

Волинський національний університет імені  
Лесі Українки  
Біологічний факультет  
Кафедра ботаніки і садово-паркового  
господарства

**С.М. Голуб, В.О. Голуб, Ю.В. Мельничук**

## **Мікробіологія**

Методичні вказівки до лабораторних робіт  
для студентів III курсу біологічного факультету

Редакційно-видавничий відділ “Вежа”  
Волинського національного університету імені Лесі Українки  
Луцьк - 2012

Методичні вказівки містять зміст лабораторного експерименту з курсу мікробіології і призначені для проведення лабораторних робіт на третьому курсі біологічного факультету.

Складені на основі університетської робочої програми з мікробіології, згідно якої для проведення лабораторних занять відведено годин.

Рекомендовано до друку вченою радою Волинського національного університету імені Лесі Українки.

Рецензенти :

Верстка і макетування:

## Зміст

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії.....	
Лабораторна робота №1. Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.....	
Лабораторна робота №2. Стерилізація.....	
Лабораторна робота №3 Методи виготовлення препаратів для світлової мікроскопії.....	
Лабораторна робота №4. Приготування поживних середовищ. Культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах.....	
Лабораторна робота №5. Ознайомлення з формами прокаріотів та еукаріотів.....	
Лабораторна робота №6. Будова мікробної клітини. Ендоспори бактерій. Включення клітин мікроорганізмів.....	
Лабораторна робота №7. Клітинна стінка та капсула бактерій.....	
Лабораторна робота №8. Аналіз мікрофлори повітря, води та зубного нальоту.....	
Лабораторна робота №9. Виділення мікроорганізмів з ґрунту. Вплив антропогенних факторів на мікрофлору ґрунту.....	
Лабораторна робота №10. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків.....	
Лабораторна робота №11. Спиртове бродіння.....	
Лабораторна робота №12. Молочнокисле бродіння.....	
Лабораторна робота №13. Маслянокисле бродіння.....	
Додаток.....	
Література.....	

## Правила роботи у мікробіологічній лабораторії

Робота у мікробіологічній лабораторії потребує суворого додержання спеціальних правил, оскільки в ній, в основному, дослідження проводяться з живими культурами мікроорганізмів. Тому всі працівники мікробіологічної лабораторії зобов'язані дотримуватись наступних правил роботи, які забезпечують стерильність в роботі і попереджують можливість зараження:

1. До приміщення мікробіологічної лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу – халату.
2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.
3. Перед початком занять черговий повинен одержати від лаборанта дрібний інвентар.
4. Студенти несуть повну відповідальність за закріплені за ними на робочому місці мікроскопи, обладнання, реактиви і посуд.
  - а) слід суворо дотримуватися правил користування хімічними реактивами, фарбами, легкозаймистими речовинами;
  - б) для попередження розсіювання мікроорганізмів не залишати відкритими пробірки, колби, чашки з культурами мікроорганізмів.
5. Після роботи металеві інструменти (пінцети, скальпелі, мікробіологічні петлі) необхідно прожарити на вогні.
6. Після використання скляні піпетки, предметні і покривні скельця з живими препаратами, шпателі необхідно занурити у кристалізатор з дезінфікуючим розчином.
7. Після закінчення занять студенти миють посуд, прибирають робоче місце.
8. Черговий студент повинен здати дрібний інвентар і прибрану лабораторію лаборанту кафедри.

## Лабораторна робота № 1

### МЕТОДИ МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

**Мета роботи:** Ознайомитися з методами мікроскопічного дослідження мікроорганізмів. Освоїти будову світлового мікроскопа та правила роботи з ним.

Одним з основних методів вивчення мікроорганізмів є мікроскопічний. Залежно від завдань, які стоять перед дослідником, використовується декілька типів мікроскопів. На сьогодні у мікробіології застосовують *світлові*, *електронні* та *зондові* мікроскопи.

#### Світлова мікроскопія

Більшість мікробіологічних досліджень виконується із використанням світлових мікроскопів – приладів з певним розташуванням лінз, за допомогою яких зображення об'єкта збільшується і стає видимим. Розрізняють світлопольну, темнопольну, фазово-контрастну та люмінесцентну світлові мікроскопії. Всі вони працюють за однаковим принципом, оскільки для їх роботи використовується світло з певною довжиною хвилі, що проходить крізь лінзи і безпосередньо сприймається сітківкою ока людини.

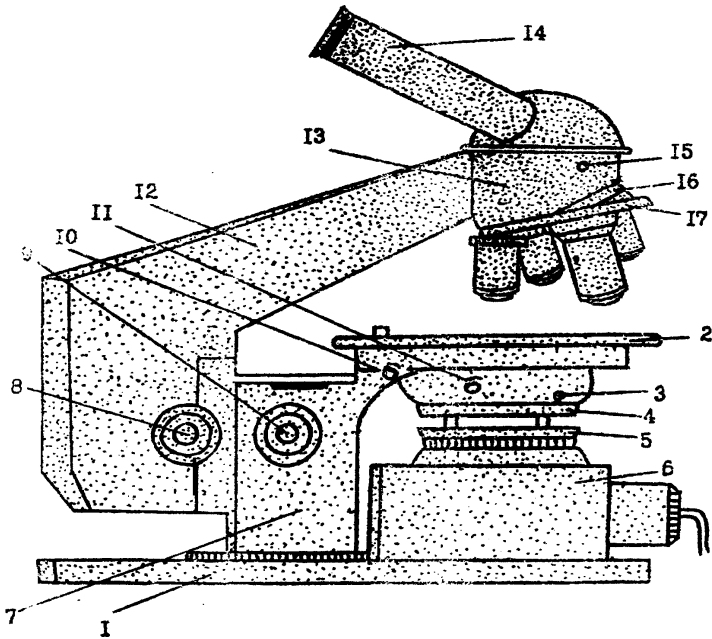
#### *Світлопольна мікроскопія*

Будову світлового мікроскопа наведено на рис.1.

Світловий мікроскоп має механічну (допоміжну) і оптичну (головну) частини.

Оптична система складається з освітлювальної системи (штучний освітлювач або дзеркало, конденсор з діафрагмою, тримач світлофільтрів) і системи спостережень (окуляр та об'єктиви). Джерело штучного освітлення і конденсор з діафрагмою знаходяться під предметним столиком. Конденсор складається з 2-3 лінз. Рухаючись за допомогою гвинта догори

або вниз, він скеровує промені світла на об'єкт. При розгляданні фарбованих препаратів отвір діафрагми збільшують, нефарбованих – зменшують. При користуванні штучним освітленням у тримач під конденсором вкладають світлофільтр. Окуляр вставлений у верхній отвір тубуса мікроскопа, на нижньому кінці якого закріплена насадка з об'єктивами.



**Рис. 1. Схематична будова світлового мікроскопа**

1 – основа штатива, 2 – предметний столик, 3 – гвинт для кріплення конденсора, 4 – конденсор, 5 – відкидна лінза, 6 – освітлювач, 7 – коробка з механізмом мікрометричного фокусування, 8 – макрометричний гвинт, 9 – мікрометричний гвинт, 10-11 – гвинти для переміщення предметного столика, 12 – штатив, 13 – головка для кріплення насадки і тубуса, 14 – тубус з окуляром, 15 – гвинт для кріплення тубусу, 16 – гвинт кріплення насадки, 17 – насадка з об'єктивами.

Коефіцієнт збільшення мікроскопа визначається добутком збільшення окуляра на збільшення об'єктива. Робоче збільшення окулярів коливається в межах від 4х до 15х. Найголовніша частина мікроскопа – об'єктив – складається з системи лінз.

Основна лінза об'єктива – передня (фронтальна), вона розміщена безпосередньо над досліджуваним об'єктом, від її фокусної віддалі залежить збільшення об'єктиву.

Розрізняють сухі, або повітряні, і імерсійні (занурені) об'єктиви. При користуванні об'єктивами 8x, 20x, 40x між фронтальною лінзою і препаратом знаходиться шар повітря, в якому заломлюється і відхиляється частина променів. Імерсійним називається об'єктив, при роботі з яким між фронтальною лінзою і препаратом міститься рідина з показником заломлення, близьким до показника заломлення скла (об'єктив 90x). Такою рідиною є кедрова олія (показник заломлення кедрової олії – 1,515, скла – 1,52). Крім кедрової олії можна використовувати інші імерсійні рідини: гліцерин і воду, показник заломлення яких складає відповідно 1,4 та 1,3. Лінза імерсійного об'єктива занурюється в масляну імерсію, яка підвищує освітленість поля зору і роздільну здатність мікроскопа. Роздільна здатність мікроскопа визначається найменшою відстанню між двома точками на препараті, які можна побачити окремо. Для того, щоб покращити роздільну здатність мікроскопа, необхідно освітлювати об'єкт більш короткими променями світла або збільшити показник заломлення середовища, яке межує з лінзою (наприклад, за допомогою нанесення імерсійної олії на препарат). Межа роздільної здатності світлового мікроскопа при освітленні об'єктива видимими променями спектра дорівнює 0,2 мкм, а людського ока – 200 мкм.

У мікроскопах без електричних освітлювачів пристроєм для освітлення є рухоме дзеркало, яке збирає світло і скеровує його в конденсор для освітлення препарату. Дзеркало має дві сторони – увігнуту і плоску. Плоску сторону використовують при роботі з конденсором і незалежно від джерела світла, увігнуту - при роботі без конденсора з об'єктивами малих збільшень.

Крім світлопольної існують інші типи світлової мікроскопії, характеристики яких наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

## Інші типи світлової мікроскопії

Типи	Принцип	Переваги	Застосування
Темнопольна	Використовується конденсор темного поля із затемненим центром. Об'єкт освітлюється лише променями, що падають на нього під кутом	Дозволяє побачити лише зовнішні контури об'єкта та його рух. Об'єкт виглядає як світла точка на темному фоні	Для дослідження дуже дрібних та неконтрастних живих об'єктів
Фазово-контрастна	Використовуються спеціальні конденсор, об'єктиви та допоміжні пристрої	Фази світлових хвиль перетворюються в різницю інтенсивності світла і деталі будови об'єкта стають видимими для ока	Для вивчення живих нефарбованих об'єктів, внутрішньоклітинних структур
Люмінесцентна (ультрафіолетова)	Має ртутно-кварцеве джерело світла, яке випромінює УФ-промені, системи кварцевих лінз та світлофільтрів (для захисту очей від УФ). Деякі структури клітин, опромінені УФ, світяться, випромінюючи промені з іншою довжиною хвилі. Клітини можна обробляти додатково флюорохромами	Має більшу роздільну здатність, ніж інші типи світлової мікроскопії, високу чіткість зображення. Дозволяє відрізнити живі клітини від мертвих за характером світіння	Для живих та фіксованих клітин. Дозволяє проводити кількісні дослідження



## Електронна мікроскопія

В електронній мікроскопії замість світлових променів ( $\lambda=550$  нм), використовують пучок електронів, довжина хвилі яких дорівнює 0,04 нм, що приблизно у 10000 разів менше, ніж у світла. Крім того, в електронній мікроскопії зображення виводиться на екран, тому чутливість рецепторів зорового нерва в сітківці ока не обмежує сприйняття об'єкта. Саме через це роздільна здатність і збільшення електронного мікроскопа значно вищі, ніж у світлового. Використання електронного мікроскопа у мікробіології в основному пов'язано з дослідженнями як внутрішніх, так і поверхневих структур.

Типи електронної мікроскопії наведено в таблиці 2

Таблиця 2

### Типи електронної мікроскопії

Тип	Принцип	Можливості
Трансмісійний (просвічуючий)	Пучок електронів проходить у вакуумі від джерела електронів (вольфрамова граната) до екрану, пронизуючи об'єкт	Дозволяє розрізнити внутрішні компоненти клітини, що мають різну щільність.
Скануючий (растровий)	Пучок електронів, зібраний у точку, описує поверхню об'єкта, попередньо вкритого напиленням у вигляді шару важкого металу. Пучок вибиває електрони з напилення, які і реєструються на екрані	Дозволяє побачити лише поверхневі структури клітини

### Зондова мікроскопія

Найсучаснішими мікроскопічними методами є методи зондової мікроскопії. Розрізняють скануючу тунельну зондову мікроскопію та атомно-силову. Для візуалізації поверхні клітин, дослідження їх пружності та інших характеристик найбільш перспективною є атомно-силова мікроскопія. Вона має ряд переваг над усіма іншими. Насамперед, це висока роздільна

здатність, що перевищує електронно-мікроскопічну, і на кристалічних зразках дає можливість отримати зображення окремих атомів; можливість дослідження нативних клітин без будь-якої обробки (напилення, контрастування); можливість проведення дослідження у рідині. Для одержання зображення використовують мініатюрну голку із надтвердого матеріалу (зонд), яка, злегка дотикаючись, пересувається по поверхні досліджуваного зразка. Голка знаходиться на пружній мікропластинці, що закріплена одним кінцем. Згинання вільного кінця пластинки (відносно голки) обумовлена силою взаємодії голка-зразок і визначається оптичним методом за відхиленням відбитого лазерного променя. Переміщення голки забезпечується спеціальним маніпулятором. Результати аналізуються комп'ютером, на моніторі якого виникає зображення об'єкта. Існують різні режими вимірювань, які дають можливість чітко встановити рельєф поверхневих структур бактерій, їх розміри та ін.

### ***Техніка роботи зі світловим мікроскопом***

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

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

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

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

5. При роботі з об'єктивом 8х, 40х, та 90х конденсор залишити у максимально верхньому положенні. Ступінь освітлення слід регулювати ірисовою діафрагмою.

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

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

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

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

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

11. Покращити видимість препарату за допомогою мікрометричного гвинта.

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

### **Контрольні питання:**

1. Перерахуйте методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.

2. Охарактеризуйте типи світлової мікроскопії.

3. Що таке розподільча здатність мікроскопа і як можна її збільшити?

4. Які переваги має імерсійний метод дослідження мікроскопічних препаратів?

5. Назвіть правила користування світловим мікроскопом.

6. Електронна мікроскопія, принцип, типи та можливість застосування.

## Лабораторна робота № 2

### СТЕРИЛІЗАЦІЯ

**Мета роботи:** Ознайомитися з способами стерилізації та дезінфекції. Навчитися готувати матеріал до стерилізації.

Стерилізація – це повне звільнення будь-якого матеріалу від вегетативних клітин мікроорганізмів та їх форм, що знаходяться у стадії спокою (спор). В основу процесу стерилізації покладена здатність деяких чинників викликати загибель мікробних клітин та їх спор.

#### *Способи стерилізації*

Стерилізацію посуду, матеріалів, розчинів та поживних середовищ для культивування мікроорганізмів можна здійснювати різними способами, наведеними на рис. 1.



## **Рис 1. Способи стерилізації**

*Стерилізація опроміненням* проводиться під дією ультрафіолетових променів,  $\gamma$ -променів та інших видів радіоактивного випромінювання. Застосовується для обробки приміщень (повітря), поверхні лабораторного оснащення, а також одноразового пластикового посуду (шприци, бактеріологічні петлі, піпетки, чашки Петрі та ін.).

*Стерилізація фільтруванням (холодна стерилізація)* ґрунтується на пропусканні розчинів або газів (повітря) через спеціальні фільтри (азбестові, керамічні, скляні, синтетичні, мембранні) з величиною пор, що затримують мікробні клітини (0,25-0,4 мкм). Застосовується для стерилізації термолабільних компонентів поживних середовищ, буферних розчинів, реактивів, різноманітних матеріалів, газів та повітря, наприклад, у ламінарних боксах та виробничих приміщеннях.

*Стерилізація вологою парою під тиском (автоклавування)* ґрунтується на прогріванні будь-якого матеріалу насиченою парою під тиском, вищим від атмосферного і при температурі вище 100°C. Температура насиченої пари залежить від тиску – при підвищенні тиску зростає її температура. Між показниками манометра автоклава та температурою існує певна залежність (*табл. 1*). Таким способом зазвичай стерилізують поживні середовища, різні термостабільні розчини, скляний лабораторний посуд, гумові матеріали, а також знезаражують культури мікроорганізмів та відпрацьований матеріал.

Під час автоклавування гинуть вегетативні клітини мікроорганізмів і їх спори.

Автоклави бувають різної конструкції, але принцип їх будови однаковий.

Автоклав вертикальний (*рис. 2*) є металевим двостінним котлом, здатним витримати високий тиск. Внутрішня частина котла є стерилізаційною камерою (1). В ній є отвори, з'єднані з краном для виходу повітря (2), мановакуометром (3), електроконтактним манометром (4), який автоматично підтримує певний тиск, з запобіжним клапаном (5), який запобігає розриву

автоклаву, випускаючи надлишок пари. Між подвійними стінками котла є простір – водопарова камера (11), яка заповнюється через лійку (6) водою. Для безпеки працюючих ззовні паровий котел закритий міцним металевим кожухом. Після закипання води водяна пара через отвір (8) потрапляє у стерилізаційну камеру, герметично закриту металевою кришкою, створює підвищений тиск. Більшому тиску відповідає вища температура. Температура в автоклаві і тривалість автоклавування визначається складом живильних середовищ.

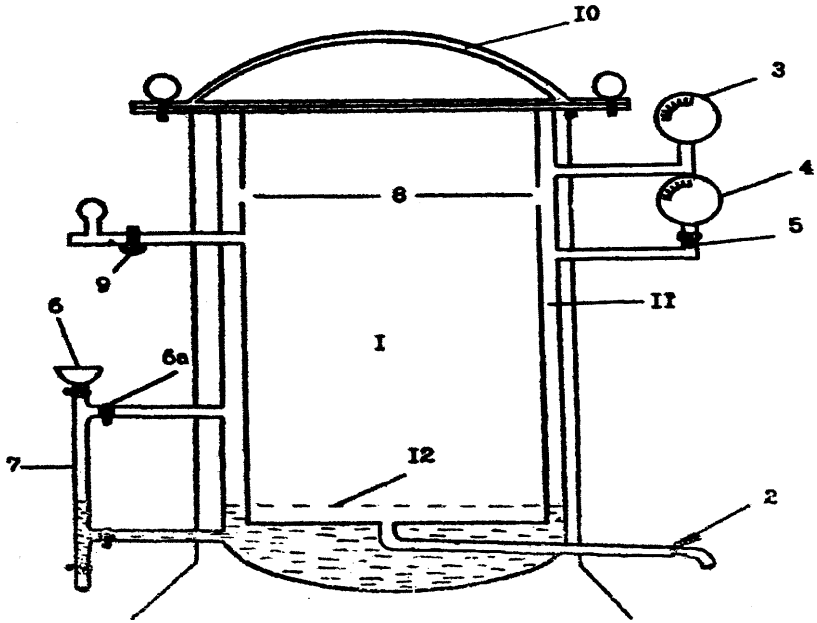
Таблиця 1

**Співвідношення показників манометра та температури кипіння води при автоклавуванні**

Показники манометра, атм	Температура кипіння води, °С
0	100
0,2	105
0,4	110
0,5	112
0,6	114
0,7	116
0,8	117
0,9	119
1,0	121
1,5	127
2,0	134

*Стерилізація вологою парою без тиску (текучою парою)* проводиться у апараті Коха або в автоклаві без надлишкового тиску і застосовується, в основному, для таких поживних середовищ, властивості яких змінюються при температурі, вищій 100°C, та матеріалів, які не витримують дії високої температури. Стерилізацію текучою парою слід проводити повторно, оскільки однократне прогрівання при температурі 100°C не забезпечує повного знезараження. Такий метод отримав назву “*дрібна стерилізація*”. Матеріал, який стерилізується, обробляють текучою парою 15-30 хв. протягом 3-х днів щоденно. Між цими обробками матеріал витримують при кімнатній температурі або у термостаті для проростання

спор у вегетативні форми, які гинуть при наступних прогріваннях. Подібна до цієї стерилізації – “тиндалізація”, під час якої матеріал прогрівається при 56-60°C протягом 5-6 днів і у проміжках між прогріваннями витримується у термостаті.



**Рис. 2. Схема автоклава**

1 – стерилізаційна камера, 2 – кран для виходу повітря, 3 – мановакуометр, 4 – електроконтактний манометр, 5 – запобіжний клапан, 6 – лійка для заповнення автоклава водою, 6а – кран водомірної колонки, 7 – водомірна колонка, 8 – отвори, 9 – кран ежектора, 10 – кришка автоклава, 11 – водопарова камера, 12 – підставка для розміщення стерилізаційного матеріалу.

Стерилізація сухим жаром здійснюється у сухо-жаровій шафі і застосовується для підготовки скляного та металевого посуду. Тривалість стерилізації залежить від температури (табл.

2). Слід мати на увазі, що при 170°C папір та вата жовтіють, а при більш високих температурах обуглюються.

*Прокалювання у полум'ї пальника* застосовують для стерилізації або знезараження бактеріологічних петель, кінчиків пінцетів, свердл та деяких інших металічних предметів.

Таблиця 2

**Тривалість стерилізації у сухожаровій шафі при різних температурах**

Температура, °C	Час стерилізації, год
150	2
165	1
180	40
200	10-15

*Хімічна стерилізація (дезінфекція)* – це знищення мікроорганізмів, які знаходяться на поверхнях різних об'єктів під дією хімічних агентів (дезінфікуючих речовин або мікробіцидних газів). Дезінфекцію проводять у тих випадках, коли неможливо застосувати стерилізацію іншими методами. Як дезінфікуючі агенти використовують оксид етилену,  $\beta$ -пропіолактон, формальдегід та його пари, фенольні сполуки, галогени та їх похідні (гіпохлорид натрію, хлорамін), спирти, альдегіди, розчини солей важких металів (срібла, ртуті, міді), четвертинні амонійні сполуки.

*Пастеризація (неповна стерилізація)* застосовується для знищення в матеріалі тільки вегетативних форм мікроорганізмів. При пастеризації матеріал прогрівають при 75-80°C протягом 5-10 хв. Цей метод найчастіше використовують для обробки продуктів харчування, які під впливом високих температур втрачають свої смакові та поживні якості.

**Практичне завдання**

*Підготувати до стерилізації пробірки, градуйовані піпетки, чашки Петрі та поживні середовища.*

**Хід роботи**



## **1. Підготовка матеріалів до стерилізації**

Посуд перед стерилізацією чисто вимити і загорнути в папір для збереження стерильності після прогрівання. Чашки Петрі загорнути в папір по три штуки.

Широкий отвір піпеток закрити ватними корками, піпетки вкласти в паперові пакети. Пробірки, колби, пляшечки, призначені для культивування мікроорганізмів, закрити ватними корками, які захищають культури від зараження сторонньою мікрофлорою і висихання. Через ватні корки відбувається також газообмін з оточуючим середовищем. Корок на 2/3 повинен заходити в пробірку.

Для захисту від пилу перед стерилізацією ватні корки накрити ковпачками, зробленими з паперу.

Середовища, підготовлені для стерилізації, налити в колби не більше ніж до половини, в пробірки – на 1/3 - 1/2 об'єму.

## **2. Робота з автоклавом**

1. Відкрити кришку автоклава. Відкрити кран (2) для виходу повітря з стерилізаційної камери назовні. На кран одягти гумовий шланг, кінець якого занурений в посуд з водою.

2. Через лійку (б) налити дистильовану воду у водопарову камеру до рівня, відзначеного на водомірній трубці (7).

3. Закрити кран водомірної колонки (6а).

4. В стерилізаційну камеру (1) закласти посуд, живильні середовища та інші матеріали, підготовлені для стерилізації. Закрити кришку автоклава.

5. На електроконтактному манометрі (4) виставити вибраний для стерилізації тиск і включити автоклав.

6. Електронагрівачі нагрівають воду. Водяна пара поступає до стерилізаційної камери і витискає з автоклава повітря назовні через кран (2). Необхідно, щоб водяна пара витіснила з автоклава все повітря, тому що згубна дія насиченої водяної пари на мікроорганізми більша, ніж у суміші водяної пари з повітрям.

Почекати, поки з автоклава почне виходити суха водяна пара (про це свідчить рівномірний шиплячий звук), випустити її протягом 5 хв, і закрити кран (2).

В автоклаві зростає тиск. Контрольний манометр показує надлишковий тиск понад атмосферний.

7. Відзначити час досягання в стерилізаційній камері заданого тиску як час початку стерилізації. Це співпадає з першим автоматичним відключенням електроелементів.

8. Після закінчення стерилізації автоклав вимкнути і почекати, поки тиск в стерилізаційній камері не впаде до нуля. Ні в якому разі не можна відкривати автоклав передчасно, оскільки:

а) це загрожує обслуговуючому персоналу;

б) раптовий перепад тиску може призвести до виштовхування ватних корків і порушить стерильність матеріалу.

9. Якщо тиск в автоклаві зрівняється з атмосферним (стрілка манометра на 0), відкрити кран (2) і випустити пару та конденсат.

10. Висушування простерилізованого матеріалу проводять за допомогою ежекції, при якій через кран (9) вакуумом відсмоктується пара із стерилізаційної камери (кран 2 попередньо закрити).

11. Відкрити кришку автоклава і вийняти стерильний матеріал.

***УВАГА!!! Автоклав є приладом, що працює при високому тиску і температурі.***

*Неправильне користування ним може бути причиною нещасного випадку.*

**Категорично забороняється :**

1) доливати воду в автоклав під час стерилізації;

2) користуватись автоклавом з несправним манометром або запобіжним клапаном;

3) залишати автоклав без нагляду під час стерилізації.

До роботи допускаються лише особи, які добре ознайомлені з правилами експлуатації автоклава.

### Контрольні питання:

1. Що таке стерилізація?
2. Способи термічної стерилізації, з'ясуйте їх переваги і недоліки.
3. Назвіть послідовність операцій при автоклавуванні.
4. У яких випадках користуються тиндалізацією, пастеризацією, дезінфекцією?
5. Яким чином можна простерилізувати посуд, поживні середовища та термолабільні розчини?
6. Якими методами стерилізації можна знищити спори?

### Матеріали та обладнання:

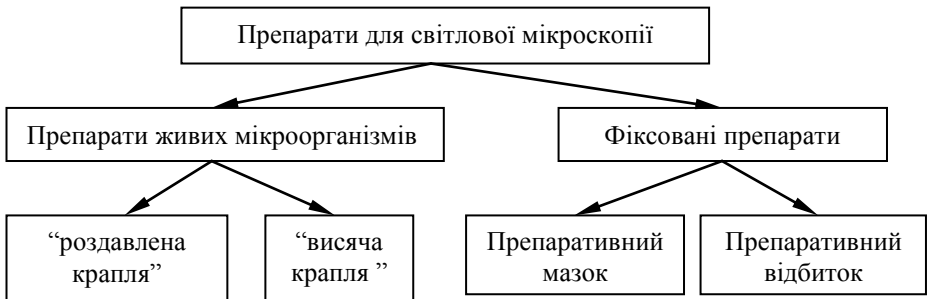
Чашки Петрі, колби, піпетки, папір, ватні корки, паперові пакети, ковпачки з паперу, поживні середовища.

## Лабораторна робота № 3

### МЕТОДИ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ СВІТЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ

**Мета роботи:** Навчитися виготовляти мазки-препарати для мікроскопічного дослідження, фарбувати їх та мікроскопіювати.

Одним із основних етапів досліджень у мікробіології є мікроскопія фіксованих або препаратів живих мікроорганізмів (рис. 1).



## Рис.1. Типи препаратів для світлової мікроскопії

Мікроскопія живих мікроорганізмів дозволяє встановити розміри клітини, її форму, рухливість бактерій та характер їх поділу, вплив на них різних хімічних речовин. Живі мікроорганізми можна спостерігати у мікрокамерах – препарати “вісяча крапля ” та “роздавлена крапля”. Інколи для прижиттєвої мікроскопії бактерій застосовують барвники (нейтральний червоний, діамантовий червоний, діамантовий крезоловий синій, везувін), але у низьких концентраціях (0,001-0,0001%) з причини їх токсичності. Спостереженню за окремими живими клітинами перешкоджає їх постійне переміщення у полі зору мікроскопа. Тому цитологічні дослідження мікроорганізмів здійснюють переважно із застосуванням фіксованих забарвлених препаратів.

Фіксовані препарати виготовляють за спеціальною схемою із застосуванням різноманітних способів фіксації та фарбування.

Фіксація препаратів необхідна для інактивації бактерій, міцного прикріплення клітин до поверхні скла та підвищення їх сприйнятливості до барвників. Фіксація може здійснюватися жаром або хімічними речовинами (рідкими та газоподібними). Фіксація жаром (у полум'ї пальника) не бажана для тонких цитологічних досліджень, і у таких випадках здійснюють хімічну фіксацію з різною експозицією.

Фарбування фіксованих препаратів здійснюють переважно аніліновими барвниками, що є похідними бензолу та його гомологів, які відрізняються між собою хімічною природою та кольором (табл. 1).

Таблиця 1

### Види барвників, які використовуються для фарбування препаратів

Колір	рН барвника	
	рН>7 (лужна реакція)	рН<7 (кисла реакція)
Червоні	Нейтральний червоний, сафранін, фуксин	Фуксин кислий, еозин, еритрозин
Фіолетові	Генціановий	

	фіолетовий, кристалічний фіолетовий, гемадоксилін	
Жовті		Конго, пікринова кислота
Чорні	Індулін	Нігрозин
Сині	Метиленовий синій, толуїдиновий синій	
Зелені	Діамантовий зелений, малахітовий зелений, янус зелений	
Коричневі	Хризоїдин, везувін	

*Просте фарбування* препаратів здійснюється із застосуванням як правило одного барвника (наприклад, фуксину основного, генціанового фіолетового).

*Складне (або комплексне) фарбування* передбачає застосування кількох, часто контрастних барвників, послідовному використанню яких може передувати застосування знебарвлювачів (спиртів, кислот та ін.). Комплексне фарбування, на відміну від простого, дозволяє виявляти клітинні структури (нуклеоїд, включення, спори), встановлювати певні властивості (кислотостійкість), особливості будови клітинної стінки (фарбування за Грамом) тощо.

### **Виготовлення препарату “відбиток”**

1. З агаризованого середовища у чашці Петрі, на якому досліджувані мікроорганізми ростуть суцільним газоном чи у вигляді окремих колоній, вирізати скальпелем невеликий блок і перенести його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була розташована догори.

2. Чисте покривне скло покласти на поверхню блока, злегка натиснути і відразу зняти, не зсуваючи вбік.

3. Помістити отриманий препарат (відбитком донизу) у краплю води на предметне скло.

4. Розглянути препарат під мікроскопом у сухій чи імерсійній системі.

### **Виготовлення препарату “висяча крапля”**

1. Взяти предметне скло із шліфованою лункою. Краї лунки змастити вазеліном.

2. На центр покривного скельця нанести краплю досліджуваного матеріалу. У випадку використання бульйонної культури матеріал відбирають безпосередньо із колби або пробірки, додержуючись умов стерильності. У випадку використання культур, які вирости на щільному поживному середовищі, на покривне скло попередньо нанести краплю стерильного фізіологічного розчину, а потім петлею внести невелику кількість досліджуваної культури.

3. Предметне скло перевернути лункою вниз і помістити на покривне скло таким чином, щоб крапля з матеріалом знаходилась у центрі лунки, не торкаючись її країв. Предметне скло злегка притиснути до покривного і перевернути. У герметичній камері, що утворилась, крапля не підсихає. Це дозволяє спостерігати за мікроорганізмами досить тривалий час.

4. Провести мікроскопію із використанням імерсійного об'єктиву.

### **Виготовлення живого препарату “роздавлена крапля”**

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.

2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.

3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.

4. Розглянути препарат при збільшенні 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

### **Виготовлення фіксованих препаратів мікроорганізмів**

1. Додатково знежирити предметне скло. Для цього його необхідно нетерти сухим господарським милом та витерти насухо марлевою серветкою. Із зворотньої сторони сла олівцем по склу позначити межі майбутнього препарату та його номер.

2. За допомогою петлі нанести на скло краплю стерильної дистильованої води. Бактеріальну культуру у невеликій

кількості забрати з поверхні щільного поживного середовища за допомогою петлі із додержанням умов стерильності і внести у краплю води на склі. Мікробний матеріал розподілити на склі рівномірним шаром у вигляді мазка правильної форми (округлої чи квадратної), площею 1,5-2 см<sup>2</sup>. Площа розподілу бактеріальної суспензії залежить від її густини.

3. Висушити виготовлений препарат при кімнатній температурі на повітрі, помістивши предметне скло на місток кристалізатора.

4. Підсушений матеріал зафіксувати жаром у полум'ї пальника. Для цього скло затиснути за допомогою прищепки або пінцета і, тримаючи скло препаратом догори, тричі провести через полум'я пальника. Для запобігання спалення бактерій, скло у полум'ї слід тримати не більше 3-4 секунд.

5. Зафіксований препарат помістити на місток кристалізатора і нанести безпосередньо на мазок водно-спиртовий розчин фуксину основного. Фарбування проводити протягом 3 хв.

6. Легким струменем води змити барвник із препарату над кристалізатором, притримуючи предметне скло прищепкою або пінцетом. Промивання препарату слід проводити до тих пір, поки вода, що стікає з мазка, не стане прозорою.

7. Препарат висушити на повітрі, зібравши частину води зі скла за допомогою фільтрувального паперу.

8. Розглянути препарат під мікроскопом з імерсією.

### **Практичне завдання**

1. *Виготовити, розглянути і замалювати фіксовані препарати мікроорганізмів.*

2. *Виготовити, розглянути і замалювати препарат "роздавлена крапля".*

### *Мікроскопія фіксованих препаратів мікроорганізмів*

Препарати мікроорганізмів досліджують під мікроскопами, які мають імерсійні об'єктиви (збільшення 90х) із

використанням імерсійного масла. Попередньо слід перевірити готовність мікроскопа до роботи.

Краплю імерсійного масла нанести безпосередньо на виготовлений препарат. Помістити скло на предметний столик мікроскопа і зафіксувати його. Встановити імерсійний об'єктив. Макрогвинтом опустити об'єктив у краплю імерсійного масла, контролюючи занурення об'єктиву збоку. Дивлячись в окуляр мікроскопа, сфокусувати зображення об'єкту за допомогою макро- і мікрогвинтів.

Рухаючи предметний столик, розглянути декілька полів зору та вибрати найбільш вдалу зону препарата. Бактеріальні клітини в полі зору не повинні знаходитись у вигляді суцільного шару. У правильно виготовленому препараті поле зору повинне залишатися світлим, а зафарбованими повинні бути тільки клітини.

Замалювати препарат у масштабі поля зору із збереженням відповідних розмірів та кольору клітин. Підписати малюнок.

Зняти предметне скло. Протерти об'єктив марлевою серветкою, змоченою спиртом, для зняття імерсійного масла.

### **Контрольні питання**

1. Назвіть типи препаратів для світлової мікроскопії.
2. Яка послідовність дій при виготовленні препаратів живих клітин мікроорганізмів?
3. Яка послідовність дій при виготовленні фіксованих фарбованих препаратів?
4. Для чого необхідна фіксація препаратів? Способи фіксації.
5. Які барвники використовуються в мікробіологічній практиці?

**Матеріали та обладнання:** предметні та покривні скельця, шматочки господарського мила, марлева серветка, фільтрувальний папір, мікробіологічні петлі, кристалізатори з містками, стерильна дистильована вода, суміш-ефір (1:1),



ацетон, фарби: метиленовий синій, карболовий фуксин Ціля, імерсійне масло, спирт для витирання об'єктів, мікроскопи.

## **Лабораторна робота № 4**

### **ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ**

**Мета роботи:** Ознайомитися з поживними середовищами, уміти характеризувати ріст мікроорганізмів на них.

#### **1. Приготування поживних середовищ**

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні та неорганічні субстрати, які їм надають енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи живлення вони отримують із навколишнього середовища. При культивуванні у лабораторних умовах застосовують поживні середовища, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітини потребують для свого розвитку мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь та ін.). Для деяких мікроорганізмів необхідні додатково фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) та вітаміни. Таким чином, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту та розвитку мікроорганізмів.

Поживні середовища повинні відповідати наступним вимогам:

- містити всі необхідні джерела макроелементів, мікроелементів, а при необхідності вітамінів та факторів росту;
- всі сполуки, що входять до їх складу, повинні бути у певному збалансованому співвідношенні;
- містити необхідну кількість води у соєму складі;
- мати оптимальні для мікроорганізмів значення рН;

- бути ізотонічними, тобто мати такий же осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- бути стерильними.

Середовища, які використовуються в мікробіології, поділяють на групи за: походженням, консистенцією, призначенням (табл. 1).

Таблиця 1

### Класифікація поживних середовищ

Поживні середовища									
Консистенція				Склад та походження			Призначення		
Рідкі	Напіврідкі	Щільні	Сипучі	Натуральні	Синтетичні	Напівсинтетичні	Загального призначення	Спеціального призначення	
								Елективні	Диференційно-діагностичні

*Рідкі середовища* використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів, для вивчення їх фізіолого-біохімічних особливостей та ін.

*Напіврідкі середовища* містять 0,75-1% агар-агару (полісахарид з бурих водоростей, температура плавлення біля 100°C) або 5-7,5% желатини (речовина білкової природи з сполучної тканини тварин, температура плавлення 25°C) і використовуються для визначення газоутворення та характеру росту мікроорганізмів.

*Щільні середовища* містять 1,5-2% агар-агару або 10-15% желатини. Вони використовуються для виділення чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх культуральних особливостей та антагоністичних властивостей.

*Сипучі середовища* (розварене зерно, а також сипучі субстрати, що просочені поживними речовинами) використовуються, як правило, в промисловості.

*Натуральні середовища* мають рослинне або тваринне

походження та невизначений склад. Це – відвари злаків, фруктів та овочів; молоко, кров, сироватка, сеча, тваринні тканини, яйця птахів та їх зародки; дріжджовий автолізат; відвари м'яса; витяжки гною і ґрунту; вода озер і морів. До них належить м'ясо-пептонний бульон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонна желатина (МПЖ) та ін.

*Синтетичні середовища* готуються з певних хімічно-чистих речовин у точно вказаних концентраціях. Вони мають визначений склад і легко відтворюються. Наприклад, середовище Чапека для цвільових грибів, середовище Ешбі для азотфіксуючих бактерій та ін.

*Напівсинтетичні середовища* мають частково невизначений склад. Вони містять як хімічно чисті сполуки (вуглеводи, фосфати, нітрати), так і компоненти чітко не встановленого складу (дріжджовий екстракт, пивне сусло, пептон).

*Середовища загального призначення* використовуються для культивування більшості відомих мікроорганізмів. Наприклад, МПБ, МПА, МПЖ.

*Середовища спеціального призначення* готуються з певною метою для конкретних потреб. Серед них розрізняють *елективні середовища*, які забезпечують оптимальні умови лише для певних мікроорганізмів (наприклад, середовище Ешбі для азотфіксаторів); та *диференційно-діагностичні* середовища, що використовують для ідентифікації мікроорганізмів (наприклад, середовище з кров'ю для визначення гемолітичної активності, середовище Ендо для виявлення кишкової палички).

Найважливіші хімічні елементи (вуглець, азот, фосфор та сірку) мікроорганізми споживають у різних формах.

Джерелами вуглецю можуть бути органічні речовини – цукри, спирти, органічні кислоти, амінокислоти та неорганічні – карбонати, диоксид та моно оксид вуглецю.

Джерелами азоту можуть бути неорганічні сполуки (амонійні солі, нітрати, молекулярний азот) та органічні (амінокислоти). Найбільш доступним джерелом азоту для мікроорганізмів є амонійний азот, який має ступінь окислення

( $N^{3-}$ ), тому що саме в такому вигляді він включається в процес біосинтезу амінокислот. Для включення нітратного азоту в біосинтез, мікроорганізмам потрібно спочатку його відновити від  $N^{5+}$  до  $N^{3-}$ . Цей процес називається *асиміляторною нітратредукцією* і потребує затрат енергії. Зв'язування молекулярного азоту називається *азотфіксацією* і є ще більш енергозатратним, тому азотфіксація притаманна лише певним групам мікроорганізмів. Деякі мікроорганізми використовують як джерело азоту амінокислоти, які одночасно можуть бути і джерелом вуглецю.

Універсальним джерелом фосфору для мікроорганізмів є фосфатні солі.

Джерелом сірки для більшості мікроорганізмів є сульфати. Для включення сульфатної сірки у біосинтез, її спочатку необхідно відновити від  $S^{6+}$  до  $S^{2-}$ . Цей процес називається *асиміляторною сульфатредукцією* і потребує затрат енергії.

Речовини, що поглинаються мікроорганізмами, мають забезпечити їх енергією, що необхідна для активного біосинтезу, відновленими еквівалентами (тобто електронами), які необхідні для функціонування дихального ланцюга, фотосинтетичних електротранспортних систем та процесів анаболізму, і вуглецем, який є основним компонентом клітини. За джерелом енергії мікроорганізми поділяють на хемо- та фототрофів. *Хемотрофи* одержують енергію за рахунок хімічних реакцій, а *фототрофи* – в результаті перетворення енергії світла. За походженням джерела електронів мікроорганізми поділяють на орґано- та літотрофів. *Орґанотрофи* одержують електрони в процесі окислення орґанічних сполук, а *літотрофи* – неорґанічних. За походженням джерела вуглецю мікроорганізми поділяють на авто- та гетеротрофів. *Автотрофи* споживають неорґанічні джерела вуглецю, а *гетеротрофи* – орґанічні.

На відміну від вищих орґанізмів, мікроорганізми мають дуже різноманітні варіанти метаболізму, які представлені в таблиці 2.

Загальна назва, що характеризує метаболічні особливості

мікроорганізма, складається з 4-х коренів, наприклад, хемо-літо-гетеротрофи:

- перший корінь вказує на джерело енергії, що її використовує мікроорганізм;
- другий корінь вказує на походження електронів;
- третій корінь вказує на джерело вуглецю.
- четвертий походить від грецького *trophe* – живлення.

Таблиця 2

### Типи метаболізму мікроорганізмів

Джерела енергії	Енергія хімічних реакцій	Джерела електронів	Джерела вуглецю	
			Органічні речовини	Неорганічні речовини
Джерела енергії	Енергія хімічних реакцій	Органічні речовини	Хемоорганогетеротрофи	Хемоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини	Хемолітогетеротрофи	Хемолітоавтотрофи
	Енергія світла	Органічні речовини	Фотоорганогетеротрофи	Фотоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини	Фотолітогетеротрофи	Фотолітоавтотрофи

### Практичне завдання

*Приготувати одне з наведених нижче середовищ.*

1. *Щільне натуральне загальнозживане середовище – м'ясо-пептонний агар (МПА).*
2. *Рідке натуральне загальнозживане середовище – пептонну воду.*
3. *Щільне натуральне середовище – картопляний агар.*
4. *Щільне напівсинтетичне середовище – середовище для дріжджів.*
5. *Щільне синтетичне елективне середовище – середовище Ешбі.*

### Хід роботи

1. Для приготування м'ясо-пептонного агару (МПА) використовують виготовлений промисловим способом сухий

порошок, який містить всі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю і простотою приготування. До його складу входять гідролізат м'яса або риби – 17,9 г/л, пептон – 10 г/л, NaCl – 5 г/л, агар-агар – 20 г/л. Вказану в інструкції кількість сухого порошку слід розмішати у колбі з 1000 мл холодної дистильованої води. Перевірити рН і при необхідності довести його значення до 7,2-7,4 розчином NaOH. Потім, при постійному перемішуванні, довести розчин до кипіння та повного розчинення інгредієнтів. Отримане середовище профільтрувати у гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр. Стерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) протягом 15-20 хвилин.

2. Для приготування пептонної води до дистильованої води необхідно додати 1% пептону і 0,5% NaCl або розчинити у дистильованій воді стандартну суміш, виготовлену промисловим способом. Встановити значення рН на рівні 7,2-7,4 розчином NaOH, прокип'ятити 30 хвилин, знову перевірити рН. У випадку застосування стандартного середовища, суміш прокип'ятити протягом 3 хв. Потім розчин профільтрувати через паперовий фільтр і простерилізувати при 121 С (при 1 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

3. Для приготування картопляного агару 200 г картоплі (добре помитої та очищеної) подрібнити, залити 1 л водопровідної води, кип'ятити протягом 15 хвилин. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водопровідною водою до початкового рівня, додати 0,2% NaCl і 2% агар-агару. Нагріти при постійному перемішуванні до повного розплавлення агару, при необхідності знову профільтрувати. Встановити значення рН на рівні 7,0. Середовище простерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

4. Для приготування середовища для дріжджів в 1л дистильованої води розчинити солі, додати агар-агар, витримати протягом 15-20 хвилин до його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр та

розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 112°C (при 0,5 атм в автоклаві) протягом 30 хвилин.

Компоненти середовища (г/л):

- Сахароза – 20,0
- Пептон – 5,0
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0
- агар-агар – 20,0

5. Для приготування синтетичного середовища Ешбі в 1л водопровідної води розчинити солі, виміряти рН, при необхідності довести значення рН до рівня 7,3 - 7,6, додати агар-агар, витримати протягом 15-20 хвилин до його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати  $\text{CaCO}_3$  за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5°C (при 0,75 атм в автоклаві) протягом 10 хвилин.

Компоненти середовища (г/л):

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2
- $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,1
- $\text{NaCl}$  – 0,2
- $\text{CaCO}_3$  – 5,0
- Сахароза – 20,0
- агар-агар – 20,0

## **2. Культивування мікроорганізмів в лабораторних умовах.**

Для дослідження мікроорганізмів їх необхідно культивувати в лабораторії. Культивування – це вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах в певних умовах.

Для культивування мікроорганізмів слід виконати такі дії:

1. Стерильні щільні поживні середовища розплавити на водяній бані, тоді як рідкі поживні середовища не

потребують такої підготовки.

2. Розлити поживні середовища у стерильний посуд для культивування із дотриманням асептичних умов.
3. Інокулювати (посіяти) мікроорганізми на поживні середовища за певними правилами.
4. Середовища із інокульованими мікроорганізмами помістити в умови , оптимальні для росту даної культури.

Стерильні поживні середовища розливають у стерильний посуд біля полум'я газового пальника або спиртівки (на відстані 10-12 см) або в ламінарному боксі. Краї посуду перед розливом середовища необхідно обпалювати на полум'ї. Після того, як середовище застигне, його інокують мікроорганізмами. Способи посіву мікроорганізмів наведено в табл. 3.

Таблиця 3

### Способи посіву мікроорганізмів у лабораторних умовах

Консистенція середовища	Посуд для культивування	Техніка посіву
Рідке	Колби, пробірки, флакони	Біомаса інокулюється петлею або за допомогою піпетки
Щільне	Пробірки з середовищем у вигляді стовпчика	Уколом за допомогою петлі або голки
	Пробірки з середовищем у вигляді скошеної поверхні	Штрихом знизу вгору за допомогою петлі
	Чашки Петрі	Газоном за допомогою шпателя
		Штрихом за допомогою петлі
	Бактеріологічні матраси	Газоном за допомогою шпателя

Для успішного вирощування мікроорганізмів необхідно забезпечити певні умови культивування, які визначаються їх фізіологічними особливостями. Як правило, це – температура, наявність чи відсутність кисню у середовищі, рівень освітлення тощо. За відношенням до факторів навколишнього середовища мікроорганізми поділяються на певні групи (табл. 4).



### Вимоги до культивування деяких фізіологічних груп мікроорганізмів

Фактори	Назва фізіологічної групи	Оптимальні умови культивування	Засоби створення оптимальних умов
Температура	Мезофіли	20-45°C	Термостати або термостатовані кімнати з певною температурою
	Психрофіли	Нижче 20°C	
	Термофіли	Вище 45°C	
Світло	Фототрофи	При освітленні	Флуоресцентні лампи або лампи накаливання
	Хемотрофи	У темряві	-
Кисень	Аероби	Середовища, насичені киснем	Інтенсивне перемішування рідкого середовища на качалках; посуд для культивування закривається так, що забезпечується надходження у нього кисню (наприклад, під ватно-марлевими пробками)
	Мікроаерофіли	Середовища з низькими концентраціями кисню	Культивування здійснюється в анаеростатах із зниженим вмістом кисню або мікроорганізми висіваються на щільне середовище
	Анаероби	Безкисневі середовища з додаванням відновників (сульфіду натрію, солей заліза-II або цитрату титану-III)	Культивування здійснюється в анаеростатах або герметично закритому посуді з повним видаленням кисню та заповненням газової фази інертними газами (наприклад, аргонем)

**Контрольні питання:**

1. Для чого використовують поживні середовища в мікробіології? Які хімічні елементи входять до складу поживних середовищ? Які джерела вуглецю, азоту, фосфору, сірки використовують мікроорганізми?

2. Яким вимогам повинні відповідати поживні середовища? Класифікація поживних середовищ. В яких випадках використовуються рідкі, щільні та сипучі поживні середовища?

3. Вказати джерела енергії, електронів та вуглецю у хемоорганогетеротрофних, хемоорганоавтотрофних, хемолітогетеротрофних, хемолітоавтотрофних, фотоорганогетеротрофних, фотоорганоавтотрофних, фотолітогетеротрофних, фотолітоавтотрофних мікроорганізмів.

4. Дати визначення психрофільним, мезофільним, термофільним, аеробним, анаеробним, мікроаерофільним мікроорганізмам. Як забезпечити оптимальні умови для їх культивування?

### **Матеріали та обладнання:**

Газові пальники, технічні та торозійні терези, рівноваги, шпатель для відбору реактивів, скальпелі, стакани з термостійкого скла, мірні циліндри на 500 та 250 мл., лійки, вата, марля, фільтрувальний папір, скляні палички для перемішування, стерильний посуд для розливу середовищ, індикаторний папір для визначення рН, агар-агар, сухий порошок МПА, пептон, стандартизована суміш для приготування пептонної води, дистильована вода, водогінна вода, 30% розчин NaOH, 10% розчин HCl, NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, глюкоза (або сахароза), картопля.

## **Лабораторна робота №5**

### **ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ФОРМАМИ ПРОКАРІОТІВ ТА ЕУКАРІОТІВ**

**Мета роботи:** Розглянути і замалювати різні форми мікроорганізмів.

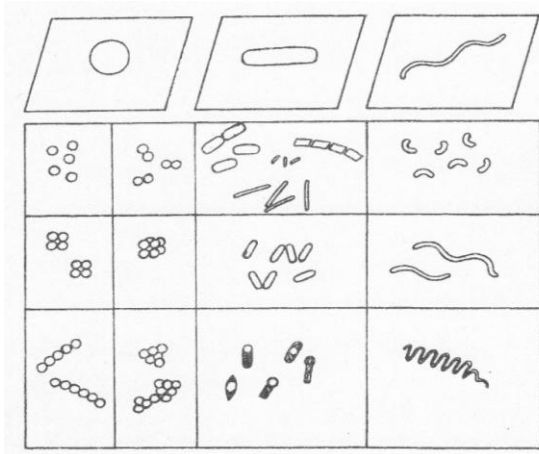
### **1. Морфологія бактерій. Сферичні, циліндричні, звивисті та плеоморфні форми.**

За типом будови клітин мікроорганізмів їх поділяють на прокаріоти та еукаріоти. Прокаріоти відрізняються від еукаріотів за наступними ознаками:

- прокаріоти не мають справжнього сформованого ядра, замкнена у вигляді кільця ДНК лежить у цитоплазмі;
- мітохондрії і хлоропласти відсутні;
- рибосоми дрібніші;
- клітинна стінка має особливий хімічний склад.

До прокаріотів належать бактерії і ціанобактерії (синьо-зелені водорості), до еукаріотів – рослини і тварини (в тому числі мікроскопічні).

Найбільш численну та різноманітну групу серед мікроорганізмів складають бактерії, більшість з яких є одноклітинними. На відміну від морфологічно різноманітних багатоклітинних макроорганізмів, розрізняють 3 основні форми клітин бактерій: сферичні (або коковидні), циліндричні (або паличковидні) та звивисті (*рис. 1*). Вперше ці форми бактерій описав ще Антоні Левенгук 1676 року у своїх листах до Королівського наукового співтовариства.



**Рис.1. Основні морфологічні форми бактерій**

*Сферичні форми (коки)* – це найбільш прості у морфологічному відношенні бактерії, що мають діаметр клітини 0,3-3,5 мкм. Як правило, вони не утворюють спори (виняток - рід *Sporosarcina*), широко розповсюджені у природі і мають різноманітні фізіологічні властивості. Після поділу коки можуть залишатися у вигляді поодиноких клітин або утворювати угруповання. У таблиці 1 наведені приклади розташування клітин у найбільш розповсюджених коків.

Серед коків відомі представники нормальної мікрофлори, сапрофіти, кисломолочні бактерії та збудники інфекційних хвороб (табл. 2).

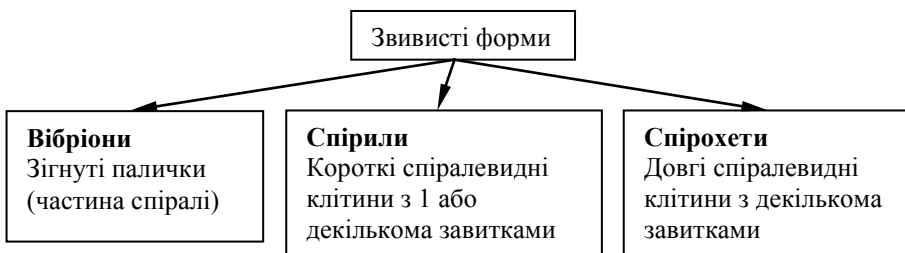
*Циліндричні (паличковидні) бактерії* дуже різноманітні за розмірами, співвідношенням довжини до ширини клітин та їх розташуванням. Палички можуть бути короткими або довгими, поодинокими або утворювати ланцюжки різної довжини. Деякі паличковидні бактерії можуть утворювати ендоспори, що деформують або не деформують клітину. Паличковидні бактерії можуть бути як сапрофітними, так і патогенними. Вони мають різноманітні властивості, деякі з яких наведено в таблиці 3.

Таблиця 1

**Приклади угруповань клітин бактерій сферичної форми**

Угрупування	Розташування клітин	Представники
Диплококи	Клітини діляться в одній площині і розташовуються парами. Клітини роду <i>Neisseria</i> мають вигляд кавових зерен.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pertostreptococcus anaerobicus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Стрептококи	Клітини діляться в одній площині, але не відокремлюються одна від одної, утворюючи ланцюжки.	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Тетракоки	Клітини діляться у двох взаємно перпендикулярних площинах, внаслідок чого утворюються групи з 4-х з'єднаних клітин.	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Aerococcus viridans</i> <i>Deinococcus radiodurans</i>
Сарцини	Клітини діляться у трьох взаємно перпендикулярних площинах, внаслідок чого утворюються групи кубічної форми з 8-16 з'єднаних клітин.	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Sporosarcina urea</i> <i>Sarcina ventriculi</i> <i>Methanosarcina barkeri</i>
Стафілококи	Клітини діляться в різних площинах, залишаючись разом, утворюють угруповання неправильної форми.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i>

Звивисті бактерії відрізняються не лише за довжиною та шириною, але й за кількістю завитків у клітині (рис.2).



**Рис. 2. Морфологічне різноманіття звивистих бактерій**

Таблиця 2

**Біологічне різноманіття коковидних бактерій**

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Збудник гострого гнійного захворювання сечостатевого тракту (гонореї) та захворювання очей (бленореї).
<i>Neisseria meningitides</i>	Збудник цереброспінального менінгіту.
<i>Pertostreptococcus anaerobicus</i>	Облігатний паразит ротової порожнини, слизових облонок та кишкового тракту ссавців. Можуть викликати гнійні інфекції.
<i>Streptococcus salivarius</i>	Представник нормофлори порожнини рота людини, збудник молочнокислого бродіння.
<i>Streptococcus bovis</i>	Представник нормофлори кишечника великої рогатої худоби, збудник молочнокислого бродіння.
<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus cremoris</i>	Збудники молочнокислого бродіння, використовуються людиною для приготування кисломолочних продуктів.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Розповсюджений у фекаліях хребетних, збудник гнійних інфекцій.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Паразити хребетних, розповсюджені у ротовій порожнині та верхніх дихальних шляхах. Збудник піодермії.
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	Збудник запальних процесів.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Збудник крупозної пневмонії, пневмококового менінгіту, ендокардиту, артриту, повзучої виразки рогівки ока, запалення середнього вуха і гайморової порожнини.
<i>Pediococcus damnosus</i>	Сапрофіт. Зустрічається на овочах на харчових продуктах.

<i>Micrococcus luteus</i>	Сапрофіт, зустрічається на шкірі та у ґрунті, часто виділяються із запиленого повітря.
<i>Sporosarcina urea</i>	Представник мікрофлори сечо-статевого тракту, має джгутики, утворює спори.
<i>Sarcina ventriculi</i>	Зустрічається в ґрунті та шлунку при шлункових захворюваннях, клітини об'єднані в крупні пакети (по 64 і більше).
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Облігатний анаероб, утворює метан, розповсюджений у затоплених мулах.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Представник мікрофлори теплокровних, виділяє токсини та ферменти, що викликають фурункульози, мастити, абсцеси внутрішніх органів, пневмонію, коліти.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Широко розповсюджений на рослинах, харчових продуктах. Шкодить виробництву цукру.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Представник нормофлори людини, може викликати гнійно-септичні захворювання.

Таблиця 3

### Біологічні властивості деяких паличковидних бактерій

<i>Escherichia coli</i>	Представник нормальної флори кишківника людини.
<i>Serratia marcescens</i>	Сапрофіт, розповсюджений на поверхні рослин, у воді і ґрунті, може викликати септицемію та запалення сечових шляхів. Синтезує червоний пігмент – протідіозин.
<i>Salmonella typhi</i>	Збудник черевного тифу.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Збудник паратифу, гастроентеритів.
<i>Shigella dysenteriae</i>	Збудник бактеріальної дизентерії.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Збудник синьогнійної інфекції, утворює синьо-зелений пігмент піоціанін.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Сапрофіт, зустрічаються у воді, ґрунті. Можуть бути патогенними для комах (ентомопатоген).
<i>Erwinia amylovora</i>	Фітопатогенний мікроорганізм.

<i>Yersinia pestis</i>	Збудник чуми. Віднесений до групи найбільш небезпечних бактерій.
<i>Franciella tularensis</i>	Збудник туляремії - хвороби диких гризунів, від яких може інфікуватися людина.
<i>Brucella abortus</i>	Збудник бруцельозу. Вражає велику рогату худобу.
<i>Proteus vulgaris</i>	Збудник хвороб сечо-статевого тракту людини.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Аеробний спороутворюючий сапрофіт, зустрічається у воді, ґрунті. Деякі штами є патогенними для комах.
<i>Bacillus anthracis</i>	Аеробний спороутворюючий збудник сибірської виразки. Віднесений до групи найбільш небезпечних бактерій.
<i>Clostridium tetani</i>	Спороутворююча анаеробна бактерія, розповсюджена в ґрунті та фекаліях тварин, утворює сильнотоксичний нейротоксин. Збудник правцю.
<i>Clostridium botulinum</i>	Спороутворююча анаеробна бактерія, розповсюджена в ґрунті, в анаеробних умовах синтезує сильнотоксичний токсин. Збудник ботулізму.
<i>Clostridium perfringens</i>	Спороутворююча анаеробна бактерія, розповсюджена в ґрунті. Потрапляючи в рану, виділяє багато водню та декілька розчинних токсинів. Збудник газової гангрени.

Деякі біологічні властивості звивистих бактерій наведено в таблиці 4.

Форма клітин деяких бактерій не є сталою. Це так звані *плеоморфні* бактерії, для яких характерна зміна форми клітин з віком та в залежності від умов культивування (рис.3). Наприклад, для бактерій роду *Corynebacterium* властива зміна форми кок-паличка-кок у процесі росту культури; для *Mycobacterium* – паличка-кок-ниткоподібна клітина; для *Nocardia* – міцелій-паличка-кок; для *Rothia* – суміш коків, паличок з булавовидними кінцями та ниток (таблиця 5).

Таблиця 4

### Властивості деяких звивистих бактерій



Вібріони	<i>Vibrio cholerae</i>	Збудник холери. Виділяє екзотоксин, що діє на клітини слизової оболонки.
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Бактерія-хижак, що паразитує в середині клітин інших бактерій.
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	Розповсюджений в мулових відкладах водоймищ. Анаероб. Відновлює
Спірили	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Фотосинтезуюча пурпурна бактерія.
	<i>Spirillum volutans</i>	Сапрофіт, розповсюджений у забруднених водах.
Спірохети	<i>Treponema Pallidum</i>	Збудник сифілісу.
	<i>Treponema macrodentium</i>	Зубна спірохета, представник нормофлори порожнини рота
	<i>Borellia burgdorferi</i>	Збудник Лайм-інфекції.
	<i>Borellia recurrentis</i>	Збудник зворотнього тифу.
	<i>Leptospira interrogans</i>	Збудник інфекційної жовтухи (лептоспірозу).

Для деяких бактерій характерна здатність до утворення V- або Y-конфігурацій, а також груп клітин у вигляді "китайських ієрогліфів" (рід *Propionibacterium*). Бактерії родів *Corynebacterium*, *Bifidobacterium* та *Arthrobacter* мають дихотомічне галуження, булавовидне потовщення клітин та ін.

До особливої морфологічної групи бактерій належать актиноміцети (наприклад, рід *Streptomyces*), довгі клітини яких здатні до галуження і утворення специфічного міцелію (псевдоміцелію), що вростає у щільне поживне середовище.

Окремі морфологічні групи складають бактерії, що утворюють плодові тіла – скупчення вегетативних клітин та слизу (міксобактерії, рис. 4), стебельця та розетки (рід *Planctomyces*), мають зірчасту форму (рід *Stella*). Морфологічне різноманіття збагачують бактерії, що утворюють бруньки, мають слизові чохла, інколи інкрустовані металами, сіркою та ін. (роди *Leptothrix*, *Gallionella*)(рис.5).

Ціанобактерії, так звані, синьо-зелені водорості, та деякі інші (наприклад, роди *Beggiatoa*, *Saprospira*) мають нитчасту форму або здатні до колоніального росту.

Форма бактеріальної клітини визначається її ригідною поверхневою структурою – клітинною стінкою. При порушенні синтезу складових компонентів клітинної стінки виникають особливі форми бактерій: сферопласти, протопласти, L-форми, які морфологічно відрізняються від вихідних форм.

Повністю відсутня клітинна стінка у *мікоплазм* – дрібних, неспороутворюючих хемоорганотрофних аеробних або анаеробних бактерій. Вони зазвичай поліморфні, зустрічаються сферичні, еліпсоїдні форми розмірами 0,15-0,35 мкм, а також нитковидні довжиною до кількох мікрметрів. Серед мікоплазм зустрічаються паразити слизових оболонок сечостатевої та респіраторних шляхів людини. Найбільш небезпечними є *Mycoplasma pneumoniae* та *M. hominis*, які викликають гострі ангіни та інші респіраторні захворювання, як правило, без підвищення температури, та *Ureaplasma urealyticum*, що викликає простатити та негонорейні уретрити.

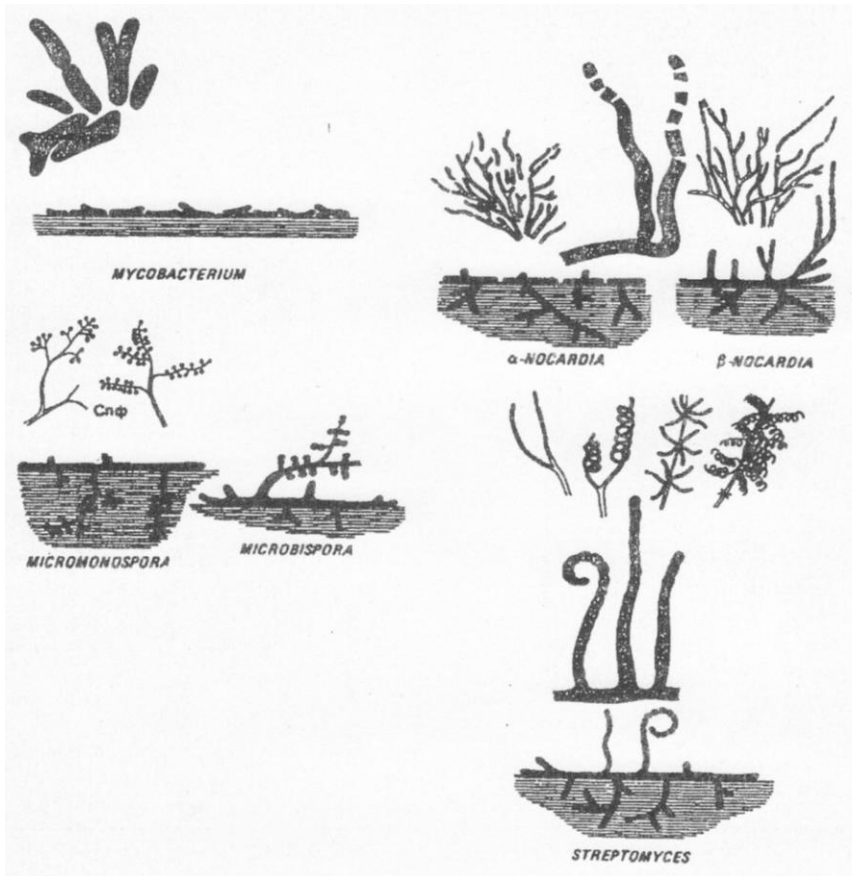
Таблиця 5

### Біологічні властивості деяких плеоморфних бактерій

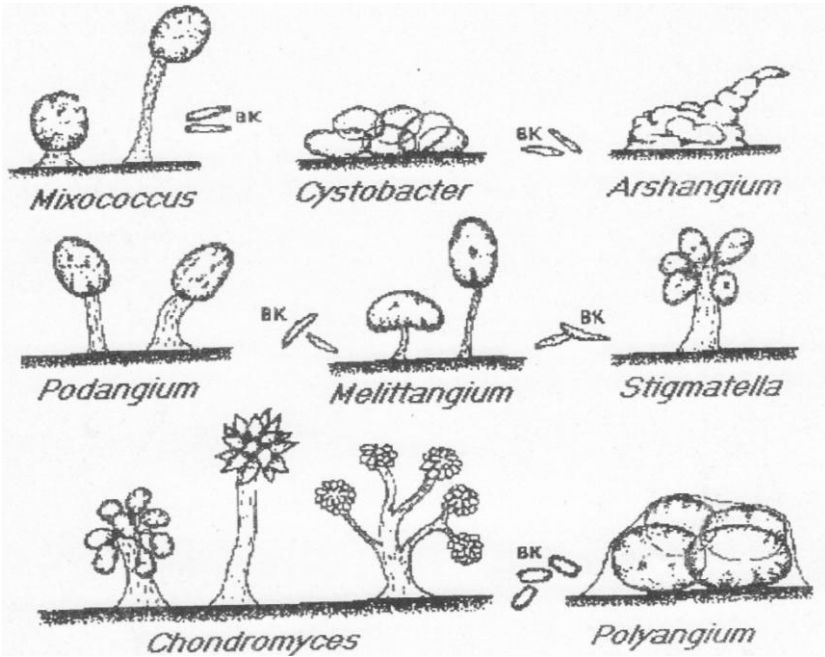
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Збудник дифтерії
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Продуцент глютамінової кислоти і лізину
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Збудник туберкульозу органів дихання, травлення, кісток, шкіри
<i>Mycobacterium leprae</i>	Збудник лепри, враження ектодерми та нервової системи
<i>Propionibacterium acnes</i>	Представник мікрофлори кишковика людини, може викликати гнійничкові захворювання шкіри
<i>Propionibacterium freudenreichi</i>	Представник мікрофлори твердого сиру та молочних продуктів
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Представник нормофлори кишковика людини
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Сапрофіт, зустрічається в ґрунті
<i>Nocardia asteroides</i>	Сапрофіт, зустрічається в ґрунті, може бути патогенним для людей і тварин

Особливу морфологію мають облигатні внутрішньоклітинні паразити – *рікетсії* та *хламідії*. Рікетсії – це дрібні (0,3-0,6 x 0,8-2 мкм) паличковидні або нитковидні клітини. Серед них є небезпечні збудники рікетсіозів людини, наприклад, *Richetsia prowazeki*, що викликає висипний тиф, який передається вошами. Хламідії – це бактерії, що мають кілька стадій розвитку з різною формою клітин. Наприклад, на стадії елементарного тільця вони мають яйцевидну форму розмірами 0,3-0,5 мкм, а у вегетативній репродуктивній стадії – сферичну розмірами 1,5-1 мкм. Серед них найбільш відомий збудник захворювань сечостатевої шляхи людини, що передається статевим шляхом – *Chlamidia trachomatis* та збудник орнітозу - *C. psittaci*.

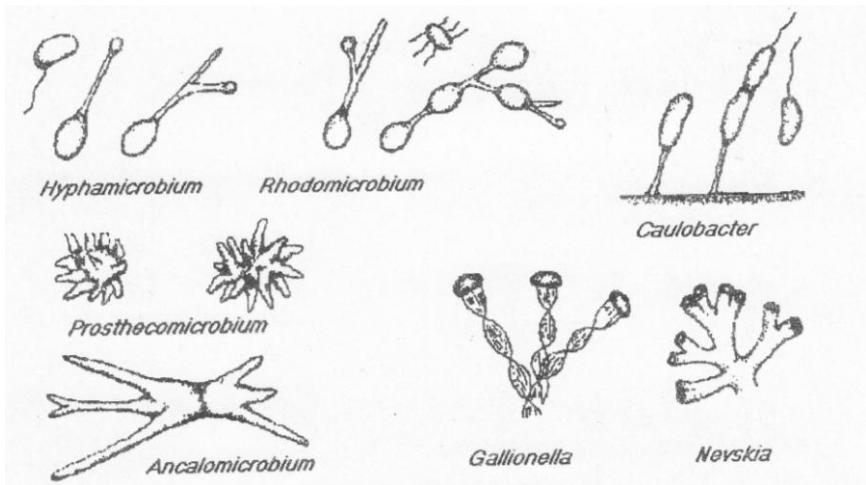
Морфологічно дуже різноманітними є *архебактерії* – одна із найдревніших гілок еволюції живих істот, яка була описана лише 1978 році. Наприклад, *Methanococcus jannischii* – представник нормофлори різця жуйних тварин, має форму неправильних коків, часто трикутних, з двома пучками джгутиків. Серед архебактерій багато екстремальних мікроорганізмів - галофілів та термофілів. Наприклад, екстремальний термофіл *Sulfolobus acidocaldarius*, що росте при температурі 60-95° С та рН 1-5, має форму неправильних куль з псевдоподіями. Особливо плеоморфними з варіаціями від сферичної до нитковидної є архебактерії без клітинної стінки.



**Рис. 3.** Форма клітин, міцелію та характер росту на щільних поживних середовищах мікобактерій, нокардій та актиноміцетів



**Рис. 4.** Плодові тіла та форми вегетативних клітин (BK) деяких міксобактерій



**Рис. 5.** Бактерії рідкісних форм

## 2. Морфологія актиноміцетів, цільових грибів та дріжджів.

*Актиноміцети* – це бактерії з міцеліальним типом будови прокаріотичної клітини. За деякими морфологічними ознаками вони подібні до грибів, тому що здатні до формування міцелію (субстратного та повітряного) і розмноження спорами, фрагментацією міцелію. На щільних поживних середовищах актиноміцети утворюють шкірясті колонії, що характеризуються матовою оксамитовою поверхнею та здатністю вrostати в агар. Різні представники актиноміцетів відрізняються за складом хімічних компонентів клітин та морфологічними ознаками: структурою міцелію, типом галузнення спороносних гіфів, пігментоутворенням та ін. (рис. 6). Багато представників цієї групи є продуцентами антибіотиків та ряду біологічно активних речовин (таблиця 6).

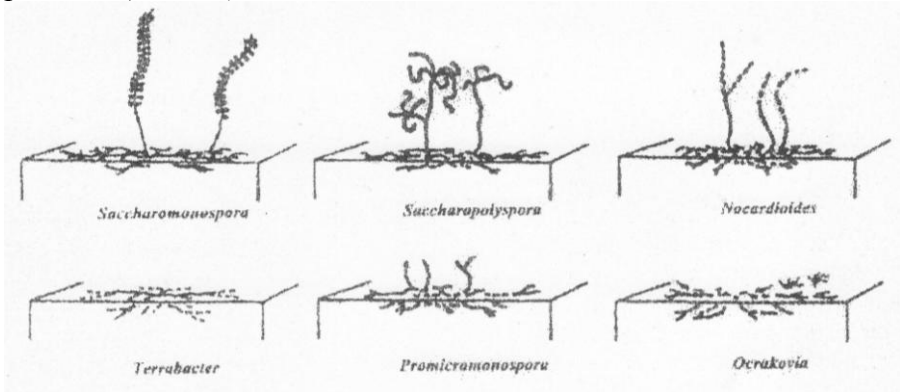


Рис. 6. Схеми будови міцелію актиноміцетів

За складністю морфології та особливостями розмноження актиноміцети подібні до грибів, проте існує ряд чітких ознак для їх морфологічної диференціації (табл.7).

Мікроскопічні гриби – це еукаріотичні одноклітинні або багатоклітинні організми. Серед мікроскопічних грибів є гіфальні та дріжджі. Велику групу серед гіфальних грибів складають цільові. Вони широко розповсюджені у навколишньому середовищі в умовах з підвищеною вологістю,

здатні утворювати на твердих поживних середовищах пухнасті та ватоподібні різнокольорові колонії. Колонії грибів характеризуються просторовою агресивністю, розподілом на центральну, передкрайову та крайову зони, відрізняються забарвленням субстратного та повітряного міцелію. Гіфи цвільових грибів утворюють повітряний та субстратний міцелій, який у нижчих грибів – несептований, у вищих – септований, багатоклітинний. Сполучення між паралельно розташованими гіфами (анастомози) сприяють утворенню видозмін міцелію – тяжів, різоморф.

Таблиця 6

### Практичне значення актиноміцетів

Актиноміцети - продуценти	Біологічно активні речовини
<i>Streptomyces griseus</i>	Аміноглікозидний антибіотик стрептоміцин, протеолітичні ферменти
<i>S. antibioticus</i>	Макролідний антибіотик олеандоміцин, протипухлинні актиноміцинові антибіотики
<i>S. aureofaciens</i>	Тетрациклінові антибіотики, вітаміни групи В
<i>S. olivaceus</i>	Оліванова кислота – інгібітор β-лактамаз (некласичні β-лактаміні антибіотики), вітаміни групи В
<i>S. clavuligerus</i>	Клавуланова кислота – інгібітор β-лактамаз, цефаміцинові В-лактаміні антибіотики
<i>S. fradiae</i>	Макролідний антибіотик тілозин, протеолітичні
<i>S. noursei</i>	Полієновий антибіотик ністатин
<i>Nocardia</i>	Нокардіоцини (некласичні β-лактаміні антибіотики), антибіотики ріфаміцини
<i>Saccaropolyspora erythraea</i>	Макролідний антибіотик еритроміцин
<i>Micromonospora purpurea</i>	Аміноглікозидний антибіотик гентаміцин
<i>M. olivoasterospora</i>	Аміноглікозидний антибіотик фортіміцин
<i>M. galomices</i>	Ріфаміцинові антибіотики (галоміцини)

Морфологічні відмінності грибів у значній мірі залежать від особливостей статевого та нестатевого розмноження. Спори нестатевого розмноження можуть утворюватися в замкнених спорангіях на кінці гіфи – спорангіеспори (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), бо розташовуватися вільними ланцюжками на кінцевих булавовидних клітинах (стеригмах) гіфи-конідіеносця – конідіеспори (*Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) (рис. 7). Утворення статевих спор у грибів пов'язане з різними морфологічними структурами. У нижчих муковорих грибів результатом статевого процесу є утворення зигоспори. У вищих грибів, зокрема аскоміцетів, наслідком статевого процесу є утворення аска, в якому розвиваються аскоспори. Утворення асків у більшості випадків відбувається у плодових тілах. Плодові тіла – це ділянки міцелію, де визрівають статеві спори гриба. Розрізняють три форми плодових тіл: клейстотеції (повністю закриті); перитеції (шишкоподібні); апотеції (відкриті, чашеподібні) (рис. 8).

До цвільових грибів належать як представники нижчих грибів, наприклад, муковорі (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), так і представники вищих – аскоміцетів, зокрема мітоспорових грибів (*Aspergillus*, *Penicillium*).

Цвільові гриби представляють великий інтерес як продуценти різноманітних ферментів, антибіотиків, органічних кислот та ін.

Окрім гіфальних грибів відомі також дріжджі – одноклітинні гриби. Колонії дріжджів мають глянцеvu поверхню, пастоподібну консистенцію, подібні до бактеріальних.

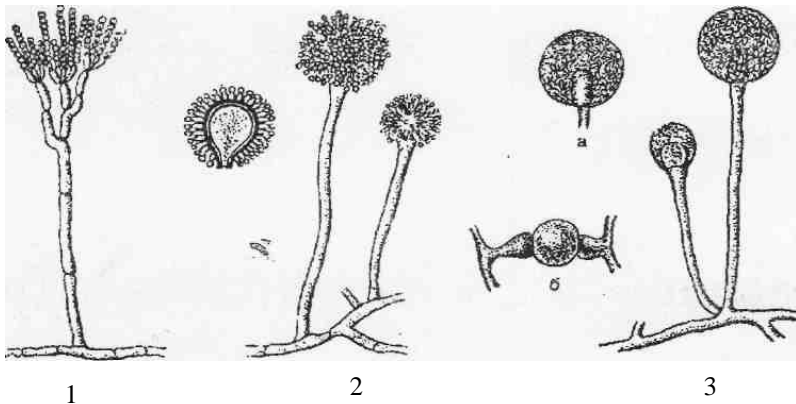
Таблиця 7

**Відмінність актиноміцетів від гіфальних  
мікроскопічних грибів**

Критерії диференціації	Актиноміцети	Мікроскопічні гриби



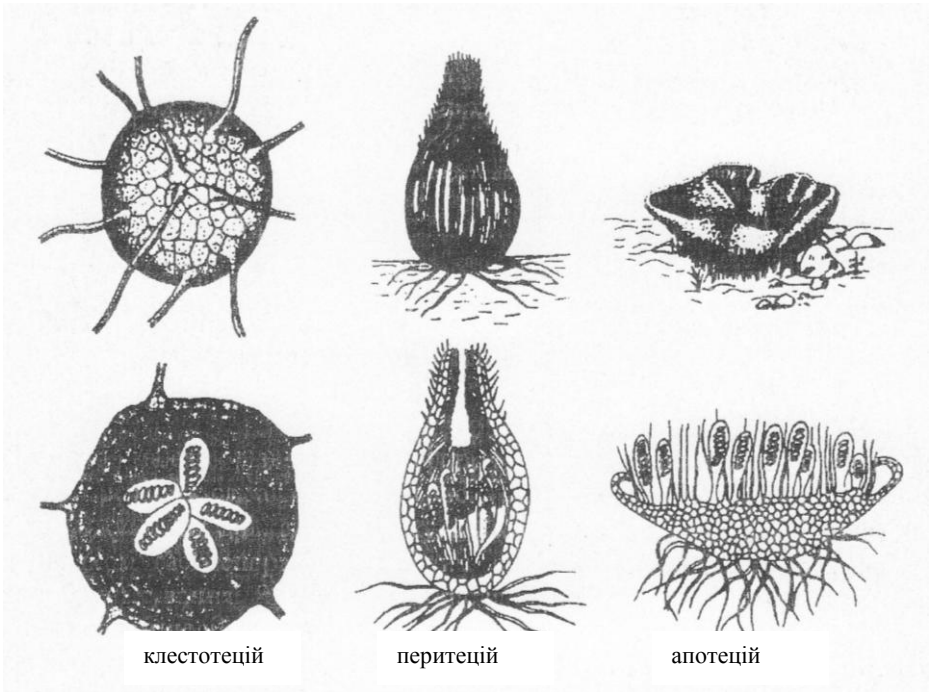
Організація клітини	Прокаріоти	Еукаріоти
Мицелій	Гіфи діаметром 1-1,5 мкм, що утворені розгалуженою клітиною	Гіфи діаметром 5-50 мкм, багатоклітинні ( септовані або несептовані).
Колонії	З оксамитовою поверхнею, чітким рельєфом	Пухнасті, ватоподібні з концентричними зонами, мають необмежений ріст
Розмноження	Фрагментацією мицелію або фрагментами спороносної гіфи (спорами)	Вегетативне (фрагментацією мицелію); нестатевими спорами - спорангіоспорами або кондіями (анаморфізм); статевим спорами - аскоспорами (телеоморфізм)
Особливості мікроскопії	Препарати-відбитки із застосуванням імерсійного об'єктиву (90x; 100x)	"Роздавлена крапля" із застосуванням об'єктивів 8 <sup>x</sup> , 20 <sup>x</sup> , 40 <sup>x</sup> ; бінокулярна лупа



**Рис. 7. Форми спороношення у цвільових грибів:**

1. Кистьовидно розгалужений конідієносець з кондіями у *Penicillium*
2. Лійкоподібний конідієносець з кондіями у *Aspergillus*

3. Головчастий спорангіоносець зі спорами у *Mucor*: а) спорангій; б) зигоспора



**Рис. 8.** Зовнішній вигляд та поперечні розрізи плодових тіл: клейстотецій, перитецій та апотецій.

Дріжджі мають різноманітну форму клітин, найчастіше овальну або видовжену, відрізняються за розмірами (рис. 9).

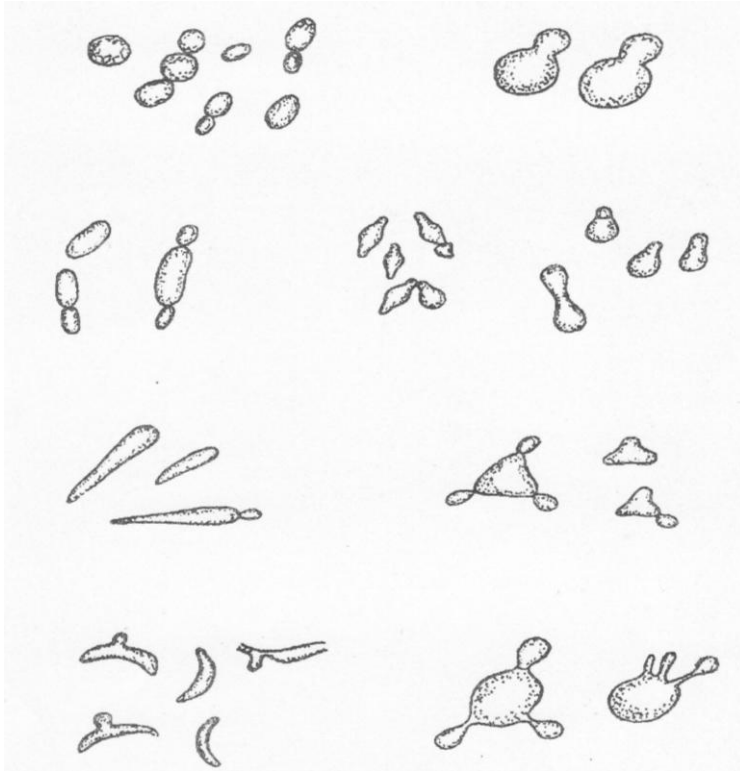
Розмножуються дріжджі брунькуванням, бінарним поділом і лише іноді статевим шляхом (аскоспорами). Типовим способом нестатевого розмноження дріжджів є брунькування. Якщо клітини після брунькування не розходяться, вони утворюють псевдоміцелій (рис. 10).

Велику групу дріжджів складають аспорогенні гриби, що втратили здатність до статевого розмноження. Їх називають дріжджеподібними грибами.

Дріжджі дуже поширені в природі, особливо на субстратах, які містять цукристі речовини. Багато видів дріжджі

є збудниками спиртового бродіння і здавна використовуються при виготовленні вина, пива та випіканні хліба. Серед дріжджеподібних грибів відомі збудники хвороб.

Цитоморфологічні особливості та практичне значення мікроскопічних грибів наведено в таблиці 8.



*Рис. 9. Форми клітин дріжджів*

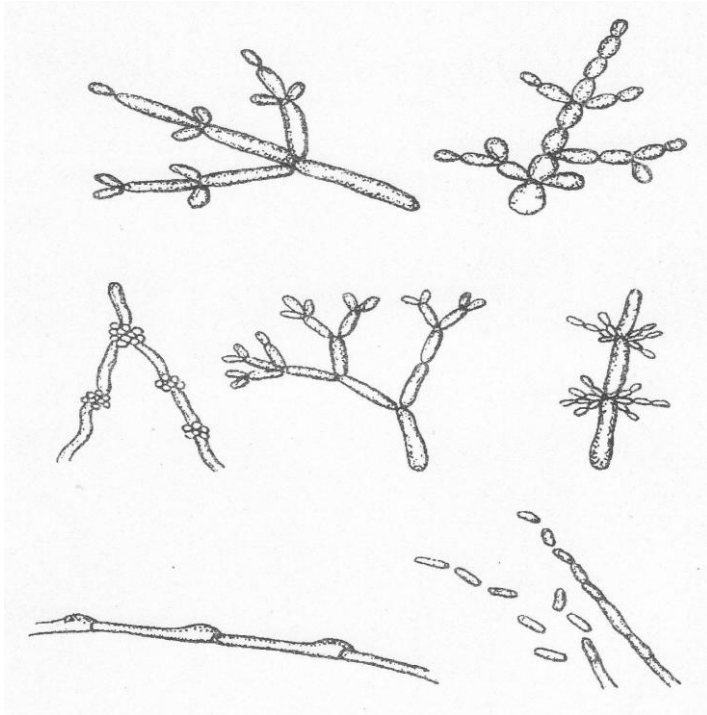


Рис. 10. **Форми міцелію у дріжджів**

Таблиця 8

**Цитоморфологічні особливості та практичне значення  
мікроскопічних грибів**

	Морфологічна особливість		Представники	Значення
Цвільові гриби	Ендогенні спори нестатевого розмноження в спорангіях головчатої форми	Моноподіальне галуження спорангієносців	<i>Mucor nigricans</i>	Рослинний сапрофіт
			<i>Mucor hiemalis</i>	Продуцент амілолітичних ферментів
		Симподіальне та дихотомічне галуження. Столони та ризоїди для прикріплення до субстрату	<i>Rhizopus cohnii</i>	Продуцент амілолітичних та ліполітичних ферментів
			<i>Absidia spinosa</i>	Рослинний сапрофіт

Екзогенні спори нестатевого розмноження (конідії) на повітряних конідієносцях	Одиночні конідієносці з роздутою апікальною клітиною і радіальними стеригмами з конідіями (лійкоподібна форма)	<i>Aspergillus flavus</i>	Збудник мікотоксикозів – отруєнь афлатоксином
		<i>Aspergillus niger</i>	Продуцент цитринової кислоти
		<i>Aspergillus oryzae</i>	Продуцент амілолітичних та протеолітичних ферментів
	Одиночні конідієносці з фіалі дою (пучком стеригм) і ланцюжками конідій	<i>Stachybotrys alternans</i>	Збудник стахіботріотоксикозу худоби – отруєння токсином, який викликає некрози слизових оболонок та лейкопенію
		<i>Stachybotrys chartarum</i>	Рослинний сапрофіт, целюлозолітичний гриб
	Кистьовидно розгалужені конідієносці з багатоярусними стеригмами, що несуть ланцюжки конідій	<i>Penicillium notatum</i> <i>P. chrysogenum</i>	Продуценти антибіотика пеніциліну
		<i>Penicillium nigricans</i>	Продуцент антибіотика гризеофульвіну
		<i>Penicillium roqueforti</i>	Використовується у сироварних виробництвах
	Аскоспори в перитеціях (пляшковидних плодкових тілах)	Перитеції з виростами, які дихотомічно галузяться	<i>Chaetomium globosum</i>
Аскоспори в клейстотеціях (закритих плодкових тілах)		<i>Eurotium</i> , <i>Emericella</i> <i>Eupenicillium</i> , <i>Talaromyces</i>	Телеоморфи <i>Aspergillus</i> Телеоморфи <i>Penicillium</i>

Дріжджі	Аскоспори в асках без плодових тіл	Часто розмножуються вегетативно брунькуванням	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Хлібопекарські та пивні дріжджі
			<i>Hansenula anomala</i>	Контамінант дріжджових виробництв
			<i>Torula cremoris</i>	Продукент ферменту β-галактозидази
			<i>Pichia guilliermondii</i>	Деструктор вуглеводнів нафти
Дріжджоподібні гриби	Аспорогенні дріжджі	Розмножуються вегетативно – фрагментацією міцелію та брунькуванням	<i>Candida albicans</i>	Збудник мікозів (кандидозів)
			<i>Cryptococcus neoformans</i>	Збудник бластомікозів
			<i>Endomyces lactis</i>	Представник мікрофлори молочнокислих продуктів
			<i>Pullularia pullulans</i>	Фітопатогенний гриб

### Практичне завдання:

Розглянути і замалювати різні форми мікроорганізмів.

### Контрольні питання:

1. Назвати основні морфологічні форми бактерій. Групування клітин у диплококів, стрептококів, тетракоків, сарцин та стафілококів. Навести приклади. Назвати коковидних збудників інфекційних процесів. Які коковидні бактерії належать до нормофлори людини та тварин? Порівняти форму клітин у вібріонів, спірил та спірохет. Які бактерії звивистої форми є збудниками холери, зворотнього тифу, лептоспірозу, Лайм-інфекції та сифілісу? Які ви знаєте сапрофітні бактерії звивистої форми? Які аеробні та анаеробні паличковидні бактерії утворюють ендоспори? Назвати збудників правцю, ботулізму, газової гангрени, чуми, черевного тифу, паратифу, бактеріальної дизентерії, бруцельозу, сибірської виразки. Назвіть представників плеоморфних бактерій. Що подібного у будові клітини і чим відрізняються мікоплазми та L-форми бактерій?

2. Яку форму мають клітини актиноміцетів? Доведіть, що актиноміцети – це бактерії. Назвіть актиноміцетів – продуцентів антибіотиків.

3. Порівняйте організацію клітин, міцелію, колоній, особливості розмноження та дослідження актиноміцетів та грибів. Які типи розмноження існують у грибів? Які ви знаєте форми плодових тіл грибів? Назвіть органи спороутворення у грибів. Чим відрізняються спорангіоспори та конідіоспори? Назвіть відомих Вам представників цільових грибів.

4. Чому дріжджі відносять до грибів, а не до бактерій? Назвіть представників дріжджів та дріжджеподібних грибів.

## Лабораторна робота № 6

### БУДОВА МІКРОБНОЇ КЛІТИНИ. ЕНДОСПОРИ БАКТЕРІЙ. ВКЛЮЧЕННЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

**Мета роботи:** Ознайомитися з будовою мікробної клітини. Відпрацювати методики виявлення ендоспор бактерій, параспоральних кристалів, гранул волютину у клітинах дріжджів, полі- $\beta$ -оксимасляної кислоти.

Мікробна клітина є складною живою системою, яка характеризується високим ступенем упорядкованості структур. Кожен із структурних компонентів має певне призначення, а їх комплекс забезпечує цілісність клітини та її існування.

#### *Клітинна стінка*

Опорним скелетом клітини є її стінка, до складу якої входять різноманітні компоненти (пептидоглікан, білки, ліпополісахариди, тейхоєві кислоти та ін.). Одним із основних компонентів бактеріальної клітинної стінки, який забезпечує її ригідність, є полімер пептидоглікан - *муреїн*. Він має вигляд сітки, що складається з гетерополімерних гліканових ланцюгів, з'єднаних між собою поперечними короткими тетрапептидними ланцюжками.

За будовою муреїнового каркасу, а також вмістом інших речовин у клітинній стінці, бактерії поділяють на *грамнегативні* і *грампозитивні* (табл. 1).

Таблиця 1

### Основні особливості будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій

Грампозитивні	Грамнегативні
Муреїнова сітка має до 40 шарів і складає 30-70% сухої маси клітинної стінки	Муреїнова сітка має 1 -2 шари і складає до 10% сухої маси клітинної стінки
Діаміноокислоти: мезо-, LL-діамінопімелінові, діаміномасляна кислоти, L-лізін, орнітин та ін.	Діаміноокислоти: мезо-діамінопімелінова кислота
Полісахариди та білки у незначній кількості. <i>Зовнішня мембрана</i> відсутня.	Значна кількість ліпополісахаридів, ліпопротеїнів, фосфоліпідів та білків. Вони складають до 80% сухої маси клітинної стінки, розташовані зовні від муреїнового шару і <i>утворюють зовнішню мембрану</i>
<i>Периплазматичний простір</i> відсутній	<i>Периплазматичний простір</i> має товщину до 10 нм
Наявні <i>тейхоєві кислоти</i>	<i>Тейхоєві кислоти</i> відсутні
Представники: <i>Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Clostridium</i> та ін.	Представники: <i>Escherichia coli, Pseudomonas, Vibrio Salmonella</i> та ін.

Клітинна стінка бактерій містить цілий ряд речовин, які не зустрічаються у тварин і рослин та є *характерними тільки для бактерій*: N-ацетилмурамова кислота, мезо- та L,L-діамінопімелінові кислоти, D-форми аланіну і глутамінової кислоти, тейхоєві кислоти.

Під дією деяких речовин (ферментів, наприклад, лізоциму; антибіотиків, наприклад, пеніциліну) у бактерій порушується синтез пептидоглікану або він руйнується. В результаті цього виникають особливі форми бактерій – сферопласти, протопласти та L-форми.



*Сферопласти* – це форма грамнегативних бактерій, позбавлених частини клітинної стінки, які мають сферичну або напівсферичну морфологію. У звичайних умовах вони гинуть у результаті осмотичного лізису, а в умовах підвищеного осмотичного тиску здатні деякий час виживати, рости і навіть розмножуватися, не втрачаючи при цьому деяких властивостей бактерій, наприклад, чутливості до фагів. При видаленні з середовища речовини, що призвела до втрати клітинної стінки, при наявності желатини частина сферопластів реверсує у вихідну форму.

*Протопласти* – це форма грам позитивних бактерій, повністю позбавлених клітинної стінки, які мають сферичну форму. На відміну від сферопластів вони повністю резистентні до дії фагів. У середовищах з підвищеним осмотичним тиском протопласти здатні деякий час виживати, метаболізувати та розмножуватися. При відміні дії факторів, що викликали появу протопластів та наявності у середовищі желатини та низки стабілізуючих речовин, частина протопластів перетворюється у вихідну форму із частковою втратою деяких фізіологічних властивостей.

*L-форми* – це адаптивні, а інколи інволюційні форми бактерій, які повністю або частково втратили здатність синтезувати компоненти клітинної стінки, особливо пептидоглікану. На відміну від прото- та сферопластів вони здатні до тривалого виживання та розмноження в макроорганізмах та на поживних середовищах. Морфологічно L-форми дуже різноманітні (округлі та нитковидні різних розмірів); відрізняються від вихідних форм бактерій метаболізмом, способами розмноження, стійкістю до хіміотерапевтичних речовин. Дуже часто хронізація інфекційних хвороб бактеріальної етіології та складність їх діагностики пов'язані з переходом збудника у L-форму. L-форми виявлено у мікобактерій, коринебактерій, гонококів та ін.

### **Включення**

Включення – це такі структури, які не є абсолютно необхідними для життєдіяльності клітини і можуть бути присутніми або відсутніми. Вони є досить різноманітними за

хімічним складом (полісахариди, білки, жироподібні речовини, поліфосфати, сірка, залізо) та виконують, в основному, функцію запасних поживних речовин, утворення яких залежить від умов культивування бактерій (табл. 2). Виявити включення бактеріальної клітини можна за допомогою спеціальних методів фарбування.

Таблиця 2

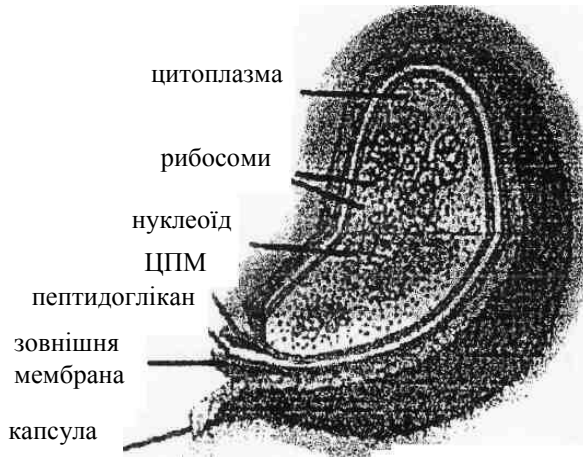
### Хімічний склад та функції включень клітин мікроорганізмів

Включення	Хімічний склад	Значення для клітини	Приклади мікроорганізмів
Полісахариди	Крохмаль	Запас вуглецю та енергії	Ціанобактерії
	Гранульоза		Маслянокислі бактерії - роду <i>Clostridium</i>
	Глікоген		<i>Sacharomyces</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i>
Жироподібні речовини	Полі-β-оксимасляна кислота	Запас вуглецю та енергії	<i>Rhizobium</i> , <i>Spirillum</i> , <i>Bacillus</i>
	Нейтральні жири		<i>Sacharomyces</i>
Параспоральні кристали	Білки	Синтезуються перед утворенням спор	<i>Spirillum</i> , <i>Sacharomyces</i> , <i>Lactobacillus</i>

Запасні речовини накопичуються клітинами мікроорганізмів при надлишку і екзогенних субстратів, насамперед енергетичних, і використовуються клітиною і при недостатці подібних речовин, а також в період адаптації клітин до середовища.

#### **Капсула**

Капсула – це слизовий шар, який розташований над клітинною стінкою бактерій, має товщину 0,2-200 нм і синтезується за певних умов (рис. 1).



**Рис. 1.** Схематична будова грамнегативної бактеріальної клітини

За будовою та хімічним складом розрізняють декілька типів капсул (таблиця 3).

Таблиця 3

### Типи капсул бактерій

Тип капсули	Склад капсули	Приклади
Рівномірний шар	Полісахариди чи поліпептиди	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Bacillus anthracis</i>
Шар із попереково-смугастих фібрил	Екстрацелюлярні нитки целюлози	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Складні капсули	Полісахариди та поліпептиди	<i>Bacillus megaterium</i>

### Ендоспори бактерій

Ендоспори бактерій – це унікальні за будовою і властивостями утворення клітини, що забезпечують виживання в несприятливих умовах та збереження спороутворюючих видів. У середині вегетативної клітини утворюється одна ендоспора.

Ендоспори мають ряд особливостей:

- термостійкість (можуть витримувати температуру 100° С протягом 180 хвилин);
- стійкість до висушування;
- стійкість до хімічних речовин;
- низький вміст води;
- присутність кальцієвої солі дипіколінової кислоти, яка відсутня у вегетативних клітинах.

Стадії спороутворення у бактерій:

1. Поділ нуклеоїда;
2. Відшнування частини протопласта;
3. Утворення поперечної перегородки біля полюса клітини;
4. Утворення проспори;
5. Синтез матеріалу кортексу;
6. Утворення поверхневих оболонок.

Спора оточена багатьма оболонками. Основні з них це:

1. Внутрішня цитоплазматична мембрана;
2. Зародкова клітинна стінка;
3. Кортекс;
4. Внутрішня оболонка спори;
5. Зовнішня оболонка спори;
6. Екзоспоріум.

Спори різних бактерій відрізняються за формою (круглі або еліпсоїдні), розмірами (0,3-1,9 мкм), розміщенням у клітині (*таблиця 4*).

Таблиця 4

### Розташування спор у клітинах

Тип клітини зі спорою	Розташування спор у клітині	Приклади
Бацилярний (найменший діаметр спори не перевищує діаметр клітини)	Центральне Ексцентральне Термінальне	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>

Клостридіальний (найменший діаметр спори перевищує діаметр клітини)	Центральне	<i>Clostridium pasteurianum</i>
	Ексцентральне	<i>Bacillus laterosporus</i> <i>Clostridium butyricum</i>
Плектридіальний (найменший діаметр спори перевищує діаметр клітини)	Термінальне	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Clostridium tetani</i>

Властивість утворювати спори характерна для деяких родів бактерій, наприклад: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*.

Спори мають складну структурну та хімічну будову, відрізняються здатністю заломлювати світло, стійкістю до кислот. При звичайному фарбуванні ендоспори не забарвлюються через слабку проникність барвників крізь їх оболонки. Враховуючи це, для виявлення ендоспор застосовують комплексні методи фарбування.

*Включення* мікробної клітини виявляють різними методами, враховуючи їх хімічний склад та деякі специфічні властивості. Волютин, наприклад, стійкий до дії мінеральних кислот, ліпідні гранули вибірково зв'язуються з Суданом, гранульоза – з йодом і т.п. Під час ендоспороутворення у клітинах деяких бактерій з'являються специфічні білкові структури – *параспоральні кристали (тільця)*. Вони мають ентомопатогенні властивості і використовуються як засіб боротьби з комахами. Кристали бувають різної форми (ромбовидні, кубічні), заломлюють світло подібно до спор, добре фарбуються основними та кислими барвниками. *Поліфосфатні включення* називають ще *гранулами волютину* чи *метахроматиновими зернами*. У молодих клітинах поліфосфатів більше, ніж у старих. Виявлення поліфосфатів базується на властивості волютину змінювати колір барвника. Наприклад, при фарбуванні метиленовим синім поліфосфати набувають червоно-синього кольору. В основі такого фарбування лежить взаємодія полікатіонів основних барвників з поліаніонами поліфосфатів, що зумовлює зсув максимуму поглинання барвників у сторону більшої довжини хвилі. Виявлення поліфосфатів інколи

базується на їх стійкості до розчинів кислот. При обробці профарбованих клітин кислотою, барвник, що зв'язався з поліфосфатом, не знебарвлюється. *Гранульоза* – це крохмалеподібний полісахарид, який зустрічається в клітинах маслянокислих бактерій. При взаємодії з розчином йоду гранульоза набуває темно-синього забарвлення. *Глікоген* – це полімер глюкози, який накопичується в клітинах дріжджів та бактерій. Виявити глікоген можна реакцією з йодом, при взаємодії з яким, він набуває червоно-коричневого забарвлення. *Полі-β-оксималяна кислота* – це жироподібна речовина. Вона інтенсивно накопичується при культивуванні мікроорганізмів в умовах недостатньої кількості азоту та надлишку вуглецю у середовищах. Ці включення виявляють за допомогою спиртових розчинів судану чорного або червоного, які розчиняються у жирах і забарвлюють полі-β-оксималяну кислоту у відповідні кольори. Цитоплазма при цьому залишається не забарвленою.

### **Практичне завдання**

- 1. Виявити ендоспори у баціл за методом Шефера-Фултона та замалювати.*
- 2. Виявити параспоруальні кристали у баціл при фарбуванні аніліновим чорним та замалювати.*
- 3. Виявити гранули волютину у клітинах дріжджів за методом Леффлера та замалювати.*
- 4. Виявити полі-β-оксималяну кислоту у баціл методом Бурдона та замалювати.*

### **Хід роботи**

Для виявлення ендоспор бактерій можна застосувати метод Шефера-Фултона. Для проведення цього фарбування слід виконати наступні дії:

1. На знежирене предметне скло нанести дві краплі стерильної води .
2. Петлею внести культури та суспендувати їх.
3. Висушити препарат на повітрі, зафіксувати жаром.

4. На препарат покласти смужки фільтрувального паперу, наситити їх розчином малахітового зеленого і щільно притиснути папір до мазків. Барвник нафівати на водяній бані протягом 10 хвилин або над полум'ям пальника протягом 5 хвилин, не допускаючи висихання. При необхідності слід додавати барвник.
  5. Препарат добре промити водою.
  6. Препарат додатково дофарбувати водним розчином фуксину протягом 30 с.
  7. Препарат промити і висушити на повітрі та промікроскопіювати з імерсією.
- У полі зору: спори яскраво-зелені, а клітини – червоні.

Для виявлення параспоральних кристалів у клітинах можна використати фарбування аніліновим чорним. Для проведення цього фарбування слід виконати такі процедури:

1. Виготовити мазок, висушити і зафіксувати жаром.
2. Препарат накрити смужкою фільтрувального паперу і нанести на нього кілька крапель анілінового чорного.
3. Прогріти препарат на водяній бані протягом 10-15 хвилин, не допускаючи висихання. При необхідності слід додавати барвник.
4. Промити препарат водою.
5. Дофарбувати препарат карболовим фуксином. Ціля протягом 15 секунд.
6. Промити препарат водою, висушити і промікроскопіювати з імерсією.

У полі зору: клітини рожевого кольору і чорні параспоральні тільця.

Для виявлення гранул волютину у клітині дріжджів можна використати фарбування фіксованих препаратів за методом Леффлера. Для цього потрібно виконати наступні дії:

1. На знежирене предметне скло нанести краплю стерильної води і суспендувати в ній культуру.

2. Препарат висушити на повітрі, зафіксувати жаром.
  3. На препарат нанести розчин метиленового синього за Леффлером і витримати протягом 1-2 хвилин.
  4. Препарат промити водою.
  5. На препарат нанести 1%-ний розчин  $H_2SO_4$  на 1 хвилину. При цьому клітини знебарвлюються, а волютин залишається зафарбованим.
  6. Препарат промити водою.
  7. Препарат дофарбувати розчином метиленового синього, розбавленого 1:100 протягом 30-40 секунд.
  8. Препарат промити водою, висушити і промікрископіювати з імерсією.
- У полі зору: гранули волютину – червоного кольору, а клітини – сині.

Для виявлення полі- $\beta$ -оксимаєляної кислоти Суданом чорним можна застосувати фарбування за методом Бурдона. Для цього потрібно виконати такі процедури:

1. Виготовити препарат, зафіксувати жаром.
  2. Нанести на препарат розчин Судану чорного В і витримати 15 хвилин.
  3. Барвник злити, промити препарат водою.
  4. Нанести на препарат декілька крапель етилового спирту.
  5. Підсушити препарат, промокнувши фільтрувальним папером.
  6. Додатково дофарбувати препарат 0,5% водним розчином сафраніну протягом 40 секунд.
  7. Промити препарат водою, висушити і промікрископіювати з імерсією.
- В полі зору: включення полі- $\beta$ -оксимаєляної кислоти – чорно-сині, цитоплазма – рожева.

### **Контрольні питання:**

1. Будова пептидоглікану бактерій. Чим відрізняється клітинна стінка грам-позитивних та грам-негативних бактерій?



Які хімічні речовини клітинної стінки характерні лише для бактерій?

2. Хімічний склад та значення мікробних включень для клітини. За яких умов клітина утворює включення?

3. Методи виявлення ендоспор, параспоральних кристалів, волютину, полі- $\beta$ -оксимасляної кислоти.

4. Типи, склад, локалізація мікробних капсул.

5. Значення для бактерій та розташування ендоспор у клітині. Хімічні та фізичні властивості ендоспор. Оболонки бактеріальних спор. Назвати представників спороутворюючих бактерій.

### **Матеріали та обладнання:**

Газові пальники, знежирені предметні скельця, марлеві серветки, шматочки господарського мила, фільтрувальний папір, дистильована вода, мікробіологічні петлі, кристалізатори з містками, розчини барвників та реактивів (0,5% водний розчин сафраніну, 10% водний розчин малахітового зеленого, фуксин Циля, розчин метиленового синього за Леффлером, розчин метиленового синього, розведений 1:100, аніліновий чорний, водний розчин насичений, 0,3%-ний спиртовий розчин судану чорного В, 1%-ний розчин  $H_2SO_4$ ), мікроскопи, імерсійне масло, спирт для витирання об'єктивів, смужки фільтрувального паперу.

## **Лабораторна робота № 7**

### **КЛІТИННА СТІНКА ТА КАПСУЛА БАКТЕРІЙ**

**Мета роботи:** Відпрацювати методики фарбування за Грамом та виявлення капсул у бактерій.

*Клітинна стінка* у різних груп мікроорганізмів характеризується різною макромолекулярною будовою.

Основний компонент клітинної стінки водоростей –целюлоза, міцеліальних грибів – хітин, дріжджів – глюкози і манани, бактерій – пептидоглікани. Клітинна стінка характеризується низькою спорідненістю до барвників, тому її фарбують спеціальними методами.

Хімічний склад і структура клітинної стінки зумовлюють забарвлення бактерій за Грамом. Суть цього методу полягає в тому, що барвники трифенілметанового ряду в комплексі з йодом утримуються грампозитивними бактеріями при знебарвленні їх органічними розчинниками (етанолом, ацетоном, сумішшю ацетону та диетилового ефіру). Ці бактерії залишаються синьо-фіолетового кольору. Грамнегативні клітини знебарвлюються і їх виявляють додатковим фарбуванням контрастним барвником ( фуксином або сафраніном).

При фарбуванні за Грамом слід враховувати такі особливості:

1. Бактерії повинні бути молодого віку – 18-24 год (старі і мертві клітини змінюють здатність до фарбування за Грамом).
2. Препарат повинен бути тонким – моношар клітин (при товстому шарі фарба повністю не вимивається ).
3. Знебарвлення необхідно проводити чітко дотримуючись методики, щоб не вимити фарбу з грампозитивних клітин.
4. Додаткове контрастне фарбування повинно бути недовготривалим (щоб не замаскувати попередню фарбу).

Фарбування за Грамом досліджуваної культури треба проводити паралельно з тест-культурами: грампозитивним *Staphylococcus aureus* та негативною *Escherichia coli*.

Поверхневим шаром багатьох бактерій є *капсула*, яка складається з різних хімічних речовин – гідратованих полімерів (полісахаридів, поліпептидів та інших). Найкраще спостерігати капсули у вологих препаратах, так як при висушуванні і фіксації вони деформуються. При звичайних методах фарбування капсули залишаються незабарвленими. Тому, як правило, застосовують методи негативного фарбування (контрастування).

## Практичне завдання

- 1. Зафарбувати за Грамом клітини бактерій. Замалювати препарати.*
- 2. Виявити капсулу у культур мікроорганізмів використовуючи наведені методи. Замалювати препарати.*

### Хід роботи

Для проведення фарбування клітин за Грамом слід виконати наступні дії:

1. На знежирене спиртом чи ацетоном предметне скло нанести три тонких мазки різних культур мікроорганізмів (два з них з відомим наперед відношенням до фарбування за Грамом). Мазки висушити, зафіксувати над полум'ям.
  2. Препарат накрити смужкою фільтрувального паперу, змоченого 1% спиртовим розчином генціану фіолетового. Нанести на нього кілька крапель води. Витримати препарат під барвником 2 хв.
  3. Зняти смужку фільтрувального паперу пінцетом і, не промиваючи препарат, залити його розчином Люголя ( $J_2$  в КJ) до повного почорніння. Скло у цьому та інших випадках краще тримати в нахиленому положенні.
  4. Препарат, не промиваючи водою, занурити у склянку з 96% етиловим спиртом на 30-60 с. Необхідно ретельно дотримуватись вказаного часу, оскільки при недостатньому витримуванні препарату у розчиннику грам негативні бактерії можуть виявити позитивний ефект, і навпаки – при збільшенні часу обробки етиловим спиртом – барвник може бути вимитий із грампозитивних бактерій.
  5. Промити препарат водою і знебарвлені мазки зафарбувати додатково водним розчином фуксину (2 хв.). Фарбу злити, ретельно промити препарат водою і висушити.
  6. Розглянути препарат в імерсійній системі мікроскопа
- Прикладом комплексних методів виявлення капсул у

бактерій є методи фарбування за Гіссом, Антоні та Буррі.

Для виявлення капсул за методом Гісса слід виконати такі дії:

1. На знежирене предметне скло нанести дві краплі нормальної сироватки крові коня або знежиреного молока.
2. Внести петлею у ці краплі культури, суспендувати їх для виготовлення мазків.
3. Висушити препарат на повітрі, зафіксувати жаром.
4. На мазки нанести розчин кристалічного фіолетового та нагрівати над полум'ям пальника до початку випаровування барвника ( відходження парів).
5. Промити препарат 20%-м водним розчином сульфату міді, нанести на мазки свіжий розчин сульфату міді і витримати протягом 1-2 хвилин.
6. Не промиваючи водою, підсушити препарат на повітрі та промікроскопіювати з імерсією.  
У полі зору: клітини бактерій – темно-фіолетові, капсули світло-блакитні.

Для виявлення капсул за методом Антоні слід виконати такі процедури:

1. Приготувати препарати та зафіксувати жаром.
2. На препаративні мазки нанести 1% водний розчин кристалічного фіолетового та фарбувати протягом 2 хвилин.
3. Промити препарати 20%-м водним розчином сульфату міді, нанести на них свіжий розчин сульфату міді і витримати протягом 1-2 хвилин.
4. Не промиваючи водою, підсушити препарати на повітрі та промікроскопіювати з імерсією.  
У полі зору: клітини бактерій – темно-фіолетові, капсули – світло-блакитні.

Для виявлення капсул за методом Буррі слід виконати такі процедури:

1. На знежирене предметне скло нанести краплю чорної туші і суспендувати в ній клітини культури.

2. Виготовити мазок за типом "мазка крові" та висушити на повітрі.
3. Нанести на мазок 1-2 краплі етанолу і спалити його на мазку (для фіксації).
4. На препарат нанести розчин фуксину на 2-3 хвилини.
5. Препарат ретельно промити водою, висушити на повітрі та промікроскопіювати з імерсією.

У полі зору: яскраво-червоні клітини, оточені незабарвленими капсулами на темному фоні.

Для візуалізації капсули бактерій також можна застосувати прості методи фарбування, наприклад, водним розчином фуксину протягом 5 хвилин. Для цього необхідно провести всі дії простого фарбування фіксованих препаратів бактерій водним розчином фуксину. При мікроскопічному аналізі препаратів у полі зору спостерігаємо яскраво-червоного кольору клітини бактерій та непрофарбовану капсулу, на зовнішній стороні якої зберігається адсорбований і барвник.

### **Контрольні питання:**

1. Етапи та принцип фарбування клітин за Грамом.
2. Чому грамнегативні бактерії забарвлюються у червоний, а грампозитивні – у синій колір?
3. Назвати представників грампозитивних та грамнегативних бактерій.
4. Методи виявлення мікробних капсул.

### **Матеріали та обладнання:**

Знежирені предметні скельця, марлеві серветки, газові пальники, шматочки господарського мила, фільтрувальний папір, дистильована вода, мікробіологічні петлі, кристалізатори з містками, вода для промивання препаратів, реактиви (папірці просочені карболовим розчином генціану фіолетового, розчин Люголя, етанол, 96%, водно-спиртовий розчин фуксину основного), мікроскопи, імерсійне масло, спирт для витирання об'єктивів.

## Лабораторна робота № 8

### АНАЛІЗ МІКРОФЛОРИ ПОВІТРЯ, ВОДИ ТА ЗУБНОГО НАЛЬОТУ

**Мета роботи:** Виявити забрудненість повітря та виконати санітарно-бактеріологічне дослідження води. Зробити аналіз мікрофлори зубного нальоту.

#### I. Аналіз мікрофлори повітря

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

Людина в середньому за добу вдихає 12000-14000 л повітря, при цьому 99,8% мікробів, які містяться в повітрі, затримуються у дихальних шляхах. У повітрі закритих приміщень виявляють бактерії, які виділяються зі слизових оболонок верхніх дихальних шляхів людини при чханні, кашлі, розмові. Від хворих у повітря виділяються поряд з умовно-патогенними мікроорганізмами (стафілококами, стрептококами) патогенні мікроби (гемолітичні стрептококи, бактерії дифтериту, кашлюку, мікобактерії туберкульозу та інші). При дослідженні повітря закритих приміщень важливим є метод вловлювання мікроорганізмів із повітря. Залежно від цього розрізняють **седиментаційні, фільтраційні та аспіраційні** методи дослідження повітря.

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

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

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

«Засіяні повітрям» чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, які виростили на них. Результати аналізу виражають найчастіше мікробним числом – кількістю мікроорганізмів у  $1\text{ м}^3$  повітря.

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

Розрахунки мікробного числа виконують за формулою Омелянського (1):

$$x = \frac{n \times 5 \times 10^4}{t \times r^2}, \quad (1)$$

де  $x$  – кількість мікроорганізмів у  $1 \text{ м}^3$  повітря;

$n$  – кількість колоній мікроорганізмів, які виростили у чашці Петрі;

$t$  – час осадження, хв;

$r^2$  – площа чашки Петрі,  $\text{см}^2$ . Площа чашки Петрі дорівнює  $78,5 \text{ см}^2$ ;

$5$  і  $10^4$  – коефіцієнти для перерахунку кількості мікроорганізмів у  $1 \text{ м}^3$ .

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

Офіційних стандартів чистоти повітря не розроблено, але прийнято показники оцінки ступеня мікробного забруднення приміщень (табл. 1).

Таблиця 1

### Число мікроорганізмів у $1 \text{ м}^3$ повітря

Оцінка чистоти повітря	Літній період		Зимовий період	
	Всього мікроорганізмів	Гемолітичні бактерії	Всього мікроорганізмів	Гемолітичні бактерії
Чисте	<1500	<16	<4500	<36
Забруднене	>2500	>36	>7000	>124

### Практичне завдання

1. Визначити кількість мікроорганізмів у  $1 \text{ м}^3$  повітря у різних приміщеннях.

### Хід роботи

1. Розплавлений стерильний МПА розлити у чашки Петрі. Після застигання середовища чашки відкрити у досліджуваному



приміщенні на 10 хв. Чашки підписати і помістити у термостат з температурою 30°C на дві доби;

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

Досліджуване приміщення	Кількість мікроорганізмів у 1м <sup>3</sup> повітря

## **II. Аналіз мікрофлори води**

Сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів є вода річок, ставків та інших водойм. Чисельність та різноманітність видів мікроорганізмів у воді залежить від вмісту в ній органічних речовин. Особливо багато мікроорганізмів у стічних водах. Їх кількість у забрудненій воді може сягати кількох мільярдів в 1 мл.

Санітарно-бактеріологічне дослідження води включає:

- визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води;
- визначення колі-титру або колі-індексу та, в окремих випадках (при несприятливих епідеміологічних показниках – спалахи холери, тифу, дизентерії та ін.), визначення патогенних мікроорганізмів, їх токсинів та фагів.

### *Правила відбору зразків води для аналізу*

Зразки води відбирають у стерильні 0,5 л флакони із водогінних кранів, насосів, труб та ін. Для цього останні попередньо обпалюють полум'ям ватного тампону, змоченого у спирті, потім спускають воду протягом 10 хв. для того, щоб змити бактерії, які знаходились у верхній частині труб, і лише

потім відбирають зразки. З відкритих водойм воду для дослідження відбирають за допомогою батометра – спеціального приладу, що представляє собою металевий каркас, всередині якого встановлюється стерильний посуд. Батометр дає змогу відбирати зразки з будь якої глибини. Дослідження відібраних зразків води необхідно проводити не пізніше 2 год від моменту забору. Як виняток їх можна досліджувати пізніше, але слід пам'ятати, що після 6 год зберігання зразки води не підлягають бактеріологічному дослідженню, оскільки кількість мікроорганізмів у них суттєво змінюється.

*Визначення загальної кількості мікроорганізмів у зразках води*

Визначення загальної кількості мікроорганізмів (ЗКМ) проводять шляхом глибинного посіву в розплавлений та охолоджений до 45°C МПА у стерильній чашці Петрі. Чисту воду сіють в об'ємі 1 мл, при підозрі на забрудненість її розводять стерильним фізіологічним розчином від 1:10 до 1:1000 і висівають не менше двох розведень по 1 мл.

Для цього готують титраційний ряд пробірок з 9 мл фізіологічного розчину. У першу пробірку ряду вносять 1 мл досліджуваного зразка, перемішують і переносять у наступну пробірку 1 мл. Таким чином титрують далі. У кінцевому рахунку одержують розведення 1:10, 1:100; 1:1000 і т.д. Як правило на чашки Петрі висівають не менше двох розведень, кожне з яких у 2-х повторах.

Спочатку на дно стерильної чашки Петрі вносять краплинами 1 мл досліджуваної води або відповідного розведення і заливають 15 мл розплавленим та охолодженим до 45°C МПА. Обережно круговими рухами перемішують, не допускаючи попадання середовища на кришку чашки Петрі та не відриваючи її від поверхні стола. Після застигання агару чашки поміщають в термостат при 28°C.

Якщо досліджуваний зразок води містить значну кількість мікроорганізмів, то можна зробити висів газом 0,2 мл води на поверхню чашки Петрі.

Відповідно до санітарних вимог питна водогінна вода повинна містити не більше 100 мікробних клітин в 1 мл. Мікробне число у воді колодязів та відкритих водойм не повинне перевищувати 1000.

#### *Визначення колі-індексу у зразках води*

Колі-індекс – це кількість клітин кишкової палички в 1 л води. Його визначають висівом зразка води на диференційно-діагностичне середовище Ендо. *Escherichia coli* на середовищі Ендо утворює темно-червоні колонії з характерним металевим блиском, тому її легко діагностувати. Наявність кишкової палички свідчить про фекальне забруднення води. Воду висівають безпосередньо в товщу чи на поверхню середовища Ендо, або попередньо концентрують клітини фільтруванням досліджуваного зразка крізь мембранні фільтри.

Якщо через 18-24 год культивування при 37°C виростають червоні колонії з металевим блиском, то ці колонії фарбують за Грамом, мікроскопіюють, перевіряють на наявність оксидази і здатності утворювати газ при рості на лактозі. Виявлення у мазках грамнегативних паличок, газоутворення і відсутність оксидази свідчать про наявність у воді *E. coli*. Розраховують кількість клітин кишкової палички на 1л води.

Відповідно до санітарних норм питна водогінна вода повинна містити не більше 3 клітин *E. coli* в 1л, тобто колі-індекс повинен бути  $\leq 3$ .

### **Практичне завдання**

*Провести визначення кількості КУО в 1 мл води.*

#### **Хід роботи**

Для дослідження мікрофлори води необхідно виконати такі процедури:

1. Відібрати зразок води згідно вказаних правил;
2. Висіяти газом по 0,2 мл води на поверхню МПА і середовища Ендо;
3. Чашку Петрі з МПА культивувати 2-3 доби при 28°C, а з середовищем Ендо – 1 добу при 37°C.

4. Провести визначення кількості КУО/л.

### **III. Аналіз мікрофлори зубного нальоту**

Для вивчення мікрофлори людини у мікробіологічних лабораторіях найчастіше застосовують посіви змивів із рук і шкіри, із слизових оболонок рото- і носоглотки, зубного нальоту, секрету піхви, із сечі та випорожнень тощо.

Із зубного нальоту, карієсних зубів стерильними зубочистками роблять мазки, зафарбовують фуксином або за Грамом і досліджують мікроскопічно. При потребі проводять посіви на спеціальні середовища.

У мікрофлорі зубного нальоту зустрічаються бактерії: паличковидні (*Bacillus maximus bucalis*), плеоморфні, у формі ниток (*Actinomyces*), звивисті форми (*Treponema denticola*), різні коки, серед яких переважають стрептококи (*Streptococcus salivaris*, *S. Sanguis*, *S. Mutans*). Саме *S. Mutans* пов'язують з розвитком карієсу завдяки його здатності міцно прикріплюватись до поверхні зубів і утворювати кислоту з різних вуглеводів, що надходять до ротової порожнини.

### **Практичне завдання**

*Розглянути мікрофлору зубного нальоту та замалювати її.*

### **Хід роботи**

Для дослідження мікрофлори зубного нальоту необхідно:

1. Стерильною зубочисткою відібрати матеріал з поверхні зубів, суспендувати в краплині стерильної води на знежиреному предметному склі;
2. Препарат висушити на повітрі і зафіксувати жаром;
3. Зафарбувати препарат водним розчином фуксину;
4. Препарат розглянути під мікроскопом та замалювати.

### **Контрольні питання:**

1. Охарактеризуйте седиментаційні, фільтраційні та аспіраційні методи дослідження повітря.

2. Розрахунок загальної кількості мікроорганізмів у 1 м<sup>3</sup> повітря, 1 мл води.

3. Як оцінюється ступінь забруднення води бактеріями групи кишкової палички? Визначення колі-індексу у зразках води.

4. Назвіть мікроорганізми, що беруть участь у формуванні зубного нальоту.

### **Матеріали та обладнання:**

Стерильні чашки Петрі, МПА, середовище Ендо, стерильна зубочистка, стерильна дистильована вода, водний розчин фуксину, мікроскопи, імерсійне масло, спирт для витирання об'єктів.

## **Лабораторна робота № 9**

### **ВИДІЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ З ГРУНТУ. ВПЛИВ АНТРОПОГЕННИХ ФАКТОРІВ НА МІКРОФЛОРУ ГРУНТУ**

**Мета роботи:** Навчитися визначати кількість мікроорганізмів у пробах ґрунту та ознайомитися з впливом антропогенних факторів на його мікрофлору.

#### **I. Виділення мікроорганізмів з ґрунту**

Одним із найсприятливіших середовищ для існування мікроорганізмів є ґрунт. Кількісний і якісний склад мікрофлори ґрунтів залежить від їх хімічного складу, фізичних властивостей, вмісту вологи й повітря, кліматичних умов, пори року, характеру рослинного покриву, антропогенного впливу та багатьох інших факторів. До складу мікрофлори ґрунту входять амоніфікуючі, нітрифікуючі, денітрифікуючі, азот фіксуючі, целюлозолітичні, сірко- та залізобактерії, актиноміцети, гриби та ін. У верхніх шарах ґрунту також можуть міститись збудники

правцю, газової гангрени, кишкових інфекцій, наприклад, дизентерії, колієнтериту, черевного тифу, холери та ін. Грунт є головним джерелом надходження мікроорганізмів у інші середовища, зокрема у повітря та воду.

Для вивчення та обліку мікрофлори ґрунту найчастіше проводять поверхневий висів (газоном) ґрунтової суспензії на щільні поживні середовища. При правильному виборі середовищ є можливість дослідити різні групи мікроорганізмів, що заселяють ґрунт (бактерії, актиноміцети, гриби та дріжджі), оцінити кількісний та якісний склад мікрофлори та провести виділення чистих культур (при необхідності). *Чисті культури* – це популяція мікроорганізмів одного виду. *Накопичувальні* ж культури містять тільки переважно клітини одного виду.

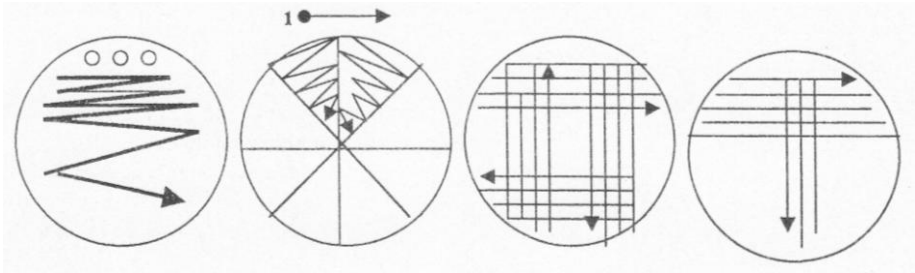
Сутність методу висіву полягає в нанесенні ґрунтової суспензії на поверхню поживних середовищ. Клітини, які потрапили в оптимальні умови для росту, утворюють на поверхні середовища колонії, які видимі неозброєним оком. При проведенні кількісного обліку, як правило, вважають, що кожна колонія утворюється в результаті поділу однієї клітини. Для характеристики мікрофлори ґрунту найбільш широко вживаними є такі середовища:

1. Середовище Чапека – для виділення грибів та актиноміцетів;
2. Середовище Ешбі – для виділення олігонітрофільних бактерій та деяких дріжджів;
3. Крохмально-аміачне середовище – для виділення актиноміцетів і бактерій;
4. МПА та розведений МПА – для виділення бактерій;
5. Агаризоване сусло або синтетичні середовища (Сабуро, глюкозо-амонійне) – для виділення дріжджів;
6. Картопляний агар (КА) – для виділення фітопатогенних бактерій;
7. Голодний агар;
8. Ґрунтовий агар Локхіда та ін.

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей бактерій, а також визначення видової приналежності необхідно проводити

на чистих культурах мікроорганізмів. Виділення чистих культур мікроорганізмів – основа мікробіологічної практики.

*Метод штриха, що виснажується* є найбільш вживаним для одержання чистих культур мікроорганізмів. Сутність цього методу полягає у тому, що досліджуваний матеріал розподіляють штрихами на поверхні поживного середовища в чашці Петрі. З кожним наступним штрихом матеріал, який знаходиться на петлі, поступово виснажується, зменшується кількість висіяних клітин, і, в кінцевому рахунку, можна отримати ізольовані колонії. Посівний матеріал можна наносити на поверхню середовища зигзагом, сіткою або Т-подібним штрихом (рис. 1).



**Рис.1.** Схема посіву методом штриха, що виснажується

### **Практичне завдання**

*Визначити загальну кількість КУО в 1 г ґрунту.*

#### **Хід роботи**

1. Відбір проби ґрунту для аналізу.

ґрунт і мікрофлора ґрунту дуже гетерогенні, тому необхідно відібрати по можливості більш однорідну пробу з поверхневих шарів стерильними копачками, з глибини спеціальними бурами.

З поверхні дослідної ділянки зсунути рослинні рештки і 0,5-1 см верхнього шару ґрунту. По діагоналі ділянки або в чотирьох різних кутах відібрати проби і добре перемішати. Загальна маса проби повинна бути не менша 1 кг. ґрунт пересіяти через сито з діаметром отворів 2 мм. Якщо ґрунт дуже

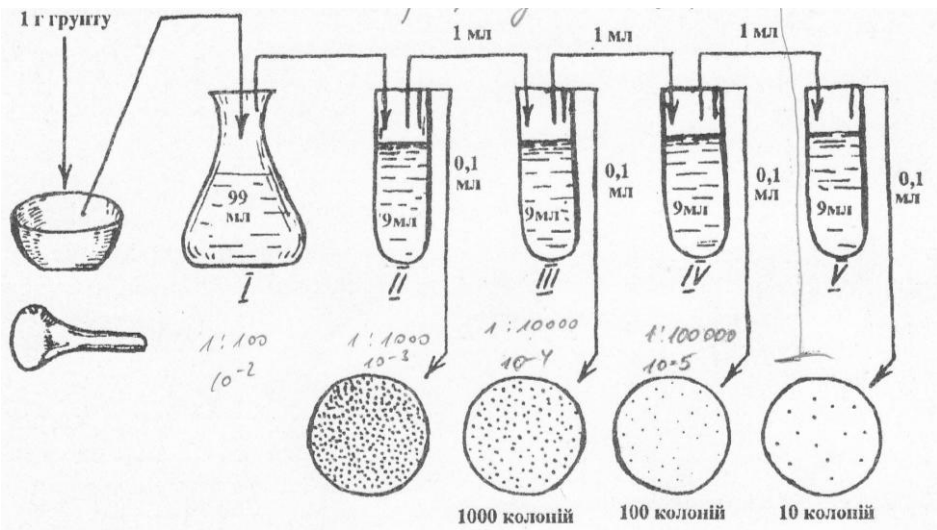
вологий, то він не сіється. В цьому випадку його висипати на папір, і підсушити на повітрі. Ні в якому разі ґрунт, підготовлений до мікробіологічного аналізу, не висувувати повністю, тому що це істотно впливає на його мікрофлору.

2. Виготовлення ґрунтової суспензії для посіву. Перед посівом з ґрунту вибрати дрібні корінці, різні сторонні вclusions. Зважити 1 г ґрунту і висипати в колбу з 100мл стерильної води. Закрити ватним тампоном колбу струшувати на качалці протягом 5хв, зачекати 30 секунд, щоб осіли грубі частки ґрунту і зробити наступні розведення, користуючись постійним коефіцієнтом розведення, що дорівнює 10.

3. Виготовлення розведень.

Виготовлення розведень необхідне для одержання ізольованих клітин. Розведення зробити в стерильній водопровідній воді. В пробірки налити по 10мл (після стерилізації залишається по 9мл води). В колбу до 100 мл води додати 1 г ґрунту, тоді розведення буде 1:100. Новою стерильною піпеткою добре перемішати суспензію, набираючи і видуваючи її з піпетки, потім цією піпеткою набрати 1мл суспензії і перенести в пробірку з 9 мл стерильної води. Одержати розведення 1:1000 (або  $10^{-3}$ ). Аналогічно перенести 1мл суспензії з першої пробірки в другу і т.д., кожного разу користуючись новою стерильною піпеткою. Зазвичай готують розведення до 1:1000000 або  $10^{-6}$  (рис. 2).





**Рис. 2.** Схема виготовлення розведень і посіву

Одночасно визначити вологість ґрунту. Для цього використати чисті алюмінієві бюкси, попередньо висушені при  $105^{\circ}\text{C}$  протягом 24 год і зважені. Накласти в бюкси приблизно 10 г ґрунту і зважити. Висушити бюкси в сушильній шафі при  $105^{\circ}\text{C}$  протягом 3-5 годин до постійної ваги і знову зважити.

Вологість ґрунту обчислити за формулою (1):

$$W = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 100}{P_2 - P} \quad (1)$$

де  $W$  – вологість, %,

$P$  – вага бюкса,

$P_1$  – вага ґрунту разом з бюксом до висушування,

$P_2$  – вага ґрунту разом з бюксом після висушування,

Поправку на вологість обчислити за формулою (2):

$$K = \frac{100 + W}{100}, \text{ де} \quad (2)$$

$K$  – поправка на вологість.

4. Посів в чашки Петрі на агаризоване середовище.

Посів зробити з трьох послідовних розведень так, щоб на одній чашці вирости десятки, на другій – сотні, а на третій – ще більше колоній. В більшості випадків посів на відповідні середовища для визначення кількості бактерій роблять з 4-5 розведень, актиноміцетів – з 3-5, грибів – з 2-4 розведень. Посів з кожного розведення зробити в 2-5 повтореннях.

Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способами. Поверхневий посів: на поверхню живильного агару нанести 2 краплі (0,1 мл) ґрунтової суспензії і рівномірно розподілити її по всій поверхні агару за допомогою стерильного скляного шпателя. Глибинний посів: на дно стерильної чашки Петрі стерильно внести 1мл суспензії відповідного розведення. Розплавлений агар охолодити до 45-50°C і по 10-20 мл налити у чашки Петрі, дотримуючись правил асептики.

Обережно і старанно перемішати агар з суспензією, обертаючи чашку по поверхні столу до застигання середовища. Засіяні чашки Петрі помістити в термостат кришками донизу. На кришці восковим олівцем написати номер розведення, групу, прізвище студента.

#### 5. Підрахунок колоній на чашках Петрі.

Колонії бактерій необхідно підрахувати через 3 доби, колонії грибів – через 2-7, а колонії актиноміцетів – через 7-15 діб інкубації в термостаті. Колонії слід рахувати, не відкриваючи чашку Петрі. Підрахунок проводити на тих розведеннях, при посіві яких виросло від 15 до 150 колоній бактерій і актиноміцетів, 30-50 колоній грибів. Якщо колоній багато, то дно чашки Петрі поділити на чотири сектори і рахувати кількість на секторах, а потім перерахувати на всю площу. Підрахувавши кількість колоній на всіх паралельних чашках, знайти середнє значення для однієї чашки і за формулою обчислити кількість мікроорганізмів в 1 г сухого ґрунту:

Загальну кількість КУО в 1 г ґрунту визначають за формулою (3):

$$a = \frac{b \cdot v \cdot 1000}{d \cdot z} \quad (3)$$

де  $a$  – кількість клітин в 1 г ґрунту;  
 $b$  – середня кількість колоній з однієї чашки Петрі;  
 $v$  – розведення, з якого було зроблено висів;

$$v = \frac{1}{1000}$$

$z$  – об'єм суспензії, який вносили на поживне середовище;  
 $d$  – вага ґрунту, який брали для аналізу.

Для виділення чистої культури необхідно:

- вибрати варіант методу виснаженого штриха, яким буде здійснюватися посів;
- підготувати чашку Петрі для посіву (підписати, при необхідності позначити сектори);
- стерильною петлею відібрати посівний матеріал з обраної колонії.
- посіяти відібраний матеріал на середовище, дотримуючись правил асептики.

## **II. Вплив антропогенних факторів на мікрофлору ґрунту**

Перетворюючи органічні і мінеральні сполуки, які надходять у ґрунт, мікрофлора забезпечує собі відносно постійність умов існування (гомеостаз). Антропогенні фактори, змінюючи екологічний стан, можуть стимулювати або пригнічувати життєдіяльність організмів у ґрунті.

Після внесення певних енергетичних речовин при окультуренні в ґрунті починають розмножуватись види, які їх використовують. Несприятливі антропогенні фактори, наприклад, іони важких металів, зменшують видову різноманітність мікрофлори і її біохімічну активність.

Для спостереження за природними угрупованнями мікробів в ґрунті видатний мікробіолог М.Г. Холодний запропонував кілька екологічних методів. Одним з найпростіших є якісний метод контактних скелець або скелець обростання. Цей метод дав вперше можливість спостерігати мікробні угруповання в природних умовах, які М.Г. Холодний

назвав «природним ландшафтом ґрунтової мікрофлори» або «мікробним пейзажем». При проведенні досліджень скельця закопують в природні ґрунти, де знаходяться важкі метали в малих кількостях. Так, в дерново-підзолистому ґрунті містяться (мг/100г ґрунту): Zn-0.4; Ni-0.1; в сірому лісовому Zn-1.2; Ni 1.1. В певних місцевостях спостерігають забруднення важкими металами.

### **Практичне завдання**

*Прослідкувати зміни мікробних пейзажів в модельних дослідах під впливом збільшення доз важких металів за допомогою методу скелець обростання.*

### **Хід роботи**

Зважують три наважки ґрунту по 200 г кожної і додають до них:

- 1) контроль (без нічого).
- 2) органічну речовину – 2 г глюкози.
- 3) 2 г глюкози та 80 мг  $\text{CuSO}_4$  або 120 мг  $\text{ZnSO}_4$ .

Ретельно перемішують ґрунт і органічні речовини, зволожують і поміщають у три банки.

Чисті предметні скельця (попередньо витримані 2 доби в конц. розчині  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , добре відмиті дистильованою водою) закладають вертикально по два в кожному банку на відстані 3 см одне від одного так, щоб 2 см кожного скла залишалось над поверхнею ґрунту. Скельця добре притискають до ґрунту.

Через 7 днів обережно витягають по одному склу з кожної банки так, щоб не пошкодити її поверхні. Одну сторону скелець витирають чистим фільтрувальним папером. Скельця підсушують на повітрі, фіксують над полум'ям. Охолоджене скло обережно відмивають від більших частинок ґрунту, фарбують фуксином і розглядають під імерсією, замальовують мікробний пейзаж. Порівнюють зміни мікробних пейзажів в різних варіантах досліду.

### **Контрольні питання:**

1. Розрахунок загальної кількості мікроорганізмів у 1 г

грунту.

2. Дати визначення поняттю чиста культура мікроорганізмів. Назвати етапи одержання чистих культур мікроорганізмів.

3. Пояснити поняття накопичувальної культури. Суть методу посіву мікроорганізмів штрихом, що виснажується.

4. Пояснити суть якісного методу контактних скелець або скелець обростання.

### **Матеріали та обладнання:**

Стерильні чашки Петрі, колби з 99 мл стерильної водопровідної води, пробірки з 9 мл стерильної води, стерильні піпетки на 1 мл, МПА, СА, ваги, різноважки, папір для зважування, шпателі, ґрунт, предметні скельця, три банки, глюкоза,  $\text{CuSO}_4$  або  $\text{ZnSO}_4$ , фуксин, мікроскоп.

## **Лабораторна робота № 10**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ**

**Мета роботи:** Визначити вплив антибіотиків на ріст бактерій.

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

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

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

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

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

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

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

### **Практичне завдання**

*Визначте чутливість досліджуваних культур до антибіотиків.*

#### **Хід роботи**

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

2. Індикаторні диски покласти на поверхню МПА профламованим пінцетом. На кожен чашку помістити не більше 5-6 різних індикаторних дисків.

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

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

Досліджувана культура бактерій	Діаметр стерильної зони, мм				
	Диски антибіотиків				

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

### Контрольні питання:

1. Що таке природна чутливість до антибіотиків?
2. Чим зумовлена набута стійкість? Чим відрізняється фенотипова стійкість від генотипової?
3. В чому суть методу індикаторних дисків?
4. Чим визначається ступінь чутливості бактерій до антибіотиків?

### Матеріали та обладнання:

Чашки Петрі, МПА, суспензія бактеріальної культури, стерильна піпетка, стерильний шпатель, індикаторні диски, пінцет, лінійка.

## Лабораторна робота № 11

### СПИРТОВЕ БРОДІННЯ

**Мета роботи:** Спостерігати за спиртовим бродінням, визначити його продукти.

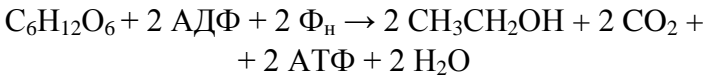
Бродіння – це метаболічний процес, під час якого відбувається регенерування АТФ у реакціях субстратного фосфорилування за анаеробних умов. Залежно від кінцевих



продуктів бродіння поділяють на спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропіоновокисле тощо.

Одним із найпоширеніших і достатньо вивчених типів бродіння є спиртове. Спирт – один з найрозповсюдженіших продуктів зброджування вуглеводів мікроорганізмами. Збудники спиртового бродіння широко розповсюджені в природі – особливо у середовищах з високим вмістом вуглеводів.

При спиртовому бродінні в анаеробних умовах з вуглеводів утворюються етиловий спирт і вуглекислий газ:



Спиртове бродіння лежить в основі виноробства, пивоваріння, хлібопечіння і виробництва спирту.

Для одержання спирту використовують різні мікроорганізми: дріжджі, бактерії *Zyomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, гриб *Aspergillus oryzae*. Однак важливе практичне значення мають тільки дріжджі. В бродильній промисловості використовують дріжджі з класу сумчастих грибів (*Ascomycetes*) родів *Saccharomyces* та *Shizosaccharomyces*. Дріжджі *Sacch. cerevisiae* – одноклітинні, нерухомі, сферичні, еліпсоїдальні, розміром 8-10 мкм. Клітини багаті на включення: краплі жиру, волютин, глікоген, білкові зерна, оптимальне рН для росту – від 3,5 до 6,5. Розмножуються дріжджі переважно вегетативно: брунькуванням, рідше поділом. Дріжджі є аеробними організмами, їх вирощують на заводах кормових дріжджів та на дріжджзаводах при посиленій аерації. В анаеробних умовах для підтримання своєї життєдіяльності дріжджі зброджують вуглеводи за типом спиртового бродіння.

### Практичне завдання

1. Розрахувати кількість утвореного спирту і збродженого цукру.
2. Провести якісну реакцію на етиловий спирт.
3. Розглянути дріжджі під мікроскопом.

### Хід роботи:

1. Виготовити синтетичне середовище такого складу (г): сахароза – 10; пептон – 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4$  – 0,03; вода дистильована – 300 мл. У колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл внести 40 мл середовища (рН 5,5) і близько 1 г пресованих пекарських дріжджів. Колбу закрити гумовим корком з газовивідною трубкою, зважити на вазі з точністю до 0,1 г і помістити в термостат з температурою  $30^\circ\text{C}$  на три доби.

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

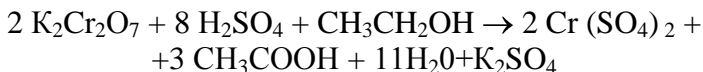
3. Виготовити препарат “роздавлена крапля” з додаванням до краплі культури на предметному склі 1 краплі метиленової синьки. Мертві клітини швидко зафарбовуються у синій колір. Підрахувати кількість живих і мертвих клітин дріжджів у полі зору мікроскопа  $40\times$ . Відшукати клітини в стадії брунькування і замалювати їх.



Рис.1. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* в стадії брунькування

4. Якісна реакція на етиловий спирт.

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



### Контрольні питання:

1. Суть процесу бродіння. Які розрізняють типи бродіння?
2. Які продукти утворюються в результаті спиртового бродіння? Яке промислове значення має цей тип бродіння?
3. Назвіть збудників спиртового бродіння.
4. Якісна реакція на етиловий спирт.

### **Матеріали та обладнання:**

Колби Ерленмейера на 100 мл, корки з газовідвідними клапанами, мірні циліндри, пробірки, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, ваги, різноважки, мікроскопи, дріжджі. Реактиви: сахароза, пептон,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , 1%-ний  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  конц.

## **Лабораторна робота № 12**

### **МОЛОЧНОКИСЛЕ БРОДІННЯ**

**Мета роботи:** Спостерігати процес молочнокислого бродіння, розглянути його збудників, визначити продукти бродіння.

Здавна людина використовує діяльність молочнокислих бактерій. Молочнокислі бактерії здійснюють найбільш розповсюджений у природі процес молочнокислого бродіння, який, завдяки консервуючій і стерилізуючій дії, що ґрунтується на підкисленні середовища до значення  $\text{pH} < 5$  широко використовується в сільському та домашньому господарстві, у молочній промисловості. Їх представники, що наведені у табл. 1 мають такі основні властивості:

- утворюють молочну кислоту;
- позитивно фарбуються за Грамом;
- не утворюють спори;
- нерухливі;
- коки чи палички;
- вимогливі до джерела азоту;

- не утворюють каталазу;
- анаероби (мають бродильний тип метаболізму);
- аеротолерантні.

Таблиця 1

### Бактерії, що здійснюють молочнокисле бродіння

Форма клітин	Гомоферментативне		Гетероферментативне	
	Основний продукт – молочна кислота		Окрім молочної кислоти утворюють значну кількість оцтової, янтарної кислот, етиловий спирт та вуглекислий газ	
	Представники	Розповсюдження	Представники	Розповсюдження
Коки	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Молоко та молочні продукти	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	Рослини та рослинні залишки
	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Кишковик та слизові оболонки		
Палички	<i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Молоко та молочні продукти	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus viridescens</i>	Рослини та рослинні залишки
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Рослини та рослинні залишки		

При виготовленні кисломолочних продуктів мають місце процеси, в яких бактерії розщеплюють вуглеводи молока з утворенням молочної кислоти та деяких інших речовин. Молочна кислота денатурує білок казеїн, в результаті чого він випадає в осад. В залежності від виду молочнокислих бактерій, а також від властивостей вихідного матеріалу бродіння, одержують той чи інший продукт з характерним смаком, ароматом та іншими властивостями (табл. 2).

Таблиця 2

### Продукти молочнокислого бродіння

Продукт	Культури, що входять до складу заквасок
Вершкове масло	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
Сметана	<i>Streptococcus diacetilactis</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i>
Йогурт	<i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Кефір, кумис	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> дріжджі <i>Torula</i>
М'які сири	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
Тверді сири	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>

При виробництві сиру тверді згустки, які складаються з білка і жирів, відокремлюють від сироватки і потім інокують різними видами молочнокислих бактерій і (або) мікроскопічними грибами. Деякі знамениті сорти сиру визрівають, набуваючи специфічних смакових властивостей, завдяки життєдіяльності різних видів *Penicillium*.

Молочнокислі бактерії застосовують також для приготування різноманітних солонин і маринадів, для сквашування овочів. При цьому рослинна сировина витримується у сольовому розчині, де під впливом спонтанної мікрофлори розпочинається молочнокисле бродіння. Наприклад, у дрібно посіченій, посоленій та добре спресованій капусті бродіння проходить за участю *Leuconostoc* (з утворенням  $\text{CO}_2$ ), а потім *Lactobacillus plantarum*. У розсолі огірків розвивається огіркова паличка *Lactobacillus cucumeris*.

Молочнокислі бактерії, що мешкають на рослинах відіграють основну роль при силосуванні кормів. Вони зброджують цукри рослин до молочної і частково оцтової кислот, знижуючи рН соковитих кормів до 4,2-4,0. Це призводить до пригнічення розвитку гнилісних та інших бактерій, що спричинюють псування кормів. Для силосування сировина повинна мати достатній вміст цукрів, тому інколи додатково додають мелясу. Важливо також створити анаеробні умови шляхом пересування комів.

Недотримання умов силосування кормів, технології виготовлення та вимог до зберігання кисломолочних продуктів та сквашених овочів сприяє розвитку інших мікроорганізмів та пригніченню молочнокислих бактерій. За таких обставин у складі мікрофлори розсолів тощо можлива присутність дріжджів, дріжджоподібних грибів (*Oidium lactis* – молочна цвіль), гіфальних грибів, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій, бацил, мікрококів та ін. Молочна цвіль окислює молочну кислоту, яку продукують бактерії, до  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2\text{O}$ . При цьому знижується кислотність, що створює сприятливі умови для розвитку гнилісних бактерій. Показниками якості молочнокислих продуктів є наявність активної мікрофлори та молочної кислоти.

### Практичне завдання

1. Визначити кількість утвореної молочної кислоти;
2. Провести якісну реакцію на молочну кислоту;
3. Розглянути під мікроскопом молочнокислі бактерії.

## Хід роботи

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

Дослід на молочнокисле бродіння закласти у 2 широких пробірках, в які налити по 10 мл свіжого молока, закрити ватними корками і помістити в термостат при температурі  $30^{\circ}\text{C}$  на 4-5 днів.

На наступному занятті вміст однієї пробірки перелити в колбу на 100 мл (перемішуючи склянкою паличкою і поступово ополіскуючи в 20 мл дист. води). Додати 2-3 краплі фенолфталеїну і титрувати 0,1н розчином NaOH. Визначити градуси Тернера і кількість утвореної молочної кислоти. За різницею (мг) молочної кислоти в молоці до і після досліду розрахувати, яка її кількість утворилась при молочнокислому бродінні.

2. *Якісна реакція на молочну кислоту.* Для виявлення молочної кислоти використати реактив, який складається з суміші 5%-них розчинів карболової кислоти і хлорного заліза (1:2), розведених подвійною кількістю води. Він має аметистово-синій колір. В присутності молочної кислоти це забарвлення переходить в солом'яно-жовте за рахунок утворення молочнокислого заліза. Реакцію проводять у фарфорових чашках, додаючи реактив до кількох крапель сироватки.

3. *Мікроскопування молочнокислих бактерій.* Для вивчення молочнокислих бактерій приготувати мазок з кислого молока. Набрати петлею згусток, розмазати по склі і висушити на повітрі. Мазок зафіксувати сумішшю спирту з ефіром (1:1), кілька разів наливаючи її на предметне скло. При такій фіксації

мікроорганізми прилипають до скла а жир розчиняється і вимивається з мазка. Після фіксації препарат зафарбувати метиленою синькою (протягом 5 хв), розглянути в імерсійній системі і замалювати.



*Рис. 1. Streptococcus lactis*

### **Контрольні питання:**

1. Збудники молочнокислого бродіння. Основні властивості молочнокислих бактерій.
2. Охарактеризуйте типи молочнокислого бродіння.
3. Яким чином визначається кількість молочної кислоти, утвореної в результаті молочнокислого бродіння?
4. Якісна реакція на молочну кислоту.

### **Матеріали та обладнання:**

Склянка, скляна паличка, молоко, NaOH, фенолфталеїн, реактив (5% розчин карболової кислоти і 5% розчин хлорного заліза (1:2)), кисле молоко, мікробіологічні петлі, предметні скельця, суміш спирту з ефіром (1:1), метиловий синій, мікроскопи, імерсійне масло.

## **Лабораторна робота №13**

### **МАСЛЯНОКИСЛЕ БРОДІННЯ**

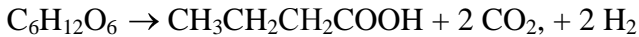
**Мета роботи:** Спостерігати маслянокисле бродіння, виявити його збудників, продукти бродіння.

Збудниками маслянокислого бродіння є бактерії роду *Clostridium* (*C. pasreriuanum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*),



широко розповсюджені в ґрунті, гної, забруднених водоймах, на поверхні рослин, у молоці та інших субстратах.

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



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

### **Практичне завдання**

1. *Виявити масляну кислоту;*
2. *Провести якісні реакції на масляну кислоту;*
3. *Промікроскопіювати маслянокислі бактерії.*

### **Хід роботи:**

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

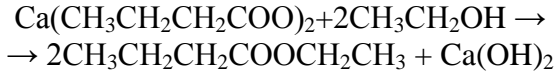
Завдяки елективним умовам: анаеробіозу, наявності джерела вуглецю – крохмалю, який розкладається мікробним ферментом амілазою, знищенню неспороутворюючих

мікроорганізмів при пастеризації, забезпечується переважне розмноження маслянокислих бацил.

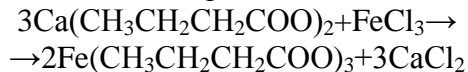
Після закінчення бродіння у бражці виявити масляну кислоту і розглянути збудників бродіння.

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

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



- Реакція з хлоридом заліза (III). Нейтральні розчини бутиратів при нагріванні з  $\text{FeCl}_3$  дають коричневе забарвлення. Реакція відбувається за таким рівнянням:



У пробірку налити приблизно 5 мл культуральної рідини і додати 2 мл 5%-ного розчину  $\text{FeCl}_3$ . При нагріванні отримують коричневе забарвлення внаслідок утворення бутирату заліза.

3. *Мікроскопування маслянокислих бактерій.* Після закінчення бродіння краплю зброженої рідини перенести на предметне скло і змішати з краплею розчину Люголя, накрити покривним склом, надлишок рідини відтягнути фільтрувальним папером. Препарат розглянути в імерсійній системі мікроскопа. Знайти булавовидні потовщені палички *Clostridium*, у клітинах яких видно спори, і замалювати.



Рис. 10. *Clostridium butyricum*

### **Контрольні питання:**

1. Назвіть і охарактеризуйте збудників маслянокислого бродіння.
2. Які продукти утворюються в результаті маслянокислого бродіння?
3. Якісні реакції на масляну кислоту.

### **Матеріали та обладнання:**

Пробірка, картопляне лушпиння,  $\text{CaCO}_3$ , водопровідна вода, гумовий корок з газовідною трубкою, водяна баня, 96% розчин етилового спирту,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , предметні та покривні скельця, фільтрувальний папір, мікроскопи, імерсійне масло.

## Додаток

### Поживні середовища:

#### *М'ясо-пептонний агар (МПА)*

До м'ясної води додають 1% пептону і 0,5% хлориду натрію, кип'ячать на слабкому вогні при постійному перемішуванні до повного розчинення компонентів. Приготовлений таким чином бульйон фільтрують, доводять рН до рівня 7,2-7,4 та додають 2% агар-агару. Після чого кип'ячать до повного розчинення агар-агару. Середовище фільтрують та стерилізують при температурі 121°C (1 атм) протягом 20 хв.

#### *МПА з сироваткою крові коня*

До 100 мл стерильного розплавленого і охолодженого МПА додають 5% сироватки крові коня.

#### *Середовище для індукції капсулоутворення та накопичення полі-β-оксималяної кислоти:*

До МПА додають 1% глюкози. Стерилізують при температурі 112°C (0,5 атм) протягом 30 хв.

#### *Середовище з марганцем для індукції спороутворення (г/л)*

- пептон – 5,0
- м'ясний екстракт – 3,0
- $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,005
- агар-агар – 20,0

стерилізують при температурі 121°C (1 атм) протягом 20 хв.

#### *Пептонна вода, г/л:*

- пептон – 10,0
- NaCl – 5,0
- дист. вода

рН 7,2 - 7,4

стерилізують при температурі 121°C (1 атм) протягом 30 хв.

### ***Середовище Ендо***

Поживне середовище випускається у вигляді сухого порошка і готується за прописом, вказаним на етикетці.

### ***Середовище Чапека***

Синтетичне середовища Чапека, що призначене для вирощування цвільових грибів, містить (г/л):

- $\text{NaNO}_3$  – 2,0
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0
- $\text{KCl}$  – 0,5
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01
- сахароза (або глюкоза) – 20,0
- $\text{CaCO}_3$  – 3,0
- агар-агар – 20,0
- дист.вода

значення рН 5,0 - 6,0.

Стерилізують при 116,5°C (0,75 атм ) протягом 10 хв.

### ***Середовище Ешбі***

Середовища Ешбі, яке призначене для вирощування азотфіксуючих бактерій, містить (г/л):

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2
- $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,1
- $\text{NaCl}$  – 0,2
- $\text{CaCCO}_3$  – 5,0
- Сахароза – 20,0
- агар-агар – 20,0
- водогінна вода

значення рН 7,3 - 7,6. Стерилізують при 116,5°C (0,75 атм) протягом 10 хв.

### ***Крохмально-аміачне середовище***

Крохмально-аміачне середовище, призначене для культивування актиноміцетів, містить( г/л):

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0
- $\text{NaCl}$  – 1,0
- $\text{CaCO}_3$  – 3,0
- розчинний крохмаль – 10,0
- агар-агар – 20,0
- дист.вода

Крохмаль попередньо розмішують у невеликій кількості води, а потім доливають до основного середовища. Стерилізують при  $121^\circ\text{C}$  (1 атм ) протягом 20 хв.

### ***Агаризоване сусло***

Для приготування цього середовища застосовують концентроване солодове сусло, яке фільтрують та розводять водогінною водою до концентрації 6-8% сухої речовини. Додають 2% агар-агару і стерилізують при  $112^\circ\text{C}$  (0,5 атм) протягом 30 хв.

### ***Середовище для дріжджів (г/л):***

- сахароза – 20,0
- пептон – 5,0
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0
- агар-агар – 20,0
- дист.вода

Середовище стерилізують при  $112^\circ\text{C}$  (0,5 атм) протягом 30 хвилин.

### ***Картопляний агар (г/л):***

Для приготування картопляного агару 200 г картоплі (добре помитої та очищеної) подрібнюють, заливають 1 л водогінної води, кип'ятять протягом 15 хвилин. Відвар

фільтрують, доливають до початкового об'єму, додають 2% агару і 0,2% NaCl. Нагрівають до повного розплавлення агару при необхідності знову фільтрують. Встановлюють рН 7,0. Середовище стерилізують при 121°C (1 атм.) протягом 30 хв.

### ***Середовище Гісса***

Середовище Гісса, що застосовують для визначення ферментації вуглеводів, містить (г/л):

- пептон – 10,0
- NaCl – 5,0
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,7
- глюкоза (або лактоза, сахароза) – 3,6
- бромтимоловий синій (робочий розчин) – 1-2 мл
- агар-агар – 10,0
- дист. вода

рН 7,1-7,2

Колір середовища зелений. Стерилізувати при 112°C (0,5 атм.) протягом 30 хв.

Для приготування робочого розчину бромтимолового синього 400 мг індикатора розчиняють у 40 мл дистильованої води, нагріваючи до кипіння. До розчину додають 6,4 мл 0.1 н розчину NaOH, в результаті чого рідина набуває зеленого кольору. Об'єм доводять до 100 мл дистильованою водою.

### **Барвники для фарбування мікроорганізмів:**

#### ***Фуксин основний, насичений спиртовий розчин:***

- фуксин основний кристалічний – 8-9 г
- спирт етиловий – 100 мл

Розчин зберігається тривалий час у посуді з темного скла з притертою пробкою.

#### ***Фуксин основний, водно- спиртовий розчин:***

1 мл насиченого спиртового розчину фуксину основного розбавляють 10 мл дистильованої води. Розчин водного фуксину

нестійкий. Його можна зберігати не більше ніж 10 днів, тому краще використовувати свіжоприготовленим.

***Фуксин Циля карболовий:***

- основний фуксин кристалічний – 1 г,
- карболова кислота кристалічна – 5 г,
- гліцерин – 0,5 мл,
- етиловий спирт 96% – 10 мл,
- вода дистильована – 100 мл.

Спосіб 1. Для приготування розчину 1 г основного кристалічного фуксину розтирають у фарфоровій ступці з 5 г карболової кислоти і декількома краплями гліцерину. Протягом розтирання невеликими порціями додають спирт. Після того як барвник буде добре розтертий, додають при постійному перемішуванні 100 мл дистильованої води. Розчин барвника фільтрують через вологий паперовий фільтр. Фуксин Циля дуже стійкий і може зберігатися тривалий час у флаконі із темного скла з притертою пробкою.

Спосіб 2. До 10 мл насиченого спиртового розчину основного фуксину доливають 90 мл 5% карболової кислоти (карболову кислоту наливають у барвник, але не навпаки). Суміш протягом декількох хвилин енергійно перемішують, фільтрують через паперовий фільтр, а потім зливають у флакон для зберігання.

***Метиленовий синій, насичений спиртовий розчин :***

- метиленовий синій – 10 г,
- етиловий спирт – 100 мл.

Приготовлений розчин залишають при кімнатній температурі на 3 дні, періодично перемішуючи. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр та зберігають у посуді з притертою пробкою. Барвник стійкий і може зберігатися тривалий час.

***Метиленовий синій, водно-спиртовий розчин (1:40)***

- метиленовий синій, насичений спиртовий розчин – 1 мл,



- дистильована вода – 40 мл.

***Метиленовий синій, водно-спиртовий розчин (1:100)***

- метиленовий синій, насичений спиртовий розчин – 1 мл,
- дистильована вода – 100 мл.

***Метиленовий синій за Леффлером***

- метиленовий синій, насичений спиртовий розчин – 30 мл,
- КОН (1%-ний) – 1 мл
- дистильована вода – 100 мл.

***Суміш спирт + гліцерин або вода + оцтова кислота (1:1)***

До готової суміші додати насичений спиртовий розчин метиленового синього до утворення ніжно-блакитного забарвлення.

***Сафранін О, водний розчин (2%):***

- сафранін О – 2 г,
- дистильована вода – 98 мл

***Сафранін О, водний розчин (0,5%):***

- сафранін О – 0,5 г,
- дистильована вода – 99,5 мл

***Кристалічний фіолетовий – насичений спиртовий розчин:***

- кристалічний фіолетовий – 10 г,
- спирт етиловий – 100 мл.

Замість кристалічного фіолетового можна застосовувати генціановий фіолетовий або метиловий фіолетовий.

***Кристалічний фіолетовий, водний розчин (1%):***

- кристалічний фіолетовий – 1 г,
- дистильована вода – 99 мл.

***Кристалічний фіолетовий, водний розчин (0,1%):***

- кристалічний фіолетовий – 0,1 г,
- дистильована вода – до 100 мл.

***Кристалічний фіолетовий спиртовий розчин (2%):***

- кристалічний фіолетовий – 2 г,
- етиловий спирт (96%) – 98 мл

Цей розчин використовується для виготовлення папірців за методом Синьова.

***Малахітовий зелений, водно-спиртовий розчин :***

- малахітовий зелений – 10 г,
- етиловий спирт (96%) – 20 мл,
- вода дистильована – 80 мл.

## **Реактиви**

***Судан чорний В, 0,3%-ний спиртовий розчин***

300 мг Судану чорного В розчиняють у 70%-ному етиловому спирті. Об'єм доводять до 100 мл.

***Розчин Люголя***

- йод кристалічний – 1г,
- йодид калію – 2 г,
- дистильована вода – 300 мл.

У 5 мл дистильованої води спочатку розчиняють йодид калію, після чого додають решту води.

***Йодна протрава за Бурке:***

- йод кристалічний – 1 г,
- йодид калію – 2 г,
- дистильована вода – 100 мл.

У фарфоровій ступці розтирають йод кристалічний та йодид калію і порціями по 5 мл додають воду до повного

розчинення кристалічного йоду в йодиді калію. Зберігають у темному скляному посуді.

## Список використаної літератури

1. *Векірчик К.М.* Мікробіологія. Лабораторні роботи. К.: Вища школа, 1976. – 98 с.
2. *Михальський Л.О., Радченко О.С., Степура Л.Г.* та ін. Практикум із загальної мікробіології. – Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 2001. – 112 с.
3. *Михальський Л.О., Фуртат І.М.* Методичні рекомендації та практичні завдання до лабораторних робіт з курсу “Мікробіологія”. – Київ: Національний університет “Кієво-Могилянська академія”, 2000. – 43 с.
4. *Мищустин Е.Н. Емцев В.Т.* Мікробиологія. – М.: Агропромиздат, 1987. – 368 с.
5. *Промышленная* мікробиологія / Под ред. Егорова Н.С. – М.: Высшая школа, 1989. – 687с.
6. *Сэги И.М.* Методы почвенной мікробиології. – М.: Колос, 1983. – 296с.
7. *Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* /Практикум по мікробиології. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239с.
8. *Шлегель Г.* Общая мікробиологія. – М.: Мир, 1987. – 566 с.