

Міністерство освіти і науки України
Чорноморський державний університет імені Петра Могили
Кафедра біології та екологічної безпеки

С. Г. Лебідь
Г. Т. Федорович

ОСНОВИ ЗАГАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

Методичні рекомендації для студентів
напряму підготовки 6.040106
«Екологія, охорона навколишнього середовища
та збалансоване природокористування»

Випуск № 203



Видавництво ЧДУ ім. Петра Могили
Миколаїв – 2013

УДК 579(076)
ББК 28.4
Л 33

*Рекомендовано до друку вченою радою
Чорноморського державного університету імені
Петра Могили (протокол № 14 від 11.04.2013 р.)*

Рецензенти:

Григор'єва Л. І., доктор біологічних наук,
професор, завідувач кафедри біології та екологічної
безпеки Чорноморського державного університету
імені Петра Могили;

Черно В. С., кандидат медичних наук, доцент, декан
біологічного факультету Миколаївського національного
університету імені В. О. Сухомлинського.

Л 33

Лебідь С. Г.

Основи загальної мікробіології : [методичні
рекомендації для студентів напряму підготовки
6.040106 «Екологія, охорона навколишнього
середовища та збалансоване природокористування»] /
С. Г. Лебідь, Т. Г. Федорович. – Миколаїв : Вид-во
ЧДУ ім. Петра Могили, 2013. – 76 с. – (Методична
серія; Вип. 203).

Методичні рекомендації присвячено питанням організації
лабораторних робіт із мікробіології для студентів екологічних
спеціальностей. Детально розглянуто методику проведення
відповідних мікробіологічних досліджень, зокрема подано
інструкції, користуючись якими, студенти можуть планомірно
організувати свою роботу під час лабораторних занять. Крім
того, наведено контрольні питання та завдання до кожної
лабораторної роботи.

УДК 579(076)
ББК 28.4

© Лебідь С. Г., 2013
© Федорович Т. Г., 2013
© ЧДУ ім. Петра Могили, 2013

ЗМІСТ

Вступ	4
Лабораторна робота № 1. Мікробіологічна лабораторія. Мікроскоп і техніка роботи з ним. Виготовлення мікроскопічних препаратів	5
Лабораторна робота № 2. Морфологія бактерій. Простий метод фарбування	12
Лабораторна робота № 3. Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування	18
Лабораторна робота № 4. Вивчення морфології та способів вегетативного розмноження цвільових грибів.....	22
Лабораторна робота № 5. Виготовлення поживних середовищ для мікроорганізмів. Види стерилізації.....	25
Лабораторна робота № 6. Методи виділення й культивування мікроорганізмів.....	34
Лабораторна робота № 7. Виділення чистих культур. Морфологічні та культурні ознаки мікроорганізмів	38
Лабораторна робота № 8. Дослідження мікрофлори ґрунту	46
Лабораторна робота № 9. Санітарно-мікробіологічні дослідження води.....	54
Лабораторна робота № 10. Аналіз мікрофлори повітря.	57
Лабораторна робота № 11. Дослідження нормальної мікрофлори тіла людини.	60
Лабораторна робота № 12. Аналіз якості кисломолочних продуктів.	63
Лабораторна робота № 13. Бактеріологічний аналіз молока.....	66
Лабораторна робота № 14. Симбіотичні азотофіксатори (ознайомлення з бульбочковими бактеріями).	69
Література	72

ВСТУП

Мікробіологія – це наука про мікроорганізми, одна з провідних біологічних дисциплін. У біосфері Землі немає такого середовища, де б не зустрічалися мікроорганізми. Активна життєдіяльність величезної кількості, гігантська роль у колообігу речовин у природі має виняткове значення для підтримки динамічної рівноваги всієї біосфери, порушення якої призвело б до катастрофічних наслідків. Збереження природної рівноваги біосфери – це галузь інтересів сучасної екологічної науки. Саме тому мікробіологічні знання є досить необхідними для екологів, оскільки вони складають основу розуміння процесів саморегуляції в екосистемах різного рівня, у тому числі всієї біосфери.

Цей курс передбачає вивчення морфології, систематики, фізіології, біохімії та екології мікроорганізмів, їхньої ролі та значення в колообігу речовин, патології людини, тварин і рослин, дослідженню загальних умов життєдіяльності мікроорганізмів. Особлива увага приділяється дослідженню найчисленнішої групи мікроорганізмів – бактерій.

На межі мікробіології, епідеміології та гігієни виникла та набула свого величезного значення санітарна мікробіологія. Цей курс містить спеціальний розділ, присвячений саме основам цієї галузі мікробіології. Для фахівців-екологів ці знання є необхідними, оскільки санітарна мікробіологія вирішує такі завдання, як бактеріологічне дослідження води, ґрунту, повітря тощо, оцінка шляхів впливу людини та тварин на навколишнє середовище, що можуть стати причинами його бактеріологічного забруднення, розробка державних санітарних стандартів щодо мікрофлори навколишнього середовища. У програмі курсу передбачено низку лабораторних робіт, присвячених ознайомленню студентів із методиками санітарно-бактеріологічних досліджень та їх опрацюванню. Крім того, заплановано ознайомлення майбутніх фахівців із сучасними методиками екологічних досліджень, у яких використовуються мікроорганізми.

Методичні рекомендації покликані допомогти студентам при підготовці до занять і під час проведення лабораторних робіт. Теоретична підготовка за усіма темами повинна проводитись за підручником та лекційним матеріалом. Засвоєння навчального матеріалу систематично контролюється питаннями для самоперевірки, які наведені в кінці кожної теми.

Лабораторна робота № 1

Тема: Мікробіологічна лабораторія. Мікроскоп і техніка роботи з ним. Виготовлення мікроскопічних препаратів

Матеріали й обладнання: світлові мікроскопи марки МБР-1, МБІ, Біолам; лампи розжарення; мікробіологічні петлі; газові пальники; набори для мікроскопування (предметні й покривні стекла, барвники фуксин і метиленовий синій, фільтрувальний папір, гліцерин, кристалізатор із підставкою для препаратів); штативи для пробірок; об'єкти для мікроскопування (розсіл квашених огірків або капусти, кисломолочний продукт).

Мета роботи:

1. Ознайомитися з будовою мікроскопів марки МБР-1, МБІ, Біолам.
2. Із розсолу огірків або капусти виготовити препарат «роздавлена крапля», розглянути під мікроскопом (40х) і зарисувати.
3. Із кислого молока або іншого кисломолочного продукту виготовити фіксований забарвлений (метиленовий синій, 5 хв) препарат, розглянути його під мікроскопом (90х) і зарисувати.

Мікробіологічна лабораторія і правила роботи в ній

Сучасна мікробіологічна лабораторія – це комплекс приміщень, обладнання та приладів, які забезпечують роботу з культурами мікроорганізмів. До її складу входять: кімната для мікробіологічних досліджень, або навчальна лабораторія, стерилізаційна, посівна (бокс), мийка та лаборантська кімната. Усі приміщення повинні бути добре освітлені й вентилявані, стіни на висоту до 170 см від підлоги пофарбовані масляною фарбою або викладені плиткою (для вологого прибирання із застосуванням дезінфікуючих розчинів). Лабораторне приміщення обладнане шафами, де зберігаються апаратура й реактиви, термостатом для вирощування мікроорганізмів і лабораторними столами, покритими термо- й хімічно стійким матеріалом, лабораторними стільцями. На лабораторних столах до кожного робочого місця підведено електроенергію і газ (встановлені газові пальники Теклю).

Під час виконання робіт необхідно дотримуватися таких правил:

1. У лабораторію заборонено входити у верхньому одязі та класти на лабораторні столи сумки й інші особисті речі, які можуть заважати роботі.

2. У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.

3. Робоче місце має бути обладнане всім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок із культурами, бактеріологічною петлею тощо. За справність приладів несе відповідальність студент.

4. Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет), необхідно прожарювати на вогні.

5. У лабораторії заборонено споживати їжу, пити воду.

6. У випадку попадання досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл, необхідно негайно повідомити про це викладача й під його контролем провести дезінфекцію.

7. Усі живі препарати після мікроскопування, а також піпетки й шпатель, якими користувалися, необхідно занурити в склянку з дезінфекційною рідиною (2-відсотковий розчин хлораміну).

8. Після закінчення занять необхідно прибирати на робочому місці.

Мікроскоп і техніка роботи з ним

Для вивчення будови мікроорганізмів використовують різні мікроскопи, які забезпечують збільшення досліджуваних об'єктів у сотні (світловий мікроскоп) і десятки тисяч разів (електронний мікроскоп).

Найпоширенішими моделями сучасного біологічного мікроскопа, які дають змогу вивчати об'єкти у світлі, що проходить через лінзи, є мікроскопи марки МБІ, МБР, Біолам (рис. 1), Ergaval та ін. Ці мікроскопи мають механічну та оптичну частини.

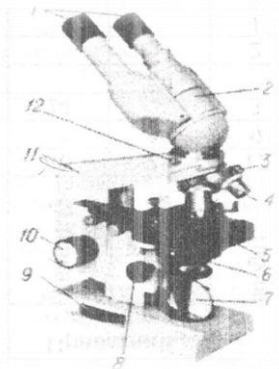


Рис. 1. Мікроскоп «Біолам» з біокулярною насадкою

1 – окуляри; 2 – біокулярна насадка; 3 – револьвер; 4 – об'єктив;
5 – предметний столик; 6 – конденсор; 7 – дзеркало; 8 – гвинт

переміщення кронштейна конденсора; 9 – мікрогвинт; 10 – макрогвинт; 11 – тубусотримач; 12 – гвинт для кріплення насадки.

Механічна частина мікроскопа МБР-1 складається зі штатива з предметним столиком і тубуса. Предметний столик має квадратну або круглу форму, і його можна зміщувати за допомогою спеціальних гвинтів. Під предметним столиком на штативі закріплений кронштейн конденсора, який переміщується в межах 20-ти мм за допомогою гвинта конденсора. Верхню частину штатива (тубусотримач) приводять у рух обертанням мікрометричного й макрометричного гвинтів, призначених для грубого й тонкого фокусування зображення.

Оптична частина мікроскопа складається з освітлювального апарата, об'єктивів і окуляра. Освітлювальний апарат – це дзеркало або вмонтований у мікроскоп освітлювач (найчастіше марки ОІ-32) і конденсор, який закріплений над дзеркалом або освітлювачем і складається з декількох лінз. Конденсор призначений для фокусування паралельних променів, які йдуть від джерела світла, у площині препарату. Тому при роботі з конденсором слід користуватися лише плоскою стороною дзеркала. У корпусі конденсора вмонтовані ірисова діафрагма, за допомогою якої регулюється освітлення поля зору мікроскопа, і відкидна оправа для світлофільтра. У мікроскопах деяких марок конденсор оснащений додатковою відкидною лінзою, яку використовують найчастіше при роботі з об'єктивами малих збільшень.

Найважливішою деталлю мікроскопа є об'єктив, який складається з системи лінз, вмонтованих у металеву оправу. Більшість марок мікроскопів мають зазвичай об'єктиви, які дають збільшення у 8, 40 і 90 разів, що завжди вказано на їхній оправі. Слід пам'ятати, що чим більше збільшення об'єктива, тим менша його відстань від препарату. Об'єктиви 8х і 40х називають сухими, оскільки під час роботи з ними між фронтальною лінзою об'єктива і препаратом на предметному склі знаходиться повітря. Об'єктив 90х занурюють у краплю імерсійної рідини (вода, гліцерин, кедрова олія), тому його називають імерсійним. Це збільшує показник заломлення середовища на межі з фронтальною лінзою і наближає його до показника заломлення скла ($n_{\text{скла}} = 1,52$; $n_{\text{води}} = 1,3$; $n_{\text{гліцерину}} = 1,47$; $n_{\text{кедрової олії}} = 1,52$). Занурення (імергування) об'єктива підвищує роздільну здатність мікроскопа до 0,2 мкм. Масляний імерсійний об'єктив має на оправі чорне кільце. Об'єктиви кріпляться у гніздах револьвера, обертанням якого здійснюється заміна одного об'єктива іншим.

Окуляр містить дві лінзи – верхню (очну) і нижню (збірну) – і служить для розгляду зображення препарату, яке дає об'єктив, тобто

виконує роль лупи. Окуляри можуть давати збільшення в 5, 7, 10, 15 і 20 разів, що вказано на їхній оправі. Окуляри бувають прості й більш складні – компенсаційні, про що свідчить індекс «К» на оправі. Багато сучасних світлових мікроскопів є бінокулярними.

Збільшення, яке дає мікроскоп, визначають із добутку збільшення окуляра на збільшення об'єктива. Чіткість зображення визначають за роздільною здатністю мікроскопа, яка залежить від довжини хвилі світла й числової апертури оптичної системи мікроскопа, яка, у свою чергу, є мірою кількості світла, що потрапляє на лінзу. Числова апертура об'єктива вказана на його оправі, наприклад 0,20 (об'єktiv 8), 1,25 (об'єktiv 90). Конденсори зазвичай мають числову апертуру 1,2 або 1,4.

Роздільна здатність мікроскопа визначається й тим, як освітлений препарат. Неправильне освітлення не лише знижує якість зображення, але й призводить до виникнення оптичних явищ, які помилково можна прийняти за структури, властиві досліджуваному об'єктові. Тому світловий мікроскоп потрібно правильно підготувати до роботи.

Підготовка до роботи світлового мікроскопа при використанні електричної лампи як джерела світла

1. Протерти лінзи окуляра й об'єктива м'якою серветкою, поставити лупу й мікроскоп так, щоб було зручно для роботи.

2. Підняти конденсор у максимально верхнє положення, закрити ірисову діафрагму, вивести світлофільтр. Поставити в робоче положення об'єktiv 8х.

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

4. Встановити окуляр і, пересуваючи тубус мікроскопа за допомогою мікрометричного гвинта, знову знайти чітке зображення джерела світла (спіраль лампи). Увести світлофільтр і відкрити ірисову діафрагму.

5. При роботі з об'єктивами 8х, 40х і 90х конденсор залишити в максимально верхньому положенні. Ступінь освітлення регулювати ірисовою діафрагмою.

Техніка роботи зі світловим мікроскопом

1. Розмістити мікроскоп так, щоб було зручно для роботи. Протерти лінзи окуляра й об'єктива м'якою серветкою.

2. Покласти предметне скло з препаратом на столик мікроскопа, затиснути його клемами.

3. Встановити обертанням револьвера необхідний об'єktiv.

4. Підняти конденсор у максимально верхнє положення.

5. При роботі з об'єктивами 8х і 40х частково прикрити ірисову діафрагму. Чіткість зображення відрегулювати за допомогою мікрометричного й макрометричного гвинтів.

6. При роботі з об'єктивом 90х на препарат нанести краплю кедрової олії чи гліцерину. Відкрити повністю ірисову діафрагму.

7. Дивлячись збоку, обережно, за допомогою макрогвинта, опустити тубус мікроскопа так, щоб лінза об'єктива занурилась у імерсійну рідину й навіть злегка доторкнулася поверхні скла. Слід пам'ятати, що при різкому опусканні об'єктива можна роздавити фронтальну лінзу й вивести мікроскоп з ладу.

8. Дивлячись у 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 7 і 8.

9. Поліпшити видимість препарату за допомогою мікрометричного гвинта.

10. Після завершення роботи зняти серветкою кедрову олію чи гліцерин із лінзи об'єктива 90х. Перевести мікроскоп на мале збільшення.

Для спостереження за мікроорганізмами готують їх живі або мертві (фіксовані) препарати.

Виготовлення мікроскопічних препаратів

1. Виготовлення 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 пухирців повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
4. Розглянути препарат при збільшенні об'єктива 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

2. Виготовлення препарату «відбиток»

1. З агаризованого середовища в чашці Петрі, на якому досліджувани 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 повернута вгору.
2. Чисте покривне скло покласти на поверхню блока, злегка натиснути й відразу зняти, не зсуваючи на бік.
3. Помістити одержаний препарат (відбитком вниз) у краплю води на предметне скло.

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

Виготовлення фіксованого забарвленого препарату

1. На середину чистого знежиреного предметного скла за допомогою скляної палички чи промивача нанести краплю води.

2. Профламбованою петлею чи піпеткою внести в неї досліджувану культуру мікроорганізмів і розподілити рівномірно на площі 1-4 см².

3. Препарат висушити, тримаючи скло високо над газовим пальником, або на повітрі.

4. Фіксуєючи препарат, тобто вбиваючи мікроорганізми, забезпечуємо їхнє прилипання до поверхні скла й ліпше фарбування. Для цього скло з препаратом провести тричі через верхню частину полум'я пальника (термічна фіксація). Можна фіксувати висушені на повітрі препарати, обробляючи їх метиловим чи етиловим спиртом, сумішшю Нікіфорова, ацетоном (хімічна фіксація).

5. Фіксований препарат покласти на підставку ванночки для фарбування, залити декількома краплями барвника (фуксин, метиленовий синій тощо), розподіляючи барвник по всій поверхні мазка. Фарбувати препарат фуксином протягом 1-2 хв, метиленою синькою – 3-5 хв, іншими барвниками – відповідно до методик. Потім фарбу злити, препарат добре промити дистильованою водою з промивача.

6. Скло з країв протерти фільтрувальним папером, препарат висушити й використовувати для мікроскопування. При роботі з об'єктивом 90х на сухий препарат нанести краплю імерсійної рідини.

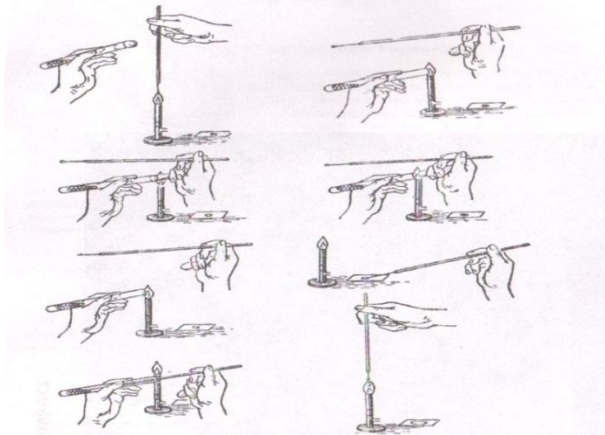


Рис. 2. Стерильний відбір мікроорганізмів бактеріологічною петлею

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Задачі мікробіологічної лабораторії.
2. Основні правила техніки безпеки в лабораторії.
3. Що таке імерсійний об'єктив, імерсійна система мікроскопа, імерсійна рідина?
4. Як за зовнішнім виглядом визначити імерсійний об'єктив?
5. Як виготовити препарат «роздавлена крапля»?
6. Як виготовити препарат «відбиток»?

Лабораторна робота № 2

Тема: Морфологія бактерій. Простий метод фарбування

Матеріали й обладнання: мікроскопи; мікробіологічні петлі; набори для мікроскопування; газові пальники, штативи для пробірок; культури бактерій, вирощені в пробірках із МПА.

Мета роботи:

1. Виготовити забарвлені фуксином препарати з чистих культур *Sarcina ventriculi* (*S. lutea*, *S. flava*), *Escherichia coli* (*Pseudomonas denitrificans*, *Pruteus vulgaris*), *Bacillus subtilis* (*B. mycoides*, *B. megaterium*), *Mycobacterium luteum*.

2. Розглянути під мікроскопом і зарисувати готові препарати бактерій *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus lactis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Streptomyces olivaceus* (*S. rimosus*, *S. globisporus*), *Microcycylus major*.

Усі препарати бактерій розглядають у іммерсійній системі мікроскопа.

Бактерії – це різноманітна й дуже поширена в природі група мікроорганізмів. Розміри їхні коливаються в межах 0,5-10 мкм. Клітини більшості бактерій мають сферичну, циліндричну чи звивисту форму. Крім того, існують галузисті й нитчасті бактерії; бактерії, які утворюють простеки (вирости); бактерії у вигляді півкола, незамкненого кільця (тороїди), правильної шестикутної зірки, трикутної та прямокутної форми тощо (рис. 3).

Форма клітини прокаріотів визначається жорсткою (ригідною) клітинною стінкою. Але в деяких бактерій клітинна стінка еластична (спірохети, міксобактерії, флексибактерії) чи зовсім відсутня (мікоплазми і L-форми).

Бактерії сферичної форми – **коки** – мають форму правильної кулі. Величина коків коливається в межах 1,2-5 мкм. Переважно це нерухомі та поодинокі коки, які не утворюють ендоспори (*Micrococcus lysodeikticus*, *M. radiodurans*). Коки здатні утворювати різні угруповання клітин:

диплококи – подвійні коки (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*);

тетракоки – поєднання чотирьох коків (*Tetracoccus casei*, *T. mycodermatis*, *Pediococcus acidilactici*);

стрептококи – ланцюжки з коків (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. mutans*);

стафілококи – скупчення коків у вигляді грон винограду (*Staphylococcus albus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*);

сарцини – пакети з 8-ми, 16-ти, 32-х і т. д. коків (*Sarcina ureae*, *S. ventriculi*).

Найбільш численною і різноманітною групою бактерій є паличкоподібні (циліндричні) форми, розміри яких – довжина і ширина – коливаються у різних видів. Паличкоподібні бактерії, які утворюють ендоспори, називають **бацилами** (*Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *Clostridium pasteurianum*, *C. tetani*). Нездатні до спороутворення палички називають бактеріями (*Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*, *Acetobacter aceti*). Бактерії та бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді **диплобактерій (диплобацил)** і **стрептобактерій (стрептобацил)**. У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин укриті спільною оболонкою (піхвою) і утворюють трихом (*Thriotryx nivea*, *Beggiatoa alba*, *B. gigantea*).

Паличкоподібні бактерії деяких родів можуть злегка галузитися (*Artrobacter globiformis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Propionibacterium freudenreichii*), а деяких – навіть утворювати слаборозвинений міцелій, який із часом розпадається на паличкоподібні та сферичні фрагменти (**коринеформні бактерії**) (*Nocardia rugosa*, *Mycobacterium luteum*, *M. tuberculosis*), або розвинений розгалужений несептований міцелій (**актиноміцети**) (*Streptomyces griseus*, *S. aureofaciens*, *Actinomyces lividans*, *A. albus*). Частина міцелію актиноміцетів занурюється в субстрат, частина піднімається над субстратом, утворюючи спороносні гіфи, на яких розвиваються екзогенні спори.

Звивисті бактерії, незалежно від ступеня звивистості, ділять на **вібріони** – вигнуті у вигляді коми палички (*Vibrio cholerae*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Desulfovibrio desulfuricans*), **спірили** – бактерії, які утворюють один чи декілька завитків (*Rhodospirillum rubrum*, *Spirillum volutans*, *Thiospira winogradskyi*). **Сніпoxети** (*Treponemf pallidum*, *Leptospira dentium*) утворюють багато завитків і петель, але їхня звивиста форма зумовлена відсутністю жорсткої стінки й специфічним характером руху.

Виявлено бактерії у формі замкненого або незамкненого кільця (**торойд**) – рід *Microcycylus*; бактерії, які мають вирости цитоплазми (**простекобактерії**). Серед архебактерій виявлено бактерії незвичної форми: трикутника, прямокутника, бактерії плоскої форми, які нагадують уламки скла (*Haloarcula*) (рис. 3).

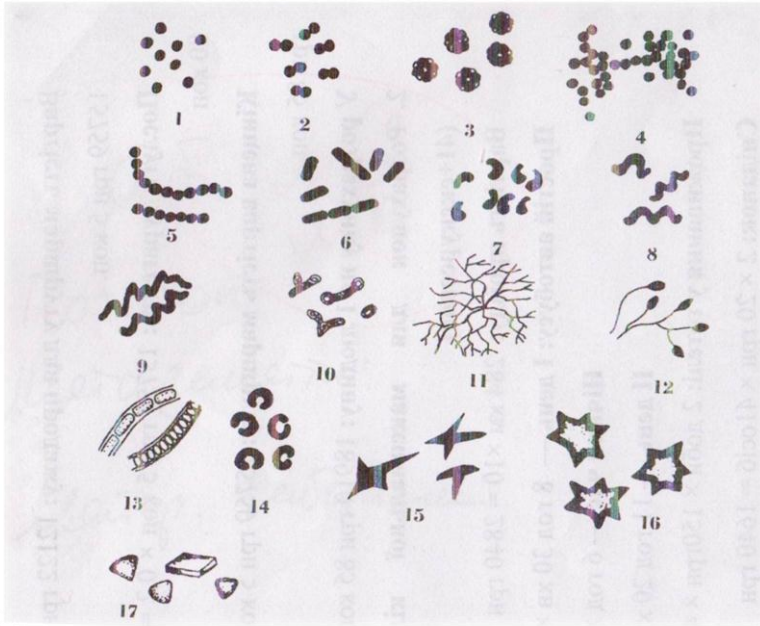


Рис. 3. 1 – мікрокок; 2 – диплокок; 3 – сарцина; 4 – стафілокок; 5 – стрептокок; 6 – паличка; 7 – вібріон; 8 – спірила; 9 – спірохета; 10 – коринеформна; 11 – актиноміцет; 12 – стебельцева; 13 – нитчаста; 14 – тороїд; 15 – простекобактерія; 16 – зірчаста простекобактерія; 17 – плоскі бактерії.

Приготування фарбованих препаратів

1. Підготовка предметних скельць. Препарати готують на предметних скельцях, які повинні мати товщину не більше 1,2-1,4 мм. Застосування товстіших скельць не дозволяє одержати різке зображення країв діафрагми освітлювача в площині препарату, оскільки воно потрапляє в товщу скла, що порушує фокусування конденсора й різко знижує чіткість зображення.

Для бактеріологічних досліджень необхідно використовувати чисті, добре знежирені скельця. Нові скельця промивають водою, витирають насухо та зберігають у склянках із спиртом або спирто-ефіром (порівну). Скельця, що використовувалися, витримують 1-2 години в концентрованій сірчаній кислоті або хромовій суміші, а потім промивають водою,

кип'ятять у мильній воді, промивають водою, ополіскують дистильованою водою, висушують у сушильній шафі. Скельця із рідин достають пінцетом. Перед використанням їх проводять через полум'я вогню. При роботі скельця беруть тільки з боків.

2. Приготування мазків. Мазок готують на предметному склі за допомогою бактеріологічної петлі або пастерівської піпетки.

Бактеріологічну петлю виготовляють із платинового дроту завдовжки 50-90 мм, вставляють у спеціальний тримач із рукояткою.

Згадані вище інструменти в роботі тримають трьома пальцями – як олівець. Робочі частини – петлю або голку – перед взяттям матеріалу обпалюють у полум'ї вогню у вертикальному положенні. Мазки виготовляють із культур мікробів, тканин, крові і т. д.

При виготовленні мазків із мікробних культур беруть у ліву руку пробірку з культурами так, щоб дно її було назовні, а корок, що її закриває, був усередині. Пробірку фіксують у долоні під кутом 45°, притискаючи її великим пальцем. У праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і фламбірують її в полум'ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають ватний корок до долоні, виймають його з пробірки й тримають так під час послідовних маніпуляцій. Відкритий край пробірки обпалюють над полум'ям вогню й після цього вводять у пробірку стерильну петлю, охолоджують і набирають невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату. Горличко пробірки після взяття матеріалу знову обпалюють у полум'ї спиртівки, потім обпалюють ватний корок і закривають ним пробірку. Взятий таким чином матеріал наносять на предметне скельце й рівномірно розподіляють по поверхні тонким шаром у вигляді мазка, а петлю знову розжарюють. Щоб отримати мазок менш густий, спочатку готують суспензію культури на запасному склі, а з неї готують мазок.

Якщо мазок готується із культур, що вирости на щільних живих середовищах, то попередньо на центр предметного скельця наносять краплю води або фізрозчину, петлею вносять дослідний матеріал і розподіляють його на предметному склі так, щоб отримати рівномірний мазок площею 1-1,5 см². Якщо дослідний матеріал рідина, то попередньо краплю води або фізрозчину не наносять. Мазок висушують на повітрі або ж у струмені теплого повітря над полум'ям спиртівки і фіксують. Мазки повинні бути тонкими, висушеними на повітрі й зафіксованими.

При приготуванні мазків із дуже дрібних колоній, їх беруть нікельованою голкою злегка зігнутою на кінці. Кінчиком голки обережно забирають із центра колонії бактерійну масу й суспендують у фізрозчині, а потім із неї петлею роблять мазок.

Для фіксації бактерійних клітин на поверхні предметного скла останнє протягом 3-5 секунд декілька разів проводять крізь полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале нагрівання скла недопустимо, оскільки при цьому відбувається деформація бактерій.

Фіксація мазків хімічним способом

1. Етиловий спирт 96°. Термін фіксації 15-20 хв.
2. Спирт-ефір. Термін фіксації 15-20 хв.
3. Метиловий спирт. Термін фіксації 1-5 хв.

Хімічний метод фіксації має переваги перед нагріванням тому, що при цьому морфологія бактерій не змінюється й застосовується переважно для фіксації мазків крові, мазків із молочних продуктів і т. д.

Простий метод фарбування мазків

Розрізняють прості й складні методи фарбування. Фарбування простим методом полягає в тому, що препарат фарбують однією фарбою: водним фуксином (1-2 хв), метиленовою синькою (3-5 хв) тощо.

В основі фарбування лежить фізико-хімічний процес, при якому проходить адсорбція фарби мікробною клітиною. Комплекс із мікроба і фарб є досить стійким і не піддається вимиванню водою. Чим вище концентрація фарби, тим вище швидкість адсорбції.

Після фарбування залишки фарби змивають і висушують фільтрувальним папером. При неповному висушуванні залишки вологи з імерсійною олією утворюють непрозору емульсію, яка погіршує зображення. Простим методом бактерії фарбуються в один колір рівномірно, й інколи з'являється зернистість, а також метакромазія (розчеплення тону кольору).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Як обробляють предметні й покривні скельця?
2. Виготовлення мазка для фарбування.
3. Як підготувати бактеріологічну петлю?
4. Із яких етапів складається процес виготовлення мазка.
5. Із якою метою і як фіксують мазки?
6. Техніка простого методу фарбування мазків.

Лабораторна робота № 3

Тема: Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування

Матеріали й обладнання: пробірки с культурами *Bac. Megaterium* і *E. coli* або суміш мікроорганізмів; колба з прокислим пивом; мікробіологічні петлі; предметні скельця; спиртівки; набір фарб для фарбування за Грамом; фільтрувальний папір; мікроскопи; імерсійна олія; таблиці зафарбованих бактерій та фарбування за Грамом.

Мета роботи:

1. Ознайомитися з приготуванням фарбувальних розчинів.
2. Оволодіти методикою фарбування за Грамом.

Зміст заняття: студенти готують мазки з культур на щільному середовищі або прокислого пива, проводять фарбування фіксованих мазків за Грамом.

Фарби. При фарбуванні мазка фарба проникає в мікробну клітину. Це дає можливість розглядати не тільки її зовнішні ознаки, але й деякі особливості внутрішньої структури – спори. У мікробіологічній практиці використовують основні й кислі фарби. Мікроби, як і ядра клітин, фарбуються основними фарбами, рідше нейтральними. Кислі фарби служать для створення фону, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Із основних фарб частіше застосовують фуксин основний феноловий, сафранін, нейтральрот (червоні фарби); метиловий голубий, азур II (сині фарби); малахітовий зелений (зелена фарба); везувін, хризойдин (жовто-коричневі фарби); пікринову кислоту (жовта фарба); нігрозин (чорна фарба) і т. д.

Розчини фарб можуть бути як спиртові, так і водні. Спиртові розчини фарб більш стійкі. Заздалегідь готують насичені спиртові розчини. До спирту додають стільки фарби, щоб на дні залишався нерозчинений осад. Із цих насичених розчинів готують розбавлені водно-спиртові розчини фарб для фарбування мікробів. Для підсилення дії фарби до неї додають, протравлюючи, речовину, яка підвищує стійкість водно-спиртових розчинів, сприяє розрихленню оболонки й кращому фарбуванню мікробів. Для цього використовують спирт, формалін, фенол, луги, нагрівання фарби.

Рецепти виготовлення фарб та фарбувальних розчинів

1. **Карболовий фуксин Ціля:** беруть 10 мл етилового спирту, додають 1 г основного фуксину. Залишають на одну добу, додають 100 мл 5-відсоткового розчину карболової кислоти на дистильованій воді. Через добу розчин фільтрують і розливають у флакони. Такий розчин фарби зберігається довго. У чистому вигляді його використовують для фарбування спор, збудника туберкульозу, лепри та інших.

Для фарбування багатьох видів мікроорганізмів застосовують розбавлені розчини. Беруть одну частину основного розчину й розбавляють у 10 мл дистильованої води.

2. **Карболовий генціанвіолет:** 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, далі додають 100 мл 2-відсоткову розчину фенолу. Фільтрують, розливають у флакони. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

3. **Метиленова синька:** 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, додають 30 мл 0,01-відсоткового КОН. Через добу фільтрують. Ця фарба використовується для простого фарбування бактерій. Експозиція 1-2 хвилини.

4. **Водний розчин сафраніну:** 1 г фарби розчиняють у 50 мл гарячої дистильованої води, гарячим фільтрують, розливають у флакони. Ця фарба добре фарбує капсулу антракси.

5. **Водний розчин метилвіолету:** 1 г фарби розчиняють у 100 мл гарячої дистильованої води, фільтрують. Фарба нестійка. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

6. **Фарба Романовського-Гімзи** – це суміш азуру: 0,8 г, еозину – 3 г, гліцерину х. ч. – 250 мл, метилового спирту – 250 мл. Фарби дуже ретельно розтирають у невеликій кількості гліцерину й спирту, далі додають решту кількості гліцерину та спирту. Розчин 4-6 діб витримують у термостаті при температурі 37 °С, фільтрують.

7. **Розчин Люголя:** 2 г KI розчиняють у 25 мл дистильованої води, додають 1 г кристалічного йоду, додають 275 мл дистильованої води, фільтрують.

Складні (диференціювальні) методи фарбування. Складні методи фарбування застосовують із метою ідентифікації та диференціації мікробів. Хімічний склад і будова клітинної стінки мікробів різні й тому вони фарбуються одними й тими ж фарбами по-різному і не однаково віддають їх при подальшому обезбарвленні етиловим спиртом, кислотами й іншими реактивами.

Фарбування за Грамом. Відношення бактерій до фарбування за Грамом визначається їх здатністю утримувати комплекс фарби з йодом. У грампозитивних бактерій клітинна стінка містить 90 % пептидоглікану,

тоді як у грамнегативних бактерій – 10 % пептидоглікану, який представлений тонким шаром у глибині стінки клітини. В оболонці грамнегативних бактерій значно більше, ніж у грампозитивних значно більше міститься білків та ліпідів, які разом з поліцукридами утворюють поверхневі шари у вигляді мозаїки. Їх цитоплазма містить РНК і ДНК у співвідношенні 1:1, а у грампозитивних – 8:1. Проникність стінки в грампозитивних бактерій менша, ніж у грамнегативних. Це пов'язано з тим, що в грампозитивних бактерій міститься більше пептидоглікану та діаметр пор у них менший, ніж у грамнегативних бактерій.

Суть цього методу полягає в тому, що грампозитивні мікроорганізми містять магнієву сіль РНК, яка утворює з генціанвіолетом і йодом стійкий комплекс, який не знебарвлюється спиртом і зберігає початкове фіолетове забарвлення. Грамнегативні мікроби не здатні утримувати фіолетову фарбу й при проведенні через спирт знебарвлюється. Використання водного фуксину на завершальному етапі сприяє фарбування таких мікробів у рожево-червоний колір.

Техніка фарбування за Грамом

1. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води й через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають.

2. На мазок наносять розчин Люголя й через 2 хвилини його зливають.

3. Мазок знебарвлюють 96-відсотковим етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 секунд.

4. Мазок ретельно промивають водою.

5. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні – у червоний.

Для фарбування за Грамом студенти готують мазок із суміші мікробів (*Bac. Megaterium* і *E. coli*) або прокислого пива (плівка на поверхні пива – оцтовокислі бактерії, внизу розміщуються дріжджі). На склі культуру змішують, мазок висушують, фіксують і фарбують за Грамом. Кишечна паличка й оцтовокислі бактерії – грамнегативні; капустяна бацила і дріжджі – грампозитивні.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Які фарби використовуються в мікробіологічній практиці?
2. Структура, хімічний склад та функції клітинної стінки бактерій. Відмінності в будові клітинної стінки в грампозитивних та грам-негативних бактерій.
3. Методика фарбування мікробів за Грамом.
4. Яке значення в мікробіології має метод фарбування мікробів за Грамом?

Лабораторна робота № 4

Тема: Вивчення морфології та способів вегетативного розмноження цвільових грибів

Матеріали й обладнання: мікроскопи; мікробіологічні петлі; набори для мікроскопування; газові пальники; культури цільових грибів; вирощені на чашечках Петрі з сусло-агаром.

Мета роботи:

1. Виготовити, розглянути й зарисувати препарати «роздавлена крапля» з чистих культур *Mucor plumbeus*, *Pencillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

2. Визначити будову субстратного й повітряного міцелію, будову спорангієносців і нестатевих спор, способи нестатевого розмноження.

3. Розглянути детально внутрішню будову клітин.

Гриби – безхлорофільні мікроорганізми, живуть на поверхні різних субстратів. Клітини грибів мають диференційоване ядро, тому їх відносять до еукаріотів. Цвільові гриби не вимогливі до поживних середовищ, але більшість із них потребують повітря (кисень). Легко переносять низькі температури, можуть жити й розмножуватись у холодильних камерах, серед грибів зустрічаються як сапрофіти, так і паразити.

Усі гриби ділять на вищі й нижчі, а також поділяють на 6 класів: хітридієві, ооміцети, зигоміцети відносять до нижчих грибів; аскоміцети, базидіоміцети й дейтеромицети, недосконалі гриби – до вищих.

Цвілі належать до міцеліальних грибів (фікоміцетів, аскоміцетів, базидіоміцетів, незавершених грибів). Міцелій цвілей складається з переплетених гіфів, за допомогою яких гриби прикріплюються до субстрату. Значна частина міцелію може розвиватися й у повітрі, утворюючи повітряний міцелій. Діаметр гіфів більшості грибів лежить у межах 5-50 мкм, а нитки повітряного міцелію у деяких грибів можна побачити неозброєним оком. Крім фікоміцетів (роди *Mucor*, *Rhizopus*), усі цвілі мають септований міцелій (рис. 4).

Розмноження цільових грибів відбувається нестатевим та статевим способами.

Нестатеве розмноження здійснюється окремими клітинами або групами клітин міцелію та за допомогою спор. У деяких грибів (рід *Geotrichum*) міцелій фрагментується на багато овальних клітин – оїдій

або артроспор. Вони можуть мати потовщені оболонки й багато запасних речовин (хламідоспори грибів роду *Fusarium*).

Нестатевими спорами є спорангіоспори, що утворюються в середині спорангію (роди *Mucor*, *Rhizopus*), або конідіоспори, які формуються на вільних кінцях плодоносних гіфів у представників родів *Penicillium* та *Aspergillus*.

У разі статевого розмноження цвільових грибів утворюються три типи статевих спор: зигоспори та ооспори – у фікоміцетів; аскоспори – у сумчастих грибів. Дейтероміцети статевих спор не утворюють.

При мікроскопуванні живих препаратів із культур плісень доцільно користуватися об'єктивами 8х і 40х.

Мікроскопічне дослідження грибів

Звичайні гриби досліджують у незафарбованому стані. На предметне скло наносять краплю рідини (вода, спирт, гліцерин порівну). Препарувальною голкою беруть частину міцелію і розмішують його в краплі рідини. Міцелій обережно розправляють голкою і накривають покривним скельцем. Препарат вивчають спочатку під малим, а потім середнім збільшенням у затемненому полі зору (звужена діафрагма). Препарат потрібно готувати поблизу предметного скла, не допускаючи розсіювання спор. Препарувальні голки після роботи ретельно фламбують над полум'ям спиртівки. Дріжджі мікроскопують аналогічним методом, або готують із них мазки і фарбують за Грамом, а потім розглядають препарат під імерсійною системою мікроскопа.

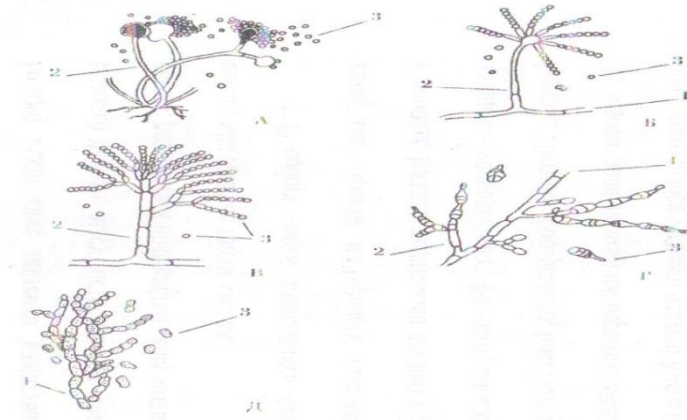


Рис. 4. Будова цвільових грибів родів: А – *Mucor*; Б – *Aspergillus*; В – *Penicillium*; Г – *Alternaria*; Д – *Geotrichum*; 1 – субстратний міцелій; 2 – споро-конідіє носець; 3 – спори

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Підготовка матеріалу й особливості мікроскопії грибів.
2. Особливості будови цвільових грибів.
3. Народногосподарське значення грибів.
4. Морфологія, біологічні особливості.
5. Розмноження цвільових грибів.
6. Будова дріжджів.

Лабораторна робота № 5

Тема: Виготовлення поживних середовищ для мікроорганізмів.
Види стерилізації

Матеріали й обладнання: колби на 500 і 1000 мл; ватні корки; МПБ; сусло; агар; хімічні реактиви для приготування середовищ; технічна вага з ціною поділки не більше 0,05 г; шпателі для зважування; стерилізатори; термостат; автоклав; водяна баня; піч Пастера; бактерицидна лампа; бактеріологічні фільтри; лабораторний посуд; чашки Петрі.

Мета роботи:

1. Виготовити МПА та сусло-агар (або інші поживні середовища) для проведення лабораторних робіт.

2. Ознайомитись із основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням, правилами миття, обробки та підготовки до стерилізації лабораторного посуду.

У лабораторних умовах мікроорганізми культивують на поживних середовищах, які мусять мати всі речовини, необхідні для їхнього росту. Конструктивні та енергетичні процеси в мікроорганізмів дуже різняться. Тому так само відрізняються їхні потреби в поживних речовинах. Універсальних середовищ, однаково придатних для росту всіх без винятку мікроорганізмів, не існує.

Основними компонентами будь-якого поживного середовища для культивування мікроорганізмів є сполуки вуглецю й азоту. Вони й визначають специфічність більшості поживних середовищ.

Автотрофні мікроорганізми використовують вуглекислоту як єдине джерело вуглецю, тому в середовище вносять NaHCO_3 або продувають повітря, збагачене CO_2 .

Гетеротрофні мікроорганізми здатні використовувати різні вуглець-вмісні органічні сполуки – кислоти, спирти, вуглеводи, ароматичні сполуки.

Потреби мікроорганізмів у азоті задовольняються за рахунок азотовмісних сполук, у яких азот має різний ступінь окиснення (амонійні солі, нітрати, амінокислоти й молекулярний азот, а інколи білки й пептони).

Багато мікроорганізмів потребує наявності в середовищі т. зв. факторів росту (вітамінів, пуринів, піримідинів, амінокислот), які додають до середовища у вигляді чистих сполук чи в складі дріжджового або кукурудзяного екстрактів.

Крім джерел вуглецю та азоту й факторів росту, для побудови речовин клітині необхідні сірка, фосфор та інші елементи, а також мікроелементи. Вони мають входити до складу поживного середовища в доступній для мікроорганізмів формі.

За компонентами прийнято розрізняти натуральні, або природні середовища невизначеного складу, і синтетичні середовища.

Натуральними зазвичай називають середовища, які складаються з продуктів тваринного або рослинного походження. До них належать овочеві чи фруктові соки, м'ясо, кров, молоко, відвари або екстракти, одержані з м'яса, риби, ґрунту, гною, овочів. Натуральні середовища використовують головним чином для підтримування культур мікроорганізмів, нагромадження біомаси та їхньої діагностики. До натуральних середовищ, які часто використовують у лабораторній практиці, належать м'ясо-пептонний бульйон і неохмелене пивне сусло.

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Основою для його виготовлення служить м'ясна вода, яку готують таким чином: пропущене через м'ясорубку волове м'ясо, звільнене від жиру, кісток, сухожиль, заливають подвійним об'ємом водопровідної води й витримують 2-4 год при температурі, близькій до кипіння, або при 15 °С протягом 13-15 год. Настій кип'ятять годину з м'ясом або без нього, фільтрують через кілька шарів марлі. До 1 л одержаної м'ясної води додають 10 г пептону і 5 г хлористого натрію, рН МПБ 7,0.

Для одержання м'ясо-пептоного агару (МПА) до МПБ додають 1,5-2 % агару. МПБ і МПА стерилізують при 1 атм 20 хв.

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

Пивне сусло готують на пивоварних заводах із ячмінного солоду. До нього входять: вуглеводи (мальтоза, декстрини) азотовмісні сполуки, а також вітаміни групи В, органічні кислоти й мінеральні солі.

Для усунення білків сусло фільтрують, за допомогою сахариметра визначають у ньому концентрацію цукру в градусах Балінга (°Б), які приблизно відповідають відсотковому вмісту цих речовин. Для культивування дріжджів і грибів використовують сусло з концентрацією 6-8 °Б, для молочнокислих бактерій – 8-12 °Б. Сусло, концентрація якого вища вказаної, розводять водопровідною водою.

Для приготування сусло-агару до сусла додають 1,5-2 % агару. Сусло й сусло-агар стерилізують при 0,5 атм 20-30 хв.

Синтетичні середовища – це середовища, до складу яких входять певні хімічні компоненти, взяті в точно вказаній кількості. Їх використовують при дослідженні метаболізму мікроорганізмів. Існує

багато прописів синтетичних середовищ, які забезпечують ріст різних мікроорганізмів.

Поряд із натуральними й синтетичними виділяють т. зв. **напівсинтетичні середовища**. Основним їхнім компонентом є синтетичні середовища, до яких додають у невеликій кількості речовини невизначеного складу: пептон (джерело азотного живлення), дріжджовий автолізат (джерело вітамінів групи В, піримідинових і пуринових основ), гідролізат казеїну (джерело амінокислот).

Елективні середовища призначені для виділення мікроорганізмів із місць їхнього природного існування. Вони забезпечують вибіркового розвитку певної групи мікроорганізмів, для якої характерні спільні фізіологічні властивості.

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

За консистенцією розрізняють рідкі, сипучі й тверді середовища.

Рідкі середовища широко використовують для нагромадження біомаси чи продуктів обміну мікроорганізмів, для підтримки і збереження в колекції культур мікроорганізмів, які погано розвиваються на твердих середовищах.

Сипучі середовища застосовують у мікробіологічній промисловості для культивування деяких продуцентів фізіологічно активних сполук. До таких середовищ належить розварене зерно (пшениця, пшоно), висівки та ін.

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

Агар – складний полісахарид, який одержують із бурих водоростей. Містить 1,5-4 % мінеральних солей, 10-20 % води й 70-80 % полісахаридів, до складу яких входять галактози, пентози, органічні кислоти.

Желатин – білок, який одержують із виварених кісток, хрящів, сухожиль, луски. Желатин плавиться при температурі 25 °С, яка нижча звичайної температури культивування багатьох мікроорганізмів (30-37 °С). Ця властивість желатину обмежує його застосування для ущільнення середовища. Желатин використовують головним чином для виявлення протеолітичної активності мікроорганізмів. Його додають до рідких середовищ у кількості 15-20 %. Желатинові середовища стерилізують при 0,5 атм 15 хв.

Види стерилізації

Стерилізація – процес, який передбачає знищення в об'єкті усіх вегетативних і спорових, патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

Підготовка до стерилізації: посуд миють і висушують. Пробірки, колби, флакони закривають ватно-марлевым корком. Зверху на корки одягають паперові ковпачки (окрім пробірок). Чашки Петрі стерилізують загорнутими в папір по 1-5 штук, пастерівські піпетки по 3-15 штук. У верхню частину піпетки вкладають трохи вати для того, щоб попередити потрапляння матеріалу до рота. Під час роботи піпетки потрібно брати за верхній кінець. Градуировані піпетки з ватним корком зверху, загортають кожну окремо в смужку паперу, для чого його нарізують смужками розміром (2-2,5) × (50-70) см. Лівий кінець загинають, накручують на піпетку, а верхній – закручують, або приклеюють. Посуд стерилізують сухим жаром при температурі 150 або 160, 190 °С відповідно 2,1 і 0,5 годин або у автоклаві при тиску 1 атм протягом 20-30 хвилин.

Фізичні методи включають: 1) стерилізацію сухим жаром (фламбування, сухим нагрітим повітрям), 2) стерилізацію вологим жаром (кип'ятіння текучою парою при 100 °С, дробову стерилізацію при температурі нижче ніж 100 °С, стерилізація парою під тиском з температурою вище ніж 100 °С, пастеризація), 3) стерилізацію фільтруванням (бактеріологічні фільтри), ультрафіолетовими променями, ультразвуком.

Засоби стерилізації сухим жаром. Фламбуванням або пропалюванням, стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети та інші металеві предмети.

Стерилізація **сухим нагрітим повітрям** здійснюється в спеціальних сушильних шафах (печі Пастера) із подвійними стінками. Зовні шафа облицьована теплоізоляційним матеріалом, усередині – стінки металеві. У верхній частині шафи знаходиться термометр. Між теплоізоляційною обшивкою та внутрішнім металом шафи на дні є автоматичний електронагрівальний елемент. У печі Пастера стерилізують чистий скляний посуд. Колби закривають ватними корками, накривають паперовими ковпачками й зав'язують. Чашки Петрі й пастерівські піпетки загортають пачками в пергаментний папір. При включенні сушильної шафи в електромережу, повітря всередині шафи нагрівається. При досягненні заданої температури відзначають час початку стерилізації. Режим стерилізації – при температурі 155-160 °С, експозиція 2 год, при 165-170 °С – 1-1,5 год, при 180 °С – 1 год. Після закінчення часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45 °С, шафу відкривають. Речовини, що запалюються, живильні середовища, гумові та пластмасові предмети стерилізувати сухим жаром не можна.

Засоби стерилізації вологим жаром. Кип'ятіння – засіб стерилізації інструментів (шприци, голки, пінцети, ножиці, скальпелі та ін.) і деяких гумових та скляних предметів у стерилізаторах, які мають решітку. На решітку кладуть два-три шари марлі або тонкий шар гігроскопічної вати. Шприци стерилізують у розібраному вигляді, у голки вставляють мандрени. Леза скальпелів і ножиці рекомендується обгортати марлею або ватою. У стерилізатор наливають воду (краще дистильовану) так, щоб вона повністю вкривала інструменти. Стерилізатор закривають кришкою. Кип'ятять 20-30 хвилин. Після стерилізації воду обережно зливають, а інструментами користуються тільки після їхнього охолодження.

Стерилізація текучою парою. В основу цього способу покладений засіб дробної стерилізації (розроблений Тиндалем, 1877 р.) при різних температурних режимах не вище 100 °С. Здійснюють стерилізацію в апараті Коха при 100 °С 30-40 хв. Апарат являє собою металевий котел циліндричної форми з подвійним дном, що закривається кришкою з отвором для термометру й виходу пари. Усередині котла є спеціальна підставка з отвором для матеріалу, що стерилізують, і нагрівальні елементи. На дно апарату наливають воду до рівня, про який дізнаються за показами водомірної трубки.

Початком стерилізації вважають момент закипання води. Пара, що утворюється при цьому, піднімається доверху безперервно до матеріалу, який стерилізується. Стерилізацію проводять 3 дні підряд. Однократне прогрівання вбиває тільки вегетативні форми мікроорганізмів. Спори, які залишилися життєздатними в періоди між стерилізацією проростають у вегетативні форми. Стерилізація на наступний день викликає їхню загибель. На третій день прогрівання гарантує повну стерильність матеріалу. Ефективність дробної стерилізації залежить від проростання спор, а тому в проміжках між нагріванням матеріали витримують при кімнатній температурі (25 °С). Дробну стерилізацію при 100 °С можна проводити і в автоклаві, закритому не герметично, у тих же режимах. Текучою парою стерилізують живильні середовища й інші матеріали, що руйнуються при нагріванні їх вище 100 °С (желатина, вуглеводи).

Тиндалізація – дробна стерилізація при температурах нижче 100 °С. Стерилізацію здійснюють у водяній бані. Принцип цього способу той же, що й при стерилізації текучою парою. Кратність нагріву залежить від температур, що застосовуються: при 70-80 °С протягом 3 діб, 60-65° С – 5 діб, 56-58 °С – 6-7 діб. У перший день матеріали стерилізують 2 год, у наступні дні – по одній годині. У проміжках між прогріванням матеріал, що стерилізується, витримують при кімнатній температурі для проростання спор. За допомогою тиндалізації при

56-58 °С стерилізують матеріали, що руйнуються при більш високій температурі (колоїдні розчини, сироватка крові та ін.)

Автоклавування – стерилізація парою під тиском із високою температурою, здійснюють у спеціальному апараті – автоклаві. В основі цього способу лежить нагрівання матеріалу, поміщеного в автоклав із герметично закритою кришкою, чистою насиченою парою під тиском вище атмосферного. При зустрічі насиченої пари з більш холодним об'єктом пара конденсується, перетворюючись на воду, в результаті чого виділяється велика кількість тепла і температура об'єкта стерилізації швидко підвищується. Крім того, при конденсації пари відбувається зменшення її обсягу, що сприяє проникненню пари у внутрішні частини матеріалу. Обов'язковою умовою є надходження справді насиченої пари, щоб її торкання з холодним предметом вело до негайної конденсації і нагрівання та не призводило до вилучення води з матеріалу, який стерилізується. Сучасні автоклави електричні. Промисловість випускає автоклави вертикальні й горизонтальні.

Вертикальний автоклав являє собою двостінний металевий котел циліндричної форми, що закривається герметично кришкою. Через спеціальний кран із лійкою між стінками заливають воду до певного рівня. Внутрішня стінка котла у верхній частині має отвір, у нижній частині – кран, через який при нагріванні води пара витісняє повітря з котла. Автоклав нагрівають включенням у електромережу. Автоклав завантажують матеріалом, кришу закривають герметично, закривають кран, через який заливають воду, нижній кран тимчасово залишається відкритим. При закипанні води між стінками автоклаву пара, що утворюється, піднімається доверху й через верхній отвір внутрішньої стінки потрапляє всередину котла, витісняючи повітря через нижній відкритий кран. Коли повітря все витиснеться й пара починає виходити рівним струменем, нижній кран закривають. У результаті, тиск пари всередині автоклаву підвищується. Початком стерилізації вважають момент досягнення показань манометра заданої величини. Нагрівання регулюють протягом усієї стерилізації, підтримуючи тиск пари на одному рівні. При надмірному підвищенні тиску всередині автоклаву передбачений запобіжний клапан, через який автоматично надлишок пари виходить назовні.

При підвищенні тиску пари відповідно підвищується й температура в автоклаві:

0,505*10⁵ Па (0,5 атм) температура 110-112 °С
1,01*10⁶ Па (1 атм) – 120-121 °С
1,515*10⁶ Па (1,5 атм) – 124-126 °С
2,02*10⁶ Па (2 атм) – 132-133 °С

Манометр показує тиск пари без врахування навколишнього атмосферного тиску (760 мм рт. ст.) Після закінчення часу стерилізації автоклав відключають. Після охолодження при нульовій позначці манометру відкривають кран для того, щоб випустити пару. Кришку відкривають обережно на себе, не заглядаючи в котел, уберігаючи очі від можливої залишкової пари. До повного виходу пари відкривати кришку не можна. Бо при швидкому падінні тиску всередині автоклаву простерилізовані рідкі середовища закипають, корки з пробірок виштовхуються разом із рідиною.

В автоклаві стерилізують живильні середовища, що витримують нагрівання вище 100 °С (МПА, МПБ, фізрозчин), скляний посуд, загорнутий у папір, перев'язувальний матеріал, халати. Крім того, в автоклаві знезаражують використані бактеріальні культури, посуд. У цих випадках тиск пари й експозиція стерилізації повинні бути тривалішими (1,5 атм – 1 год), ніж при стерилізації чистого матеріалу (0,5 атм – 30-40 хв). Для перевірки якості роботи автоклаву, відповідність показів манометра й температури пари використовують різноманітні хімічні речовини (бензонафтол, сірка), які мають певну температуру плавлення.

Горизонтальний автоклав відрізняється від вертикального конструкцією, але принцип роботи той же.

Пастеризація – спосіб запропонований Пастером із метою збереження біологічної цінності харчового продукту (молоко, м'ясні, рибні й овочеві консерви), що знижується при кип'ятінні (руйнуються вітаміни й інші нестійкі до високої температури речовини). При пастеризації продукт нагрівають до 80 °С 30 хв, після цього різко охолоджують (до 4-8 °С). Пастеризацією досягається часткова стерилізація – гинуть вегетативні форми бактерій, а спори зберігаються. Різке охолодження й наступне зберігання при низькій температурі (4-5 °С) перешкоджають проростанню спор і наступному розмноженню бактерій.

Стерилізація фільтруванням полягає в пропусканні рідкого матеріалу через бактеріологічні фільтри шляхом створення на фільтрі перепаду тиску або шляхом створення вакууму в приймальникові фільтрату. Для фільтру полягає в механічній затримці й в адсорбції мікроорганізмів стінками пор фільтру. Розміри мікробів часто бувають менші середнього діаметру пор фільтрів. Фільтрують звичайно рідини, які не витримують нагрівання (сироватки крові, розчини антибіотиків та ін.). Фільтри бувають тверді – (керамічні, азбестові) і мембранні.

Частіше в роботі використовують фільтри Зейтца й мембранні фільтри, які вмонтовані в спеціальному утримувачі-лійці, вставленому в корок, що закриває колбу Бунзена (товстостінна колба з тубусом). Змонтований фільтр загортають папером і стерилізують у автоклаві.

Рідину, яка фільтрується, наливають у лійку над фільтром, на тубус колби надягають гумову трубку, приєднану до ручного або електричного насоса, викачуванням повітря з колби створюють понижений тиск, і рідина фільтрується, бактерії залишаються на фільтрі. Стерильність отриманих фільтратів перевіряють посівом на живильні середовища з наступним інкубуванням у термостаті протягом декількох діб.

Стерилізація ультрафіолетовим промінням. У лабораторії джерелом УФ-опромінення служать спеціальні бактерицидні лампи. Ці промені використовують для знезараження повітря в приміщеннях (боксах, операційних). Бактерицидні лампи знайшли також своє застосування в харчовій промисловості при зберіганні різноманітних продуктів (температура вище 0 °С).

Ультразвук як фізичний стерилізаційний чинник може бути використаний, наприклад, для знезараження води, молока, деяких продуктів. Стерилізаційна дія ультразвуку пов'язана з виникненням у цитоплазмі бактерій кавітаційних міхурців, заповнених парою з тиском біля 10 тис. атм, унаслідок чого руйнуються внутрішні структури бактеріальної клітини.

Стерилізація за допомогою хімічних речовин у лабораторній практиці має обмежене застосування й зводиться до консервування з метою попередження бактеріального забруднення живильних середовищ, вакцин, а також лікувальних і діагностичних сироваток різноманітними хімічними сполуками (солі металів, луги, антибіотики та ін.). Живильні середовища консервують хлороформом, толуолом, інколи ефіром (для звільнення від консерванту середовище нагрівають до 56 °С). Вакцини й лікувальні сироватки консервують фенолом (0,25-0,5 %), хлороформом (0,5 %).

Хімічні речовини застосовують у лабораторіях і для дезінфекції.

Дезінфекція – це знищення патогенних мікроорганізмів у об'єктах зовнішнього середовища. Навіть у фіксованих і зафарбованих мазках іноді зберігаються збудники деяких хвороб. Тому дезінфекція в бак лабораторії – це обов'язковий повсякденний захід. Дезінфекції не підлягає лише той посуд, де культивувались мікроорганізми; його складають у бікси, пломбують і здають до стерилізації.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Призначення живильних середовищ і вимоги до них.
2. Класифікація живильних середовищ.
3. Культивування аеробів.
4. Культивування анаеробів.
5. Поняття «стерилізація», «дезінфекція», їх застосування на практиці.
6. Методи стерилізації.
7. Автоклав, його будова та призначення.
8. Стерилізація сухою парою.

Лабораторна робота № 6

Тема: Методи виділення й культивування мікроорганізмів

Матеріали й обладнання: термостат; чашки Петрі; конічні колби (0,2-0,5 л); електроплитка; бактеріологічні петлі та препарувальні голки; фільтрувальний папір; стерильні пробірки; МПА; сіно; картопля; чисті культури на МПА.

Мета роботи: виділення чистих і елективних культур.

Основні відомості. Серед мікробних культур розрізняють чисті й елективні. *Чистою* називають культуру одного виду мікробів, що походить з однієї клітини або спори. *Елективні* культури (культури нагромадження) одержують на елективних середовищах при певних умовах культивування. Для цих культур використовують середовища, склад яких найкраще задовольняє потреби певної групи мікроорганізмів. Наприклад, у середовищах для культивування хемо- й фотоавтотрофних бактерій не повинно бути органічних речовин.

Вивчення властивостей бактерій та інших мікроорганізмів, як правило, проводять на чистих культурах. Найчастіше отримують чисті культури з попередньо виготовлених елективних культур. З цією метою використовують різні методи, залежно від мети досліджень і властивостей вихідного матеріалу.

Якщо в досліджуваному матеріалі містяться різні види мікроорганізмів, то основним завданням є одержання ізольованих колоній цих мікробів шляхом пересівання їх на поверхні твердого поживного середовища. Для цього застосовують: *метод розведень, метод виділення чистої культури з окремої колонії, метод виділення чистої культури з однієї клітини* та інші.

Метод розведень увів у практику Л. Пастер. Згідно з цим методом, досліджуваний матеріал, який містить мікроорганізми, за допомогою петлі переносять у пробірку з рідким стерильним поживним середовищем і старанно розмішують. Потім із цієї пробірки петлею переносять матеріал у нову, і так повторюють, змінюючи 5-6 пробірок доти, доки не одержать розведення, у якому буде тільки одна клітина. Проте цей метод зараз майже не застосовують, оскільки він має низку недоліків.

При виділенні чистих культур і культивуванні мікробів часто проводять їх посіви й пересіви. Техніка посіву є простою. Наприклад, невеличку кількість досліджуваного матеріалу петлею вносять у посудини з рідким поживним середовищем.

Тверде поживне середовище треба спочатку приготувати: розлити розплавлений і охолоджений до 50 °С МПА чи інше середовище. Стерильні чашки Петрі виставляють на рівну поверхню, обпалюючи на спиртівці отвір пробірки з середовищем, піднявши кришку чашки з одного боку, наливають поживне середовище, обережно закривають чашку кришкою і заливають до застигання агару.

Посів у чашки Петрі. Піднявши край чашки проводять посів петлею або шпателем (рис. 5) і закривають чашку. Позначають і розміщують її у термостаті догори дном, щоб крапельки води, які утворюються з пари на кришці чашки, не потрапили на поверхню середовища і не розмивали ізолювані колонії.

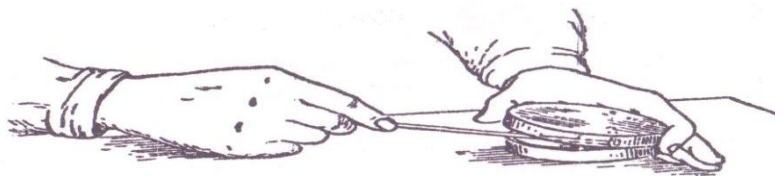


Рис. 5. Посів на пластинку МПА у чашці Петрі

Посів на косий агар у пробірках. Лівою рукою горизонтально тримають пробірку з середовищем. Правою рукою беруть петлю, обпалюють її на полум'ї спиртівки, охолоджують і вводять у посудини з досліджуваним матеріалом. Виймають пробку з пробірки, обпалюють отвір пробірки на спиртівці, вводять петлю в пробірку і зигзагоподібними рухами розсівають культуру по поверхні косого агару. Виймають петлю, знову обпалюють край пробірки (і пробку), закривають пробірку і ставлять у термостат.

Посів уколом у стовпчик МПА застосовують для вирощування анаеробів, для виявлення характерних ознак бактерій або з метою тривалого зберігання культур (рис. 6).

Отже, у дослідженнях із виділення чистих культур різних організмів (бактерій тощо) входять такі операції: 1) посів досліджуваного матеріалу; 2) виділення чистої культури; 3) ідентифікація цієї культури.

Одержання елективних культур (на прикладі сінної палички). Уперше термін сінна паличка (*Bacillus subtilis*) був введений К. Еренбергом у 1838 р. Ф. Кон у 1875 р. виділив її з настоєм сіна й докладно описав як дрібну спороносну паличку. Вона належить до аеробних (дуже поширених у природі) амоніфікуючих бактерій, які викликають розпад білкових речовин рештків рослинних і тваринних організмів.

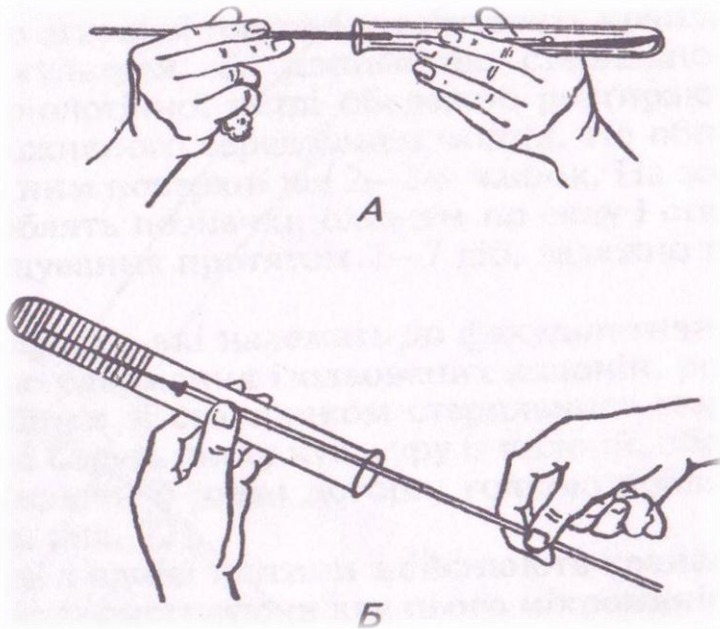


Рис. 6. Методи посіву мікроорганізмів:

А – на косий агар у пробірках; Б – уколом у стовпчик МПА.

Проведення роботи. Для одержання елективної культури сінної палички в конічну колбу (об'ємом 0,3-0,5 л) вміщують 10 г свіжого сіна, наливають 200 мл води, додають грудочку крейди (для нейтралізації) і кип'ятять протягом 20-30 хв. За цей час із сіна в розчин переходять поживні речовини й водночас гинуть майже всі неспороносні та переважна кількість спороносних бактерій. Спори сінної палички витримують кип'ятіння протягом 2 год. Одержаний сінний настій розливають у стерильні колби шаром 1-2 см, щоб краще відбувалась аерація, колби закривають ватою і розміщують у термостаті за температури 30 °С на 2-3 доби. Якщо сінний настій перед цим стерилізували, то для зараження бактеріями в колбу опускають кілька стебелець сухого сіна.

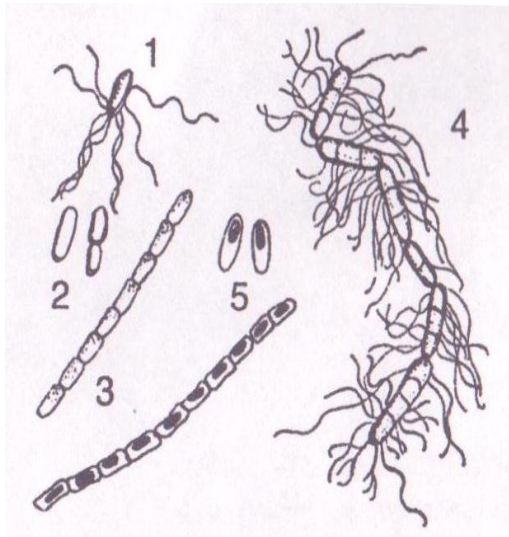


Рис. 7. Розвиток сінної палички:

1 – молода клітина; 2 – клітина без джгутиків; 3 – поділ клітин;
4 – утворення джгутиків у ланцюжку; 5 – утворення спор у клітинах

На поверхні настою, який витримували в термостаті 2-3 доби, утворюється добре помітна тоненька бактерійна плівка. З неї виготовляють препарати «роздавлена» або «висяча» крапля й вивчають їх під мікроскопом із сухим або імерсійним об'єктивом. У полі зору добре видно поодинокі та з'єднані в нитки (стрептобактерії) клітини сінної палички (рис. 7).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Чисті культури мікроорганізмів.
2. Елективні культури мікроорганізмів.
3. Методи одержання чистих культур.
4. Одержання елективних культур.

Лабораторна робота № 7

Тема: Виділення чистих культур. Морфологічні та культурні ознаки мікроорганізмів

Матеріали й обладнання: термостат; спиртівки; стерильні чашки Петрі та пробірки; скляні шпателі та бактеріологічні петлі; стерильні поживні середовища МПА і МПЖ; досліджувальні культури; олівці по склу.

Мета роботи: вивчити морфологічні ознаки мікроорганізмів.

Основні відомості. Чисті культури найчастіше виділяють з елективних: із однієї клітини або окремої колонії. У навчальних лабораторіях для цього послугуються методом Дригальського, Коха й Ліндера. Для відокремлення мікробів із досліджуваної суміші, за методом Дригальського, рекомендується робити послідовне розтирання досліджуваного матеріалу по поверхні агарової пластинки в кількох чашках Петрі.

Правила роботи з чистими культурами мікроорганізмів

Чисті культури – це популяція мікроорганізмів одного виду. Їх використовують для дослідження морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Під час роботи з чистою культурою важливо не допустити її забруднення іншими мікроорганізмами. Часто чисті культури мікроорганізмів вирощують на твердих середовищах у пробірках, які закриті ватними корками. Корки перешкоджають проникненню в них мікроорганізмів із повітря. Щоб не заразити чисті культури сторонніми мікроорганізмами, при виготовленні препаратів і пересівах необхідно додержуватися певних правил роботи з ними:

1. Запалити газовий пальник.
2. Пробірку з культурою взяти в ліву руку так, щоб було видно поверхню середовища з нальотом мікроорганізмів і наблизити до полум'я пальника.
3. У праву руку взяти бактеріологічну петлю і прожарити її у верхній частині полум'я пальника. Металеву частину держака повільно пронести через вогонь два-три рази.
4. Не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцями правої руки притиснути ватний корок до долоні, витягнути його з пробірки й тримати так, не доторкаючись оточуючих предметів.

5. Край відкритої пробірки пронести через полум'я пальника.

6. Увести в пробірку стерильну петлю, охолодити її, торкаючись внутрішніх стін пробірки або поверхні агару, а потім взяти петлею невелику кількість мікробної маси.

7. Шийку пробірки й ватний корок одночасно провести через верхню частину полум'я пальника й закрити пробірку корком.

8. Пробірку поставити в штатив, а відібрану петлею мікробну масу використати для виготовлення препарату або посіву.

9. Залишки мікроорганізмів на петлі спалити в полум'ї пальника.

Проведення роботи

Метод Коха. Розплавлене й простерилізоване поживне середовище (МПА, МПЖ, сухий поживний агар тощо) розливають у стерильні чашки Петрі та пробірки для одержання агарових пластинок, прямого й косого агару. Після застигання агару чашки вміщують у термостат догори дном для підсушування на 1 годину.

У кількох чашках Петрі з поживним середовищем обережно піднімають кришку і на центр агарової пластинки наносять краплину суспензії досліджуваної культури. За допомогою стерильного скляного шпателя або бактеріологічної петлі обережно розтирають краплину по всій поверхні поживного середовища чашки. Не обпалюючи шпатель, протирають ним поверхні ще 2-3-х чашок. На зовнішній стороні для чашок роблять позначки олівцем по склу і ставлять їх у термостат для вирощування протягом 2-7 діб, залежно від швидкості росту культури.

З елективної культури мікробів, які належать до факультативних аеробів та анаеробів, з метою одержання ізольованих колоній, роблять глибинний посів у пробірки зі стовпчиком стерильного агару. Для цього стерильною голкою беруть чистку культуру із колонії, обпалюють край пробірки й, тримаючи її дном догори, голкою роблять прокол до дна пробірки.

Виділення чистої культури з однієї клітини здійснюють крапельним **методом Ліндера**, використовуючи для цього мікроманіпулятор або мікроселектор Перфільєва. Найчастіше метод Ліндера застосовують при роботі з великими клітинами, наприклад дріжджами, цвільовими грибами і водоростями. З цією метою елективну культуру розводять доти, доки в краплі середовища не залишаться поодинокі клітини. Після цього на поверхню стерильних накривних скелець сталевим пером наносять крапельки суспензії одержаного розведення й виготовляють мікропрепарати «висяча крапля». Препарати розглядають під мікроскопом і відбирають ті, у яких виявлено тільки по одній клітині. Останні вміщують у вологу камеру й ставлять у термостат. Після 1-2 діб інкубації препарати знову розглядають під мікроскопом і ті з них, у яких спосте-

рігається утворення мікроколоній, обережно переносять із накривного скельця клаптиком стерильного фільтрувального паперу в пробірку зі стерильним поживним середовищем.

Визначення чистоти культури можна водночас проводити різними методами: візуально, мікроскопуванням і пересіванням на поживних середовищах.

При візуальній перевірці найчастіше виявляють характер росту культури на поверхні косого агару в пробірках. Якщо штрих на поверхні є однорідним, то культура вважається чистою. Візуально можна перевіряти чистоту культури й на агарових пластинках у чашках Петрі.

У разі мікроскопування вибирають колонію з однорідним характером росту, чітко ізольовану від інших. Із цієї колонії виготовляють фіксований препарат і вивчають його під мікроскопом за допомогою імерсійної системи. Якщо в полі зору всі клітини виявляються морфологічно однорідними, то культура є чистою.

Якщо при посівах на низку поживних середовищ спостерігається однаковий характер росту колоній, то можна вважати, що виділена культура є чистою.

Ідентифікація чистої культури. Після виділення культури й перевірки її чистоти визначають, до якого виду вона належить. При ідентифікації виду беруть до уваги морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки бактерій, а в актиноміцетів зважають і на хімічний склад клітинної оболонки.

До морфологічних ознак належать: форма, розміри, взаємне розміщення клітин, здатність до руху й характер розміщення джгутиків, здатність до утворення спор та розміщення їх у клітинах, наявність капсул і включень, фарбування за Грамом. В актиноміцетів до цих ознак належать також утворення гіф, які галузяться.

Серед культуральних ознак мікроорганізмів розрізняють: характер росту культури на рідких і твердих поживних середовищах (МПА, МПЖ, сусло-агар тощо). На рідких середовищах зазначають вигляд бактерійних плівок (тоненька, товста, складчаста, слизиста, суха), їхній колір, наявність помутніння, утворення осаду (щільний, пластівчастий).

При вивченні колоній на твердих поживних середовищах відмічають такі ознаки: форму, профіль, край, структуру (рис. 8), розміри. Форма колоній буває кругляста, овальна, неправильна, ризоїдна, амебоподібна, міцелярна. Розрізняють великі колонії – з діаметром понад 4-5 мм, середні – 2-4 мм, дуже дрібні – менше 1 мм. Великі колонії вимірюють звичайною лінійкою, дрібні й дуже дрібні – окуляр-мікрометром.

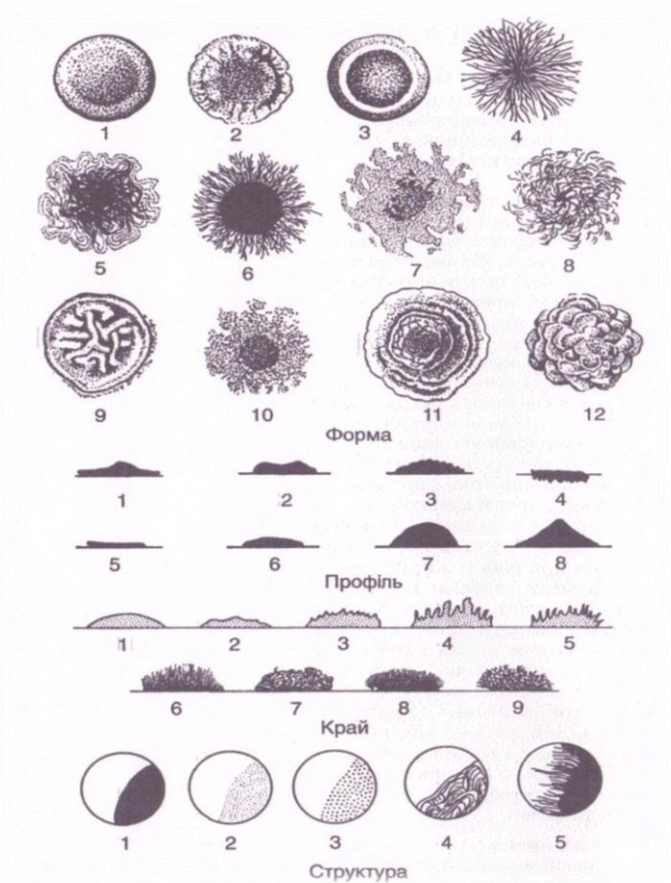


Рис. 8. Характеристика колоній мікроорганізмів

Форма: 1 – округла; 2 – округла з фестончастим краєм; 3 – округла з валиком; 4,5 – ризоїдна; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – ниткоподібна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна. *Профіль:* 1 – зігнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбкуватий; 4 – врослий у субстрат; 5 – плескатий; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний. *Край:* 1 – гладенький; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – галузистий. *Структура:* 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струминчаста; 5 – волокниста.

Поверхня колоній буває гладенькою, зморшкуватою, блискучою, матовою, шорсткою, з концентричними колами тощо. Найкраще її вивчати у відбитому світлі. Край колоній рівний, хвилястий, бахромчастий, зазублений. Колонії можуть мати м'яку, тверду, слизову, волокнисту консистенції. Структура колоній буває однорідною, дрібнозернистою, великозернистою, хвилястою. Край, консистенцію, структуру колоній добре вивчати за допомогою мікроскопа МБС-1. Колір колоній – білий, брудно-білий, жовтий, оранжевий, синій, зелений, червоний, чорний – залежить від наявності в тілі мікробів пігментів. Особливу увагу звертають на колір при вивченні актиноміцетів. До культуральних ознак належать також запах колоній (земляний, ефірний, фруктовий та інші).

Визначення мікроорганізмів за культуральними й морфологічними ознаками. Із колоній, які вирости на твердих поживних середовищах, виготовляють мікропрепарати і вивчають під мікроскопом. За формою клітин і характеристикою колоній встановлюють, до якого роду належать мікроорганізми. Розглянемо такі роди: *Actinomyces*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*.

Рід *Actinomyces*. Бактерії цього роду переважно є сапрофітами, утворюють щільні шкірясті колонії різної структури (гладенькі, складчасті, горбкуваті з мучним нальотом). Вони можуть бути різних відтінків, зростаються з субстратом, часто складаються із несептованих ниток.

Рід *Bacillus*. Спороносні паличкоподібні бактерії. Сінна паличка (*B. subtilis*) утворює на МПА + сусло-агарі сухі дрібнозморшкуваті, безбарвні з хвилястим краєм колонії. Під мікроскопом бактерії мають вигляд коротких рухомих паличок із перетрихальним розміщенням джгутиків. Картопляна паличка (*B. mesentericus*), як і сінна, утворює на МПА сухі зморшкуваті сірі колонії, а на МПА + сусло-агарі – шкірясто-складчасті.

Клітини картопляної палички прямі, рухливі, з центричним розміщенням спор. Грибоподібна паличка (*Bacillus mycoides*) утворює дуже характерні колонії, які мають плескату ризоїдну або міцелопоподібну форму (рис. 9).

Вони стеляться по поверхні агару. Клітини цих бактерій рухомі, перетрихи, фарбуються грампозитивно.

Рід *Flavobacterium*. Представники цього роду утворюють на МПА дрібні колонії (діаметром 2-3 мм), які переважно бувають гладенькими, прозорими або матовими, жовтого кольору. Клітини мають злегка зігнуту паличкоподібну форму, більшість нерухомі, грам негативні, не утворюють ендоспор.

Рід мікрококи *Micrococcus*. Утворюють на МПА дрібні та середнього розміру колонії, які можуть бути блискучими, матовими, гладенькими,

опуклими або плескатими, зернистими, дрібно складчастими, пастоподібної або слизової консистенції. За кольором вони бувають білими, сірими, рожевими або червоними; трапляються і безбарвні. Клітини нерухомі, неспороносні, грампозитивні.

Pið Pseudomanas. Бактерії цього роду на МПА утворюють колонії круглястої і неправильної форми, плескаті та опуклі, слизової пасто- побідної консистенції, безбарвні та забарвлені в синій, синьо-зелений, жовто-зелений, флуоресцуючий, червоний, бруднувато-білий і чорний колір. Клітини мають пряму або зігнуту форму, рухливі, грам негативні, переважно аероби.

Pið Sarcina. Утворюють середні за розмірами колонії круглястої форми, які можуть бути опуклими, плескатими, гладенькими або складчастими, зернистої структури, матові або жирно-блискучі. За кольором бувають жовтими, білими, а подекуди рожевими й червоними. Клітини, як правило, мають кулясту форму і з'єднані в пакетики по 8-16 клітин. Сарцини належать до облігатних аеробів. Це нерухливі, грампозитивні бактерії.

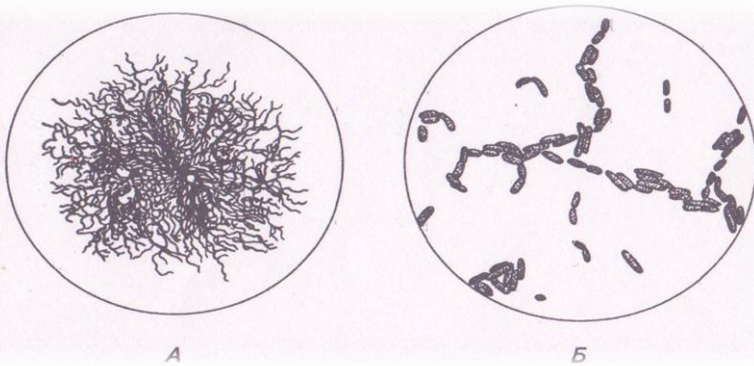


Рис. 9. Грибоподібна бацила *Bacillus mycoides*: А – колонія на МПА; Б – клітини молоді культури під мікроскопом.

Вивчення фізіолого-біохімічних ознак мікроорганізмів. Включає дослідження ферментної активності мікробів, відношення їх до різних джерел вуглецю й азоту, характер продуктів життєдіяльності, які нагромаджуються в поживних середовищах (гази, кислоти, спирти тощо), а також реагування бактерій на кисень, кислоти, луги та інші фактори довкілля. Ферментну активність виділеної культури визначають за розрідженням желатину при уколї в стовпчик желатину, а також за коагуляцією і пептонізацією молока. Визначають активність амілази,

целюлози, сахарози, уреазі, нітратредуктази тощо. У актиноміцетів визначають утворення ними антибіотиків. Щоб встановити, які джерела використовуються досліджуваною культурою, виготовляють спеціальне синтетичне поживне середовище і до нього додають 1 % вуглецевої сполуки (яку хочуть випробувати). Найчастіше з цією метою застосовують пентози, гексози, дисахариди, полісахариди, солі органічних сполук, спирти, жири тощо.

Для вивчення використання мікроорганізмами джерел азоту в основному мінеральному середовищі замінюють фосфат амонію на фосфат калію, додають 1 % глюкози, а як джерело азоту використовують альбумін, пептон, амінокислоти, сечовину, аміачні й нітратні солі. Щоб виявити здатність мікроорганізмів засвоювати молекулярний азот, із поживного середовища виключають усі зв'язані форми азоту.

Відношення до **кисню** виявляють за допомогою посіву культури методом уколу в пробірки з МПА, МПЖ та ін. Аероби, як правило, розвиваються у верхній частині середовища. Факультативні анаероби – майже по всьому сліду уколу, облігатні анаероби – тільки в нижній частині.

Щоб виявити витривалість мікроорганізмів до кислот та лугів, до поживного середовища додають різні буферні суміші (для підтримання певного рН середовища).

При використанні мікробами сполук вуглецю (вуглеводів) у субстраті як продукти життєдіяльності можуть нагромаджуватись органічні кислоти, спирти, гази тощо, які можна виявити за допомогою різних методів (використанням індикаторів, якісних хімічних реакцій тощо).

Стійкість бактерій до температури найчастіше виявляють при вирощуванні їх у полі термостатах із різною температурою. Стійкість до концентрації солей у середовищі – культивуванням на основних поживних середовищах із добавкою різних концентрацій солей NaCl , Na_2SO_4 .

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Яка культура вважається чистою?
2. Методи визначення чистої культури.
3. Характер росту мікроорганізмів на МПБ.
4. Характер росту мікроорганізмів на щільному живильному середовищі.
5. Техніка визначення видів мікроорганізмів.
6. Які ознаки мікроорганізмів є фізіолого-біохімічними?

Лабораторна робота № 8

Тема: Дослідження мікрофлори ґрунту

Матеріали та обладнання: апарат для збовтування рідини; терези і важки; водяна баня; електроплитка; мікроскоп; предметні та накривні скельця; стерильні пробірки та піпетки; конічні колби; сухий поживний агар; досліджуваний ґрунт; стерильні чашки Петрі; апарат для підрахунку колоній; карболовий еритрозин.

Мета роботи: опанувати методику мікробіологічного дослідження ґрунту.

Основні відомості. У процесах ґрунтоутворення мікроорганізмам належить надзвичайно важлива роль. Адже під впливом біологічного чинника виникає основна властивість ґрунту, яка відрізняє його від материнської породи, – родючість.

Оскільки ґрунт є найкращим середовищем для життя переважної більшості мікроорганізмів, мікрофлора ґрунту дуже різноманітна. У її складі: азотфіксуючі, нітрифікуючі та денітрифікуючі бактерії, целюлозорозкладачі, різні пігментні мікроорганізми, сірко- і залізобактерії, мікоплазми, актиноміцети, гриби, водорості, найпростіші тощо. У ґрунті живуть аеробні, анаеробні, автотрофні, гетеротрофні, психрофільні, термофільні, галофільні та інші мікроорганізми.

З огляду на різноманітність мікрофлори ґрунту її досліджують різними методами. Серед них: бактеріоскопічний, розроблений С. М. Виноградським, метод пластинок обростання за М. Г. Холодним. Кількісний облік мікроорганізмів методом підрахунку на твердих поживних середовищах, кількісно-якісний облік мікрофлори ґрунту за Д. М. Новогрудським, метод капілярів Б. В. Перфільєва і Д. Р. Габе, облік кількості бактерій у ґрунті за допомогою люмінесцентної мікроскопії за Д. Г. Зв'ягінцевим, облік бактерій у ризосфері за М. О. Красильниковим, облік ризосферної і кореневої мікрофлори методом К. З. Теппер та інші.

Проведення роботи. Дослідження мікрофлори ґрунту будь-яким методом дає надійні результати тільки тоді, коли правильно відібрано ґрунтові зразки. При дослідженні оранки знімають верхній двосантиметровий шар і відбирають із глибини всього орного шару. Під час вивчення мікрофлори ґрунтового профіля роблять ґрунтовий розріз і відбирають проби з генетичних горизонтів (знизу доверху).

Рекомендується використовувати стерильний бур, лопату та ніж. Відібрані зразки вміщують у стерильні скляні колби або в стерильні поліетиленові мішочки з етикетками, де позначено місце відбору зразка, горизонту тощо. Аналіз зразків необхідно проводити в той же день. Допускається витримування зразків у холодному приміщенні не більше двох діб. При висушуванні зразків кількість мікробів різко знижується.

Для одержання **середньої** проби ґрунту необхідно змішати окремі зразки, кількість яких залежить від рельєфу та площі, звідки їх відібрано. Рекомендується з площі 100 м² відбирати проби в трьох місцях, понад 100 м² – у п'яти, а з 1 га й більшої площі – у 15 місцях. Підготовлену середню пробу використовують для проведення аналізів, залежно від мети досліджу використовують той чи інший метод дослідження.

1. Бактеріологічний метод С. М. Виноградського (у модифікації О. Г. Шульгіної). Виготовляють мікропрепарати з ґрунтової суспензії і фарбують еритрозином. Кількість бактерій у ґрунті визначають прямим підрахунком під мікроскопом.

Проведення роботи. Із середньої проби ґрунту відважують 5 г, розтирають у ступці та вносять у конічну колбу об'ємом 250-300 мл, додають 50 мл стерильної водогінної води і збовтують протягом 5 хв на спеціальному апараті. Після осідання великих частинок (протягом 3-5 сек) стерильною градуйованою мікропіпеткою відбирають 0,01 мл зависі суспензії та наносять її на знежирене предметне скло. До суспензії на склі додають краплю 0,01-відсоткового розчину агару (агар заздалегідь промивають і виготовляють на дистильованій воді). Суспензію перемішують з агаром і стерильним накривним скельцем розподіляють по предметному склу за допомогою трафарету на площі 4 см². Після цього препарат підсушують, фіксують 96-відсотковим спиртом і фарбують карболовим еритрозином (занурюють скло в розчин барвника й витримують протягом 30 хв, а за потреби до 24 год). Залишок фарби змивають, занурюючи препарат у воду (тильною стороною), підсушують і вивчають під мікроскопом за допомогою імерсійної системи.

Кількість мікроорганізмів вивчають за такою формулою:

$$x = q \cdot \frac{S_m \cdot 10^8 \cdot C}{S_{n.з} \cdot V}, \quad (1)$$

де q – середня кількість мікробів у полі зору; S_m – площа мазка, см²; $S_{n.з}$ – площа поля зору, мкм²; 10^8 – перерахунок на мкм²; C – розведення; V – об'єм досліджуваної суспензії.

Приклад. Щоб дістати точний результат, здійснюють підрахунок кількості мікробів у 100 полях зору мікроскопа. Далі визначають площу поля зору за формулою $S=\pi r^2$. Щоб одержати величину радіуса, вимірюють діаметр поля зору за допомогою об'єкт-мікромметра. Після цього визначають, скільки полів зору розміститься на площі препарату (4 см²). Для цього треба поділити площу препарату на площу поля зору. Одержану середню кількість мікроорганізмів у одному полі зору множать на кількість полів, які вміщує площа препарату. У результаті, дістають кількість мікробів у 0,01 мл суспензії. Знайдене число множать на 100, щоб одержати їх кількість у 1 мл суспензії. Для обчислення кількості бактерій у 1 г абсолютно сухого ґрунту, треба знайдене число помножити на ступінь розбавлення й поділити на масу абсолютносухого ґрунту, що міститься в 1 г сирого ґрунту.

2. Метод підрахунку на агарових пластинках. Цей метод за своєю точністю значно поступається перед методом С. М. Виноградського та дає тільки орієнтовні дані, переважно про кількість аеробних мікробів у ґрунті. Проте внаслідок простоти й доступності його дуже часто застосовують у навчальних мікробіологічних лабораторіях. Згідно з цим методом, ґрунтову суспензію висівають на тверді поживні середовища, вирощують на них колонії, підраховують та аналізують вирощені мікроорганізми.

Проведення роботи. Із зразка досліджуваного ґрунту відважують 1 г і роблять серію розведень у стерильній воді для одержання ґрунтової витяжки. Розведення готують так: у стерильну мірну колбу об'ємом 100 мл вносять 1 г ґрунту, додають 99 мл стерильної води й збовтують упродовж 3 хв. Потім відстоюють 1,5 хв і роблять наступне розведення (рис. 10).

Для виготовлення кожного наступного розведення буреть окрему стерильну піпетку. У стерильні чашки Петрі стерильною піпеткою вносять 1 мл ґрунтової суспензії (наприклад 1:100 000) і розподіляють рівномірно по дну. Розплавлене стерильне середовище (МПА, БПА, КАА, ґрунтовий агар) із пробірки виливають у чашку і, обережно похитуючи її, перемішують поживне середовище з ґрунтовою суспензією. З одного розведення готують 4-5 таких чашок.

Після застигання середовища для видалення крапель води з кришок чашки Петрі підсушують, позначають і ставлять у термостат при температурі 28-30 °С на 3-5 діб. Потім підраховують (без відкривання кришки чашки) кількість колоній, що вирости на агарових пластинках. Найкращі результати одержуються при утворенні на чашках 20-50 колоній бактерій і 20-30 колоній грибів. Для підрахунку кількості колоній зручно користуватися спеціальними приладами для підрахунку колоній.

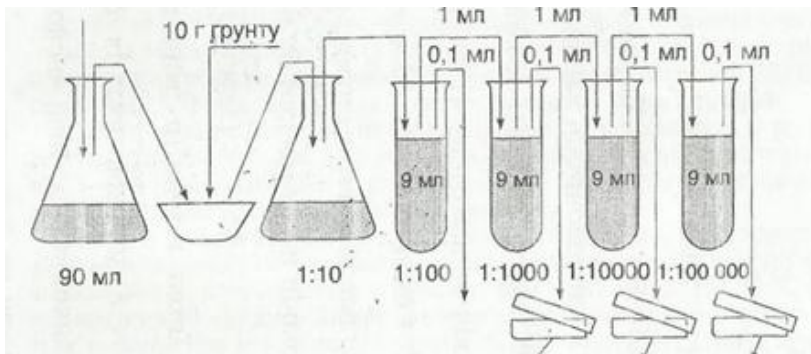


Рис. 10. Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової суспензії в чашки Петрі

Після закінчення підрахунків колоній визначають середнє з 4-5 чашок і множать на розведення, взяте для аналізу. У такий спосіб одержують кількість аеробних мікробів у 1 г сирого ґрунту. Для точних дослідів кількість мікроорганізмів визначається в 1 г повітряно-сухого, а найточніших – абсолютно сухого ґрунту. Для таких розрахунків треба водночас визначити вологість ґрунтової проби.

Кількість мікроорганізмів на 1 г повітряно-сухого ґрунту розраховують за формулою:

$$A = \frac{B \cdot B \cdot \Gamma}{D}, \quad (2)$$

де A – кількість клітин мікробів у 1 г повітряно-сухого ґрунту; B – середнє число колоній мікроорганізмів у чашці Пері; B – відповідне розведення ґрунтової витяжки; Γ – кількість крапель у 1 мл рідини в піпетці; D – наважка ґрунту, взята для аналізу.

3. Метод пластинок обростання (за М. Г. Холодним). На відміну від наведених вище, цей метод дає можливість вивчати цілі мікробні асоціації безпосередньо в ґрунті, тобто в природному середовищі.

Проведення роботи. На рівній поверхні ґрунту роблять гострим ножом розріз, глибина якого залежить від досліджуваного ґрунтового горизонту. До вертикальної стінки зрізу щільно прикладають стерильне знежирене предметне скло, на 2-3 см нижче від поверхні ґрунту. Зверху зріз закривають ґрунтом. Місце, де встановлено скло, позначають. Залежно від мети дослідів, скло витримують у ґрунті 10-15 днів, а іноді й кілька місяців. Після цього обережно ножом знімають замлю й виймають скло.

Поверхню скла, що була притулена до стінки ґрунтового розрізу, висушують на повітрі. Протилежну сторону скла витирають сухою ганчіркою. Препарат фіксують на полум'ї спиртівки. Потім предметне скло занурюють у банку з водою верхньою стороною донизу, внаслідок чого великі частинки ґрунту відмокають і падають на дно, а мікроби та дрібні частинки залишаються на склі. Після закінчення промивання препарат фарбують карболовим еритрозином (витримують від 30 хв до 24 год), висушують і вивчають під мікроскопом з імпресійною системою.

4. Груповий аналіз мікрофлори ґрунту. Диференційоване виділення з ґрунту різних фізіологічних груп мікроорганізмів та їхній аналіз можливі при використанні різних поживних середовищ.

Залежно від фізіологічної групи мікробів і методу досліджень, застосовують різні елективні та диференціально-діагностичні поживні середовища (МНА, МПА, + сусло-агар, КАА, середовища Виноградського, Ешбі, Гільтая, Імшенецького, Чапека та інші). За допомогою цього методу одержують значно більшу кількість мікроорганізмів, ніж користуючись методом пластинок обростання.

Можна рекомендувати виявити й вивчити такі фізіологічні групи: спороносні та неспороносні (пігментоутворювальні) форми бактерій на МПА; групу бацил (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. idosus*, *B. mycodies* та інші) на МПА + сусло-агар, мікробактерії на картопляному агарі, актиноміцети на КАА, гриби на сусло-агаровому середовищі тощо.

Проведення роботи. З ґрунтової проби відважують 10 г ґрунту, висипають у конічну колбу об'ємом 250 мл, доливають 90 мл стерильної води та збовтують на спеціальному апараті протягом 10 хв. Щоб осіли грубі частинки, суспензію відстоюють, а потім виготовляють із неї серію розведень і висівають на різні поживні середовища. Водночас відбирають із середньої проби 10 г ґрунту для визначення вологості, щоб перерахувати результати дослідів на абсолютно сухий ґрунт.

Посів на м'ясо-пептонний агар (МПА). 1 мл ґрунтової суспензії потрібного розведення вносять у стерильну чашку Петрі, сюди ж вливають 12 мл попередньо розплавленого й охолодженого до 45 °С МПА і старанно перемішують. Коли ставиться завдання систематизувати мікрофлору за типом колоній, то краще посів робити на поверхні агарових пластинок. Для виявлення бацилярних форм мікробів за Є. М. Мішустіним використовують змішане поживне середовище з МПА і суслоагару (у відношенні 1:1). Перед посівом на це середовище ґрунтову суспензію прогрівають при температурі 70 °С протягом 15 хв для звільнення її від вегетативних форм бактерій.

Засіяні чашки Петрі позначають і розміщують у термостаті при температурі 25-30 °C на 3-5 діб. Облік кількості колоній проводять на 3-4 день. Вивчають культуральні та морфологічні ознаки мікроорганізмів і роблять відповідні висновки.

Посів на картопляний агар. Суспензію ґрунтового зразка (розведення 10^{-3}) висівають на поверхню картопляного агару в чашках Петрі, розміщують у термостаті при температурі 25-30°C і витримують 10-15 днів. За цей час на агарових пластинках з'являються плодові тіла міксобактерій різної форми й кольору. Препарати старанно вивчають візуально і мікроскопічно.

Посівний сусло-агар. На цьому середовищі можна виділити низку ґрунтових грибів: *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* та інші.

Перед змішуванням розплавленого сусло-агару з ґрунтовою суспензією до нього додають 2 мл стерильної молочної кислоти або 0,5 г стерильної лимонної кислоти (на 1 л середовища). Посів ґрунтової суспензії проводиться так само, як і на м'ясо-пептонному агарі.

Мікроорганізми, які беруть участь у розкладі гумусових речовин, добре ростуть на водному агарі, а також на агаризованій ґрунтовій витяжці. Азотобактер і олігонітрофільні мікроорганізми можна виявляти на середовищі Ешбі.

Аеробні мікроорганізми, що розкладають клітковину, виявляють на рідкому поживному середовищі, склад якого розроблений О. О. Імшенецьким і Л. І. Солнцевою.

Нітрифікуючі бактерії можна вирощувати на рідкому поживному середовищі С. М. Виноградського, а денітрифікуючі бактерії – на середовищі Гільтая.

Кількісний і якісний аналіз груп мікроорганізмів. Після інкубації виймають із термостату чашки Петрі з посівами і спочатку обліковують кількість вирощених мікроорганізмів, а потім приступають до якісного аналізу. Насамперед, колонії групують за культуральними ознаками.

Із мікроорганізмів, що розвиваються на МПА і МПА + сусло-агар, виділяють такі групи: 1) бацили (слизисто-складчасті, шкірясто-складчасті, галузисті колонії тощо); 2) неспороносні бактерії (переважно плечасті колонії жовтого, оранжевого, білого та інших кольорів); 3) флуоресціюючі бактерії (колонії зеленуватого кольору); 4) актиноміцети (як безбарвні, так і пігментовані колонії), мікробактерії (дрібненькі, куполоподібні колонії, жовтого, рожевого та білого забарвлення).

Кількісний підрахунок бацил, що виростили на МПА + сусло-агарі, роблять через 2 доби після інкубації, а якісний аналіз – на 5 добу.

Сінна паличка має дрібно-зморщені, переважно безбарвні, сухі колонії з хвилястим краєм. Картопляна паличка утворює тонкі, зморщені, сухі, шкірясті колонії сірувато-білого, рідше кремового кольору. *B. megaterium* має гладенькі білого або кремового кольору опуклі колонії з концентричними колами. *B. cereus* утворює плекасті матові колонії з хвилястим краєм.

На крохмале-аміачному агарі (КАА) на 7-10 день ідентифікують колонії актиноміцетів і мікобактерій. Актиноміцети утворюють колонії різної пігментації. Повітряний міцелій актиноміцетів має сіре, біле, зеленувато-сіре, рожеве та інше забарвлення і характерний землистий запах. Мікобактерії утворюють дрібні куполоподібні колонії переважно жовтого кольору.

На картопляному агарі мікобактерії з роду *Polyangium* утворюють плодові тіла переважно червоно-коричневого кольору, а з роду *Mucosoccus* – безбарвні або світло-рожеві плодові тіла.

На сусло-агаровому середовищі підрахунок кількості грибів проводять після двох діб інкубації, а ідентифікація родів – на 7-8 день. *Mucor mucedo* утворює щільні колонії міцелію жовтувато-білого або сріблясто-сірого кольору, колонії *Rhizopus* – темно-сірі, *Aspergillus* – переважно чорного і жовтого кольору, а *Penicillium* – зеленого.

На середовищі Ешбі облік мікроорганізмів проводять на 5-6 день інкубації. Тут добре ідентифікуються азотобактер і олігонітрофільні дріжджі. Колонії азотобактера – плекасті, слизисті, безбарвні; олігонітрофільних дріжджів – *Lypomyces* – слизисті, молочно-білого кольору.

Облік бактерій у ризосфері за методом М. О. Красильникова

Стерильною лопатою підкопують ґрунт під рослинами і за допомогою стерильного пінцета витягують корені. Обережно струшують із них ґрунт у стерильну чашку Петрі, перемішують і відважують 1 г. Водночас із цього ж ґрунту беруть наважку для визначення вологості ґрунту. У колбу з наважкою ґрунту доливають 99 мл води, збовтують та роблять серію розведень.

Виготовлені розведення досліджуваного ґрунту вносять у чашки Петрі з поживним середовищем. При поверхневому посіві з розведень стерильною мікропіпеткою відбирають 0,05 мл і вносять на поверхню поживного середовища (МПА, КАА та ін.). За допомогою шпателя суспензію розтирають по поверхні агарової пластинки. При глибинному посіві 1 мл ґрунтової суспензії, внесеної в стерильну чашку Петрі, зверху заливають відповідним поживним середовищем. Чашки розміщують у термостаті при температурі 28-30 °С і витримують протягом 3-5 діб. Після цього здійснюють кількісний та якісний аналізи мікрофлори ризосфери.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Як визначити загальну кількість мікробів у 1 грамі ґрунту?
2. Порядок визначення колі-титру ґрунту.
3. Відбір проб ґрунту для бактеріологічного дослідження.
4. Живильні середовища для визначення мікробного числа та колі-титру ґрунту.
5. Облік бактерій у ризосфері за методом М. О. Красильникова.

Лабораторна робота № 9

Тема: Санітарно-мікробіологічні дослідження води

Матеріали й обладнання: стерильні чашки Петрі; мембранні фільтри № 3; фільтр Зейтца; колба Бунзена; вакуумний компресор; МПА; середовище Ендо; пінцети; склографи; штатив для пробірок; стерильні піпетки; пробірки з 9-ма мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину; газові пальники; набори для мікроскопування; мікроскопи.

Мета роботи:

1. Закласти дослід на визначення мікробного числа, колі-індексу та колі-титру різних зразків води.
2. Визначити ці показники. Дати санітарно-мікробіологічну оцінку якості води.

Санітарно-мікробіологічні дослідження води проводять з метою визначення придатності її до споживання (питна вода) або виявлення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (води природних і штучних відкритих водойм, господарська вода).

Питна вода є необхідною складовою багатьох харчових продуктів, тому її погана якість, особливо мікробне забруднення, – це потенційна загроза здоров'ю людини. У воді не допустимі будь-які патогенні мікроорганізми, а кількість інших повинна бути мінімальною. Тому для оцінки її санітарного стану визначають мікробне число, колі-індекс і колі-титр. Ці ж показники використовують у разі аналізу напоїв, твердих харчових продуктів, ґрунту.

Мікробне число – кількість мікроорганізмів у літрі води, або в кілограмі продукту чи в грамі ґрунту. Для води централізованого водопостачання цей показник повинен бути не більше 100. Визначають методом висівання на агаризовані середовища, рідше прямим підрахунком під мікроскопом.

Колі-індекс – кількість бактерій групи кишкової палички (коліформних бактерій) у літрі води. Колі-індекс питної води не має перевищувати 3. Визначають методом мембранних фільтрів.

Колі-титр – найменший об'єм води (мл) або щільної речовини (г), у якому виявляють одну бактерію групи кишкової палички. Визначають бродильним методом або методом мембранних фільтрів. Для централізованої питної води цей показник має бути не менше 300.

Бактерії групи кишкової палочки є індикаторами фекального забруднення і їхнє виявлення служить обґрунтуванням непридатності використання води або іншого харчового продукту. Для їхнього виявлення найчастіше використовують середовище Ендо, на якому ці бактерії утворюють характерні колонії з металевим полиском, навколо яких середовище набуває червоного забарвлення внаслідок взаємодії з кислотою, яку продукують бактерії.

Склад середовища Ендо: МПА – 100 мл; лактоза – 1 г; насичений спиртовий розчин основного фуксину – 2 мл; 10-відсотковий розчин Na_2SO_4 – 10 мл; pH – 7,4. Автоклавують при 0,5 атм 20 хв.

Закладання дослідів

1. Визначена мікробного числа. У три чашки Петрі з МПА внести 0,05, 0,1 і 0,2 мл питної води й розтерти шпателем Дригальського. Аналізуючи воду з різних водойм, особливо багатих органічними речовинами, необхідно перед висіванням її розвести у пропорції не менше ніж 1:1000. Для цього використовують ряд пробірок із 9-ма мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, їх нумерують (цю роботу виконує лаборант). 1 мл досліджуваної води внести стерильною піпеткою у пробірку № 1, ретельно перемішати, продуваючи повітря, відібрати 1 мл речовини й перенести у пробірку № 2. Після перемішування таку ж кількість речовини перенести у пробірку № 3 (розведення 1:1000). Із пробірки № 3 висіяти по 0,05, 0,1 і 0,2 мл у чашки Петрі (рис. 11). Розтерти шпателем Дригальського, чашки підписати й поставити в термостат із 30 °С.

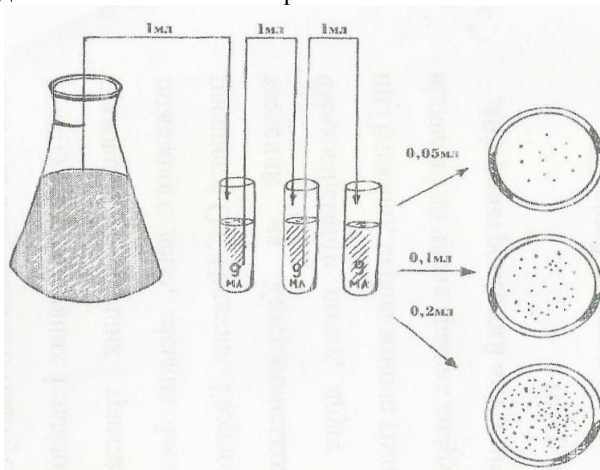


Рис. 11. Схема посіву для визначення мікробного числа води

2. Визначення колі-титру й колі-індексу. Простерилізувати мембранні фільтри № 3 шляхом кип'ятіння в дистильованій воді (тричі по 15 хв), а фільтри Зейтца – в автоклаві (при 1 атм 20 хв). Мембранний фільтр за допомогою стерильного пінцета перенести у фільтр Зейтца, закріплений у колбі Бунзена. Колбу приєднати до вакуумного компресора. Пропустити через фільтр 300-500 мл досліджуваної води й перенести його стерильно на чашку Петрі із середовищем Ендо. Цю роботу слід проводити в боксі. Чашки підписати й помістити в термостат із температурою 37 °С.

Аналіз досліду. Через два-чотири дні підрахувати кількість колоній мікроорганізмів, які вирости на чашках Петрі (т. зв. колоній утворювальні одиниці). Розрахувати мікробне число, колі-індекс і колі-титр різних зразків води. Зробити висновок про якість води. Із декількох довільно відібраних колоній виготовити мазки, фарбуючи їх за методом Грама.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Що таке мікробне число?
2. Колі-індекс, колі-титр, їх визначення.
3. Відбір проб води для бактеріологічного дослідження.
4. Визначення загальної кількості мікробів у воді.

Лабораторна робота № 10

Тема: Аналіз мікрофлори повітря

Матеріали й обладнання: апарат Кротова; чашки Петрі; МПА; склографи.

Мета роботи:

1. Провести облік мікрофлори повітря різних приміщень навчального корпусу факультету.
2. Скласти підсумкову таблицю про ступінь забруднення мікроорганізмами різних приміщень. Зробити висновки про чистоту приміщень і можливі причини їхнього забруднення мікроорганізмами.
3. Розглянути колонії мікроорганізмів повітря під бінокулярною лупою.

Повітря не є середовищем, сприятливим для існування й розвитку мікроорганізмів. Потрапляючи в повітря, вони швидко гинуть унаслідок висихання, дії сонячних променів і нестачі поживних речовин. Серед мікроорганізмів, які найчастіше виявляють у повітрі, переважають спороносні бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, цільові гриби, що найбільш стійкі для висихання, а також пігментовані бактерії родів *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, стійкі до дії ультрафіолетових променів. Мікроорганізми в повітря потрапляють головним чином із ґрунту.

У повітрі закритих приміщень виявляють бактерії, які виділяються зі слизових 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, мікробактерії туберкульозу та ін.).

У разі дослідження 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 обчислюють кількість бактерій, вловлених при аналізі повітря.

Метод вловлювання бактерій повітря рідинами належить до фільтраційних методів. Повний об'єм повітря продувають через певний об'єм рідини (стерильна вода, буфер, рідке поживне середовище). По 1 або 0,1 мл цієї рідини висівають у чашки Петрі на агаризоване поживне середовище. Чашки інкубують у термостаті. Через певний час підраховують кількість колоній, що виросли на чашках. У разі обчислення кількості мікроорганізмів у повітрі враховують об'єм рідини-поглинача та об'єм повітря, яке пройшло через рідину.

Аспіраційний метод із використанням апарата Кротова. Конструкція апарата Кротова заснована 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, що виросла на них. Результати аналізу виражають найчастіше мікробним числом – кількістю мікроорганізмів (т. зв. колонійутворювальних одиниць) у 1 м³ повітря.

Метод осадження Коха належить до седиментаційних. Цей метод дає можливість виявляти лише 35-60 % мікробів повітря і дає змогу орієнтовно оцінити чистоту повітря. Принцип методу полягає в тому, що мікроорганізми повітря досліджуваного приміщення разом із пилом осаджуються на поверхню поживного агару в чашці Петрі. Час осадження залежить від забрудненості повітря. «Засіяні повітрям» чашки інкубують у термостаті, а через два-три дні підраховують кількість колоній на них.

Розрахунки мікробного числа виконують за формулою Омелянського:

$$x = \frac{nx5 \times 10^4}{tx\pi r^2}, \quad (3)$$

де:

x – кількість мікроорганізмів (колонійутворювальних одиниць) у 1 м³ повітря;

n – кількість колоній мікроорганізмів, які виросли в чашці;

t – час осадження, хв;

πr^2 – площа чашки Петрі, см²;

5×10^4 – коефіцієнти для перерахунку кількості мікроорганізмів у 1 м³.

Для визначення загального мікробного забруднення проби повітря «висівають» на МПА. Для виявлення в повітрі дріжджів та цвілей застосовують сусло-агар. Патогенні мікроорганізми виявляють на

відповідних диференціально-діагностичних поживних середовищах, зокрема гемолітичні стрептококи та стафілококи – на кров'яному агарі.

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

Таблиця 1

Число мікроорганізмів у 1 м³ повітря

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

Закладання дослідів

Розплавлений МПА стерильно розлити в чашки Петрі. Після застигання середовища чашки відкрити в досліджуваному приміщенні на 10 хв. Чашки підписати й поставити термостат із температурою 30 °С.

Аналіз дослідів

Порахувати кількість колоній, що вирости на чашках. Щоб не помилитися при підрахунку, кожену колонію треба відмічати на дні чашки олівцем по склу.

Заміряти діаметр чашки за допомогою лінійки. Обчислити мікробне число за формулою Омелянського. Оцінити якісний склад мікроорганізмів повітря досліджуваних приміщень. Результати внести в таблицю:

Досліджуване приміщення	Кількість мікроорганізмів у 1 м ³

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря.
2. Які є методи дослідження повітря?
3. Як виконують розрахунки мікробного числа?

Лабораторна робота № 11

Тема: Дослідження нормальної мікрофлори тіла людини

Матеріали й обладнання: чашки Петрі; МПА; пінцети; ножиці; мікроскопи; газові пальники; мікробіологічні петлі; набори для мікроскопування; склаграфи.

Мета роботи:

1. Закласти в чашках із МПА дослід із виявлення мікрофлори різних частин тіла людини.

2. Виготовити й розглянути під мікроскопом препарати з окремих колоній бактерій. Охарактеризувати їхню морфологічну приналежність.

3. Виготовити та розглянути препарати мікрофлори ротової порожнини.

Мікроорганізми, які заселяють організм людини, формують його нормальну мікрофлору. Вона виникла як результат пристосування мікро- й макроорганізму в процесі еволюції.

Значні кількості мікроорганізмів виявлені на різних ділянках шкіри, особливо вкритих волоссям. Розвиток мікроорганізмів відбувається там за рахунок відмерлих клітин епідермісу, виділень сальних і потових залоз. Переважають на шкірі людини грампозитивні бактерії родів *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*.

На слизовій ротової порожнини також виникають сприятливі умови для розвитку мікроорганізмів: слина, у якій є ферменти, амінокислоти, білки, вуглеводи, неорганічні речовини, забезпечує розвиток близько 160 видів різних мікроорганізмів. Постійними «мешканцями» ротової порожнини є стрептококи *Streptococcus salivarius* (поверхня щік, язика) та *S. mutans*, який спричиняє карієс зубів (рис. 12).

У порожнині носа здорової людини кількість мікроорганізмів незначна: її слизова продукує речовини мікробіцидної дії – муцин та лізоцим. Постійно в носовій порожнині виявляють мікрококи, стафілококи, грамнегативні бактерії.

Найбільш різноманітною і чисельною є мікрофлора шлунково-кишкового тракту людини – більше 250 видів мікроорганізмів, серед яких переважають анаеробні форми (бактерії родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*), значно менше факультативно анаеробних бактерій (лактобацили, ентерококи, бактерії колі-групи). У різних частинах шлунково-кишкового тракту здорової людини може бути різна кількість

мікроорганізмів: найменша – у шлунку, дванадцятипалій і тонких кишках, найбільша – у товстому кишківнику (у дорослої людини їхня біомаса становить 1,5 кг).

Порушення видового складу нормальної мікрофлори людини за різних умов (захворювання, неправильне використання антибіотиків тощо) призводить до дисбактеріозу (дисобіозу) і, як результат, – ускладнень типу диспепсії, токсикоінфекції, катарів, пневмонії, кандидозів тощо.

Закладання дослідів

Стерильний МПА розлити в чашки Петрі. Після застигання середовища чашку з дна розділити склографом або маркером на чотири сектори. У перший сектор покласти декілька волосин із голови, у другий штрихом висіяти наліт із кутніх зубів, взятий простерилізованим заздалегідь сірником. У третьому секторі зробити відбиток будь-якого пальця немитої руки. Потім добре помити руки милом і щіткою, висушити на повітрі й цим же самим пальцем зробити відбиток у четвертому секторі.

Чашки підписати й поставити в термостат із температурою 37 °С.

Аналіз дослідів

Візуально оцінити кількість мікроорганізмів у різних секторах чашки, порівняти кількість колоній, що вирости в третьому-четвертому секторах (відбитки пальців немитої і митої руки). З колоній, які переважають у тому чи іншому секторі чашки, виготовити забарвлені фуксином фіксовані препарати і розглянути їх у імерсійній системі мікроскопа.

Стерильним сірником взяти наліт із зубів та язика й виготовити з цього матеріалу негативний препарат у 5-відсотковому водному розчині конгороту й розглянути його під об'єктивом 40х, або виготовити забарвлений фуксином фіксований препарат і розглянути його в імерсійній системі мікроскопа.

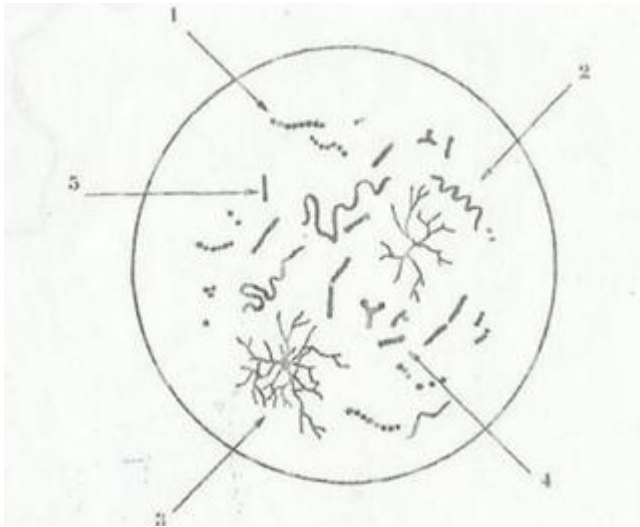


Рис. 12. Мікрофлора ротової порожнини: 1 – стрептококи;
2 – спірохети; 3 – стрептоміцети; 4 – корінеформні бактерії;
5 – палички

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Які види мікроорганізмів заселяють організм здорової людини?
2. Охарактеризувати мікрофлору, її чисельність, різноманіття шлунково-кишкового тракту людини.
3. До чого призводять порушення видового складу нормальної мікрофлори?
4. Які мікроорганізми заселяють ротову порожнину людини?

Лабораторна робота № 12

Тема: Аналіз якості кисломолочних продуктів

Матеріали й обладнання: мікроскопи; газові пальники; мікробіологічні петлі; набори для мікроскопування; штативи для пробірок; пробірки; піпетки; бюретка; мірна пробірка або циліндр на 10 мл; стакани для титрування; фарфорові чашки; розчин фенолфталейну; фенольний реактив; 0,1 н NaOH; кисломолочні продукти.

Мета роботи:

1. Визначити кількість молочної кислоти та кислотність різних кисломолочних продуктів.
2. Провести якісну реакцію на молочну кислоту.
3. Виготовити, розглянути й зарисувати препарати мікроорганізмів із різних кисломолочних продуктів.

Кисломолочні продукти людство використовувало ще задовго до відкриття мікроорганізмів, одержуючи їх зброджуванням молока. Молочнокисле бродіння залежно від нагромадження кінцевих продуктів (молочної кислоти та ін. органічних сполук) поділяють на гомоферментативне та гетероферментативне. Перший тип бродіння здійснюють у основному молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. bovis*, *S. thermophiles* та ін.) і лактобацили (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*), другий – лактобацили (*L. fermentum*, *L. brevis*), а також *Bifidobacterium bifidum*, *Leucostoc mesenteroides* та інші бактерії.

Ці бактерії вибагливі до поживного середовища, тому в ґрунтах та водоймах їх ніколи не виявляли. У природних умовах вони трапляються в молоці, на рослинах, у кишківнику та на слизових оболонках людини й тварин. Підкислюючи середовище за рахунок нагромадження молочної кислоти, швидко пригнічують розвиток інших мікроорганізмів. «Природними» нагромаджувальними культурами молочнокислих бактерій є різноманітні кисломолочні продукти (кефір, кисле молоко, ряжанка, ацидофільне молоко, йогурт, сметана, сир).

У промисловому виробництві кисломолочні продукти одержують за допомогою спеціальних заквасок. Це переважно чисті або змішані культури молочнокислих бактерій, деякі закваски містять лактозозасвоювальні дріжджі (*Kluyveromyces lactis*) та молочну цвіль (*Geotrichum candidum*). Закваски для йогуртів містять переважно лактобацили й біфідобактерії (рис. 13).

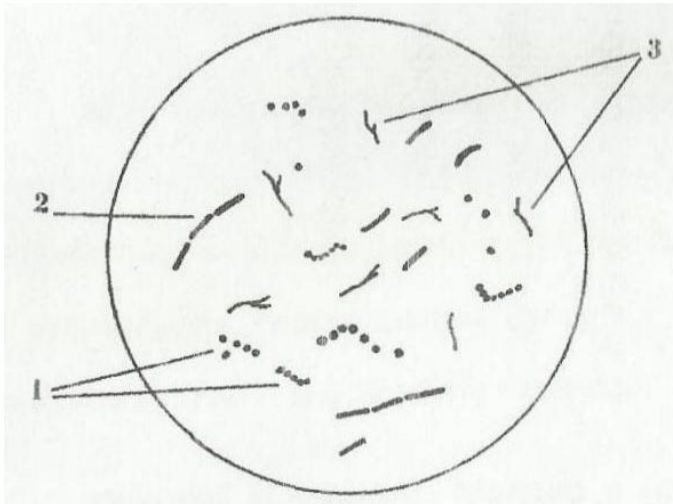


Рис. 13. Мікрофлора йогурту: 1 – стрептококи; 2 – лактобацили; 3 – біфідобактерії.

Показниками якості кисломолочних продуктів є наявність активної мікрофлори (молочнокислих бактерій) та молочної кислоти. Саме вони пригнічують у кишківнику гнильну мікрофлору й захищають організм людини від нагромадження токсичних речовин. Тому кисломолочні продукти вживають для нормальної роботи кишківника, особливо після тривалої хіміотерапії, при дисбактеріозах.

Хід виконання роботи

1. Визначення кількості молочної кислоти. У хімічну склянку налити 10 мл кисломолочного продукту й відтитрувати його 0,1 н NaOH за наявності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Визначити відсотковий вміст молочної кислоти та кислотність продукту в градусах Тернера. Обчислення виконувати, враховуючи, що 1 мл 0,1 н NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, а 1 мл 0,1 н NaOH, що йде на титрування 100 мл продукту, відповідає 1° Тернера. Оцініть якість кисломолочного продукту.

Кислотність солодкого молока 15-18 °Т. Кислотність промислових кисломолочних продуктів коливається в межах 65-130 °Т. Більший вміст молочної кислоти негативно впливає на смакові показники продукту.

2. Якісна реакція на молочну кислоту. У фарфорову чашку внести 5-10 крапель кисломолочного продукту або його сироватки й додати краплями фенольний реактив, який складається з суміші 5-відсоткових розчинів карболової кислоти і хлорного заліза (1:2), розведених подвійною кількості води. За наявності молочної кислоти простежується зміна забарвлення аметисто-синього в солом'яно-жовте за рахунок утвореного молочнокислого заліза.

3. Мікроскопування молочнокислих бактерій. Із кисломолочного продукту на предметному склі виготовити мазок, висушити й зафіксувати протягом 5-10 хв у суміші Нікіфорова (96-відсотковий етиловий спирт і ефір, 1:1) для усунення жиру. Це полегшує фарбування та мікроскопування бактерій. Фіксований препарат зафарбувати метиленовою синькою (5 хв) і мікроскопувати в імпресійній системі.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Які існують типи бродіння молочнокислих продуктів?
2. Які види мікроорганізмів здійснюють перший тип бродіння?
3. Види мікроорганізмів, що здійснюють другий тип бродіння.
4. Показники якості молочнокислих продуктів.
5. При якій температурі розвиваються гомоферментативні термофільні бактерії, а при якій призупиняють свій ріст?
6. Представник бета-бактерій, що зброджують його штами.

Лабораторна робота № 13

Тема: Бактеріологічний аналіз молока

Матеріали й обладнання: мікроскопи та все необхідне для мікроскопування; стерильні чашки Петрі та пробірки; циліндри; стерильні піпетки Мора (1 мл); редуктазник із нагрітою до 40 °С водою; розплавлений МПА і середовище Ендо; пробірки зі стерильним середовищем Буліра й поплавками; насичений розчин метилового синього; стерильне та свіже молоко.

Мета роботи: опанувати методику мікробіологічного аналізу молока.

Основні відомості: Молоко є найпоширенішим продуктом харчування людини. У ньому містяться білки, амінокислоти, вуглеводи, молочний жир, вітаміни А, С, D, групи В, Е, РР та збалансований склад мінеральних речовин тощо.

Молоко являє собою дуже сприятливе середовище для розмноження та зберігання різних видів мікроорганізмів. Кількість їх у 1 л молока може сягати кількох мільйонів. Засівання молока мікробами відбувається переважно під час доїння та зберігання. Найчастіше в молоці переважають мікрококи, молочнокислі бактерії та інші. У забрудненому молоці міститься значна кількість представників групи кишкової палички, а також маслянокислі та гнильні бактерії. За певних умов у молоко потрапляють патогенні мікроби, що може спричинитися до виникнення епідемій серед населення.

У навчальних лабораторіях найчастіше визначають загальну кількість мікроорганізмів у молоці (мікробне число), колі-титр і пробу редуктазу. Визначення в молоці патогенних мікробів здійснюється в спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

Проведення роботи. Об'єм проби молока має бути не меншим ніж 50 мл. Посуд, у який відбирають пробу повинен бути стерильним. Пробу молока необхідно досліджувати одразу після її взяття. У лабораторії її потрібно зберігати при температурі 4-6 °С.

Визначення загальної кількості мікробів у молоці безпосередньо підраховуючи мікроби під мікроскопом (метод Бріда). Для цього готують мазок молока, фіксують його, фарбують і вивчають під мікроскопом. При визначенні мікробного числа молока чашковим методом спочатку із відібраної проби виготовляють розведення за допомогою

простерилізованої водогінної води. При глибинному посіві із розведень молока, які знебарвлюються зазурином до 20 хв, стерильною піпеткою висівають по 1 мл суспензії в стерильній чашці Петрі. При знебарвленні молока резазурином більш ніж 20 хв роблять посів із розведень 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} у чашки й заливають розплавленим і охолодженим до 50 °С МПА. Суміш обережно перемішують і розмішують у термостаті при температурі 30 °С. Після триденної інкубації підраховують кількість колоній бактерій, які вирости на МПА, а на четвертий день – кількість дріжджових і цільових грибів. Потім визначають їх кількість із розрахунку на 1 мл молока.

Існує шкала оцінки якості молока за кількістю мікробів у 1 мл. До першого класу належить молоко, в 1 мл якого налічується до 500 000 мікробів, до другого – від 500 000 до 4 000 000, до третього – від 4 000 000 до 20 000 000 і до четвертого – понад 20 мільйонів. Якість першого класу вважається доброю, другого – задовільною, третього – сумнівною, четвертого – незадовільною.

Для оцінки засіяності молока мікробами часто використовують такий орієнтований метод, як проба на редуктазу. Мікроорганізми молока в процесі життєдіяльності виробляють ферменти типу редуктаз, які характеризують відновні процеси в молоці. Час, необхідний для відновлення фарби-індикатора, обернено пропорційний кількості мікробів у молоці. Основна різниця між визначенням кількості мікроорганізмів на чашках Петрі й редуктазною пробою полягає в тому, що в першому випадку визначають кількість колоній, а в другому – біохімічну активність мікрофлори молока.

Проба редуктазу проводиться за такою методикою. У стерильні пробірки з гумовими корками вливають по 20 мл сирого молока, підігрітого до 40 °С і по 1 мл 2,5-відсоткового розчину метиленового синього. Пробірки закорковують і тричі перемішують, обережно повертаючи. Після цього пробірки ставлять на водяну баню або в термостат при температурі 38-40 °С. Спостереження за забарвленням молока проводять через 20 хв, 2 год і 5,5 год. Дослідження закінчують після повного знебарвлення метиленового синього. Верхній шар молока в пробірках інколи залишається синім, але це не береться до уваги. Залежно від часу знебарвлення, проби відносять до одного із чотирьох класів молока (табл. 2).

Таблиця 2

Оцінка якості молока

Показник	Клас			
	I	II	III	IV
Час, затрачений на знебарвлення, год	$1/2$	$1/2$	$1/3$	$1/3$
Кількість мікробів у 1 мл молока	$\approx 0,5$	0,5-4	4-20	> 20
Якість молока	добра	задовільна	сумнівна	незадовільна

Для визначення колі-титру молока використовують здатність до газоутворення групи бактерій кишкової палички на рідкому середовищі Буліра.

У пробірку з середовищем Буліра вносять 1 мл суспензії відповідного розведення молока. Засіяні пробірки ставлять у термостат при температурі 42 °С на дві доби. Одержані результати визначення колі-титру також дозволяють віднести молоко до якогось із чотирьох класів. Якщо колі-титр становить 10^{-1} , то таке молоко має добру якість і належить до першого класу. До другого класу відносять молоко, колі-титр якого становить 10^{-2} . Дуже забруднене молоко має колі-титр 10^{-6} і належить до четвертого класу.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Що називають колі-титром молока?
2. Які показники характеризує колі-титр?
3. Яке поживне середовище використовують?
4. Про наявність чого в молоці свідчить утворення газу?

Лабораторна робота № 14

Тема: Симбіотичні азотофіксатори (ознайомлення з бульбочковими бактеріями)

Матеріали й обладнання: мікроскопи; предметні та накривні скельця; спиртівки; бритви; скальпелі; препарувальні голки; фіксовані у формаліні або свіжі корені з бульбочками різних бобових рослин; розчин фуксину.

Мета роботи:

1. Ознайомитись із бульбочковими бактеріями гороху овочевого.
2. Вивчити під мікроскопом препарат «роздавлена крапля» зі зрізу бульбочки.

Азот є одним із елементів, від якого залежить доля врожаю рослин. Він є невід'ємним складником білків, ДНК і РНК, АТФ, ферментів та інших важливих сполук усіх живих організмів. У середовищі, яке оточує рослину, азот перебуває у вигляді газоподібної молекулярної сполуки (N_2), що становить близько 80 % об'єму повітря, а також у вигляді різних мінеральних і органічних сполук, які містяться в ґрунті, морях та океанах. Зокрема, у ґрунті зв'язаний азот трапляється у вигляді солей амонію (NH_4^+), нітратного і нітритного азоту (NO_3^- , NO_2^-), білкового азоту (рештки рослинних і тваринних організмів) і азоту, що входить до складу ґрунтового гумусу.

Перетворення сполук азоту в ґрунті – складний процес. Він відбувається по-різному: гниття білків, або *амоніфікація*; окислення амонійних форм азоту, або *нітрифікація*; відновлення нітратів до молекулярного азоту – *денітрифікація*; *фіксація молекулярного азоту* атмосфери вільноживучими й симбіотичними мікроорганізмами.

Основні відомості. Бульбочкові бактерії, які живуть у симбіозі з бобовими рослинами, належать до роду *Rhizobium*. У молодих бульбочках вони мають форму рухливих паличок із перитрихальним розміщенням джгутиків. Із розвитком бульбочки бактерії втрачають джгутики, стають нерухомими, розростаються і перетворюються на розгалужені форми – так звані *бактероїди*. Дослідження показують, що саме в цій стадії відбувається найінтенсивніше зв'язування бактеріями молекулярного азоту.

Бульбочкові бактерії характеризуються вірулентністю, специфічністю й активністю. Вірулентність – здатність бактерій проникати в тканину кореня, розмножуватися там і спричиняти утворення бульбочок. Бульбочкові бактерії можуть заражати лише певну групу бобових рослин. Вибіркова здатність їх стосовно рослини дістала назву специфічності, а здатність у симбіозі з рослинами асимілювати молекулярний азот – активності.

Проведення роботи. З бульбочок коренів люпину, гороху або з квасолі бритвою роблять тоненькі поперечні та повздовжні зрізи. З них роблять препарати «роздавлена крапля» і вивчають під мікроскопом при сухій та імерсійній системах (рис. 14).

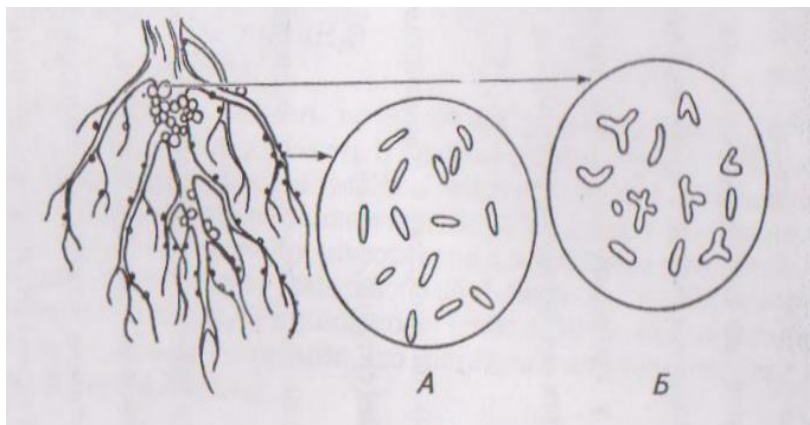


Рис. 14. Бульбочкові бактерії: А – палички; Б – бактероїди

Щоб виготовити фіксовані препарати, зріз бульбочки або маленьку бульбочку раздавлюють на предметному склі та з вичавленої маси роблять мазок. Висушений мазок фіксують на полум'ї спиртівки і фарбують фуксином, карболовим еритрозином або генціанвіолетом. Добрі результати одержуються при фарбуванні препаратів сумішшю рівних частин метиленового синього і фуксину, розчинених у 1-відсотковому розчині CH_3COOH .

Для цього витримують препарат суміші фарб протягом 3-5 хв. Тканина бульбочки фарбується в синій колір, а бактерії – у червоний. Препарати старанно вивчають і зарисовують у протоколах робіт.

Для виділення чистої культури бульбочкових бактерій беруть корінець із бульбочкою, старанно промивають у стерильній воді,

стерилізують поверхню бульбочки розчином спирту і знову промивають стерильною водою. Потім роздавлюють бульбочку в краплі стерильної води й одержану суспензію висівають у чашки Петрі на бобовий агар або середовище Фреда. Засіяні чашки витримують у термостаті при температурі 25-27 °С протягом 7 діб (залежно від форм, які вирощуються – повільних чи швидкоростучих).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про симбіоз.
2. До якого роду належать бульбочкові бактерії?
3. На якій стадії бактерії найінтенсивніше зв'язують атмосферний азот?
4. Якими особливостями характеризуються бульбочкові бактерії?
5. Утворення бактероїдів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології : [підручник] / К. М. Векірчик. – К. : Либідь, 2001. – 312 с.
2. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології : [навчальний посібник] / К. М. Векірчик. – К. : Либідь, 2001. – 144 с.
3. Гудзь С. П. Основи мікробіології / С. П. Гудзь [та ін.]. – К. : УМК ВО, 1991. – 236 с.
4. Гудзь С. П. Практикум з мікробіології : [навчальний посібник] / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська. – Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. – 80 с.
5. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М. : Медицина, 1972. – 480 с.
6. Пяткін К. Д. Мікробіологія з вірусологією та імунологією / К. Д. Пяткін, Ю. С. Кривошеїн. – К. : Вища школа, 1992. – 431 с.
7. Ситник І. О. Мікробіологія, вірусологія, імунологія / І. О. Ситник, С. І. Климнюк, М. С. Творко. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1988. – 392 с.
8. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Агропромиздат, 1987. – 239 с.
9. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель ; [пер. с нем.]. – Москва : Мир, 1987. – 567 с.

Додаткова література:

1. Беляев С. С. Метанобразующие бактерии: биология, систематика, применение в биотехнологии / С. С. Беляев // Успехи микробиологии. – 1988. – Т. 22. – С. 169.
2. Биохимия и физиология метилотрофов. – Пушкино, 1987.
3. Войткевич Г. В. Происхождение и химическая эволюция Земли / Г. В. Войткевич. – М. : Наука, 1983.
4. Воробьева Л. И. Техническая микробиология / Л. И. Воробьева. – М. : Изд-во МГУ, 1987.
5. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. – М. : Мир, 1982.
6. Грин Н. Биология : [в 3-х т.] / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – Москва : Мир, 1990.
7. Гринюс Л. Л. Транспорт макромолекул у бактерий / Л. Л. Гринюс. – М. : Наука, 1986.
8. Громов Б. В. Строение бактерий / Б. В. Громов. – Л., 1985.

9. Громов Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л., 1989.
10. Жизнь микробов в экстремальных условиях. – М. : Мир, 1981.
11. Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы / Е. Н. Кондратьева. – М. : Изд-во МГУ, 1983.
12. Кондратьева Е. Н. Фототрофные микроорганизмы / Е. Н. Кондратьева, И. В. Максимова, В. Д. Самуилов. – М. : Изд-во МГУ, 1989.
13. Нетрусов А. И. Энергетический метаболизм метилотрофных микроорганизмов / А. И. Нетрусов. – М., 1989.
14. Перспективы биохимических исследований. – М. : Мир, 1987.
15. Промышленная микробиология / [под ред. Н. С. Егорова]. – М. : Высшая школа, 1989.
16. Розанова Е. П. Сульфатвосстанавливающие бактерии (систематика и метаболизм) / Е. П. Розанова, Т. Н. Назина // Успехи микробиологии. – 1989. – Т. 23. – С 191.
17. Стейниер Р. Мир микробов / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – Т. 1-3. – М. : Мир, 1979.
18. Фототрофные микроорганизмы. – Пушино, 1988.
19. Хемосинтез: к 100-летию открытия С. Н. Виноградским. – М. : Наука, 1989.
20. Плазмиды и эволюция микроорганизмов / И. А. Хмель // Успехи совр. биол. – 1985. – Т. 99. – С. 323.

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК

С. Г. Лебідь
Г. Т. Федорович

ОСНОВИ ЗАГАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

Методичні рекомендації для студентів
напряму підготовки 6.040106
«Екологія, охорона навколишнього середовища
та збалансоване природокористування»

Випуск № 203

Редактор *К. Сільман*.
Технічний редактор, комп'ютерна верстка *М. Шевчук*.
Друк *О. Полівцова*. Фальцювальньо-палітурні роботи *Ю. Шаповалова*.

Підписано до друку 29.08.2013
Формат 60x84¹/₁₆. Папір офсет.
Гарнітура «Times New Roman». Друк ризограф.
Ум. друк. арк. 4,41. Обл.-вид. арк. 3,09.
Тираж 100 пр. Зам. № 4167.

Видавець і виготовлювач: ЧДУ ім. Петра Могили.
54003, м. Миколаїв, вул. 68 Десанників, 10.
Тел. : 8 (0512) 50-03-32, 8 (0512) 76-55-81, e-mail: rector@chdu.edu.ua.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3460 від 10.04.2009 р.