

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства
та природокористування

Кафедра водопостачання, водовідведення та бурової справи

03-06-197М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних з навчальної дисципліни
«Загальна мікробіологія та вірусологія»
(частина 2) для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського)
рівня за освітньо-професійною програмою «Біотехнології,
біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності G21
«Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання

Рекомендовано науково-
методичною радою з якості ННІ
будівництва, архітектури та
дизайну
Протокол № 5 від 07.01.2026 р.

Рівне – 2026

Методичні вказівки до для виконання лабораторних з навчальної дисципліни «Загальна мікробіологія та вірусологія» (частина 2) для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання [Електронне видання] / Полтавченко Т. В., Буднік З. М. – Рівне : НУВГП, 2026. – 32 с.

Укладачі: Полтавченко Т. В. – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри водопостачання, водовідведення та бурової справи;
Буднік З. М. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри водопостачання, водовідведення та бурової справи.

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

Керівник групи забезпечення освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня за освітньою програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія»

д.б.н., професор

Бєдункова О. О.

Зміст

Лабораторна робота № 9.	3
Лабораторна робота № 10.	7
Лабораторна робота № 11.	11
Лабораторна робота № 12.	16
Лабораторна робота № 13.	21
Лабораторна робота № 14.	24
Лабораторна робота № 15.	28
Список використаної літератури	32

Попередня версія методичних вказівок 05-03-168М

© Т. В. Полтавченко,
З. М. Буднік, 2026
© НУВГП, 2026

Лабораторна робота №9

ПІДГОТОВКА ТА ФАРБУВАННЯ МАЗКІВ: ПРОСТІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ

Мета: ознайомитися з методикою виготовлення мазків з бактеріальних культур; навчитися фіксувати мазки для подальшого фарбування; освоїти прості методи фарбування мікроорганізмів (метиленовий синій, фуксин, сафранін); дослідити морфологічні особливості бактерій під мікроскопом.

Матеріали та обладнання: чисті культури мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*); стерильні предметні скельця; бактеріологічна петля; фіксуючий розчин (спирт, над полум'ям); барвники (метиленовий синій, фуксин, сафранін); дистильована вода; мікроскоп; фільтрувальний папір; піпетки; спиртівка.

Теоретична частина

Підготовка мазків:

- ✓ Виготовлення мазка із рідких та твердих середовищ.
- ✓ Сушка мазка перед фіксацією.

Фіксація мазків:

- ✓ Термічна фіксація над полум'ям спиртівки.
- ✓ Хімічна фіксація спиртом.

Прості методи фарбування:

- ✓ Фарбування метиленовим синім (дає загальне забарвлення клітин).
- ✓ Фарбування фуксином або сафраніном для кращої візуалізації бактерій.
- ✓ Принцип дії барвників і їх взаємодія з бактеріальною клітиною.

Морфологія бактерій:

- ✓ Визначення форми (коки, бацили, спірили).
- ✓ Виявлення особливостей розміщення клітин (ланцюжки, скупчення).

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 виросла 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 виросла 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, края 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 x8. При опущеному конденсорі для кращого контрастування знаходять край краплі, потім встановлюють об'єктив x40 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.

Хід роботи

1. Приготування мазка:

- ✓ Візьміть стерильне предметне скло.
- ✓ Нанесіть краплю дистильованої води.
- ✓ Внесіть бактерії бактеріологічною петлею та рівномірно розподіліть по поверхні скла.
- ✓ Висушіть мазок на повітрі.

2. Фіксація мазка:

- ✓ Притисніть мазок до полум'я спиртівки 2-3 рази, не перегріваючи.

3. Фарбування:

✓ Нанесіть на мазок один із барвників (метиленовий синій, фуксин або сафранін).

✓ Залиште на 1-2 хвилини.

✓ Промийте водою та висушіть фільтрувальним папером.

4. Мікроскопія:

✓ Дослідіть готовий препарат під мікроскопом (об'єктиви 40х, 100х з імерсійним маслом).

✓ Визначте форму, розміри та особливості розташування клітин.

Контрольні запитання:

1. Які методи фіксації мазків використовуються у мікробіології?
2. Чому необхідно фіксувати мазок перед фарбуванням?
3. Які барвники застосовуються для простих методів фарбування?
4. Як визначити форму бактерій за допомогою мікроскопа?
5. У чому різниця між простим та диференційним фарбуванням?

Лабораторна робота №10

МЕТОДИКИ ФАРБУВАННЯ ЗА ГРАМОМ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ВИЗНАЧЕННІ БАКТЕРІЙ

Мета: ознайомитися з методикою фарбування бактерій за Грамом; вивчити відмінності між грампозитивними та грамнегативними бактеріями; навчитися аналізувати результати забарвлення під мікроскопом; оцінити практичне значення фарбування за Грамом у мікробіологічних дослідженнях.

Матеріали та обладнання: чисті культури мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*); стерильні предметні скельця; бактеріологічна петля; фіксуєчий розчин (спирт, над полум'ям); барвники: кристалічний фіолетовий, розчин Люголя, 96% етанол, сафранін; дистильована вода; мікроскоп; фільтрувальний папір; піпетки; спиртівка.

Теоретична частина:

1. Метод Грама:

- ✓ Диференційний метод фарбування, що розділяє бактерії на грампозитивні (зберігають фіолетове забарвлення) та

грамнегативні (втрачають фіолетове забарвлення та забарвлюються у червоний колір).

- ✓ В основі методу лежить різна будова клітинної стінки бактерій.

2. Етапи фарбування за Грамом:

- ✓ Фарбування кристалічним фіолетовим (основний барвник).
- ✓ Обробка розчином Люголя (утворення комплексу з барвником).
- ✓ Деколоризація 96% етанолом (вимиває барвник із грамнегативних бактерій).
- ✓ Контрфарбування сафраніном (надає грамнегативним бактеріям червоний колір).

3. Будова клітинної стінки:

- ✓ Грампозитивні бактерії: товстий пептидоглікановий шар, що утримує фіолетовий барвник.
- ✓ Грамнегативні бактерії: тонкий шар пептидоглікану, наявність зовнішньої мембрани, що перешкоджає утриманню барвника.

4. Значення фарбування за Грамом:

- ✓ Використовується у діагностиці інфекційних захворювань.
- ✓ Дозволяє швидко визначити тип бактерій для вибору антибіотикотерапії.

Метод був запропонований датським вченим Грамом ще в 1884 р. і набув значного поширення у мікробіологічній практиці, тому що має діагностичне значення при вивченні мікроорганізмів.

В залежності від результатів забарвлення за Грамом усі мікроорганізми поділяють на дві великі групи:

- 1) Грампозитивні (Гр+) – забарвлюються у фіолетовий колір.
- 2) Грамнегативні (Гр-) – забарвлюються в червоний колір.

Різне сприйняття мікроорганізмами забарвлення за Грамом обумовлено відмінностями у хімічному складі та будові клітинної стінки. Зокрема, у Гр+ бактерій основу (50–80%) будови клітинної стінки складає глікопептид муреїн, який служить опорним каркасом стінки. Муреїнова сітка багат шарова. Ліпідів, як і білків, дуже мало; відсутня діамінопімелінова кислота, проте є тейхоєві кислоти та амінокислоти (лізин, β-аланін), а в цитоплазмі

містяться магнієві солі РНК, відповідальні за сприйняття забарвлення. У Гр– бактерій муреїнова сітка одношарова (складає біля 12 % всіх біохімічних сполук), в ній багато ліпідів – до 20% (ліпопротеїди, ліпополісахариди, фосфоліпіди); відсутні магнієві солі РНК та тейхоеві кислоти, проте є діамінопімелінова кислота.

Методика забарвлення за Грамом:

1) На фіксований мазок кладуть шматочок фільтрувального паперу і наносять декілька краплин генціанвіолету, витримують 1–2 хвилини. Папір знімають, барвник зливають (але не змивають водою).

2) На мазок наносять розчин Люголя (суміш КІ та І2). Витримують 1–2 хвилини. Барвник зливають (водою не змивають!).

3) Наливають на мазок спирт (96 %-вий). Знебарвлення проводять протягом 30–40 секунд. Препарат ретельно промивають водою.

4) Наносять фуксин і витримують 1–2 хвилини. Барвник зливають. Препарат промивають водою і висушують за допомогою фільтрувального паперу, наносять імерсійну олію і вивчають під мікроскопом (об'єктив 90x).

5) Мікроскопують фіксовані забарвлені препарати в імерсійній системі при повністю відкритій ірис-діафрагмі та максимально піднятому конденсорі Аббе.

Фарбування за Грамом є важливою таксономічною ознакою, з якою пов'язані й багато інших характеристик бактерій. До грампозитивних мікроорганізмів відносять коки, споротворні паличкові бактерії (р. *Bacillus*, р. *Clostridium*), неспоротворні молочнокислі паличкові бактерії, дріжджі. До грамнегативних мікроорганізмів відносяться неспоротворні паличкові (р. *Bacterium*) та звивисті бактерії. Механізм забарвлення за Грамом.

У випадку грампозитивних мікроорганізмів барвник генціанвіолет (трифенілметанова структура) і йод утворюють

міцний комплекс з магнієвими солями РНК, нерозчинний у воді та спирті. Під впливом спирту муреїн набрякає і зменшується діаметр пор клітинної стінки, що призводить до погіршення її проникливості. Тому грампозитивні мікроорганізми щільно утримують генціанвіолет, який і обумовлює фіолетовий колір, і не сприймають червоне забарвлення фуксину.

В клітинній оболонці грамнегативних мікроорганізмів відсутні магнієві солі РНК, тому основний барвник генціанвіолет не утримується. Під впливом спирту цей барвник вимивається. Вимиваються також і ліпіди, вміст яких в клітинній стінці грамнегативних бактерій досить значний, це призводить до збільшення діаметра пор і підвищення проникності клітинної стінки. Тому грамнегативні мікроорганізми втрачають фіолетовий барвник і додатково забарвлюються фуксином в червоний колір.

Слід відзначити, що в мікробіологічній практиці використовується не тільки забарвлення фіксованих на склі бактерій (тобто, вбитих), а й вітальне забарвлення (прижиттєве). Це, в основному, прості способи забарвлення з використанням найменш отруйних барвників: метиленової сині, нейтрального червоного везувину. Існують також негативні способи забарвлення, коли забарвлюються не самі мікроби, а фон, на якому вони знаходяться.

Хід роботи

1. Приготування мазка:

- ✓ Візьміть стерильне предметне скло.
- ✓ Нанесіть краплю дистильованої води.
- ✓ Внесіть бактерії бактеріологічною петлею та рівномірно розподіліть по поверхні скла.
- ✓ Висушіть мазок на повітрі та зафіксуйте над полум'ям спиртівки.

2. Фарбування за Грамом:

- ✓ Нанесіть кристалічний фіолетовий барвник на мазок на 1 хвилину.
- ✓ Промийте дистильованою водою.

- ✓ Обробіть мазок розчином Люголя на 1 хвилину.
- ✓ Промийте водою.
- ✓ Деколюризуйте 96% етанолом (нанесіть на 15-30 секунд, стежте за знебарвленням).
- ✓ Промийте водою.
- ✓ Контрфарбуйте сафраніном протягом 1 хвилини.
- ✓ Промийте водою та висушіть фільтрувальним папером.

3. Мікроскопія:

- ✓ Дослідіть готовий препарат під мікроскопом (об'єктиви 40х, 100х з імерсійним маслом).
- ✓ Визначте забарвлення бактерій та віднесіть їх до грампозитивних або грамнегативних.

Контрольні запитання:

1. Який принцип лежить в основі диференціації бактерій за методом Грама?
2. Чому грампозитивні бактерії утримують кристалічний фіолетовий барвник?
3. Яку роль відіграє 96% етанол у процесі фарбування?
4. Чим відрізняється будова клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій?
5. Чому фарбування за Грамом є важливим для діагностики бактеріальних інфекцій?

Лабораторна робота №11

ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЇ БАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ СКЛАДНИХ МЕТОДІВ ФАРБУВАННЯ (МЕТОД ЦІЛЯ-НІЛЬСЕНА, РОМАНОВСЬКОГО-ГІМЗИ)

Мета: ознайомитися з методиками складного фарбування бактерій; освоїти техніку фарбування за Цілем-Нільсеном та Романовським-Гімзою; дослідити морфологічні особливості та структури бактерій; визначити значення складних методів фарбування у діагностичній мікробіології.

Матеріали та обладнання: чисті культури мікроорганізмів (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*); стерильні предметні скельця; бактеріологічна петля; фіксуючий

розчин (спирт, над полум'ям); барвники: карболовий фуксин, метиленовий синій, розчин Гімзи; 5% розчин сірчаної кислоти; Дистильована вода; мікроскоп; фільтрувальний папір; піпетки; спиртівка.

Теоретична частина

1. Метод Ціля-Нільсена:

✓ Використовується для фарбування кислотостійких бактерій (наприклад, мікобактерій).

✓ Базується на використанні карболового фуксину, який проникає у клітинну стінку мікобактерій.

✓ Декolorизація проводиться 5% розчином сірчаної кислоти.

✓ Контрфарбування здійснюється метиленовим синім.

✓ У результаті кислотостійкі бактерії залишаються червоними, а всі інші – синіми.

2. Метод Романовського-Гімзи:

✓ Використовується для забарвлення клітинних компонентів мікроорганізмів, зокрема при діагностиці внутрішньоклітинних паразитів.

✓ Барвник Гімзи містить азур II та еозин, що дає можливість виявити структури бактерій і найпростіших.

✓ Використовується для забарвлення спірохет, найпростіших і рикетсій.

✓ Нуклеїнові структури забарвлюються у синьо-фіолетовий колір, а цитоплазма – у рожево-блакитний.

3. Значення складних методів фарбування:

✓ Дозволяють диференціювати бактерії за структурою клітинної стінки.

✓ Використовуються в діагностиці туберкульозу, лепри, рикетсіозів та інших захворювань.

Забарвлення за методом Романовського-Гімзи

Чеслав Іванович Хенцінській і Дмитро Леонідович Романовський дали початок методикам забарвлення біологічних препаратів за допомогою суміші азура I (азур В), метиленового синього і еозину.

Унаслідок того, що водні розчини барвників були стійкими, в 1901 році Лейшман і в 1902 році Райт запропонували застосування метилового спирту як фіксатора перед фарбуванням. У 1904 році

Гімза поліпшив цю методику шляхом стандартизації розчинів барвника і додавання гліцерину для збільшення розчинності і стабільності.

Фарбування за Романовським - Гімзою - цитологічний метод фарбування мікроорганізмів, клітинних структур і тканин різних видів (у тому числі крові) для вивчення методом світлової мікроскопії.

Метод названий іменами німецьких медиків - мікробіолога Франца Циля (1857-1926) і патологоанатома Фрідріха Нільсена (1854-1898), які розробили його в 1882-1883 рр.

Фарба Романовського-Гімза складається з суміші азура I, еозину і метиленової сині. Безпосередньо перед вживанням до 10 мл дистильованої води нейтральною або слабо лужної реакції (рН 7,0 - 7,2) додають 10 крапель комерційного барвника Романовського-Гімза. Приготований розчин фарби негайно ж наливають на фіксований мазок або краще предметне скло з препаратом занурюють у стаканчик з фарбою. Через 1 год. фарбу зливають, препарат промивають водою і висушують на повітрі.

Метод забарвлення мікроорганізмів для виявлення кислотостійких мікобактерій (збудників туберкульозу, мікобактеріозів, лепри), актиноміцетів та інших кислотостійких мікроорганізмів. Кислотостійкість мікроорганізмів обумовлена наявністю в їх клітинах ліпідів, воску і оксикислот.

Методика:

1. Фіксований на полум'я пальника мазок забарвлюють протягом 3 - 5 хв. розчином карболової фуксину Циля або забарвленої фуксином папірцем з підігріванням до появи парів, але не доводячи барвник до кипіння.

2. Дають препарату охолонути, папірець знімають, зливають надлишок барвника, препарат промивають водою.

3. Пофарбований препарат знебарвлюють 5% розчином сірчаної кислоти протягом 3 - 5 с або 96 ° етиловим спиртом, що містить 3% за об'ємом хлористоводневої кислоти, кілька разів занурюючи скло з мазком в стаканчик з солянокислим спиртом.

4. Після знебарвлення залишок кислоти зливають і ретельно промивають препарат водою.

5. Дофарбовують додатково метиленовим синім Леффлера 3 - 5 хв.

6. Пофарбований препарат промивають водою, підсушують і мікроскопірують.

При фарбуванні препаратів *кислотостійкі* бактерії забарвлюються фуксином в рубіново-червоний колір і не знебарвлюються кислотою. *Некислотостійкі* бактерії, а також елементи тканини і лейкоцити під дією кислоти знебарвлюються і набувають колір додаткового барвника.

Деякі бактерії (збудники туберкульозу, лепри, актиноміцети) в цитоплазмі містять багато жироподібних речовин, вищих ненасичених жирних кислот, воскоподібних субстанцій, тому вони погано знебарвлюються сумішшю кислота - спирт або окремо кислотою після забарвлення гарячим розчином карболового фуксину. Такі мікроорганізми належать до кислотостійких, а для їх виявлення використовується спеціальний метод забарвлення Ціля-Нільсена.

На фіксованій мазок, виготовлений з мокротиння хворого на туберкульоз, кладуть листочок фільтрувального паперу, на який наносять карболовий концентрований фуксин Ціля. Препарат тримають пінцетом і тричі прогрівають у полум'ї пальника до появи пари, кожний раз остуджуючи і додаючи нову порцію барвника. Папірець знімають, а препарат промивають водою і опускають 2-3 рази в стаканчик з 5 % сірчаною кислотою або наливають цей розчин на мазок для знебарвлення. Знову ретельно промивають препарат водою і зафарбовують 3-5 хв розчином метиленового синього, промивають водою, висушують і мікроскопують.

Кислотостійкі палички забарвлюються в рубіново-червоний колір, інші бактерії та фон - у голубий.

Забарвлення за методом Ціля-Нільсена

Метод названий іменами німецьких медиків - мікробіолога Франца Ціля (1857-1926) і патологоанатома Фрідріха Нільсена (1854-1898), які розробили його в 1882-1883 рр..

Метод забарвлення мікроорганізмів для виявлення кислотостійких мікобактерій (збудників туберкульозу,

мікобактеріозів, лепри), актиноміцетів та інших кислотостійких мікроорганізмів. Кислотостійкість мікроорганізмів обумовлена наявністю в їх клітинах ліпідів, воску і оксикислот.

Методика:

1. Фіксований на полум'я пальника мазок забарвлюють протягом 3 - 5 хв. розчином карболової фуксину Циля або забарвленої фуксином папірцем з підігріванням до появи парів, але не доводячи барвник до кипіння.

2. Дають препарату охолонути, папірець знімають, зливають надлишок барвника, препарат промивають водою.

3. Пофарбований препарат знебарвлюють 5% розчином сірчаної кислоти протягом 3 - 5 с або 96 ° етиловим спиртом, що містить 3% за об'ємом хлористоводневої кислоти, кілька разів занурюючи скло з мазком в стаканчик з солянокислим спиртом.

4. Після знебарвлення залишок кислоти зливають і ретельно промивають препарат водою.

5. Дофарбовують додатково метиленовим синім Леффлера 3 - 5 хв.

6. Пофарбований препарат промивають водою, підсушують і мікроскопірують.

При фарбуванні препаратів *кислотостійкі* бактерії забарвлюються фуксином в рубіново-червоний колір і не знебарвлюються кислотою. *Некислотостійкі* бактерії, а також елементи тканини і лейкоцити під дією кислоти знебарвлюються і набувають колір додаткового барвника.

Хід роботи

1. Приготування мазка:

- ✓ Візьміть стерильне предметне скло.
- ✓ Нанесіть краплю дистильованої води.
- ✓ Внесіть бактерії бактеріологічною петлею та рівномірно розподіліть по поверхні скла.
- ✓ Висушіть мазок на повітрі та зафіксуйте над полум'ям спиртівки.

2. Фарбування за Цілем-Нільсеном:

- ✓ Нанесіть карболовий фуксин та прогрівайте мазок над полум'ям протягом 3-5 хвилин (не допускаючи кипіння).
 - ✓ Промийте водою.
 - ✓ Деколоризуйте 5% розчином сірчаної кислоти протягом 30 секунд.
 - ✓ Промийте водою.
 - ✓ Контрфарбуйте метиленовим синім протягом 1-2 хвилин.
 - ✓ Промийте водою та висушіть фільтрувальним папером.
- 3. Фарбування за Романовським-Гімзою:**
- ✓ Нанесіть розчин Гімзи на мазок та залиште на 10-15 хвилин.
 - ✓ Промийте водою.
 - ✓ Висушіть та досліджуйте під мікроскопом.
- 4. Мікроскопія:**
- ✓ Дослідіть готові препарати під мікроскопом (об'єктиви 40х, 100х з імерсійним маслом).
 - ✓ Визначте морфологію та особливості забарвлення бактерій.

Контрольні запитання

1. У чому особливість фарбування кислотостійких бактерій?
2. Яка роль карболового фуксину у методі Ціля-Нільсена?
3. Чому застосовується сірчана кислота для диференціації бактерій?
4. Які мікроорганізми найчастіше фарбують за методом Романовського-Гімзи?
5. У яких випадках використовується фарбування за Цілем-Нільсеном?

Лабораторна робота №12

МЕТОДИ ПОСІВУ МІКРООРГАНІЗМІВ: СУЦІЛЬНИЙ, ШТРИХОВИЙ, РОЗВЕДЕННЯ

Мета: ознайомитися з основними методами посіву мікроорганізмів; освоїти техніку суцільного, штрихового посіву та методу розведення; вивчити значення кожного методу для мікробіологічного аналізу.

Матеріали та обладнання: чисті культури мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*); стерильні чашки Петрі з поживним агаром; стерильні піпетки; бактеріологічна петля; стерильні пробірки з рідким середовищем; спиртівка; мікробіологічний шпатель; дистильована вода.

Теоретична частина:

1. Методи посіву мікроорганізмів:

✓ **Суцільний посів** – використовується для отримання значної кількості мікроорганізмів або тестування чутливості до антибіотиків.

✓ **Штриховий посів** – дозволяє отримати ізольовані колонії бактерій.

✓ **Метод розведення** – використовується для визначення кількості життєздатних клітин у зразку.

2. Принципи асептичної роботи:

✓ Стерилізація всіх інструментів перед і після роботи.

✓ Використання спиртівки для запобігання контамінації.

✓ Правильне поводження з культурами мікроорганізмів.

3. Значення методів посіву:

✓ Використовуються в діагностичній мікробіології.

✓ Дозволяють виділяти чисті культури бактерій.

✓ Необхідні для оцінки росту мікроорганізмів і їх ідентифікації.

Посіви проводять як з метою виділення збудників із досліджуваного матеріалу від хворих, так і для нагромадження чистих культур з метою подальшого їх вивчення та ідентифікації. Техніка посівів у рідкі та на щільні живильні середовища має свої особливості.

У ліву руку беруть дві пробірки. В одній знаходиться живильне середовище (щільне або рідке), в іншій – досліджуваний матеріал. Пробірки затискають великим та вказівним пальцями. Для того, щоб можна було спостерігати за вмістом пробірок, їх тримають зверху кисті руки. Пробірки повинні бути дещо нахиленими, і потрібно стежити, щоб при відкриванні їх матеріал або сторонні мікроби з повітря та навколишніх предметів з однієї не потрапили в іншу. Корки з пробірок виймають, тримаючи їх 4 і 5 пальцями

правої руки. Трьома іншими пальцями правої руки, як олівець, тримають бактеріологічну петлю або піпетку, якими розподіляють досліджуваний матеріал.

Спочатку стерилізують петлю у верхній частині полум'я газового пальника. Пробірки відкривають і край їх проносять через полум'я пальника. Петлю опускають у пробірку, де є досліджуваний матеріал, і, обережно торкаючись стінки, охолоджують. У подальшому петлю опускають у пробірку і набирають матеріал. Якщо він знаходиться у рідкому стані, для посіву достатньо краплі рідини, яка затримується в кільці бактеріологічної петлі. Коли використовують мікроби, що виростили на поверхні середовища, обережно плавним рухом набирають невелику кількість їх, стежачи, щоб не ушкодити живильне середовище. Петлю повільно виймають з пробірки, не торкаючись її стінок, і переносять в іншу пробірку з середовищем. Штриховими рухами від однієї стінки пробірки до іншої, починаючи з нижньої частини середовища, проводять посів матеріалу по скошеній поверхні агару знизу догори.

Петлю виймають з пробірки, корки і краї пробірок проносять через полум'я і закривають. Петлю прожарюють у полум'ї, щоб знищити мікроорганізми.

При посіві матеріалу на рідке живильне середовище петлю з матеріалом занурюють у рідину. Якщо він не знімається з петлі, його обережно розтирають на стінці пробірки й омивають середовищем.

Матеріал, який набирали пастерівською або градуйованою піпеткою, виливають у живильне середовище, а для рівномірного розповсюдження його пробірку обережно, щоб не замочити корок, струшують або обертають, затиснувши в долонях.

Для посіву матеріалу на щільне живильне середовище у чашках Петрі невелику кількість матеріалу набирають стерильною петлею і втирають у поверхню середовища біля краю чашки.

Після цього петлю стерилізують у полум'ї, щоб знищити надлишок матеріалу, охолоджують. Наступний етап посіву починають з місця, де закінчився попередній. Петлю кладуть горизонтально на поверхню агару, де було зроблено посів, проводять один-два рази по поверхні і роблять посів по решті

середовища. Необхідно намагатись, щоб штрихи посіву тривали від краю до краю чашки, не пошкоджували поверхні агару і розташовувались близько один до одного. Цим штучно подовжується лінія посіву і створюються можливості для одержання ізольованих колоній.

Посів шпателем і тампоном у чашки Петрі. Матеріал попередньо наносять на поверхню живильного середовища біля краю чашки петлею або піпеткою. Стерильний шпатель проносять через полум'я, охолоджують, торкаючись стінки чашки. Обережними круговими рухами, тримаючи чашку напівзакритою, розподіляють матеріал рівномірно по поверхні середовища.

При посіві тампоном чашку дещо відкривають однією рукою, тампоном торкаються поверхні агару біля краю чашки і починають проводити посів штрихами від краю до краю чашки, втираючи обережно матеріал у поверхню середовища, не пошкоджуючи його, поступово обертаючи тампон. Після проведення посіву чашку обертають на 90° і повторюють посів перпендикулярно до попереднього.

При посіві уколom у стовпчик живильного середовища пробірку з м'ясо-пептонним агаром, желатином тощо беруть у ліву руку, петлю з матеріалом – у праву і роблять укол до дна пробірки в середовище. Петлю обережно виймають, а пробірку закривають.

Посів матеріалу в товщу живильного середовища. Перед посівом матеріал повинен бути в рідкому стані. Стерильною градуйованою піпеткою набирають 0,1, 0,5 або 1,0 мл матеріалу і виливають його в стерильні чашки Петрі. Після цього матеріал заливають 15-20 мл розтопленого й охолодженого до 45-50 °С МПА. Обережно похитуючи чашку, круговими рухами по поверхні стола перемішують в ній матеріал, досягаючи його рівномірного розподілу в середовищі. Чашку залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном.

Для того, щоб виділити чисту культуру мікроорганізмів, слід відділити численні бактерії, які знаходяться в матеріалі, одна від одної. Це можна досягнути за допомогою методів, які засновані на двох принципах – *механічному* і *біологічному* роз'єднанні бактерій.

Розмноження рикетсій. Методи культивування рикетсій.

Розмножуються ці бактерії шляхом бінарного поділу, володіють незалежним від клітини-хазяїна метаболізмом.

Розмноження, за винятком одного виду, відбувається тільки в живих клітинах хазяїна, тобто рикетсії є облигатними внутріклітинними паразитами, ріст і розмноження яких відбуваються в клітках відповідного хазяїна. Паразитують в цитоплазмі і ядрі або тільки в цитоплазмі клітин членистоногих і теплокровних тварин. Лише один вид рикетсій (*Rochalimaea quintana*), що викликає окопну лихоманку, може рости поза клітинами в кишковопорошковій воші, а також в безклітинному поживному середовищі. У життєвому циклі більшості рикетсій членистоногі є первинними хазяїнами або переносниками.

Рикетсії культивуються в жовткових мішках курячих ембріонів, культурах клітин легенів домашніх мишей.

Рикетсії ідентифікують в мазках при забарвленні по Романовському—Гімзі, Хіменесу, Маккіавелло, Здродовському, в мазках, оброблених флюоресцентними і міченими ферментами антитілами. Для первинного виділення рикетсій використовують переважно дорослих самців морських свинок і дорослих мишей.

Хід роботи

1. Суцільний посів:

- ✓ Візьміть стерильний шпатель.
- ✓ Нанесіть суспензію бактерій на поверхню агару та рівномірно розподіліть по всій площині.
- ✓ Інкубуйте чашки Петрі за оптимальної температури.

2. Штриховий посів:

- ✓ Візьміть стерильну бактеріологічну петлю.
- ✓ Занурте її у культуру мікроорганізмів і зробіть штрихи на агарі в чашці Петрі.
- ✓ Інкубуйте чашки у відповідних умовах.

3. Метод розведення:

- ✓ Приготуйте серійні розведення культури у стерильних пробірках.
- ✓ Перенесіть визначений об'єм на поверхню агару та рівномірно розподіліть.
- ✓ Інкубуйте для розвитку колоній.

4. Мікроскопія та аналіз результатів:

- ✓ Оцініть зростання колоній за морфологічними ознаками.
- ✓ Підрахуйте колонії у варіанті з методом розведення.

Контрольні запитання:

1. У яких випадках використовується суцільний посів?
2. Яке значення має штриховий метод для отримання чистих культур?
3. Як проводиться серійне розведення мікроорганізмів?
4. Чому важливо дотримуватись асептичної техніки при посіві?
5. Як інкубаційні умови впливають на ріст колоній?

Лабораторна робота №13

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБНОЇ ЕКОЛОГІЇ: СИМБІОЗ, АНТАГОНІЗМ, КОМЕНСАЛІЗМ

Мета: ознайомитися з основними типами взаємодії між мікроорганізмами; вивчити прояви симбіозу, антагонізму та коменсалізму в мікробних популяціях; освоїти методики дослідження міжмікробних взаємодій.

Матеріали та обладнання: чисті культури мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium sp.*); стерильні чашки Петрі з поживним агаром; бактеріологічні петлі; стерильні піпетки; спиртівка; мікроскоп.

Теоретична частина:

1. Симбіоз – взаємовигідна взаємодія між мікроорганізмами. Наприклад, азотфіксуючі бактерії (*Rhizobium*) формують симбіоз із бобовими рослинами.

2. Антагонізм – пригнічення одного мікроорганізму іншим. Наприклад, *Penicillium* виробляє пеніцилін, що пригнічує ріст бактерій.

3. Коменсалізм – один мікроорганізм отримує користь, не завдаючи шкоди іншому. Наприклад, деякі непатогенні бактерії кишечника людини.

Упродовж еволюції в живій природі виникли різноманітні взаємовідносини як між мікроорганізмами, так і між мікро- та макроорганізмами.

Симбіоз – взаємно корисне співіснування організмів різних видів. Розрізняють ендосимбіоз (мікроорганізм росте і розвивається у середині клітини-господаря) та ектосимбіоз або екзосимбіоз (мікроорганізм займає зовнішнє положення по відношенню до клітин господаря). Прикладом симбіозу є співжиття молочнокислих бактерій і дріжджів. Бактерії утворюють молочну кислоту, яка підкислює середовище, створюючи сприятливі умови для росту дріжджів. Останні синтезують ростові речовини, необхідні для розвитку бактерій. Інші приклади симбіозу – лишайник (симбіоз водорості й гриба), бульбочкові бактерії та бобові рослини.

Коменсалізм – форма симбіозу, при якій має вигоду тільки один партнер, не завдаючи ані шкоди, ані користі іншому. Прикладом цього може бути симбіоз організму людини з нормальною мікрофлорою її тіла (сапрофітна мікрофлора шкіри, травного каналу тощо).

Антагонізм – тип співіснування, коли продукти життєдіяльності одного виду гальмують розвиток іншого або навіть визивають його загибель (наприклад: молочнокислі бактерії служать антагоністами гнилісним мікроорганізмам). В багатьох випадках негативна дія мікробів-антагоністів пов'язана з виділенням ними в середовище антибіотиків (біологічно активні хімічні речовини, здатні навіть в малих кількостях подавляти ріст мікроорганізмів). Відомо вже більше 2000 антибіотиків.

До синтезу антибіотиків здатні головним чином гриби (*Aspergillus*, *Penicillium*), актиномицети (*Streptomyces*) та деякі бактерії. Як хіміотерапевтичний засіб застосовують біля п'ятидесяти (пеніцилін, стрептоміцин, грамїцидин С, хлортетрациклін, грізеофульвін та ін.). Відкриття явища антагонізму належить Л. Пастеру (1877), який дослідив загибель збудника сибірської виразки в спільній культурі його з

синьогнійною паличкою. Ідею використання антагонізму мікробів в медицині вперше запропонував І.І. Мечніков. Він посилено пропагував використання молочнокислих бактерій (болгарської палички – *Lactobacillus bulgaricum*) для нормалізації мікрофлори кишечника і придушення гнильних мікробів.

Хід роботи

1. Дослідження симбіозу:

- ✓ Висіяти суміш культур *Rhizobium* та бобових рослин на відповідне середовище.
- ✓ Інкубувати проби за оптимальної температури.
- ✓ Спостерігати утворення бульбочок на коренях.

2. Дослідження антагонізму:

- ✓ Висіяти культуру *Escherichia coli* на агар.
- ✓ На протилежному боці чашки Петрі висіяти *Penicillium sp.*.
- ✓ Інкубувати чашки протягом 24–48 годин.
- ✓ Спостерігати зони пригнічення росту бактерій.

3. Дослідження коменсалізму:

- ✓ Висіяти *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* на одному живильному середовищі.
- ✓ Інкубувати чашки за оптимальних умов.
- ✓ Оцінити ріст колоній та вплив одного мікроорганізму на інший.

Контрольні запитання:

1. У чому полягає різниця між симбіозом, антагонізмом та коменсалізмом?
2. Як проявляється антагоністична взаємодія між мікроорганізмами?
3. Чому симбіотичні взаємозв'язки важливі для біологічних систем?
4. Які приклади коменсалізму можна знайти у природі?
5. Як результати цієї роботи можна застосувати у мікробіології?

Лабораторна робота №14

ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ТА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГРИБІВ (МІКРОМІЦЕТИ ТА ДРІЖДЖІ)

Мета: ознайомитися з морфологією та біологічними властивостями грибів; вивчити особливості росту та розвитку мікроміцетів і дріжджів; освоїти методи мікроскопічного дослідження грибів.

Матеріали та обладнання: чисті культури грибів (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*); стерильні чашки Петрі з поживним середовищем; стерильні піпетки; бактеріологічні петлі; спиртівка; мікроскоп; предметні та покривні скельця; фарбники (метиленовий синій, лактофеноловий бавовняний синій).

Теоретична частина:

1. Мікроміцети – група грибів, що утворюють багатоклітинний міцелій. Вони можуть бути сапрофітами, патогенами або корисними мікроорганізмами (наприклад, *Penicillium* – продуцент антибіотиків).

2. Дріжджі – одноклітинні гриби, які розмножуються брунькуванням або поділом. Використовуються в бродильних процесах (*Saccharomyces cerevisiae* – основний вид для хлібопекарської та пивоварної промисловості).

3. Методи дослідження грибів:

- ✓ Мікроскопія забарвлених та незабарвлених препаратів.
- ✓ Культуральний метод вирощування на селективних середовищах.

- ✓ Визначення ферментативної активності дріжджів.

Гриби – великі (довжина гіфів — декілька десятків мкм, товщина – 10 – 15 мкм) і досить контрастні мікроорганізми, тому в лабораторних умовах для вивчення морфологічних властивостей їх мікроскопують у прижиттєвих незабарвлених препаратах типу «роздавлена крапля» при малих (об'єктив 8^x) і середніх (об'єктив 40^x) збільшеннях.

Культуральними властивостями мікроскопічних грибів називаються зовнішній вигляд грибниці й спосіб її росту стосовно середовища перебування (поверхневий або глибокий). Наприклад, міцелій гриба може розвиватися на поверхні середовища (мукорові

гриби) або усередині (гриб Фітофтора *Phytophthora infestans* у картоплі).

При культивуванні на живильних середовищах в лабораторних умовах у грибів, як правило, відзначається радіальне розростання грибниці, утвориться округла колонія. Міцелій деяких видів грибів пофарбований за рахунок відкладення пігменту в клітинних оболонках: рожевий - у гриба Фузаріум (*Fusarium*), зелений - у гриба Пеніциліум (*Penicillium*), чорний - у деяких аспергіллових грибів (*Aspergillus*).

Культуральні властивості грибів досліджують неозброєним оком (візуально).

Вивчення морфологічних і культуральних властивостей дозволяє встановити назву роду мікроскопічних грибів. Визначення назви виду гриба вимагає подальшого дослідження процесів життєдіяльності мікроорганізмів.

З метою вивчення морфологічних властивостей грибів студенти діляться на підгрупи для роботи з різними культурами. Кожна підгрупа готує, мікроскопіює й замальовує один препарат.

З культури гриба, вирощеного на щільному середовищі сусл-агар, готують препарат «роздавлена крапля». У центр предметного скла наносять краплю суміші спирту із гліцерином (1:1). За допомогою бактеріологічної петлі, розігнутої у вигляді гачка, відбирають невелику кількість міцелію (міцелій варто брати в зоні, прикордонній із зоною плодоносіння, - границя між фарбованою й безбарвною частинами). Міцелій поміщають на предметне скло в краплю рідини; за допомогою двох препарувальних голок обережно розосереджують матеріал тонким шаром у краплі й накривають покривним склом.

Пухирці повітря під покривним склом заважають мікроскопії. Щоб уникнути їхнього утворення варто опускати покривне скло повільно, попередньо поставивши його ребром біля краю краплі.

При мікроскопії (об'єктив 40^x) слід відмітити будову міцелію (одноклітинні або багатоклітинні гіфи), органів розмноження — спорангіїв або конідій; замалювати специфічні особливості розглянутих грибів.

Для вивчення рекомендуються наступні представники міцеліальних грибів:

а. *Препарати грибів класу Зигоміцети (Zygomycetes):*

рід Ризопус (Rhizopus) — збудники хвороби ягід, коренеплодів і рослинних продуктів.

Вивчаючи ріст гриба на живильному середовищі в чашці Петрі, варто звернути увагу на міцелій на субстраті, місцями пофарбований у темно-бурий колір. Для препарату відбирають із живильного середовища довгі гіфи (столони). При мікроскопії відзначають одноклітинний міцелій й органи розмноження - спорангій і спорангієносії, нерозгалужені, пофарбовані в темний колір, що ростуть пучками й мають біля основи коренеподібні відростки (ризойди). Спори знаходяться усередині кулястого спорангія.

б. *Препарати грибів класу Аскоміцети (Ascomycetes):*

рід Аспергіллус (Aspergillus) — збудники пліснявіння непродовольчих і продовольчих товарів; деякі види використовуються в техніці.

На суслі-агарі відзначають густий, повітряний, місцями пофарбований у чорний колір міцелій. Для мікроскопії відбирають трохи пухнастого міцелію, звертають увагу на багатоклітинний міцелій й органи розмноження - одноклітинні конідієносії, що закінчуються веероподібним розширенням (стеригми зі спорами-конідіями);

рід Пеніциліум (Penicillium) -збудники пліснявіння харчових продуктів (масла, сиру, ковбас, фруктів), розвиваються на стінках сирих приміщень; деякі види використовуються в харчовій і медичній промисловості. На суслі-агарі відзначають пухнастий, пофарбований у сіро-зелений колір повітряний міцелій.

Для мікроскопії відбирають міцелій з молоді частини (границя пофарбованого й білого міцелію). На відміну від попередніх грибів пеніциллова цвіль має багатоклітинний конідієносій, що закінчується у вигляді пензлика зі стеригм і конідій,

в. *Препарати грибів класу Дейтеромицети (Deuteromycetes)*

рід Оїдіум (Oidium) — збудники псування рослинних і тваринних продуктів, зокрема кисломолочних продуктів і квашених овочів, при зберіганні. На поверхні агару відзначають оксамитовий білий наліт міцелію. Для мікроскопії зіскрібають білу плівку, у препараті відмічають багатоклітинний міцелій і наявність

(або відсутність) спеціальних органів розмноження. Під мікроскопом видні прямокутні клітини розмноження – оїдії, що утворюються на кінцях гіф при їхньому розчленовуванні;

рід Ботритис (*Botrytis*) викликає гнилизну плодів, овочів, ягід, кагатну гнилизну цукрового буряка. На поверхні агару розглядають сірий пухнастий наліт і відбирають міцелій для препарату. При мікроскопії варто звернути увагу на одноклітинний розгалужений кондієносії, що несе на кінцях гілок пучки одноклітинних овальних сіруватих конідій;

рід Альтернарія (*Alternaria*) — збудники псування сільськогосподарських рослин у період зберігання. На живильному середовищі треба розглянути щільний темнофарбований міцелій. Для мікроскопії беруть грибницю в чорних ділянках, заглиблюючись й неї голками. У препараті варто звернути увагу на багатоклітинний міцелій, слабо розвинені кондієносії й сидячі на них поодиночі або ланцюжками великі конідії. Вони мають вигляд округлих або загострено витягнутих багатоклітинних утворень.

Хід роботи

1. Вивчення морфології мікроміцетів:

- ✓ Висіяти культури *Aspergillus niger* та *Penicillium sp.* на поживне середовище.
- ✓ Інкубувати чашки Петрі за відповідних температурних умов.
- ✓ Оцінити ріст колоній за кольором, текстурою та формою.
- ✓ Підготувати мікроскопічні препарати, зафарбувати лактофеноловим бавовняним синім та дослідити структуру міцелію та спор.

2. Вивчення морфології дріжджів:

- ✓ Виростити *Saccharomyces cerevisiae* у рідкому середовищі.
- ✓ Виготовити мазки та зафарбувати метиленовим синім.
- ✓ Під мікроскопом оцінити форму, розмір клітин та процес брунькування.

3. Дослідження біохімічних властивостей дріжджів:

- ✓ Виконати тест на бродіння глюкози шляхом інкубації у рідкому середовищі з індикатором.
- ✓ Спостерігати зміну рН середовища та утворення газу.

Контрольні запитання:

1. Які основні відмінності між мікроміцетами та дріжджами?
2. Які методи використовуються для вивчення морфології грибів?
3. Які особливості росту мікроміцетів на агаризованих середовищах?
4. Як можна визначити ферментативну активність дріжджів?
5. Які практичні застосування дріжджів у промисловості?

Лабораторна робота №15

ОСНОВИ ВІРУСОЛОГІЇ: МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ

Мета: ознайомитися з основними методами виділення вірусів із біологічного матеріалу; вивчити методи культивування вірусів у лабораторних умовах; освоїти основні методи ідентифікації вірусів.

Матеріали та обладнання: біологічний матеріал, що містить віруси (вірусний ізолят, культуральна рідина); живильні середовища для клітинних культур; клітинні лінії для культивування вірусів (наприклад, HeLa, Vero); спеціальні лабораторні контейнери (колби, чашки Петрі); центрифуга; стерильні піпетки та пробірки; мікроскоп (світловий та електронний); реактиви для молекулярної діагностики (ПЛР, ІФА); ламінарний бокс.

Теоретична частина:

1. Методи виділення вірусів:

- ✓ Виділення вірусів з інфікованих організмів.
- ✓ Використання центрифугування та фільтрації.
- ✓ Концентрація вірусних частинок.

2. Методи культивування вірусів:

- ✓ Культивування у чутливих клітинних лініях.
- ✓ Використання лабораторних тварин для розмноження вірусів.
- ✓ Застосування курячих ембріонів для вирощування вірусів.

3. Методи ідентифікації вірусів:

- ✓ Морфологічні методи (електронна мікроскопія).

- ✓ Серологічні методи (ІФА, реакція нейтралізації).
- ✓ Молекулярно-генетичні методи (ПЛР, секвенування).
- ✓ Біологічні методи (спостереження за цитопатичним ефектом).

Діагностика вірусних інфекцій в більшості випадків базується на виділенні вірусу з інфекційного матеріалу та його подальшій ідентифікації. Правильне взяття матеріалу для дослідження, своєчасна доставка його в лабораторію з дотриманням умов для збереження збудника, вірне обрання методів культивування та ідентифікації вірусів дозволить своєчасно встановити діагноз вірусного захворювання. Метою даного заняття є навчитися проведенню індикації вірусної репродукції. Для досягнення цієї мети необхідно вміти виявляти віруси у різних чутливих системах (клітинних культурах, курячих ембріонах, чутливих лабораторних тваринах); розрізняти різні види ЦПД у культурі клітин; знати методику постановки реакцій бляшкоутворення під агаровим та бентонітовим покриттям; проводити облік “кольорової проби”, що поставлена з метою індикації вірусів у культурі клітин, облік реакції гемадсорбції та реакції гемаглютинації. На практичному занятті студенти мають можливість ознайомитись з різними методами індикації вірусів, навчитися інтерпретувати отримані результати.

I. Культивування вірусів. 1. Культивування вірусів рослин. Критерії відбору рослин як систем для культивування вірусів. Рослини-індикатори. Методи культивування клітин і тканин вищих рослин. Калусні культури. Типи калусних культур і їхня характеристика. Одержання калусних культур *in vitro*. Молекулярно-фізіологічні основи процесу диференціації клітин. Суспензійні культури. Основні переваги культивування клітинних суспензій. Способи одержання суспензійних культур. Типи клітинних суспензій. Фактори, що впливають на ступінь агрегації клітин. Основні параметри суспензійних культур. Способи культивування клітинних суспензій. Культури протопластів. Методи одержання протопластів. Умови і способи культивування протопластів. Методи злиття протопластів. Використання ізольованих протопластів для вирішення теоретичних і прикладних проблем вірусології. Меристематична культура. Культура пиляків.

2. Культивування вірусів тварин. Культивування у курячих ембріонах. Зараження в порожнину алантоїса, порожнину амніона, хоріоналантоїсну оболонку, жовтковий мішок. Культивування в культурах клітин. Первинні культури клітин. Перещеплювальні культури клітин. Культури диплоїдних клітин. Цитопатична дія вірусів у культурах клітин. Культивування вірусів тварин у культурі органів, лабораторних тваринах. 3. Культивування бактеріофагів. Критерії відбору бактерій як систем для культивування бактеріофагів. Метод злитного лізису. Відокремлення й очищення бактеріофагів від клітин бактерій, високо- та низькомолекулярних сполук.

II. Індикація та ідентифікація вірусів. Методи індикації та ідентифікації вірусів у культурах клітин. Цитопатична дія вірусів у культурі клітин. Реакція гемадсорбції. Бляшкоутворення. Кольорова проба. Використання реакції гемаглютинації, реакції пригнічення гемаглютинації і біологічних моделей для індикації та ідентифікації вірусів. Реакція нейтралізації вірусів *in vivo*. Критерії чистоти вірусних препаратів. Концентрування вірусів.

III. Кількісне визначення вірусів. Визначення інфекційності вірусів. Підрахунок кількості вірусних бляшок (негативних колоній), некротичних плям, зон проліферації. Титр вірусів. Метод інфекційних центрів. Метод трансформації. Прямі тести на інфекційність. Визначення інфекційної та летальної доз вірусу. Виявлення вірусних антигенів. Реакція кількісної гемаглютинації. Кількісна електронна мікроскопія.

Хід роботи

1. Виділення вірусу:

✓ Взяти пробу біологічного матеріалу (сироватка, культуральна рідина).

✓ Провести центрифугування та фільтрацію для очищення вірусних частинок.

✓ Концентрувати вірусний ізолят за допомогою ультрацентрифугування.

2. Культивування вірусу:

✓ Засіяти клітинну культуру у стерильних умовах.

✓ Внести вірусний ізолят у культуральне середовище.

- ✓ Інкубувати клітинні культури при оптимальній температурі.
- ✓ Спостерігати за морфологічними змінами клітин (цитопатичний ефект).

3. Ідентифікація вірусу:

- ✓ Виконати ІФА для визначення вірусних антигенів.
- ✓ Використати ПЛР для виявлення вірусної нуклеїнової кислоти.
- ✓ Дослідити морфологію вірусів під електронним мікроскопом.

Контрольні запитання:

1. Які основні етапи виділення вірусів із біологічного матеріалу?
2. Які методи культивування вірусів використовуються в лабораторній практиці?
3. У чому полягає принцип дії серологічних методів ідентифікації вірусів?
4. Як працює метод ПЛР для діагностики вірусних інфекцій?
5. Чим відрізняється електронна мікроскопія від світлової при вивченні вірусів?

Список використаної літератури:

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології : підручник. К. : Либідь, 2001. 312 с.
2. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник. Львів : ВЦ ЛНУ ім. І. Франка, 2009. 360 с.
3. Практична мікробіологія : посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Широкобоков. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 440 с.
4. Ястремська Л. С., Малиновська І. М. Загальна мікробіологія і вірусологія : навч. посібник. Київ : НАУ, 2019. 232 с..
5. Ібатулліна Ф. Ж., Козловська Г. В., Мельник М. В., Скибіцький В. Г. Мікробіологія : підручник. Київ, 2015. 475 с.
6. 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.
7. Яворська Г. В., Гудзь С. П., С.О. Гнатуш. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 256 с.
8. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія Навчальний посібник. Львів : Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2010. 264 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., Капрельянц Л. В., Труфкаті 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.