних середовищ.

Для проведення лабораторних занять у навчальних лабораторіях поживні середовища виготовляють, як правило, про запас і зберігають у великих колбах. Перед або на початку заняття середовища розливають у пробірки або чашки Петрі (залежно від мети занять). Тверді поживні середовища перед розливанням необхідно розплавити в автоклаві з відкритим вентиляем або на водяній бані. Після розплавлення середовище розливають у чашки Петрі, пробірки або інший посуд (залежно від мети роботи), дотримуючись умов стерильності. Для цього на полум'ї спиртівки або газового пальника обпалюють горла колб, пробірок, корки тощо. Посуд із середовищем піддають стерилізації за одним із методів стерилізації.

Питання для самоконтролю

1. Назвіть природні та штучні поживні середовища.
2. Яким вимогам повинні відповідати поживні середовища?
3. Як приготувати м'ясо-пептонний бульйон?
4. Як приготувати м'ясо-пептонний желатин?
5. Опишіть рецепт приготування бобового агару.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПРОКАРІОТИЧНОЇ КЛІТИНИ

Мета роботи: вивчити будову прокаріотичної клітини.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскоп; 2) предметні та накривні скельця; 3) кедрова олія; 4) бактеріологічні петлі.

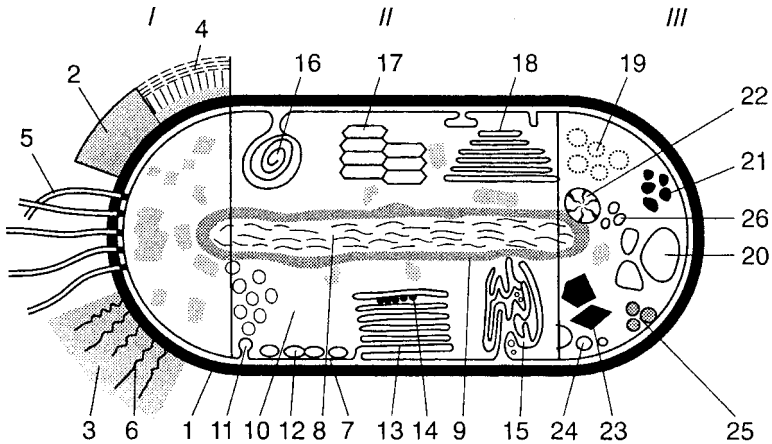


Рис.1. Будова прокаріотичної клітини

1 – клітинна стінка; 2 – капсула; 3 – слизові виділення; 4 – чохол; 5 – джгутики; 6 – ворсинки; 7 – цитоплазматична мембрана; 8 – нуклеоїд; 9 – рибосоми; 10 – цитоплазма; 11 – хроматофори; 12 – хлоросоми; 13 – пластинчасті тилакоїди; 14 – фікобілісоми; 15 – трубчасті тилакоїди; 16 – мезосома; 17 – аеросоми (газові вакуолі); 18 – ламелярні структури; 19 – полісахаридні гранули; 20 – гранули поліоксімаєляної кислоти; 21 – гранули поліфосфату; 22 – ціанофіцінові гранули; 23 – карбоксосоми; 24 – включення сірки; 25 – жирові краплі; 26 – вуглецеві гранули.

О с н о в н і п о н я т т я

1. Капсули мікроорганізмів, їх склад та функції.

Більшість мікроорганізмів мають капсулу, яка оточує мікробну клітину у вигляді слизистого шару. Капсули можуть бути різної величини та хімічного складу. Частіше вони складаються з високомолекулярних полісахаридів. Рідше до їх складу входять білки. Основна функція капсули – захисна. Капсули не сприймають фарбників при звичайних методах зафарбування.

2. Клітинна оболонка грамозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, будова, хімічний склад.

Клітинна оболонка складає приблизно 20% всієї маси мікробної клітини. Характерними її особливостями є ригідність та складна хімічна будова. Міцність клітинної оболонки та наявність в ній таких високомолекулярних полімерів як різні полісахариди та глікон'югати (муреїн, тейхоеві кислоти), а у грамнегативних ліпідів – потребує спеціальних методів зафарбування із застосуванням протрав.

Якщо у мікробних клітин повністю видалити клітинну оболонку, то утворяться особливі структури, що називаються протопластами. При частковому порушенні клітинної оболонки, або порушенні її синтезу, говорять про утворення сферопласта. Під мікроскопом протопласти та сферопласти виглядають однаково, як крупні сферичні утворення.

Протопласти та сферопласти грамозитивних мікроорганізмів при зафарбовуванні за Грамом стають грамнегативними.

3. Джгутики, їх будова та розташування.

Багато мікроорганізмів мають спеціальні органи руху – джгутики, довжина яких сягає 20 мкм, діаметр – 10-20 нм. Без спеціального зафарбування джгутики можна побачити лише в електронному мікроскопі. Якщо мікробна клітина має один джгутик, вона носить назву монотриха (рис. 2). Клітини з

пучком джгутиків на кінці називаються лофотрихами.
Амфітрихи мають джгутики на обох кінцях.

Якщо джгутики розташовані по всій поверхні тіла, то бактерії називаються перитрихами.

Наприклад, до монотрихів належить холерний вібріон, до перитрихів – більшість бацил та бактерій.

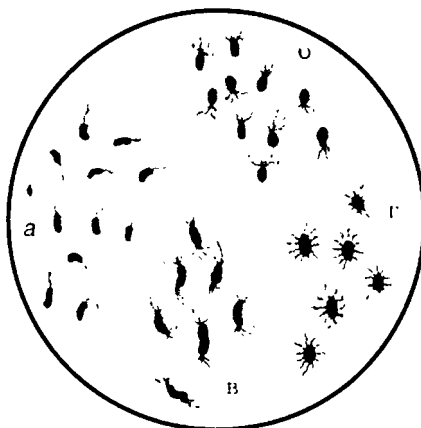


Рис.2. Джгутики в бактерій: а) монотрихи; б) лофотрихи; в) амфітрихи; г) перитрихи.

4. Ядро та ядерна субстанція мікроорганізмів.

Ядро у мікроорганізмів так само як ядра клітин інших живих організмів несе функції збереження та передавання спадкової інформації.

У еукаріот ядро сформоване, відокремлене від цитоплазми ядерною мембраною і має ядрце. Прокаріоти не мають сформованого ядра. Ядерна речовина ДНК не відокремлена від цитоплазми і представлена так званим нуклеоїдом або ядерною субстанцією. Нуклеоїд у електронному мікроскопі має вигляд тяжка.

5. Мітохондрії та мезосоми, їх функції.

Мітохондрії виконують енергетичну функцію у еукаріотичних організмів. Основний процес, що відбувається у мітохондріях – окисне фосфорування.

У прокаріот функції мітохондрій виконують цитоплазматична мембрана і мезосоми.

Мезосоми являють собою втягування внутрішнього шару цитоплазматичної мембрани (інвагінації).

6. Включення мікробної клітини, їх призначення та склад.

У цитоплазмі мікробних клітин є ряд включень неорганічної та органічної природи: сірка, кальцій, оксалати, гранули волютину, жир, глікоген, гранульоза та інші. Звичайно, вони виконують функції резервних речовин.

Волютин – поліметафосфат, в клітинах часто міститься у вигляді зерен, діаметром близько 0,3 мкм, іноді у дисперсному стані. Дає явище метахромазин, на цьому заснована його окраска метиленовим синім. Зустрічається в клітинах багатьох бактерій та більшості дріжджів. Особливо характерне розташування зерен волютину на кінцях клітини у дифтерійної палички.

Глікоген – речовина вуглецевої природи, полімер глюкози, який виявляють за допомогою концентрованого розчину Люголя.

Гранульоза – крохмалеподібний полісахарид, який також може міститись у клітинах мікроорганізмів у вигляді гранул. Деякі бацили утворюють гранульозу у період спороутворення. Виявляють включення гранульози за допомогою розчину Люголя, з яким вона дає сіро-синє забарвлення.

Жирові включення або ліпідні гранули в клітинах мікроорганізмів можуть бути представлені нейтральними жирами і полібетаоксимаєсною кислотою.

7. Спори мікроорганізмів

Спори у бацил частіше утворюються у несприятливих умовах існування і слугують для збереження виду.

Спора у клітині може розташовуватись центрально, термінально та субтермінально.

Якщо спора у діаметрі більша вегетативної клітини та розташована у центрі, то клітина набуває веретеноподібну або кластридіальну форму.

Утворення крупної спори на кінці призводить до появи форм, що нагадують барабанну паличку.

Бацили можуть утворювати капсули, більшість з них рухомі, позитивно зафарбовуються за грамами.

Питання для самоконтролю

1. Яка основна функція капсули?
2. Назвіть характерні особливості клітинної оболонки.
3. Дайте визначення монотриха, лофотриха і амфітриха.
4. Яка складова клітини несе функції збереження та передавання спадкової інформації?
5. Назвіть включення мікробної клітини, їх призначення та склад.

Лабораторна робота № 5

МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: ознайомитися із основними формами бактерій.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскопи; 2) предметні та накривні скельця; 3) бактеріологічні петлі; 4) скляні палички; 5) спиртівки; 6) препарувальні голки; 7) кедрова олія; 8) розчин фарб метиленової синьки, фуксину тощо; 9) сінна настойка та інші мікробні культури.

Основні поняття

Об'єктами досліджень у мікробіології є еубактерії, ціанобактерії, актиноміцети, дріжджі, цвільові гриби, деякі найпростіші тощо. Найчисленнішу й різноманітну, як за розмірами, так і за фізіологічними властивостями групу мікробів становлять бактерії. Це прокаріотні переважно одноклітинні організми. За формою клітин серед них розрізняють *кулясті (коки)*, *паличкоподібні*, *звивисті*, *нитчасті* (рис.1), а також *незвичайні форми* бактерії (рис. 2).

Вивчення основних форм еубактерій, актиноміцетів, цвільових грибів (рис. 3), дріжджів (рис.4) та інших мікроорганізмів проводиться на живих і фіксованих мікропрепаратах, які виготовляють з настоїв м'яса, овочів, сіна, ґрунту, гною, молочнокислих продуктів тощо, а також з колекції чистих культур.



Рис.1. Основні форми бактерій:

1-6 — сферичної форми: 1 — стафілококи; 2-3 — диплококи; 4 — стрептококи; 5 — тетракоки; 6 — сарцини; 7-9 — паличкоподібні; 10-12 — спіралеподібні форми: 10 — вібріони; 11 — спірили; 12 — спірохети.

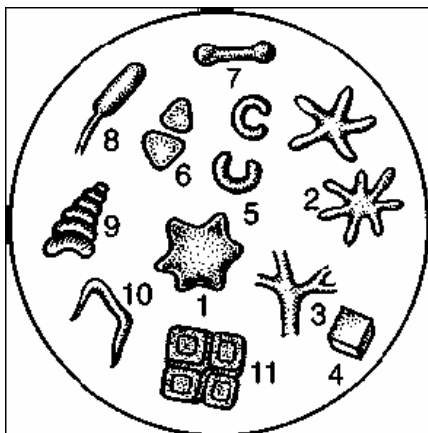


Рис.2. Нові форми бактерій:

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

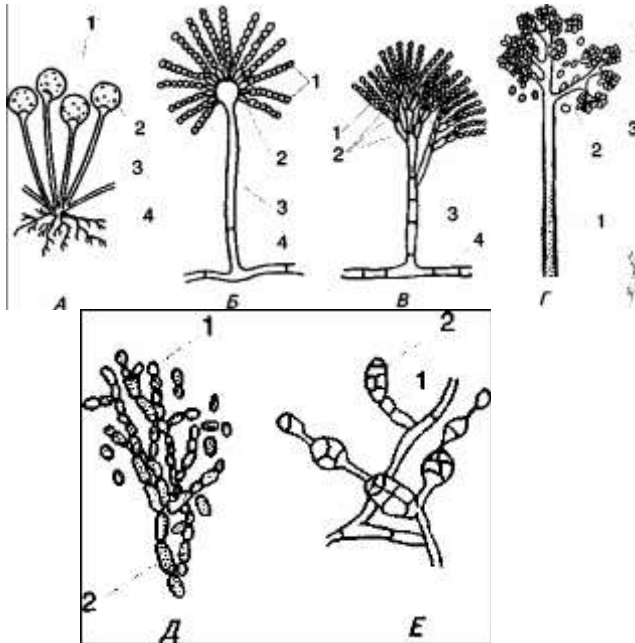
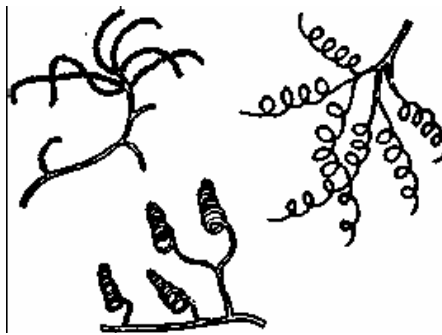


Рис. 3. Міцеліальні мікроскопічні гриби:

A — ризопус: 1 — спорангій; 2 — спори; 3 — спорангійносець; 4 — ризоїди; *Б* — аспергіл: 1 — конідії; 2 — стеригми; 3 — конідійносець; 4 — вегетативні гіфи; *В* — пенцил: 1 — конідії; 2 — стеригми; 3 — конідійносець; 4 — вегетативні гіфи; *Г* — ботритис: 1, 2 — конідійносець; 3 — конідії; *Д* — ооспора молочна (оїдіум): 1 — оїдії; 2 — гіфа; *Е* — альтернарія: 1 — конідійносець; 2 — конідії.



A



B

Рис. 4. Актиноміцети (за М. О. Красильниковим, 1974):
A - міцелій; *B* – спороносії.

Морфологію і структуру мікробної клітини на фіксованих (вбитих) або живих препаратах вивчають за допомогою імерсійної системи мікроскопа.

Для виготовлення фіксованих, а також живих мікропрепаратів («висяча крапля»), («роздавлена крапля» тощо) зазвичай користуються культурами сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus*), які виготовляють за кілька днів до заняття.

Х і д р о б о т и

1. Вивчення мікроорганізмів у живому стані найчастіше проводять на мікроскопічних препаратах («роздавлена крапля»). Для цього на стерильне предметне скло наносять бактеріологічною петлею крапельку суспензії досліджуваної культури.

2. Зверху накривають препарат накривним скельцем, розміщують на предметному столику мікроскопа і на поверхню накривного скельця наносять 1—2 краплини кедрової олії. У разі дослідження вбитих мікроорганізмів кедрову олію наносять безпосередньо на виготовлений і зафіксований мазок.

3. Потім обережно знижують імерсійний об'єктив до стикання з препаратом, дивляться в окуляр і, повільно обертаючи макрогвинт на себе, піднімають тубус до появи в полі зору зображення.

4. Після цього, користуючись тільки мікрогвинтом, старанно вивчають досліджуваний об'єкт і зарисовують його.

5. По закінченні роботи піднімають тубус, знімають препарат і обережно витирають фронтальну лінзу об'єктива ганчіркою, змоченою чистим бензином. Відпрацьовані препарати складають у посудину з дезінфікуючим розчином.

Питання для самоконтролю

1. Назвіть основні форми бактерій.
2. Назвіть групи, на які підрозділяються кокоподібні бактерії.
3. Охарактеризуйте паличкоподібні бактерії.
4. Охарактеризуйте звивисті бактерії.
5. Як проводиться вивчення морфології мікробної клітини?

МОРФОЛОГІЯ ВІРУСІВ ТА БАКТЕРІОФАГІВ

Мета роботи: навчитися готувати живильні середовища для культивування мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскоп; 2) предметні та накривні скельця; 3) кедрова олія.

О с н о в н і п о н я т т я

Віруси – дрібні (діаметр 20-300 нм) невидимі у світловий мікроскоп частинки, які відрізняються облігатним паразитизмом. Вони репродукуються тільки в живих клітинах (людей, тварин, рослин і мікроорганізмів). Окрема вірусна частина називається *віріоном*. Кожний віріон складається з одного типу нуклеїнової кислоти (ДНК чи РНК), оточеної білковою оболонкою – *капсидом*, який складається з окремих мономерів – капсомерів. При вивченні вірусів використовують електромікроскопи, ультрацентрифугування, бактерійні фільтри та інше. В тканинах, які заражені вірусами, часто формуються вірусні скупчення («тільця»), які значно більші за окремі вірусні частинки, добре зафарбовуються кислими барвниками (еозином) і видимі в світловий мікроскоп. Вони можуть розміщуватись в ядрі клітини (вірус герпесу), в цитоплазмі (вірус віспи) або в ядрі і цитоплазмі одночасно (вірус кори). Виявлення таких включень має діагностичне значення.

Методи культивування вірусів. Для культивування вірусів використовують курячі ембріони, культури тканин і лабораторних тварин. Курячі ембріони дуже практичні для культивування вірусів з ціллю виготовлення медичних препаратів і вакцин. Курячі зародки використовують у віці 8-12 днів. Перед зараженням шкаралупу обробляють 70% спиртом, обпалюють, змащують йодом і знову обробляють спиртом та обпалюють. Після зараження отвір заливають парафіном або накладають стерильне скло, краї якого заливають парафіном. Після інфікування ембріон поміщають в термостат при 37°C.

Ознаки репродукції вірусу проявляються особливо чітко в місці зараження на хоріон-алантоїсній оболонці в вигляді точок ураження і гоморагій.

Культури тканин (клітин) беруть із тканин тварин і людини. Їх поділяють на первинні, які використовують тільки в процесі однієї генерації і перививальні, які підтримують шляхом пасажів (перевивок) довгий час. Репродукція вірусів в культурі клітин супроводжується, так званою цитопатичною дією (ЦПД), яка проявляється в зміні морфології клітин і їхнього загину. Характер і час проявлення ЦПД залежить від виду вірусу.

Віруси бактерій (бактеріофаги) заражують клітини бактерій. Під дією вірулентних бактеріофагів відбувається лізис бактерій, що супроводжується змінами культури мікроорганізмів.

Бактеріофаги (від «бактерія» і грецьк. phagos – руйнівник, пожиратель) – віруси бактерій, які володіють здатністю специфічно проникати в клітини бактерій, репродукують і викликають лізис (розщеплення, руйнування) (рис.).

Історія відкриття бактеріофагів пов'язана з ім'ям кан. вченого Ф. д'Ерля, який виявив «клітинний фактор» і назвав його бактеріофагом. В подальшому вияснили, що бактеріофаги широко розповсюджені в природі. Їх виявили у воді, ґрунті, харчових продуктах, різноманітних виділеннях із організму людей і тварин, тобто там, де зустрічаються бактерії. В даний час ці віруси виявлені у більшості бактерій, як хвороботворних, так і не хвороботворних, а також ряду інших мікроорганізмів (наприклад, грибів). Тому у широкому сенсі їх стали називати просто **фагами**.

Фаги розрізняють за формою, структурною організацією, типонуклеїновою кислотою і за характером взаємодії з бактеріальною клітиною.

Більшість фагів мають форму пуголовка або сперматозоїда, деякі – кубічні чи ниткоподібні. Найбільш вивчені крупні бактеріофаги, які мають форм сперматозоїда. Вони складаються із витягнутої головки розміром 65-100 нм і хвостового відростку довжиною понад 100 нм. В середині

хвостового відростка є циліндричний стержень з'єднаний з головкою, а зовні – чохол, здатний до скорочення. Хвостовий відросток закінчується шестикутною пластинкою з короткими колючками, від яких відходять ниткоподібні структури – фібрили. Існують також фаги, котрі мають довгий відросток, в якого чохол не скорочується, фаги з короткими відростками, аналогами відростків, без відростків.

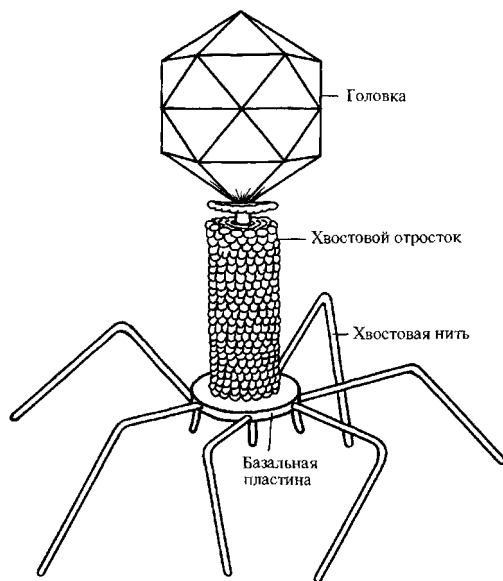


Рис. 1. Бактеріофаг (схема будови).

Фаги складаються з двох основних хімічних компонентів – нуклеїнової кислоти (ДНК чи РНК) та білка. У фагів, які мають форму сперматозоїда, двохнитчаста ДНК тісно упакована в вигляді спіралі у середині головки. Білки входять до складу оболонки (капсиду), яка оточує нуклеїнову кислоту і у всі структурні елементи хвостового відростку. Структурні білки фага розрізняються за складом поліпептидів і представлені у вигляді чисельних ідентичних субодиниць укладених у вигляді кубічної чи спіральної симетрії.

Окрім структурних білків, у деяких фагів виявлені внутрішні (геномні) білки, зв'язані з нуклеїновою кислотою, і білки-ферменти (лізоцим, АТФ), які беруть участь у взаємодії фагів з клітиною. Фаги більш стійкі до дії фізичних і хімічних факторів, ніж бактерії. Ряд дезінфекційних речовин (фенол, етиловий спирт, ефір, хлороформ) суттєво не впливають на фаги. Фаги високочутливі до формаліну і кислот. Інактивація більшості фагів настає при температурі 65-70°C.

За взаємодією фагів з бактеріальною клітиною виділяють *вірулентні* і *помірні* фаги.

Вірулентні фаги, проникнувши в клітину, автономно репродукують в клітині і викликають лізис. Процес взаємодії фага з бактерією протікає у вигляді декількох стадій. Для фагів, які мають хвостовий відросток зі скоротливим чохлом він має особливості. Ці фаги адсорбуються на поверхні на поверхні клітини з допомогою фібрил відростка.

Біологічне явище симбіозу мікробної клітини з помірним фагом (профагом) називається *лізогенією*, а культура бактерій, які містять профага називається лізигенною. Ця назва відображає здатність профага самостійно, або під впливом ряду фізичних або хімічних факторів виділятися із хромосомної клітини і переходити в цитоплазму. Лізигенні культури за своїми основними властивостями не відрізняються від вихідних, але вони не підходять для повторного зараження гомологічним і близькорідним фагом.

Зміна властивостей мікроорганізмів під впливом профага називається фаговою конверсією. Вона зустрічається у багатьох видів мікроорганізмів і взаємодіє з різними їхніми властивостями: культуральними, біохімічними, токсигенними, антигенними, чутливістю до антибіотиків та ін. Крім цього, перейшовши із інтегрованого стану у вірулентну форму, помірний фаг може захопити частину хромосоми клітини і при лізисі перенести її у іншу клітину. Якщо мікробна клітина стає лізигенною, то вона набуває нових властивостей. Таким чином, ці фаги є потужним фактором зміни мікроорганізму. Вони можуть зашкодити мікробіологічному виробництву.

Практичне застосування фага:

1. Для фагодіагностики – визначення виду культури (чумний фаг).
2. Для фаготипування при визначенні джерел інфекції (черевнотифозні, стафілококові типові фаги).
3. Для виявлення патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі за допомогою реакції наростання титру фага (РНТФ).
4. Для фаготерапії та фагопрофілактики (дизентерійний, сальмонельозний, стафілококовий фаги).
5. У генній інженерії.

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення вірусу.
2. Назвіть середовище, де продукуються віруси.
3. Опишіть загальну будову вірусу.
4. Які методи культивування вірусів ви знаєте?
5. Дайте визначення бактеріофага та опишіть його будову.

Лабораторна робота № 7

ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: на прикладі колоній мікроорганізмів на різних поживних середовищах ознайомитися із їх культуральними властивостями.

Матеріали та обладнання: 1) термостат; 2) спиртівки; 3) стерильні чашки Петрі та пробірки; 4) скляні шпателі та бактеріологічні петлі; 5) стерильні поживні середовища МПА і МПЖ; 6) досліджувані культури; 7) олівці по склу.

О с н о в н і п о н я т т я

До **культуральних** (або макроморфологічних) властивостей мікроорганізмів відносяться характерні особливості їх росту на щільних і рідких живильних середовищах.

Ріст на щільних живильних середовищах

На поверхні щільних живильних середовищ в залежності від посіву мікроорганізми можуть рости у вигляді колонії, штриха або суцільного газону.

Колонією називають ізольоване скупчення клітин одного виду, що виростили у більшості випадків із однієї клітини.

В залежності від того, де росте мікроорганізм (на поверхні щільного живильного середовища, в товщі його або на дні посуду), розрізняють поверхневі, глибинні і донні колонії.

Колонії, що виростили на поверхні середовища, відрізняються великим різноманіттям і є найбільш суттєвою особливістю росту багатьох мікроорганізмів на щільному середовищі. При їх опису враховують наступні ознаки:

1. **Форму** колонії – кругла, амебовидна, неправильна, ризоїдна та ін. (рис.1).

2. **Розмір (діаметр)** колонії – вимірюють в міліметрах; якщо розміри колонії не перевищують 1 мм, то їх називають точковими.

3. **Поверхня** колонії – гладка, шершава, борозденчаста, складчаста, морщиниста, з концентричними колами або радіально окреслена.

4. **Профіль** колонії – плоский, випуклий, кратероподібний, конусовидний та ін. (рис.2).

5. **Блиск і прозорість** – колонія блискуча, матова, тьмяна, мучниста, прозора.

6. **Колір** колонії – безколірна або пігментована – біла, жовта, золотиста, оранжева, бузкова, червона, чорна.

7. **Край** колонії – рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчастий і т.д. (рис.3).

8. **Структура** колонії – однорідна, дрібно- або крупнозерниста, струмінчаста і т.д. (рис.4).

Край і структуру колонії визначають за допомогою лупи або при малому збільшенні мікроскопа.

9. *Консистенцію* колонії визначають, доторкуючись до її поверхні петлею. Колонія може легко зніматися з агара, бути щільною, м'якою або такою, що вросла в агар, слизистою (прилипає до петлі), тягучою, плівчатою (знімається повністю), крихкою (легко ламається при дотику петлі).

Ріст в рідких живильних середовищах

Ріст мікроорганізмів в рідких живильних середовищах більш одноманітний. Він супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки чи осаду.

Часто ріст мікроорганізмів супроводжується появою запаху, пігментації, виділення газу.

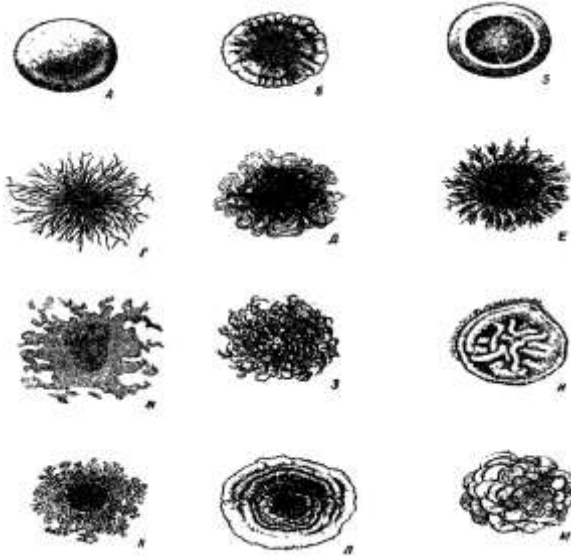


Рис. 1. Форма колоній:

A – кругла, *B* – кругла з фестончастим краєм, *C* – кругла з валиком по краю; *G*, *D* – ризоїдні; *E* – з ризоїдним краєм; *Ж* – амебовидна; *З* – нитковидна; *И* – складчаста; *K* – неправильна, *Л* – концентрична, *М* – складна.

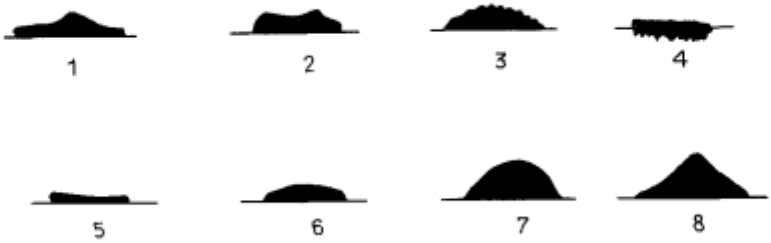


Рис.2. Профіль колоній:

1 – вигнутий; 2 – кратероподібний; 3 – бугристий; 4 – росточий в субстрат; 5 – плоский; 6 – випуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусовидний.

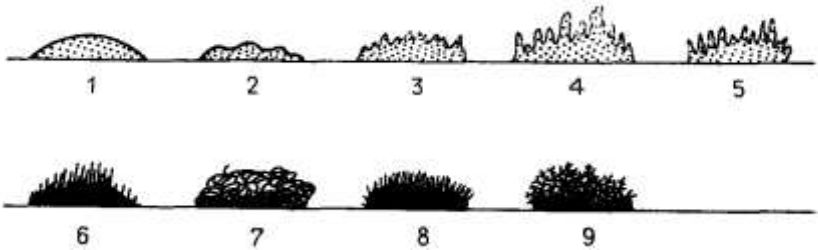


Рис.3. Край колоній:

1 – гладкий; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопастний; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – гіллястий.

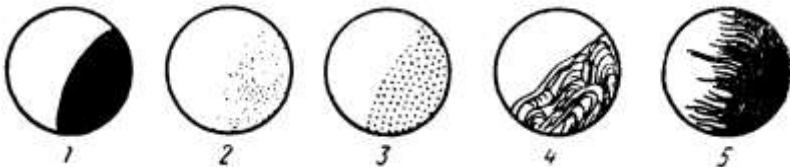


Рис.4. Структура колоній:

1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струмільчаста; 5 – волокниста.

Хід роботи

1. За допомогою мікроскопа визначити культуральні ознаки обраної колонії мікроорганізмів.
2. За допомогою шкали кольорів визначити колір колонії.
3. Виготовити мазки мікроорганізмів та забарвити за Грамом.
4. Результати визначення культуральних ознак колоній мікроорганізмів та їх морфології занести до лабораторного журналу.

Питання для самоконтролю

1. Які ознаки відносять до культуральних властивостей мікроорганізмів?
2. Дайте визначення колонії мікроорганізмів.
3. Назвіть ознаки росту колоній на щільних живильних середовищах.
4. Які форми колоній ви знаєте?
5. В чому особливість росту мікроорганізмів на рідких живильних середовищах?

Лабораторна робота № 8

ВИВЧЕННЯ МІКРОФЛОРИ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ

Мета роботи: дослідити за допомогою мікроскопа «Біолам» мікрофлору тіла людини.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскопи; 2) предметні та накривні скельця; 3) спиртівка; 4) бактеріологічні петлі; 5) промивалки з дистильованою водою; 6) фільтрувальний папір; 7) стерильні чашки Петрі; 8) пінцети; 9) пробірки зі стерильним поживним середовищем; 10) стерильна вата; 11) 0,85 %-й розчин NaCl; 12) фуксин; 13) зубочистки; 14) стерильна вода.

О с н о в н і п о н я т т я

1. Мікрофлора зовнішніх покривів

На поверхні шкіри людини, на слизових оболонках, у відкритих порожнинах людини мешкає понад 10^{13} клітин мікроорганізмів. Популяції цих організмів складають **нормальну мікрофлору (аутофлору)** людського організму.

Розрізняють **автохтонну**, постійну мікрофлору та транзиторну, випадкову – **алохтонну**.

Мікроорганізми завдяки взаємодії своїх поверхневих структур з протеїнами мембран макроорганізму, формують біоплівки й таким чином виконують функцію **протиінфекційного захисту** людини.

Кожній частині організму людини притаманна своя мікрофлора. Оскільки шкіра є відкритою екосистемою, саме тут можна знайти найбільшу кількість алохтонних мікроорганізмів. До складу постійної нормальної мікрофлори шкіри входять різні коки *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. Intermedius*, а також брєвібактерії, коринєбактерії та дифтероїди. Окрім того, на поверхні шкіри можна знайти аеробні спороутворюючі палички (р. *Acinetobacter*), які мешкають у повітрі, воді, ґрунті. Більша кількість мікроорганізмів трапляється в місцях концентрації сальних і потових залоз. Співвідношення груп мікроорганізмів залежить від віку, статі, стану імунної системи людини.

Деякі організми, що населяють шкіряні покриви, належать до умовно патогенних і при недотриманні гігієнічних правил, викликають захворювання, наприклад піддермію.

2. Мікрофлора відритих порожнин

Мікрофлора порожнини рота різноманітна, оскільки волога, температура, рН створюють сприятливі умови для розвитку мікроорганізмів. У ротовій порожнині та зубному нальоті мешкають вібріони, спірили, спірохети, гриби, палички і т.д. Мікроорганізми порожнини рота відіграють велику роль у виникненні захворювань ясен і зубів, зокрема карієсу, стоматиту. В порожнині носа постійно містяться декілька видів стрептококів, стафілококів, дифтероїдів. У верхніх дихальних

шляхах затримується більшість мікроорганізмів, що надходять з повітря при вдиханні.

3. Мікрофлора шлунково-кишкового тракту

У шлунку більшість мікроорганізмів, що надходять ззовні, гинуть внаслідок кислої реакції середовища. Зниження кислотності шлункового соку призводить до розвитку у шлунку багатї мікрофлори. У тонкому кишечнику відбувається підвищення лужності середовища та створюються більш сприятливі умови для розвитку мікроорганізмів. У товстому кишечнику кількість мікроорганізмів значна, тут виявлено близько 260 видів мікроорганізмів, серед яких переважно анаероби і ліпідобактерії.

Для вивчення норм мікрофлори людського організму використовують мікроскоп, наприклад, мазків зубного нальоту, зі слизу носа, і т.д. Мазки фіксують, зафарбовують за методом Грама та мікроскопують за допомогою імерсійної системи.

Дослідження мікрофлори шкіри людини методом відбитків

Мікрофлору поверхні шкіри людини можна дослідити методом *змивів* і методом *відбитків*. При використанні першого методу стерильною ватою, змоченою стерильним фізіологічним розчином, протирають поверхню шкіри, нігті, потім вату переносять у пробірку з напіврідким живильним середовищем, ретельно перемішують, і через годину невеликий об'єм такої суспензії з дотриманням умов стерильності переносять на тверде живильне середовище у чашках Петрі. Чашки витримують протягом доби у термостаті при температурі 36⁰ С, а потім – ще 2-3 доби витримують при кімнатній температурі. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

Хід роботи

1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище МПА (м'ясо-пептонного бульйону).

2. Із дотриманням стерильності приблизно 10 мл охолодженого до 40-45⁰ С МПА внести у стерильну чашку Петрі та залишити до повного застигання.

3. Із дотриманням стерильності легко притиснути палець до поверхні агарової пластинки у чашці Петрі.

4. Засіяні таким чином чашки Петрі поставити у термостат при температурі 35-36⁰ С.

5. На наступному лабораторному занятті дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів, які вирости на МПА у чашках Петрі.

6. На стерильне предметне скло нанести краплину дистильованої води.

7. За допомогою зубочистки відібрати трохи зубного нальоту, змішати з водою і виготовити фіксований мікропрепарат: мазок висушити, зафіксувати на полум'ї спиртівки і зафарбувати фуксином.

8. Препарат промити дистильованою водою і знову висушити.

9. Виготовлений мікропрепарат вивчити під мікроскопом за допомогою імерсійної системи, описати і замалювати у зошиті.

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення нормальної мікрофлори організму людини.

2. Поясніть поняття автохтонної і алохтонної мікрофлори.

3. Чому мікрофлора порожнини рота дуже різноманітна?

4. Чому у шлунку більшість мікроорганізмів, що надходять ззовні, гинуть?

5. Які методи дослідження мікрофлори шкіри людини ви знаєте?

ЛІТЕРАТУРА

1. Климнюк С. І., Ситник І. О. та ін. Практична мікробіологія : посібник. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 440 с.
2. Люта В. А., Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. К. : Здоров'я, 2001. 280 с.
3. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології : підручник. К. : Либідь, 2001. 312 с.
4. Ситник І. О., Климнюк С. І., Творко М. С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія : підручник. Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. 391с.
5. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології : навч. посібник. К. : Либідь, 2001. 144 с.
6. Антипчук А. Ф., Кіреєва І. Ю. Водна мікробіологія : навч. посібник. Київ : Кондор, 2005. 256 с.
7. Пяткін К.Л., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією : К. : Вища школа, 1992. 431 с.