

Міністерство освіти та науки України  
Національний університет водного господарства та  
природокористування  
Кафедра екології, технології захисту навколишнього середовища та  
лісового господарства

**03-06-167М**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

до виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни  
«Загальна мікробіологія та вірусологія» (частина 1)  
для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня  
за освітньою програмою «Біотехнології, біоробототехніка та  
біоенергетика» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
денної форми навчання

Рекомендовано  
науково-методичною радою з якості  
НП будівництва та архітектури  
Протокол №5 від 11 лютого 2025 р.

Рівне – 2025

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Загальна мікробіологія та вірусологія» (частина 1) для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньою програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання [Електронне видання] / Буднік З. М. – Рівне : НУВГП, 2025. – 43 с.

Укладачі: Буднік З. М. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства/

Відповідальний за випуск: Мартинов С. Ю., доктор технічних наук, професор, завідувач кафедри водопостачання, водовідведення та бурової справи/

Керівник групи забезпечення освітньо-професійної програми першого (освітньо-професійного) рівня за освітньою програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» к.т.н., доцент Грицина О. О.

© З. М. Буднік, 2025  
© Національний університет  
водного господарства та  
природокористування, 2025

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.....	4
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.....	11
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3.....	16
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4.....	29
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5.....	31
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6.....	35
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7.....	39
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №8.....	40
ЛІТЕРАТУРА.....	43

## ВСТУП

Лабораторні роботи є невід'ємною складовою навчального процесу з курсу "Загальна мікробіологія з основами вірусології". Їх метою є закріплення теоретичних знань, отриманих під час лекційних занять, та набуття практичних навичок, необхідних для роботи з мікроорганізмами.

Мікробіологія – це наука, що вивчає мікроорганізми, їхню морфологію, фізіологію, генетику, екологію, а також взаємодію з іншими організмами та вплив на довкілля. Вірусологія, як розділ мікробіології, присвячена дослідженню вірусів – їхньої структури, репродукції, еволюції та ролі у природних і патологічних процесах.

Практична діяльність у мікробіології потребує дотримання високих стандартів асептики, чітких правил техніки безпеки та володіння спеціальними методами роботи. Відповідно, виконання лабораторних робіт забезпечує:

Формування навичок роботи у стерильних умовах. Оволодіння основними методами мікроскопії, культивування мікроорганізмів та їхньої ідентифікації.

Застосування сучасних мікробіологічних і вірусологічних методів досліджень для розв'язання практичних завдань у біотехнології.

Методичні вказівки розроблені для забезпечення самостійної та ефективної роботи студентів під час підготовки і виконання лабораторних завдань. Вони містять опис теоретичних основ

кожної теми, детальну інструкцію з виконання роботи, контрольні запитання для самоперевірки та критерії оцінювання результатів.

Дотримання послідовності виконання робіт, точне виконання рекомендацій і ретельне ведення лабораторного журналу сприятимуть досягненню високих результатів у вивченні курсу.

Успішне засвоєння практичних навичок із мікробіології та вірусології є необхідною основою для подальшої роботи в галузі біотехнології, де мікроорганізми та віруси широко використовуються у виробництві ліків, ферментів, вакцин, продуктів харчування, а також для вирішення екологічних завдань.

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1** **ОСНОВИ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ТА РОБОТИ В** **МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ**

**Мета:** Ознайомитися з основними правилами техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами; вивчити вимоги до організації роботи в мікробіологічній лабораторії; опанувати базові методи асептики, дезінфекції та стерилізації.

**Матеріали та обладнання:** Лабораторний журнал; стерильний халат, маска, рукавички; спиртівка або газовий пальник; дезінфекційні розчини (70% спирт, 3% розчин перекису водню, розчин хлоргексидину); лабораторний посуд (склянки, пробірки, піпетки, чашки Петрі); контейнери для відпрацьованого матеріалу.

#### **Теоретична частина**

##### **1. Техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії:**

- ✓ Використання індивідуальних засобів захисту (халат, рукавички, маска).
- ✓ Дотримання правил гігієни: миття рук до і після роботи, заборона прийому їжі та напоїв у лабораторії.
- ✓ Правила роботи з відкритим полум'ям (спиртівка або газовий пальник).

##### **2. Основи асептики:**

- ✓ Значення стерильності в мікробіології.
- ✓ Методи обробки рук, робочих поверхонь та інструментів.
- ✓ Види дезінфекційних засобів та їх застосування.

##### **3. Стерилізація лабораторного обладнання:**

- ✓ Методи стерилізації: фізичні (автоклавування, випалювання), хімічні (обробка дезрозчинами).

- ✓ Використання полум'я для стерилізації металевих інструментів (бактеріальної петлі, шпателя).

### ***Загальні правила роботи в мікробіологічній лабораторії***

1. Лабораторія повинна утримуватися в ідеальній чистоті.
2. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі і класти на робочі столи сторонні предмети (сумки, портфелі й інші особисті речі).
3. У мікробіологічній лабораторії дозволяється працювати тільки в халатах, що захищають одяг від забруднення мікроорганізмами, а також перешкоджають поширенню їх за межі лабораторії.
4. За кожним студентом закріплюється постійне робоче місце і мікроскоп. Робоче місце під час занять утримується в повному порядку, на ньому не повинно бути нічого зайвого.
5. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.
6. Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельної обробки. Стіл перед початком роботи варто дезінфікувати.
7. Під час виконання практичних занять зберігати тишу, запобігати зайвого ходіння, відкривання та закривання дверей, що посилює рух повітря.
8. Дуже важливо навчитись економно витратити реактиви та фарби, бережливо відноситися до лабораторного обладнання й апаратури, особливо до мікроскопа, дотримуватись правил особистої гігієни та профілактики.
9. Закінчивши роботу із заразним матеріалом, необхідно провести профілактичну дезінфекцію рук і робочого місця. Для дезінфекції відпрацьованого матеріалу після занять використовують 2%-ний розчин хлораміну чи 3%-ний розчин карболової кислоти. Для знезаражування рук після роботи, як правило, використовують ізопропіловий або етиловий спирт, розчин хлораміну в концентрації 0,5%, потім руки миються з милом.
10. На всіх пробірках і чашках обов'язково пишеться назва мікроорганізмів, дата його посіву, прізвище студента, № групи.
11. Не можна виносити за межі кафедри будь-які матеріали (пробірки, фарби та ін.).

12. Про випадки улучення досліджуваного матеріалу культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат чи взуття необхідно негайно повідомити викладача і під його керівництвом провести дезінфекцію.

13. У лабораторії категорично забороняється приймати їжу, пити воду. Не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів).

14. Металеві предмети (бактеріологічні петлі, голки й пінцети) після кожного зіткнення з культурами пропалюють у полум'ї спиртівки. Використані шпатель, предметні та покривні стекла, піпетки поміщають у банки з дезінфікуючим розчином. Класти на стіл названі предмети категорично забороняється.

15. Забруднені патологічним матеріалом чи культурою мікробів градуйовані та пастерівські піпетки, скляні шпатель і металеві інструменти негайно після використання опускають у ємності з дезінфікуючим розчином.

16. На кожне заняття в групі призначаються чергові. Під час роботи вони стежать за виконанням кожним студентом правил роботи й поведження в лабораторії. Після закінчення заняття чергові здають відпрацьований матеріал на стерилізацію, виключають прилади, світло і провітрюють приміщення.

### *Дезінфекція*

Мікробіолог у більшості випадків має справу з чистими культурами мікроорганізмів, що являють собою потомство однієї клітини. Через те, що в повітрі і на поверхні предметів лабораторії (на столах, інструментах, одязі), а також на руках, волоссі і т.д. завжди мається велика кількість різноманітних мікроорганізмів, варто постійно піклуватися про збереження чистоти досліджуваних культур. Для цього живильні середовища, посуд, інструменти й прилади стерилізують, лабораторію та робочі місця утримують у чистоті й періодично піддають спеціальній обробці, що спрямована на знищення мікроорганізмів.

У лабораторному практикумі з мікробіології не передбачені роботи з живими патогенними мікроорганізмами. Проте варто мати на увазі, що з посівом сапрофітних мікроорганізмів з навколишнього середовища може бути внесена й патогенна форма. Сама робота із сапрофітними формами в ряді випадків вимагає абсолютної стерильності для одержання надійних результатів досліду.

У зв'язку з цим правила роботи в мікробіологічному практикумі є загальними з будь-якою бактеріологічною лабораторією.

Забезпечити повну стерилізацію лабораторії важко, і це не завжди необхідно. У мікробіологічній практиці з метою знищення мікроорганізмів в повітрі і на різних поверхнях лабораторних приміщень широко застосовують різні способи дезінфекції. Слово «дезінфекція» означає знезаражування, тобто знищення збудників інфекційних захворювань на об'єктах зовнішнього середовища. Під час дезінфекційної обробки можуть знищуватися не тільки патогенні, але і сапрофітні форми.

Дезінфекція **повітря** лабораторій найбільше просто здійснюється *протірюванням*. Тривала вентиляція приміщення через квартиру (не менш 30-60 хвилин) призводить до різкого зниження кількості мікроорганізмів в повітрі, особливо за умов значної різниці температур між зовнішнім повітрям і повітрям приміщення.

Найефективніший і найчастіше застосовуваний спосіб дезінфекції повітря – *опромінення УФ-променями* протягом 30 хвилин до декількох годин у залежності від ступеня забруднення повітря. Як джерело Уф-випромінення використовуються бактерицидні лампи. Необхідно мати на увазі, що Уф-промені можуть викликати важкі поразки очей. У невеликих приміщеннях під час включеної бактерицидної лампи знаходитися не можна.

**Робоче місце**, де безпосередньо проводиться робота з культурами мікроорганізмів, вимагає особливо ретельної обробки. Стіл варто дезінфікувати не тільки до початку роботи, але і після її закінчення. Для протирання поверхні столу можна користуватися *розчинами хлораміну, карболової кислоти*, а також *ізопропіловим і етиловим спиртом*. Спирти можуть використовуватися і для дезінфекції рук. Поверхню робочого столу можна дезінфікувати й Уф-променями.

Особливо відповідальні роботи з мікроорганізмами (пересівання чистих культур) бажано здійснювати в спеціальному приміщенні, яке називається «бокс». **Бокс** являє собою ізольовану кімнату, розділену перегородкою на дві частини. Вхід в основне, робоче приміщення боксу здійснюється через тамбур із рухливими дверима, що виключає різке переміщення повітря і, отже, занесення ззовні сторонньої мікрофлори.

## ***Причини пожежі у мікробіологічній лабораторії і способи її гасіння***

Можливість виникнення пожежі в мікробіологічній лабораторії особливо велика, тому що постійно треба працювати з газовими чи спиртовими пальниками, електронагрівальними приладами, фіксаторами, розчинниками, приготовленими на спирті, фенолі, ацетоні та ін. У роботі з газовим пальником можливе «проскакування» полум'я, що може призвести до загоряння гумової трубки чи прилеглих предметів і речовин. Загоряння може відбутися під час стерилізації сухим жаром посуду, що загорнена в папір, за умов неправильного режиму роботи сушильної шафи. Причиною пожеж може стати несправність електричних приладів.

У випадку виникнення пожежі необхідно пам'ятати, що спосіб його гасіння залежить від причини, що обумовила загоряння, і від характеру палаючого об'єкта. Палаючі дерев'яні предмети можна гасити водою, піском і за допомогою вогнегасника. Нерозчинні у воді органічні речовини (наприклад, бензин) не можна гасити водою, тому що в цих умовах пожежа може навіть підсилитися. Ці речовини варто гасити піском або швидко накрити азбестом. Розчинні у воді органічні речовини (спирт, ацетон) можна гасити водою. Для гасіння усіх вище названих речовин придатний чотирихлористий вуглець. У зіткненні з вогнем він утворює важкі пари, що витісняють кисень, у результаті чого горіння припиняється. Найефективнішим протипожежним засобом у лабораторії є вогнегасник. На кожному з них міститься інструкція, із якою повинні бути ознайомлені всі працюючі в лабораторії.

Таким чином, на випадок пожежі в лабораторії у відповідних місцях завжди повинні бути: пожежний рукав; шухляда з піском; азбестова ковдра; вогнегасник; чотирихлористий вуглець. За умов виникнення пожежі в лабораторії всі наявні під рукою засоби гасіння необхідно негайно використовувати й одночасно викликати місцеву пожежну команду.

### ***Правила безпечної роботи із застосуванням пального***

1. Перед запалюванням спиртівки треба переконатися, що корпус її вирівняний, гніт випущений на необхідну висоту і розгорнутий.



2. Запалену спиртівку не можна переносити з місця на місце; не можна запалювати одну спиртівку від іншої.

3. Гасити спиртівку необхідно, накриваючи полум'я ковпачком. Задувати полум'я забороняється.

4. У спиртівках використовується тільки етиловий спирт; користатися бензином чи іншими пальними рідинами забороняється.

5. Брикети (таблетки) сухого пального можна також використовувати для нагрівання. Запалювати їх потрібно на керамічних пластинках, гасити – ковпачками для спиртівок чи керамічними тиглями. Брикети, що не догоріли, після погашення необхідно забрати у витяжну шафу.

6. З появою пожежі насамперед необхідно виключити всі нагрівальні прилади, потім гасити полум'я. Його не можна задувати. Якщо горять органічні речовини, не слід заливати полум'я водою. Необхідно скористатися піском, азбестовою ковдрою, вогнегасником (краще вуглекислотним).

7. За умов незначних опіків обпалене місце потрібно обробити етиловим спиртом чи міцним розчином марганцевокислого калію, якщо опіки важкі, необхідно звернутися до лікаря.

### ***Невідкладна медична допомога в лабораторії***

У лабораторії бувають випадки, що вимагають невідкладної медичної допомоги – порізи рук, опіки гарячими предметами, кислотами та лугами й т.п. При пораненнях склом потрібно насамперед видалити його осколки з рани (якщо вони в ній залишилися) і, переконавшись, що там вони відсутні, змазати рану йодом і перев'язати уражене місце. При термічних опіках першого й другого ступеня обпалене місце необхідно внести під струмінь холодної води, а потім присипати гідрокарбонатом натрію чи обробити примочками зі свіжоприготовлених розчинів питної соди (2%-й) чи перманганату калію (5%-й). Кращим засобом для примочок є абсолютний чи 96%-ний етиловий спирт. Він виявляє одночасно знезаражуючу й знеболуючу дію. При опіках кислотами та лугами уражене місце варто швидко промити великою кількістю води. Потім на обпалене місце накласти примочку: при опіках кислотою – з 2%-го содового розчину, при опіках лугом – із слабого розчину оцтової чи борної кислоти.

За умов отруєння газом постраждалого необхідно вивести на свіже повітря і негайно викликати лікаря чи доставити його в медпункт.

### **Хід роботи:**

#### **1. Підготовка до роботи:**

- ✓ Одягніть стерильний халат, рукавички та маску.
- ✓ Обробіть руки 70% спиртом.

#### **2. Обробка робочої поверхні:**

- ✓ Протріть стіл дезінфекційним розчином перед початком роботи.
- ✓ Забезпечте наявність стерильного обладнання.

#### **3. Робота зі спиртівкою:**

- ✓ Вивчіть конструкцію спиртівки.
- ✓ Запаліть спиртівку та навчіться правильно гасити її.
- ✓ Обробіть металевий інструмент у полум'ї до червоного.

#### **4. Правила утилізації:**

- ✓ Відпрацьовані матеріали (зразки, використані рукавички) складіть у спеціальний контейнер.
- ✓ Дезінфікуйте робоче місце після завершення роботи.

### **Контрольні запитання:**

1. Які основні правила техніки безпеки необхідно дотримуватися у мікробіологічній лабораторії?
2. Що таке асептика, і яке її значення у мікробіологічних дослідженнях?
3. Які методи стерилізації та дезінфекції застосовуються у лабораторії?
4. Як правильно працювати зі спиртівкою?
5. Які дії потрібно виконати у разі випадкового розливу біологічного матеріалу?

### **Звіт:**

1. Опишіть послідовність підготовки до роботи у лабораторії.
2. Вкажіть, які дезінфекційні засоби та методи стерилізації використовувалися.
3. Надайте відповіді на контрольні запитання.

**Примітка:** Дотримання правил техніки безпеки та асептики є критично важливим у роботі з мікроорганізмами. Недотримання цих правил може призвести до контамінації зразків, отримання недостовірних результатів або загрози здоров'ю персоналу.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

### МІКРОСКОПІЯ ЯК ОСНОВНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ В МІКРОБІОЛОГІЇ. ВИВЧЕННЯ БУДОВИ МІКРОСКОПА

**Мета:** Ознайомитися з будовою та принципами роботи світлового мікроскопа. Навчитися налаштовувати мікроскоп для спостереження за мікрооб'єктами. Опанувати основні методи мікроскопії для вивчення мікроорганізмів.

**Матеріали та обладнання:** Світловий мікроскоп. Постійні мікропрепарати (бактерії, гриби, дріжджі). Предметні та покривні скельця. Іммісійне масло. Серветки або спеціальний папір для оптики. Інструкція до мікроскопа.

#### Теоретична частина:

##### 1. Типи мікроскопів:

- ✓ Світловий мікроскоп (простий, складний).
- ✓ Електронний, фазово-контрастний, флуоресцентний мікроскопи (оглядово).

##### 2. Будова світлового мікроскопа:

- ✓ Основні частини: оптична (окуляри, об'єктиви), механічна (тубус, штатив, столик, гвинти), освітлювальна система (дзеркало, лампа, конденсор).
- ✓ Збільшення мікроскопа: загальне збільшення = збільшення об'єктива × збільшення окуляра.

##### 3. Принцип роботи світлового мікроскопа:

- ✓ Шляхи проходження світла.
- ✓ Роль конденсора та діафрагми.
- ✓ Використання іммісійного масла.

##### 4. Методи мікроскопії:

- ✓ Світлове поле.
- ✓ Темне поле.
- ✓ Іммісійна мікроскопія.

Для вивчення морфології мікроорганізмів у прохідному світлі використовують оптичні мікроскопи МБР (рис. 1.1), МБД.

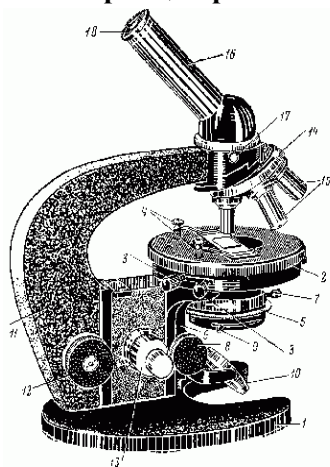


Рис. 1.1. Мікроскоп МБР-1:

1 – основа мікроскопа; 2 – предметний столик; 3 – гвинти для переміщення предметного столику; 4 – клеми для фіксації препарату; 5 – конденсор; 6 – кронштейн конденсора; 7 – гвинт, що закріплює конденсор у гільзі; 8 – гвинт переміщення конденсора; 9 – ручка ірисової діафрагми конденсора; 10 – дзеркало; 11 – тубусоутримувач; 12 – макрометричний гвинт (кремальєра); 13 – мікрометричний гвинт; 14 – револьвер; 15 – об'єктиви; 16 – тубус; 17 – гвинт для кріплення тубуса; 18 – окуляр.

*Механічна частина* складається зі штатива з предметним столиком, тубуса, револьвера, механізму наведення різкості, що складається з макрометричного й мікрометричного гвинтів.

*Оптична частина* мікроскопа включає об'єктив і окуляр. Об'єктив є найважливішою частиною мікроскопа.

Він складається із системи лінз, укладених у металеву оправу. Одне з позначень на оправі відповідає значенню збільшення об'єктива. В мікроскопі МБР використовуються об'єктиви, що дають збільшення в 8, 40 і 90 разів. Збільшення об'єктива залежить від фокусної відстані головної – фронтальної лінзи. Чим більше кривизна фронтальної лінзи, тим коротше фокусна відстань, тобто тим нижче треба опускати об'єктив над площиною препарату. Інші лінзи називаються корекційними, вони необхідні для усунення сферичної й хроматичної аберації. Окуляр містить дві лінзи – очну (верхню) і збірну (нижню). Окуляри можуть давати збільшення в 5, 7, 10, 12, 15 і 20 разів, що зазначено на їхній оправі.

*Освітлювальна система* включає дзеркало з двома поверхнями (увігнутою та плоскою) і конденсора (у мікроскопі МБД є убудоване джерело світла). Увігнуте дзеркало збирає й концентрує в площині препарату пучок рівнобіжних променів світла, що йдуть від джерела світла, тому їм користаються в тих випадках, коли працюють без конденсора, тобто з малим збільшенням. Конденсор, укріплений безпосередньо над дзеркалом, складається з двох лінз і призначений для збирання паралельних променів світла, відбитих дзеркалом, у крапці-фокусі, що знаходиться в площині препарату. Убудована в конденсор ірисова діафрагма служить для затримання зайвих променів світла і дозволяє при необхідності зменшувати апертуру конденсора.

Загальне збільшення, що дає мікроскоп, визначається добутком збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Виразність

одержуваного зображення характеризується дозвільною здатністю, що визначається мінімальною відстанню між двома крапками, коли вони ще не зливаються в одну.

Величина дозвільної здатності мікроскопа залежить від довжини хвилі використовуваного світла ( $\lambda$ ) і суми числових апертур об'єктива ( $A_1$ ) і конденсора ( $A_2$ ):

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2} \quad (1.1)$$

Числова апертура визначається добутком синуса половини кута охоплення лінзи та показника заломлення середовища ( $n$ ), що граничить із лінзою:  $A = \sin U \cdot n$ . Тобто числова апертура характеризується кількістю променів, що попадають у лінзу (рис. 1. 2).

Дозвільна здатність мікроскопа – величина, зворотна дозвільній відстані. Чим більше дозвільна здатність, тим меншої величини об'єкт можна побачити. Світловий мікроскоп за умов використання видимого світла має дозвільну здатність близько 0,2 мкм.

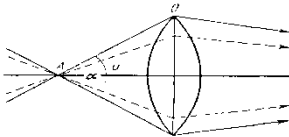


Рис 1. 2. Схема ходу променів із різною величиною отвірного кута:  
 А – об'єкт; О – об'єктив;  
 α - отвірний кут;  
 U – половина отвірного кута.

Підвищити дозвільну здатність можна двома шляхами: висвітлюючи об'єкт більш короткими променями світла, наприклад, УФ, або, збільшуючи показник середовища, що граничить із лінзою, для того, щоб наблизити його до показника заломлення скла ( $n$  скла =1,5). У вивченні мікроорганізмів майже постійно користаються *імерсійним*, або оліезануреним об'єктивом (90x), що дає збільшення у 900-1350 разів (рис. 1.3). Тому всі промені, не переломлюючись і не змінюючи свого напрямку, потрапляють в об'єктив і забезпечують гарну видимість дрібних об'єктів.

#### *Мікроскопія в темному полі*

Для дослідження об'єктів малої величини використовують темнопольну мікроскопію. Для цього в біологічному мікроскопі звичайний конденсор заміняють спеціальним конденсором темного поля, що має затемнену середню частину і пропускає тільки бічні промені.

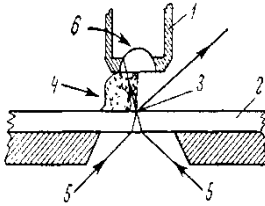


Рис 1.3. Вплив імерсійної олії на хід променів у мікроскопі:

- 1 – об’єктив; 2 – предметне скло;
- 3 – об’єкт;
- 4 – імерсійна олія;
- 5 – промені світла;
- 6 – фронтальна лінза об’єктива.

Таким чином, мікроскопія в темному полі заснована на висвітленні об’єкта косими променями світла. Ці промені, не потрапляючи в об’єктив, залишаються невидимими для ока, тому поле зору виглядає зовсім чорним (рис. 1.4).

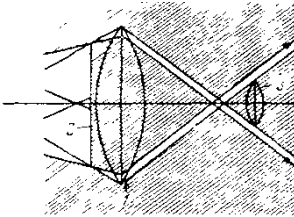


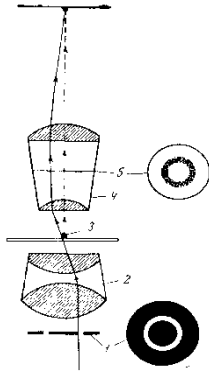
Рис. 1.4. Схема ходу променів у конденсорі темного поля:

- 1 – лінза конденсора;
- 2 – чорна пластинка;
- 3 – об’єктив.

Якщо препарат містить якісь частки, наприклад, мікроорганізми, то косі промені, проходячи через такий препарат, у значній мірі відбиваються від поверхні цих часток і, ухиляючись від свого первісного напрямку, попадають в об’єктив. Тоді спостерігач бачить на чорному фоні інтенсивно світні об’єкти з різким бічним контрастом. При цьому апертура конденсора повинна бути трохи більше апертури об’єктива (об’єктив необхідно діафрагмувати, а конденсор імергувати).

#### *Фазово-контрастна мікроскопія*

Більшість препаратів живих мікроорганізмів слабо контрастні, тобто клітини мало відрізняються за забарвленням і прозорості від навколишнього середовища. Проте світлова хвиля набуває певних змін: проходячи через ділянки препарату, що мають більший, ніж у навколишнього середовища показник заломлення, вона виходить із деяким відставанням за фазою. Спеціальний фазово-контрастний пристрій дозволяє оптичним шляхом перетворювати розходження за фазою в зміни амплітуди, у результаті чого живі прозорі об’єкти стають контрастними, їх можна побачити оком.



Оптична система, яка використовується для одержання фазового контрасту, складається з фазової пластинки в одній з лінз об'єктива, що має форму кільця, і кільцевої діафрагми в спеціальному конденсорному пристрої. Для одержання фазового ефекту необхідно точне сполучення фазового кільця з проекцією кільцевої діафрагми (рис. 1.5).

Рис. 1.5. Схема ходу промінів із використанням фазово-контрастного пристрою: 1- кільцева діафрагма; 2- конденсор; 3- об'єкт; 4- об'єктив; 5- фазова пластинка.

### Хід роботи:

#### 1. Ознайомлення з будовою мікроскопа:

- ✓ Вивчіть основні частини мікроскопа.
- ✓ Ознайомтеся з механізмами налаштування освітлення, фокусування.

#### 2. Підготовка до роботи:

- ✓ Протріть оптичні частини мікроскопа спеціальним папером для оптики.
- ✓ Налаштуйте освітлення за допомогою дзеркала або лампи.

#### 3. Спостереження за мікропрепаратами:

- ✓ Помістіть постійний препарат на столик мікроскопа, зафіксуйте його тримачем.
- ✓ Налаштуйте об'єктив на мінімальне збільшення та знайдіть об'єкт.
- ✓ Перемикайте об'єктиви, переходячи до більшого збільшення.
- ✓ Для роботи з іммісійним об'єктивом нанесіть краплю іммісійного масла на препарат.

#### 4. Вивчення об'єктів:

- ✓ Опишіть форму, розміри та особливості структури мікроорганізмів, які спостерігали.
- ✓ Використовуйте креслення для фіксації побаченого.

### Контрольні запитання:

1. Назвіть основні частини світлового мікроскопа та їх функції.
2. Як розрахувати загальне збільшення мікроскопа?
3. Які принципи роботи іммісійного об'єктива?

4. У чому різниця між мікроскопією у світлому та темному полі?
5. Чому важливо чистити оптичні частини мікроскопа?

### **Звіт:**

1. Схематично зобразіть будову мікроскопа, підписавши основні частини.
2. Опишіть послідовність налаштування мікроскопа.
3. Надайте результати спостережень із описом побачених мікроорганізмів.
4. Дайте відповіді на контрольні запитання.

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3 МЕТОДИ ПРИГОТУВАННЯ ТА СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ У МІКРОБІОЛОГІЇ**

**Мета:** Ознайомитися з видами живильних середовищ, їх складом та значенням у мікробіології. Вивчити основні методи приготування живильних середовищ. Опанувати методи стерилізації живильних середовищ для забезпечення їх стерильності.

**Матеріали та обладнання:** Хімічні реактиви для приготування живильних середовищ (м'ясний екстракт, пептон, агар-агар, глюкоза тощо); вода дистильована; лабораторний посуд (мензурки, мірні колби, пробірки, чашки Петрі); автоклав або стерилізатор; ваги, нагрівальний прилад (електроплитка або водяна баня); рН-метр або індикаторний папір; лабораторний журнал.

### **Теоретична частина:**

#### **1. Живильні середовища у мікробіології:**

- ✓ Класифікація живильних середовищ за складом (прості, складні), консистенцією (рідкі, напівтверді, тверді) та призначенням (загального призначення, селективні, диференційно-діагностичні).
- ✓ Вимоги до живильних середовищ: стерильність, оптимальний рН, наявність необхідних поживних речовин.

#### **2. Приготування живильних середовищ:**

- ✓ Рецептури найбільш поширених середовищ: живильний бульйон, агар, середовище Сабуро.
- ✓ Регулювання рН за допомогою кислот або лугів.
- ✓ Розлив у посуд до стерилізації (пробірки, чашки Петрі).



### 3. **Методи стерилізації:**

- ✓ Автоклавування (термічний метод): принцип дії автоклава, параметри (температура, тиск, час).
- ✓ Стерилізація фільтруванням: застосування для термолабільних речовин.
- ✓ Обробка сухим жаром.

#### *Методи стерилізації*

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

#### *Термічна стерилізація*

Прожарювання вогнем (фламбування) застосовують безпосередньо перед використанням для стерилізації петель, голок, пінцетів, ножиць, шпательів, скляних паличок, предметних та покровних скелець та іншого дрібного інструменту.

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

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

Стерилізацію сухим жаром при температурі 170°C, 160°C або 140°C здійснюють у сушильних шафах відповідно протягом 1 год, 2 год та 3 год. Нагрівання за допомогою сухого жару справляє значно слабший вплив на мікроорганізми, ніж волога пара. В той же час можуть серйозно пошкоджувати такі матеріали, як гума, папір, вата, тканина. Тому цей прийом переважно використовують

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

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

Таблиця 1

Температура насиченої пари при різних тисках

Тиск			Температура, °C
атм	атм (надлишковий)	кПа	
1,0	0,0	101,32	100
1,5	0,5	151,98	111
2,0	1,0	202,65	121
2,5	1,5	251,20	128
3,0	2,0	299,75	134

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини, і найстійкіші спори. Стерилізацію парою під тиском здійснюють у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах.

Для правильного автоклавування необхідно повністю витіснити повітря з робочої камери, оскільки повітря затримується між предметами, які автоклабуються, внаслідок чого вони можуть не нагріватися до заданої температури. Крім того, заповнювати автоклав слід таким чином, щоб не перешкоджати вільному рухові повітря.

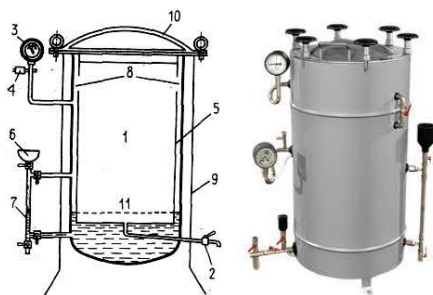


Рис. 1. Схема та зовнішній вигляд автоклава: 1— стерилізаційна камера; 2 — отвір для виходу повітря; 3 — манометр; 4 — запобіжний клапан; 5 — водопарова камера; 6 — лійка для заповнення автоклава водою; 7 — водомірна трубка; 8 - отвір для надходження пари в камеру стерилізації; 9 — захистний кожух; 10 — кришка автоклава; 11 — підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються.

Перед стерилізацією живильні середовища і посуд слід ізолювати від зовнішнього середовища. Для цього колби і пробірки закривають ватними корками: чашки Петрі, піпетки, шпателі загортають у папір чи кладуть у паперові пакети. Посуд, зазвичай, стерилізують при 1 атм. 20 - 30 хв.

Температура і тривалість автоклавування живильних середовищ визначається, перш за все, їх складом. Термолабільні субстрати (молоко, желатинові середовища, середовища з цукрами, вітаміни тощо) зазвичай стерилізують при 0,5 атм., протягом 15 – 30 хв, пивне сусло та суслоагар при 0,7 атм 20 хв, м'ясосептонні середовища при 1 атм. 20 хв. Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкцій.

*Автоклавування.* Окремі операції процесу стерилізації в автоклавах різних типів можуть бути декілька різними. Відповідно трохи розрізняється і техніка роботи з ними. Проте загальний принцип проведення стерилізації в різних автоклавах один і той же.

Перед роботою оглядають автоклав і контрольно-вимірну апаратуру. За наявності будь-якої несправності (зміщення стрілки манометра з нуля, тріщина на водомірній трубці і ін.) працювати з автоклавом не можна.

Після огляду автоклава у водопарову камеру наливають воду до верхньої відмітки через водомірну трубку. У деяких автоклавах граничний рівень заповнення водою контролюється воронкою. У камеру стерилізації на спеціальну підставку поміщають матеріал, що стерилізується. Предмети слід розміщати не дуже щільно,

оскільки пара повинна вільно проходити між ними, інакше вони не нагріваються до потрібної температури і можуть залишитися нестерильними. Завантаживши камеру стерилізації, встановлюють і щільно закривають кришку автоклава. Потім відкривають кран, що сполучає камеру стерилізації із зовнішнім повітрям, і включають нагрів.

Після початку паротворення видаляють повітря із стерилізаційної камери. Це необхідна умова стерилізації, оскільки при одному і тому ж тиску температура чистої пари вища за температуру суміші пари і повітря. Тому якщо в автоклаві залишиться повітря, матеріал може не простерилізуватися. Найбільш простий і дуже поширений спосіб звільнення автоклава від повітря — витіснення повітря парою. Пару і конденсат відводять або в ємкість з водою, або в спеціальний пристрій, який з'єднаний з каналізацією. У першому випадку на кран (2) надівають гумовий шланг, який опускають у воду. Початком продування вважають появу стійкого безперервного струменю чистої пари. Поки в автоклаві ще є повітря, суміш повітря і пари, проходять через воду, утворюючи сильний тріск. Чиста пара виходить з рівномірним шипучим звуком. Його пропускають протягом 10 хв. У цілому вся операція з моменту появи пари з повітрям повинна займати не більше 15—20 хв, інакше в автоклаві залишиться мало води і він може зіпсуватися. Щоб зменшити витрати пари (води), кран відкривають не повністю. Ступінь відкриття крана встановлюють на практиці при експлуатації автоклава. У найбільш досконалих автоклавах повітря із стерилізаційної камери видаляють за допомогою вакуумного насоса.

Після витіснення повітря, закривають паровідвідний кран, і тиск пари доводять до відповідного режиму стерилізації. Режим автоклавовання часто виражають в одиницях надмірного тиску, указуючи при цьому тривалість його підтримки. Наприклад: стерилізація при 1 аті протягом 20 хв. На манометрі автоклава позначається саме той додатковий тиск, який створюється в автоклаві понад нормального. Нерідко режим автоклавовання характеризують температурою і часом. Як тільки стрілка манометра дійде до певного додаткового тиску і, температура пари досягне відповідного значення, підтримують тиск на цьому рівні необхідний час шляхом ручного або автоматичного регулювання подачі пари. У автоклавах з вогняним обігрівом подачу пари

регулюють інтенсивністю горіння, в автоматичних автоклавах — електростатичним манометром.

Після закінчення часу стерилізації вимикають нагрів автоклава. Тиск в автоклаві поступово падає і порівнюється з атмосферним. Лише після цього відкривають кран, що виводить пару. Передчасне відкриття крана недопустиме, оскільки перегріті середовища при різкому зниженні тиску відразу ж бурхливо закипають, змочують і навіть іноді виштовхують ватяні пробки, що порушує згодом стерильність матеріалу. Коли пара вийде, відкривають кришку автоклава, дотримуючись при цьому обережності щоб уникнути опіку паром особи і рук. Видалення пари з камери стерилізації автоклавів, оснащених вакуумним насосом, здійснюють за допомогою насоса. Одночасно відбувається підсушування стерильного матеріалу.

Оскільки автоклав є апаратом, що працює при високих тисках і температурах, неправильне поводження з ним може бути причиною нещасних випадків. Установка автоклава і робота з ним проводиться при строгому і точному виконанні правил, вказаних в тій, що додається до апарату - інструкції. До роботи допускаються тільки підготовлені особи.

При необхідності проконтролювати температуру в автоклаві користуються різними речовинами, плавкими при визначеній температурі. Ці речовини заздалегідь змішують з нейтральними фарбниками і поміщають в автоклав до початку стерилізації. Як індикатори температури використовують фенантрен (температура плавлення 98—100°), бензаурин (115°), сірку (119°), бензойну кислоту (121—122°), сечовину (132°), глюкозу (146°), тиомочевину (180°), аскорбінову кислоту (187—192°). На 100 г цих речовин беруть 0,01 г фарбника (фуксин, метиленовий синій), ретельно змішують, розсипають в скляні трубочки з однаковим діаметром і товщиною стінок, запаюють і у вертикальному положенні розкладають між матеріалом, що стерилізується, в автоклаві. Після досягнення в судині відповідної температури ці речовини розплавляються і забарвлюються в колір доданого до них фарбника.

### ***Підготовка середовищ до стерилізації.***

При автоклавованні 3—5% рідин втрачається в наслідок випаровування, тому рекомендується в середовища, що готуються,

додавати понад об'єм приблизно 5% води. Тоді після стерилізації середовище (розчин) матиме необхідну концентрацію.

Середовища зазвичай стерилізують в пробірках, колбах, бутлях. Ємкості заповнюють середовищем не більш ніж на половину їх висоти, щоб запобігти змочуванню пробок. Судини з середовищами закривають ватними пробками. Вони оберігають середовище від зараження мікроорганізмами, які знаходяться в навколишньому середовищі. Пробки повинні бути достатньо щільними, але з рівномірним розподілом волокон вати, оскільки через них відбувається газообмін культури з навколишнім середовищем.

Для приготування пробки плоский шматок вати, узятий уздовж волокна, скачують валіком. Щоб додати пробці міцність, її прокатують між долонею і чистим склом. Довжина пробки для звичайної пробірки приблизно 4 см. Пробка повинна входити в пробірку на 1,5—2,0 см (мал. 2,3). Для збереження форми пробку виймають з шийки, злегка обертаючи. Зручно обернути пробку чистою марлевою серветкою.

Перед стерилізацією пробки можна прикрити паперовими ковпачками. Не можна обгортати пробки колб, які стерилізують в автоклаві, целофаном, фольгою або іншими матеріалами, які не пропускають пару.

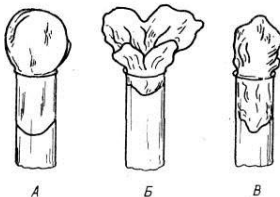


Рис. 2. Ватні пробки:

*А — приготовлена правильно; Б і В — приготовлені неправильно*



Рис. 3 Лабораторний посуд закритий ватними та паперовими пробками

## *Хімічна стерилізація*

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

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

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

### *Стерилізація ультрафіолетовими променями*

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

### *Стерилізація фільтруванням*

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

У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують:

1. Мембранні (колоїдні) фільтри, виготовлені на основі ефірів целюлози. Це диски різного діаметру товщиною 0,1- 0,5 мм. Розміри пор вітчизняних мембранних фільтрів коливаються в межах від 0,35 до 3,5 мкм. Фірма “Міліпор” (Франція, США) продукує фільтри з розміром пор від 0,01 до 14 мкм, фірма “Синпор”(Чехія) – від 0,12 до 4 мкм. На практиці придатність фільтрів для стерилізації встановлюють шляхом пробного фільтрування через них суспензії дрібних мікроорганізмів (наприклад, *Serratia marcescens*). Для перевірки на стерильність фільтрат у великих кількостях висівають на живильні середовища. Якщо протягом 5-ти діб тестмікроорганізм не проросте, фільтри можуть бути використані для стерилізації.

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

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

Серйозним недоліком цього способу стерилізації є те, що фільтрування через будьякий фільтр, окрім видалення з розчину суспендованих у ньому частинок, може також призвести до різкої зміни властивостей фільтрату.

Так, при фільтруванні може змінюватись рН незабуференого розчину, у фільтрат можуть потрапляти різного роду іони, гліцерин тощо.

Прибори для стерилізації фільтруванням зображені на мал.4.

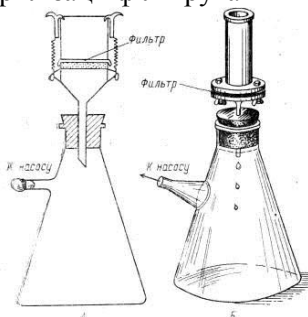


Рис. 4. Прибори для стерилізації фільтруванням:  
А — зі скляним утримувачем; Б — с металевим утримувачем фільтра від 9 до 1,2 мкм.



### *М'ясопептонний бульйон (МПБ).*

Основою для його виготовлення служить м'ясна вода, яку готують таким чином: пропущене через м'ясорубку волове м'ясо, попередньо звільнене від жиру, кісток і сухожил'я заливають подвійним об'ємом водопровідної води та витримують год при температурі, близькій до кипіння, або при кімнатній температурі протягом 13 – 15 год. Настій кип'ятять 1 год з м'ясом або без нього, і фільтрують через кілька шарів марлі. До 1 л отриманої м'ясної води додають 10 г пептону і 15 г хлориду натрію, доводять рН до значення 7,0 і знову кип'ятять протягом 20 хв. Доливають водою до початкового об'єму і фільтрують, розливають в колби і пробірки та стерилізують протягом 20 хв в автоклаві при температурі 120°C. Готовий бульйон повинен бути прозорим і мати янтарно-жовтий колір.

Для отримання м'ясопептонного агару (МПА) до МПБ додають 1,5 - 2,5 % агару. МПБ і МПА стерилізують при 1 атм (120°C) протягом 20 хв у колбах закритих ватними пробками.

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

Пивне сусло готують на пивоварних заводах з ячмінного солоду.

До нього входять вуглеводи (мальтоза, декстрини), азотовмісні сполуки, а також вітаміни групи В, органічні кислоти і мінеральні солі.

Для усунення білків сусло фільтрують, за допомогою сахариметра визначають у ньому концентрацію вуглеводів у градусах Балінга (°Б), які приблизно відповідають відсотковому вмісту цих речовин. Для культивування дріжджів і грибів використовують сусло з концентрацією 68°Б, для молочнокислих бактерій – 812°Б.

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

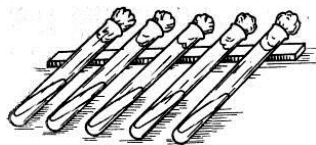


Рис. 5. Приготування агаризованого середовища в пробірках *Дріжджовий екстракт*. 1 кг пресованих дріжджів розводять в 1 л води, кип'ятять протягом 1 год, кілька разів фільтрують і стерилізують при 0,5 атм протягом 30 хв.

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

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

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

Комплексний дріжджовий ферментний препарат готують з промитих дріжджів шляхом обробки суспензії концентрацією 67% від сухої речовини на ультразвуковому пастеризаторі з гідравлічним випромінювачем 35 кГц. За доли секунд досягається відмирання дріжджових клітин при цьому ферменти зберігають свою активність.

Термін зберігання дріжджового препарату у вигляді пасти до 20 діб при температурі 24°С. Комплексний дріжджовий ферментний препарат слугує біологічним каталізатором біохімічних реакцій і біостимулятором мікроорганізмів.

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

Поряд з натуральними і синтетичними виділяють так звані напівсинтетичні середовища. Основним їх компонентом є синтетичні середовища, до яких додають у невеликій кількості речовини невизначеного складу: пептон (джерело азотного живлення), дріжджовий автолізат (джерело вітамінів групи В, піримідинових і пуринових основ), гідролізат казеїну (джерело амінокислот). Напівсинтетичні середовища широко застосовуються в мікробіологічній промисловості для отримання вітамінів, антибіотиків, амінокислот тощо.

Селективні середовища забезпечують переважний розвиток певної групи мікроорганізмів, для якої характерні подібні культуральні потреби. Ці середовища дозволяють вирощувати окремі види мікроорганізмів без попередньої стерилізації. Вони призначені для виділення мікроорганізмів з місць їх природного існування і отримання накопичувальних культур.

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

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

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

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

Агар складний полісахарид, який отримують з морських водоростей. Він здатний утворювати гелі, які плавляться при температурі приблизно 100°C і стають твердими при 45°C. Агар не розщеплюється під дією більшості мікроорганізмів. За необхідності

його можна використовувати кілька разів після кількразового промивання дистильованою водою і наступного фільтрування.

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

Таблиця 2.

Співвідношення між температурою, тиском і часом стерилізації в автоклаві.

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

Завдання: Розрахуйте наважки компонентів для приготування 150 мл середовища наступного складу: джерело вуглеводів – 2%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,3%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,015%;  $\text{NaCl}$  – 0,015%;  $\text{KCl}$  – 0,007%;  $\text{MgSO}_4$  – 0,005%;  $\text{FeSO}_4$  – 0,001%.

2. Приготуйте МПА для подальших лабораторних робіт.

#### Практична частина:

##### 1. Приготування живильного середовища:

- ✓ Відважте необхідну кількість компонентів згідно з рецептурою.
- ✓ Розчиніть компоненти у дистильованій воді, перемішайте до повного розчинення.
- ✓ Визначте рН середовища та за необхідності скоригуйте його.
- ✓ Розлийте середовище в пробірки або колби для подальшої стерилізації.

##### 2. Стерилізація живильного середовища:

- ✓ Завантажте підготовлений посуд із середовищем в автоклав.
- ✓ Проведіть автоклавування при температурі 121 °С і тиску 1 атм протягом 15-20 хвилин.
- ✓ Після завершення стерилізації обережно дістаньте посуд і охолодіть його.

### 3. Контроль стерильності:

- ✓ Помістіть кілька проб стерилізованого середовища в термостат при 37 °С на 24-48 годин.
- ✓ Перевірте наявність контамінації (помутніння, осад).

#### Контрольні запитання:

1. Які види живильних середовищ використовуються у мікробіології?
2. Чому важливо підтримувати оптимальний рН середовища?
3. Опишіть принцип роботи автоклава та його значення у стерилізації.
4. Як проводиться контроль стерильності живильного середовища?
5. Які переваги та недоліки має стерилізація фільтруванням?

#### Звіт:

1. Запишіть рецептуру приготованого живильного середовища.
2. Опишіть послідовність дій під час приготування та стерилізації.
3. Надайте результати контролю стерильності.
4. Дайте відповіді на контрольні запитання.

**Примітка:** під час роботи з автоклавом суворо дотримуйтесь техніки безпеки. Уникайте перегріву середовищ, що може призвести до їх псування або втрати поживних властивостей.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

### МЕТОДИ МІКРОСКОПІЇ: СВІТЛОВА, ТЕМНОПОЛЬНА ТА ФАЗОВО-КОНТРАСТНА МІКРОСКОПІЯ

**Мета:** Ознайомитися з основними методами мікроскопії, що використовуються у мікробіології. Вивчити будову та принцип роботи світлового мікроскопа. Опанувати техніку підготовки та дослідження мікробіологічних препаратів за допомогою світлової, темнопольної та фазово-контрастної мікроскопії.

**Матеріали та обладнання:** світловий мікроскоп; предметні та покривні скельця; приготовані мікробіологічні препарати (фіксовані мазки, водні суспензії мікроорганізмів); барвники (метиленовий синій, фуксин, сафранін); масло для імерсійної мікроскопії; серветки для очищення лінз.

## Теоретична частина:

### 1. Світлова мікроскопія:

- ✓ Основні елементи мікроскопа: окуляр, об'єктиви, конденсор, джерело світла.
- ✓ Принцип роботи: створення збільшеного зображення об'єкта за допомогою лінз.
- ✓ Застосування імерсійного масла для збільшення роздільної здатності.

### 2. Темнопольна мікроскопія:

- ✓ Особливості: використання спеціального конденсора для створення темного фону.
- ✓ Переваги: можливість спостерігати живі та рухомі мікроорганізми без фарбування.
- ✓ Основні застосування: виявлення спірохет, дрібних бактерій.

### 3. Фазово-контрастна мікроскопія:

- ✓ Принцип роботи: перетворення фазових змін світла, що проходить через об'єкт, у зміни амплітуди для підвищення контрасту.
- ✓ Переваги: дослідження живих клітин і прозорих об'єктів без фарбування.
- ✓ Застосування: вивчення клітинної морфології, структури та руху.

## Практична частина:

### 1. Підготовка мікроскопа:

- ✓ Встановіть мікроскоп на рівну поверхню.
- ✓ Перевірте чистоту лінз окуляра та об'єктивів. За необхідності очистіть їх серветкою.

### 2. Світлова мікроскопія:

- ✓ Помістіть фіксований мазок на предметний столик.
- ✓ Почніть дослідження з малого збільшення, поступово переходьте до імерсійного об'єктива (100×).
- ✓ Нанесіть краплю імерсійного масла перед використанням імерсійного об'єктива.

### 3. Темнопольна мікроскопія:

- ✓ Замініть конденсор на темнопольний.
- ✓ Встановіть зразок (водну суспензію мікроорганізмів) на предметне скельце.
- ✓ Відрегулюйте освітлення для досягнення темного фону.

### 4. Фазово-контрастна мікроскопія:

- ✓ Використовуйте фазово-контрастний об'єктив і конденсор.
- ✓ Підготуйте зразок (водна суспензія або прозорий препарат).
- ✓ Спостерігайте за живими клітинами, налаштовуючи контраст і яскравість.

### **Контрольні запитання:**

1. Опишіть будову та принцип роботи світлового мікроскопа.
2. Які переваги має темнопольна мікроскопія у порівнянні зі світловою?
3. Для чого застосовується фазово-контрастна мікроскопія?
4. Як використовувати імерсійне масло під час мікроскопії?
5. Які об'єкти найбільш ефективно вивчати за допомогою темнопольної мікроскопії?

### **Звіт:**

1. Накресліть схему будови світлового мікроскопа та підпишіть його основні елементи.
2. Опишіть процедуру роботи з темнопольним і фазово-контрастним мікроскопами.
3. Надайте відповіді на контрольні запитання.
4. Додайте спостереження та результати дослідження при використанні кожного методу мікроскопії.

**Примітка:** Робота з мікроскопом вимагає обережності. Уникайте торкання лінз руками та переконайтеся, що після роботи всі інструменти та поверхні очищені належним чином.

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5**

### **ФАРБУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ: ПРОСТІ ТА СКЛАДНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ**

**Мета:** вивчити основні методи фарбування мікроорганізмів; навчитися виконувати прості та складні методи фарбування; ознайомитися з методикою мікроскопії фарбованих препаратів.

**Матеріали та обладнання:** фіксовані мазки мікроорганізмів; барвники: метиленовий синій, сафранін, фуксин Циля, розчин йоду; реактиви для складних методів фарбування (грамове фарбування); світловий мікроскоп; предметні та покривні скельця; пінцет, піпетки, штатив для фарбування; спиртівка або пальник.

#### **Теоретична частина:**

##### **1. Методи фарбування мікроорганізмів:**

- ✓ *Просте фарбування:* використання одного барвника для візуалізації клітинної морфології (форма, розмір).

- ✓ *Складне фарбування*: застосування кількох барвників для розділення мікроорганізмів за специфічними ознаками (грамове фарбування, метод Циля-Нільсена).

## 2. **Грамове фарбування:**

- ✓ Розділення бактерій на грампозитивні та грамнегативні за будовою клітинної стінки.
- ✓ Послідовність: фарбування кристаловим фіолетовим, обробка йодом, промивання спиртом, дофарбування сафраніном.

## 3. **Значення фарбування в мікробіології:**

- ✓ Виявлення морфологічних особливостей клітин.
- ✓ Розподіл бактерій на групи для подальшої ідентифікації.

***Виготовлення препаратів-мазків з культури, яка виросла на твердому середовищі.*** Знежирене предметне скельце пропалюють у полум'ї газового пальника і після охолодження кладуть на робоче місце. Бактеріологічну петлю, тримаючи як олівець вертикально у правій руці, прожарюють у полум'ї, спочатку кінець петлі, потім її металеву частину. Не випускаючи петлі, лівою рукою беруть пробірку з 0,9% розчином хлориду натрію і зажимають ватно-марлеву пробку 4-им і 5-им пальцями правої руки, витягують її, і край пробірки проносять через полум'я пальника. Тримають пробірку на віддалі до 20 см від полум'я, не випускаючи пробки. Петлю вводять у пробірку і охолоджують, торкаючись її стінок. Занурюючи петлю в рідину, набирають краплю фізрозчину. Виймають петлю, проводять край пробірки і пробку через полум'я, після чого її закривають і ставлять у штатив. На центр скельця бактеріологічною петлею наносять краплю фізрозчину. На добре знежиреному скельці вона розтікається рівномірно.

Знову стерилізують петлю, і в ліву руку беруть пробірку зі скошеним агаром, на якому виросла культура мікроорганізмів. Відкривають пробірку із додержанням усіх правил, охолоджують петлю і набирають нею невелику кількість культури. Петлю виймають, а пробірку закривають і ставлять у штатив.

Культуру петлею наносять біля ізотонічного розчину хлориду натрію і, поступово розтираючи його по склу та емульгуючи в краплі, готують тонкий, рівномірний мазок округлої чи овальної форми діаметром 1-1,5 см. Після цього петлю прожарюють і ставлять у штатив.



**Виготовлення препаратів-мазків з культури, яка виростає в рідкому живильному середовищі.** Бактеріологічною петлею набирають краплю рідкого живильного середовища, в якому ростуть мікроорганізми, із додержанням правил стерильності, як описано вище. Торкаються петлею центра предметного скла і роблять рівномірний тонкий мазок.

Якщо для забору матеріалу використовують пастерівську піпетку, то її також тримають у правій руці та прожарюють у полум'ї перед внесенням у пробірку. Тонкий кінчик піпетки після охолодження біля стінки пробірки занурюють у рідину, тримаючи верхній кінець її відкритим. Після попадання в піпетку рідкого середовища я мікробами, верхній кінець її закривають вказівним пальцем правої руки, виймають з пробірки, проносять її відкритий кінець і корок через полум'я і закривають.

На поверхню предметного скельця випускають краплю середовища, а піпетку після цього занурюють у посуд із дезинфікуючим розчином, який повинен бути на кожному робочому місці. Стерильною бактеріологічною петлею роблять мазок.

**Виготовлення препаратів для дослідження мікроорганізмів у живому стані.** Для цього використовують методи «висячої» та «роздавленої» краплі.

Препарат для «висячої» краплі готують на покривному скельці, на яке наносять краплю бульйонної культури мікроорганізмів. Якщо використовується культура, яка виростає на агарі, спочатку на скельце наносять краплю стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, потім у нього стерильною петлею вносять культуру мікробів.

Спеціальне предметне скельце з лункою, краї якої попередньо змащені вазеліном, притуляють до покривного скельця з краплею так, щоб вона знаходилась у центрі лунки, і перевертають препарат покривним скельцем догори. Якщо препарат виготовлено правильно, то крапля вільно звисає у лунку, не торкаючись її поверхні.

Для мікроскопування спочатку використовують мале збільшення мікроскопа  $\times 8$ . При опущеному конденсорі для кращого контрастування знаходять край краплі, потім встановлюють об'єктив  $\times 40$  і досліджують препарат.

Препарат «роздавленої» краплі відрізняється від «висячої» тим, що краплю з мікроорганізмами готують на звичайному знежиреному предметному склі, а потім покривають її покривним скельцем, стежачи за відсутністю бульбашок повітря. Умови мікроскопування аналогічні до тих, що використовуються при «роздавленій» краплі.

Після мікроскопії препарати опускають у банку з дезрозчином.

**Методика виготовлення та забарвлення мазків.** Мазок перед забарвленням висушують на повітрі або над полум'ям пальника і фіксують після повного висихання. Фіксацію проводять у полум'ї пальника, тричі проносячи скельце через полум'я стороною, на якій немає мазка. Необхідно стежити, щоб загальний час перебування препарату в полум'ї не перевищував 5-6 секунд. Достатність фіксації можна перевірити, торкнувшись тильною стороною скельця шкіри кисті: скло повинно бути гарячим, але не створювати відчуття опіку.

Фіксування проводять для того, щоб вбити мікроорганізми і прикріпити їх до скла. Вбиті бактерії краще сприймають барвники.

Зафіксований препарат кладуть на спеціальну підставку над лотком, наносять одну-дві краплини барвника. Фарбувати мазок фуксином Пфейффера необхідно 1-2 хв, а лужним метиленовим синім - 3-5 хв.

Після забарвлення препарат промивають водопровідною водою до зникнення струмочків барвника, висушують фільтрувальним папером і мікроскопують.

У повсякденній мікробіологічній практиці найчастіше використовуються основні барвники: фуксин основний, нейтральний червоний, конго червоний (дають червоне забарвлення), метиленовий та толуїдиновий синій (голубе, синє), генціанвіолет, метиленовий фіолетовий (фіолетове), хризоїдин, везувін (жовто-коричневе), брильянтовий зелений, малахітовий зелений (зелене) та інші.

Існуючі методи фарбування можна поділити на прості й складні. При простих використовують один барвник, який надає змогу виявити, в основному, форму мікроорганізмів.

## **Практична частина:**

### **1. Просте фарбування:**

- ✓ Нанесіть краплю води на предметне скельце.
  - ✓ Додайте невелику кількість бактеріального матеріалу, розітріть його у воді та висушіть.
  - ✓ Зафіксуйте мазок, провівши скельце кілька разів над полум'ям спиртівки.
  - ✓ Нанесіть барвник (наприклад, метиленовий синій) на мазок на 1-2 хвилини.
  - ✓ Змийте барвник водою, висушіть препарат і досліджуйте під мікроскопом.
- 2. Грамове фарбування:**
- ✓ Підготуйте фіксований мазок, як описано вище.
  - ✓ Нанесіть кристаловий фіолетовий на 1 хвилину.
  - ✓ Промийте водою і обробіть розчином йоду на 1 хвилину.
  - ✓ Змийте йод водою, обробіть спиртом (5-10 секунд), промийте водою.
  - ✓ Дофарбуйте сафраніном на 1-2 хвилини, змийте водою і висушіть.
  - ✓ Досліджуйте препарат під мікроскопом, зазначаючи колір клітин.

#### **Контрольні запитання:**

1. У чому полягає різниця між простим та складним методами фарбування?
2. Яке значення має грамове фарбування у мікробіології?
3. Яка послідовність дій при грамовому фарбуванні?
4. Чому грамозитивні бактерії фарбуються у фіолетовий, а грамнегативні — у червоний колір?
5. Як впливає правильна фіксація мазка на якість фарбування?

#### **Звіт:**

1. Опишіть процедуру виконання простого та грамового фарбування.
2. Надайте схематичні малюнки спостережень під мікроскопом.
3. Дайте відповіді на контрольні запитання.

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6**

#### **КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ НА РІДКИХ ТА ТВЕРДИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ**

**Мета:** дослідити ріст і розвиток мікроорганізмів на рідких та твердих живильних середовищах; оцінити морфологію колоній на

твердих середовищах; ознайомитися з методами культивування та ідентифікації мікроорганізмів за культуральними властивостями.

**Матеріали та обладнання:** рідкі живильні середовища (м'ясо-пептонний бульйон, глюкозний бульйон); тверді живильні середовища (м'ясо-пептонний агар, агар Сабуро); посівний матеріал (чиста культура бактерій або грибів); стерильні піпетки, шпателі, петлі для посіву; чашки Петрі, пробірки; термостат; лупа або стереомікроскоп.

### **Теоретична частина:**

#### **1. Культуральні властивості мікроорганізмів:**

- ✓ Ріст у рідких середовищах: рівномірне помутніння, осад, плівка.
- ✓ Формування колоній на твердих середовищах: форма, розмір, колір, край, текстура, прозорість.

#### **2. Методи посіву:**

- ✓ На рідкі середовища: інокуляція стерильною петлею або піпеткою.
- ✓ На тверді середовища: штриховий посів для отримання ізольованих колоній.

#### **3. Значення культуральних властивостей:**

- ✓ Ідентифікація видів мікроорганізмів.
- ✓ Визначення оптимальних умов для росту.

**Культуральні властивості мікроорганізмів** – це характер росту мікробів на твердих, рідких і напіврідких середовищах. Вони використовуються поряд з іншими показниками при визначенні родової або видової належності мікроорганізмів. Для кожного мікроорганізму характерні певні ознаки росту на поживних середовищах, які в них з часом можуть змінюватися. Тому прийнято характеризувати їх в більшості у 16–18 годинних культурах, за виключенням деяких (збудники бруцельозу та туберкульозу) з повільним ростом впродовж 1–2 міс. Ознаками росту мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі є утворення каламуті, поверхневої плівки, пристінного кільця та осаду. Помутніння може бути інтенсивним, помірним, слабким або у вигляді опалесценції, а деякі види (лептоспіри) взагалі не викликають його. Після осідання каламуті утворюється осад, який може бути багатий, незначний, щільний, пухкий, зернистий, у вигляді шматочка вати, пластівцевий, крихкий, слизовий, сіруватого, білого жовтого або зеленуватого кольору. Певне

діагностичне значення має поведження осаду при струшуванні пробірки: він може утворювати рівномірне помутніння, великі та дрібні пластівці, підніматися вгору у вигляді «муарових хвиль», «косичок», «шматочка вати», з помутнінням середовища або без нього. Деякі мікроорганізми можуть утворювати поверхневу плівку, яка буває тоненькою, сітчастою, грубою, складчастою, пухнастою, крихкою, слизовою та різного кольору, а інші ростуть на поверхні у вигляді пристінного кільця. На щільних середовищах мікроорганізми ростуть утворюючи колонії або у вигляді суцільного нашарування. Колонії бувають поверхневими, придонними та в товщі агару. Колонії мікробів на МПА (у чашках чи пробірках) спочатку розглядають неозброєним оком, а потім із допомогою лупи. Звертають увагу на :

- характер росту: пишний, помірний, бідний;
- форму колоній: округла, овальна, коренеподібна, зіркоподібна;

- розмір колоній: великі – діаметр перевищує 4 мм; середні – діаметр 2–4мм; дрібні – діаметр 1–2 мм та мізерні (росинки – діаметр менше 1 мм);

- краї: рівні, зубчасті, кучероподібні, хвилясті, бахромчасті; - поверхню: гладенька, зморшкувата, складчаста, горбиста, матова, борошниста, борозниста;

- рельєф (профіль): плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний;

- прозорість: прозора, непрозора, каламутна, блискуча, флуоресціююча;

- колір: сірувато-білий, блакитний, золотистий, червоний, оранжевий, зелений, синій або безбарвний; - консистенція: тверда, крихка, слизувата, тістоподібна, масляниста;

- структура: однорідна, волокниста, плівчаста, зерниста.

Колонії з рівними краями та гладенькою поверхнею відносять до S-форм, з нерівними краями та шорсткою поверхнею – до R-форм, а слизові – до M-форм. Наявність протеолітичних ферментів у деяких мікроорганізмів призводить до розрідження желатини з різною інтенсивністю і формою, що залежить від виду мікроба (суцільне, пошироне, у вигляді лійки, кратера та панчохи). Аероби ростуть у верхній частині середовища, анаероби – у нижній, а факультативні анаероби – уздовж всього середовища. Враховують також газоутворення.

## **Практична частина:**

### **1. Посів у рідкі середовища:**

- ✓ Підготуйте стерильні пробірки з рідкими середовищами.
- ✓ Використовуючи стерильну петлю або піпетку, внесіть посівний матеріал у пробірки.
- ✓ Інкубуйте пробірки у термостаті при температурі 37 °С протягом 24-48 годин.
- ✓ Спостерігайте за результатами: помутніння, утворення осаду чи плівки.

### **2. Посів на тверді середовища:**

- ✓ Розподіліть посівний матеріал на поверхні твердого середовища у чашках Петрі штриховим методом.
- ✓ Інкубуйте чашки у термостаті при температурі 37 °С протягом 24-48 годин.
- ✓ Спостерігайте за ростом колоній: оцініть форму, розмір, текстуру, колір.

### **3. Аналіз результатів:**

- ✓ Використовуйте лупу або стереомікроскоп для детального дослідження колоній.
- ✓ Занотуйте відмінності між культуральними властивостями різних видів мікроорганізмів.

## **Контрольні запитання:**

1. Як відрізнити мікроорганізми за їхнім ростом у рідкому середовищі?
2. Які особливості колоній допомагають ідентифікувати мікроорганізми?
3. У чому полягає різниця між штриховим і суцільним посівом?
4. Як умови інкубації впливають на ріст мікроорганізмів?
5. Чому важливо дотримуватись стерильності під час роботи?

## **Звіт:**

1. Опишіть результати росту мікроорганізмів у рідких і твердих середовищах.
2. Зробіть схематичні малюнки колоній, спостережених на твердих середовищах.
3. Дайте відповіді на контрольні запитання.

**ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7**  
**ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ:**  
**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ, pH ТА ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ**  
**НА РІСТ БАКТЕРІЙ**

**Мета:** дослідити вплив температури на ріст мікроорганізмів; вивчити вплив кислотності середовища (pH) на розвиток бактерій; ознайомитися з впливом осмотичного тиску на життєдіяльність мікроорганізмів; навчитися оцінювати фізіологічні властивості мікроорганізмів за експериментальними даними.

**Матеріали та обладнання:** рідкі живильні середовища з різним pH (4, 6, 7, 9); рідкі середовища з різними концентраціями NaCl (0%, 3%, 7%, 10%); тверді середовища для визначення оптимальної температури росту; чисті культури бактерій (наприклад, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*); термостат із регульованою температурою; спиртівка, стерильні піпетки, пробірки, чашки Петрі; фотоколориметр або спектрофотометр (за наявності).

**Теоретична частина:**

**1. Вплив температури на ріст мікроорганізмів:**

- ✓ Поділ бактерій за температурними групами: психрофіли, мезофіли, термофіли.
- ✓ Оптимальна, мінімальна та максимальна температури росту.

**2. Вплив pH середовища:**

- ✓ Кислотофіли, нейтрофіли, алкалофіли.
- ✓ Значення буферних систем у живильних середовищах.

**3. Вплив осмотичного тиску:**

- ✓ Роль концентрації солей у середовищі.
- ✓ Галофіли та осмоотолерантні організми.

**4. Фізіологічна адаптація:**

- ✓ Механізми адаптації до стресових умов (осморегуляція, синтез стресових білків).

**Практична частина:**

**1. Дослідження впливу температури:**

- ✓ Проведіть посів бактерій на тверді середовища.
- ✓ Інкубуйте зразки при різних температурах (4 °C, 25 °C, 37 °C, 55 °C) протягом 24-48 годин.
- ✓ Визначте, при якій температурі спостерігається найбільш інтенсивний ріст.

**2. Дослідження впливу pH:**

- ✓ Посійте бактерії у рідкі середовища з різним рівнем рН (4, 6, 7, 9).
  - ✓ Інкубуйте зразки при оптимальній температурі.
  - ✓ Візуально або за допомогою спектрофотометрії оцініть інтенсивність росту.
3. **Дослідження впливу осмотичного тиску:**
- ✓ Проведіть посів бактерій у середовища з різними концентраціями NaCl (0%, 3%, 7%, 10%).
  - ✓ Інкубуйте при оптимальній температурі.
  - ✓ Зробіть висновки про здатність бактерій рости за підвищеного осмотичного тиску.

#### **Контрольні запитання:**

1. Як поділяються мікроорганізми за температурними групами?
2. Чому ріст бактерій залежить від рН середовища?
3. Який механізм дії осмотичного тиску на клітини мікроорганізмів?
4. Що таке осмотолерантні та галофільні бактерії?
5. Як зміни температури впливають на ферментативну активність бактерій?

#### **Звіт:**

1. Опишіть результати дослідження впливу температури, рН і осмотичного тиску на ріст бактерій.
2. Побудуйте графіки залежності інтенсивності росту від температури, рН і концентрації NaCl.
3. Дайте відповіді на контрольні запитання.

**Примітка:** дотримуйтесь стерильності під час виконання досліджень. Уникайте перегріву термостата та контакту з концентрованими розчинами солей без засобів захисту.

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №8 ВИВЧЕННЯ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ ТА АНТИСЕПТИКІВ НА МІКРООРГАНІЗМИ**

**Мета:** вивчити механізми дії антибіотиків та антисептиків на мікроорганізми; ознайомитися з методами оцінки чутливості бактерій до антимікробних засобів; навчитися проводити дифузійний метод визначення чутливості до антибіотиків.

**Матеріали та обладнання:** чисті культури мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*); антибіотики в стандартних дисках (ампіцилін, хлорамфенікол, гентаміцин тощо); антисептичні



засоби (спирт, перекис водню, хлоргексидин); тверде живильне середовище (м'ясо-пептонний агар); чашки Петрі, стерильні пінцети; спиртівка, термостат; лінійка або штангенциркуль для вимірювання зон інгібування.

### **Теоретична частина:**

#### **1. Антибіотики:**

- ✓ Природні та синтетичні речовини, що інгібують ріст або вбивають мікроорганізми.
- ✓ Механізми дії: порушення синтезу клітинної стінки, білків, нуклеїнових кислот, мембран.

#### **2. Антисептики:**

- ✓ Хімічні речовини, що застосовуються для обробки поверхонь, шкіри або ран з метою знищення мікроорганізмів.
- ✓ Діють шляхом денатурації білків, порушення мембран або окислювальних процесів.

#### **3. Методи визначення чутливості:**

- ✓ Дифузійний метод: використання паперових дисків, просочених антибіотиком.
- ✓ Метод розведень: визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).

#### **4. Значення тестування чутливості:**

- ✓ Вибір ефективного лікування інфекційних захворювань.
- ✓ Моніторинг появи резистентності у мікроорганізмів.

### **Практична частина:**

#### **1. Підготовка посіву:**

- ✓ Приготуйте суспензію мікроорганізмів у стерильному фізіологічному розчині (порівняйте щільність із стандартом 0,5 за МакФарландом).
- ✓ Рівномірно засійте поверхню м'ясо-пептоного агару в чашці Петрі.

#### **2. Дифузійний метод:**

- ✓ Викладіть стандартні диски з антибіотиками на поверхню агару за допомогою стерильного пінцета.
- ✓ Позначте кожен диск відповідно до антибіотика.
- ✓ Інкубуйте чашки в термостаті при 37 °С протягом 18-24 годин.

#### **3. Дослідження антисептиків:**

- ✓ Змочіть стерильні паперові диски в розчинах антисептиків (спирт, перекис водню тощо).
  - ✓ Розмістіть диски на поверхню агару, засіяного бактеріями.
  - ✓ Інкубуйте в термостаті при 37 °С.
- 4. Оцінка результатів:**
- ✓ Виміряйте діаметр зон інгібування навколо дисків.
  - ✓ Занотуйте результати та порівняйте ефективність різних засобів.

#### **Контрольні запитання:**

1. Що таке мінімальна інгібуюча концентрація (МІК)?
2. Як діють антибіотики, що порушують синтез клітинної стінки?
3. Чим відрізняється дія антисептиків від антибіотиків?
4. Як визначають чутливість бактерій до антибіотиків дифузійним методом?
5. Чому важливо тестувати чутливість мікроорганізмів до антимікробних засобів?

#### **Звіт:**

1. Опишіть результати дослідження чутливості бактерій до антибіотиків та антисептиків.
2. Побудуйте таблицю діаметрів зон інгібування для кожного засобу.
3. Дайте відповіді на контрольні запитання.

**Примітка:** дотримуйтесь правил роботи зі стерильним обладнанням та антимікробними засобами. Уникайте контакту хімічних речовин зі шкірою та слизовими оболонками.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ястремська Л. С., Малиновська І. М. Загальна мікробіологія і вірусологія : навч. посібник. Київ : НАУ, 2019. 232с.
2. Ібатулліна Ф.Ж., Козловська Г.В., Мельник М.В., Скибіцький В.Г. Мікробіологія : підручник. Київ, 2015. 475 с
3. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник: Львів : ВЦ ЛНУ ім. І. Франка, 2009. 360 с
4. Загальна мікробіологія та вірусологія. Лабораторний практикум : навчальний посібник / Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, Л. О. Титова. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. 121 с. URL: <https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/e65f28cd-88c6-4792-80a0-2bd23df16829/content>.
5. Практична мікробіологія : посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Широкобоков. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 440 с.
6. Яворська Г. В., Гудзь С. П., Гнатуш С. О. Промислова мікробіологія : навч. посіб. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 256 с.
7. Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. Загальна вірусологія : навчальний посібник. Львів : Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2010. 264 с.
8. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології : підручник. К. : Либідь, 2001. 312 с.
9. Практична мікробіологія : навчальний посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, В. П. Широкобоков; за заг. ред.: В. П. Широкобокова, С. І. Климнюка. Вінниця : Нова книга, 2018. 576 с.
10. Загальна мікробіологія: лабораторний практикум для студентів спеціальності 101 «Екологія» / І. В. Матвеева, Р. М. Крамаренко, Т. І. Білик. Київ : НАУ, 2013. 80 с.
11. Єгорова А. В., Капрельянци Л. В., Труфкати Л. В. Мікробіологія галузі. Мікробіологія бродильних виробництв : навч. посіб. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2018. 136 с.
12. Ризик-орієнтований контроль риби і рибопродуктів під час виробництва та обігу за впровадження системи НАССР / Н. М. Богатко, Т. В. Полтавченко, З. М. Буднік, А. Ф. Богатко. *Вісник НУВГП. Сільськогосподарські науки* : зб. наук. праць. Рівне : НУВГП, 2022. Вип. 4(100). С. 20–37.