МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

Інженерно-хімічний факультет

Кафедра екології та технології рослинних полімерів

О с н о в и м і к р о б і о л о г і ї

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Київ

НТУУ «КПІ»

2012

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

Інженерно-хімічний факультет

Кафедра екології та технології рослинних полімерів

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

з курсу “ О с н о в и м і к р о б і о л о г і ї ”

для напряму підготовки: 6.040106

“ Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування ”

Рекомендовано Вченою радою

інженерно-хімічного факультету НТУУ «КПІ»

Протокол № *8* від *24 вересня 2012 р.*

2012

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу “Основи мікробіології” для напряму підготовки: 6.040106 “*Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування*” / Укл. С.С. Ставська, В.В. Вембер, 2012. – 44 с.

Укладачі: С.С. Ставська, В. В. Вембер

Рецензент: Т.С. Тодосійчук, к.т.н., доц.

Відповідальний редактор: М.Д. Гомеля, д.т.н., проф.

ЗМІСТ

Вступ

Лабораторна робота № 1

Лабораторна робота № 2

Лабораторна робота № 3

Лабораторна робота № 4

Лабораторна робота № 5

Лабораторна робота № 6

Лабораторна робота № 7

Список рекомендованої літератури

В С Т У П

Мікробіологія в наш час належить до ключових біологічних дисциплін, оскільки без знання особливостей мікроорганізмів та стратегій їхнього виживання неможливо зрозуміти усього різноманіття проявів життя на Землі, умов його розвитку та еволюції, структури біосфери та її функцій, кругообігів речовини та енергії. Велике значення мікробіологія відіграла для становлення та розвитку таких наук як біохімія, молекулярна біологія, генетика, біофізика та біотехнологія.

Особливого ж значення мікробіологія та мікробіологічні методи дослідження набувають при вирішенні саме екологічних проблем. На сьогоднішній день активно розробляються та впроваджуються способи раціонального використання біохімічної активності мікроорганізмів для підвищення родючості ґрунтів, використання корисних копалин, відновлення енергетичних ресурсів. Можливості ж мікроорганізмів щодо очистки оточуючого середовища від різноманітних забруднюючих речовин та ксенобіотиків широко використовуються та мають високий потенціал для екологізації існуючих процесів та технологій.

Таким чином, коло проблем, що потребує поглибленого вивчення властивостей мікроорганізмів та мікробіологічних методів є досить широким, саме тому знання основ мікробіології є обов'язковою умовою підготовки фахівців-екологів.

Мікроорганізми є обов'язковим компонентом кожної екологічної системи. На відміну від методів вивчення рослин і тварин, мікробіологічні методи мають свою специфіку, пов'язану з малими розмірами об'єкта дослідження. Без збільшувальних пристроїв побачити мікроорганізми просто неможливо, тому мікроскоп є необхідним приладом для кожної мікробіологічної лабораторії, а засвоєння мікроскопічних методів та технік є необхідним та першочерговим етапом мікробіологічної освіти. Іншою особливістю роботи мікробіолога є те, що він працює з мікробними популяціями, а не з окремими клітинами (особинами). В лабораторних умовах популяції мікроорганізмів одержують завдяки специфічним методам культивування на спеціальних рідких або твердих середовищах.

Студенти-екологи під час лабораторних занять повинні оволодіти основними мікробіологічними методами досліджень, ознайомитися з фізіологічними групами бактерій, навчитися виявляти санітарно-показові організми у воді, освоїти ряд методів для дослідження аеробних та анаеробних процесів, а також процесів мікробної деструкції та трансформації забруднюючих речовин у довкіллі.

МЕТА І ЗАВДАННЯ ДИСЦИПЛІНИ

Метою дисципліни є опанування студентами основ мікробіології, які необхідні для розуміння ролі мікроорганізмі та практичного їх використання в процесах біологічного очищення стічних вод та переробки осадів, деструкції та трансформації природних і штучних речовин, що протікають в екосистемах.

Внаслідок вивчення учбової дисципліни студенти повинні **з н а т и** :

- положення і роль мікроорганізмів в природі;
- особливості будови прокаріотичних клітин;
- головні механізми обміну речовин і одержання енергії мікроорганізмами;
- шляхи одержання енергії мікроорганізмами через процеси бродіння і анаеробного дихання;
- основні фізіологічні групи бактерій і процеси, що вони здійснюють;
- шляхи перетворення мікроорганізмами стійких до біорозкладу органічних сполук і мікробну деградацію ксенобіотиків;
- вплив умов зовнішнього середовища на мікроорганізми;
- закономірності мікробного росту, періодичне і безперервне культивування;
- ґрунтові та водні мікроорганізми, санітарну мікробіологію води;
- мікробні біотехнології;
- екологію мікроорганізмів, мікробоценози та взаємини між мікроорганізмами.

Студенти повинні **у м і т и :**

- простерилізувати мікробіологічне обладнання;
- застосувати методи мікроскопіювання для дослідження бактерій;
- визначити морфологію бактерій і їх забарвлення за Грамом;
- визначити чисельність мікроорганізмів у певному середовищі;
- виділити чисту культуру;
- створити селективні умови для різних фізіологічних груп мікроорганізмів та виділити їх;
- провести санітарний аналіз води та ґрунту.

Лабораторна робота №1.

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Стерилізація.

Мета роботи. Ознайомитися з організацією та обладнанням мікробіологічної лабораторії, вимогами до стерилізації та дезинфекції. Навчитися готувати посуд, обладнання, поживні середовища до стерилізації та обирати необхідний метод стерилізації. Оволодіти технікою стерилізації.

Матеріали та обладнання: 1) термостат; 2) сушильна шафа; 3) чашки Петрі; 4) мікробіологічні пробірки; 5) вата; 6) марля; 7) електроплитка; 8) скляні піпетки; 9) ножиці; 10) пінцети; 11) цупкий папір.

До складу мікробіологічної лабораторії входить лабораторна кімната для безпосередньої роботи з мікроорганізмами та підсобні кімнати (препараторська, миєчна, автоклавна тощо). Робоче місце мікробіолога повинно бути добре освітленим та зручним. Працювати у лабораторії дозволяються лише у спецодязі (халаті) з прибраним волоссям (косинка, капелюшок). Правила роботи і поведінка регламентуються спеціальними інструкціями з техніки безпеки.

Стіни, підлогу, поверхню лабораторних столів необхідно систематично мити та стерилізувати. На практиці для дезинфекції використовують препарати, що містять хлор, четвертинні амонійні сполуки, спирти, фенольні сполуки, тощо.

В лабораторії для роботи з мікроорганізмами необхідно мати наступне обладнання:

- *набір фарб і реактивів для фарбування препаратів;*
- *пристрої для фарбування препаратів;*
- *скельця предметові та покривні;*
- *скельця з лунками; олівці по склу;*
- *штативи для пробірок;*
- *петлі бактеріологічні* (рис.2) *;*
- *шпателі скляні та металеві;*
- *пінцети, ножиці, скальпелі, шприци;*
- *ємності з дезинфікуючими розчинами;*
- *газові пальники;*
- *мікроскопи з освітлювачами;*
- *терези;*
- *набір стерильного посуду (чашки Петрі, пробірки, колби, мірні пляшки, піпетки градуйовані, скляні матраци тощо).*

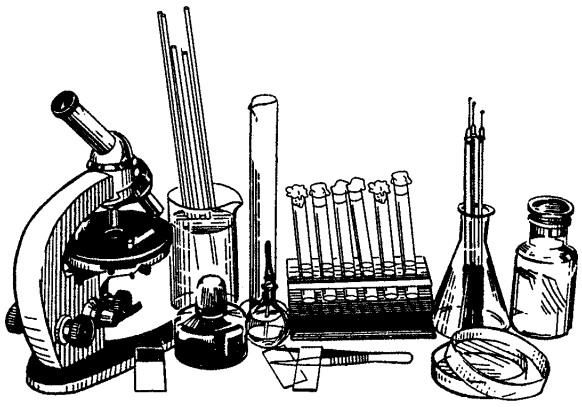
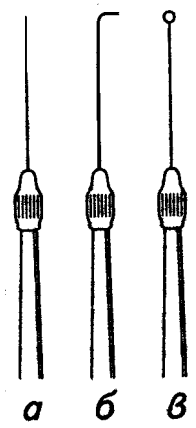


Рис. 1. Інвентар необхідний для проведення лабораторних робіт

Мікробіологічна лабораторія обладнана шафами для зберігання стерильного посуду і середовищ, термостатами, холодильниками, центрифугами, пристроями для культивування мікроорганізмів при постійному струшуванні (“качалки”), фотоелектроколориметром, обладнанням для проведення необхідних біохімічних досліджень.



В стерилізаційній кімнаті розміщують автоклави та сушильні шафи.

Процес стерилізації є одним з найнеобхідніших заходів у мікробіологічній практиці. Стерилізацією називають повне знищення живих мікроорганізмів. Процедурі стерилізації підлягають мікробіологічні середовища, посуд, інструменти, деякі пристрої. Це робиться з метою недопущення розвитку сторонніх мікроорганізмів при роботі з досліджуваними культурами.

Рис. 2. Бактеріологічні голка (*а*), гачок (*б*) та петля (*в*).

Методи стерилізації поділяють на термічні (гарячі) і холодні.

1. **<u>До термічних методів відносять:</u>**

1) ***Прожарювання у полум’ї пальника***. Так стерилізують металеву частину мікробіологічної петлі, дрібні металеві інструменти.

2) ***Стерилізація гарячим повітрям (сухим жаром)***. Вона проводиться у спеціальних шафах за таких режимів:

Температура	**Час стерилізації, год.**
170^0C	*1,0*
160^0C	*2,0*
150^0C	*2,5*
140^0C	*3,0*

Перед стерилізацією пробірки і колби закривають корками. Ватно-марлеві корки не тільки захищають посуд та його вміст від потрапляння сторонніх мікроорганізмів, але на відміну від інших (гумових, алюмінієвих, пластмасових), забезпечують повітрообмін із зовнішнім середовищем. При стерилізації скляних піпеток їх верхні кінчики також закривають шматочками вати. При роботі з ними доцільно користуватися гумовими грушами, але зручніше використовувати спеціальні автоматичні піпетки з одноразовими змінними наконечниками.

Пробірки з корками завертають у папір по 10–15 шт., а чашки Петрі – по 2–3 шт. Кожну піпетку щільно обгортають паперовими смужками, а корки на колбах накривають паперовими ковпачками. У такому вигляді посуд вміщують до сушильної шафи і стерилізують.

3) ***Стерилізація насиченою парою під тиском (вологий жар)*** проводиться у автоклаві (рис. 1), який являє собою металевий котел, що герметично закривається і здатен витримувати високий тиск. Для спостереження за тиском автоклав обладнаний манометром. З підвищенням температури тиск пари зростає наступним чином:

Величина тиску в атмосферах	**Показання манометра**	**Температура, ^{0}C**
1,00	*0*	*100*
1,25	*0,25*	*107*
1,50	*0,50*	*112*
2,00	*1,00*	*121*
3,00	*2,00*	*134*

В автоклавах стерилізують середовища, а також посуд і інструменти, які можуть бути зруйновані при дії більш високих температур.

Більшість поживних середовищ для культивування мікроорганізмів стерилізують протягом 15 хв. при 1 атмосфері на манометрі автоклава, що відповідає 121^{0}C.

Рис. 3. Сучасний електричний автоклав марки HS-61.

4) ***Роздрібна стерилізація (тиндалізація)*** полягає в тому, що субстрат прогрівається до температури 70–100^{0}C декілька разів із 24-годинними проміжками. Така температура викликає загибель лише вегетативних клітин, спори ж залишаються життєздатними. Підтримання температури субстрату на оптимальному рівні впродовж доби призводить до проростання спор, і вони гинуть під час наступного прогрівання. Роздрібна стерилізація проводиться методом текучої пари при відкритій кришці автоклава. Цим методом можна простерилізувати поживні середовища, компоненти яких розкладаються при температурі вищій за 100^{0}C, розчини вітамінів, амінокислот, тощо.

5) ***Пастеризація, або неповне знезараження.*** Цей метод застосовують у випадках, коли потрібно простерилізувати молоко, пиво, соки та інші харчові продукти, які після кип'ятіння втрачають свої споживчі якості. Метод ґрунтується на тому, що практично всі вегетативні клітини гинуть при температурі 75^0С протягом 30 хв., а при температурі 80^0С протягом 15 хв. Таким чином, процес псування продукту затримується.

2. **Холодні методи стерилізації.**

1) ***Фільтрування.*** Фільтри затримують мікроорганізми завдяки пористій структурі свого матриксу. Для пропускання розчинів через фільтри необхідний вакуум або тиск. Головні типи фільтрів – глибинні та мембранні. Глибинні фільтри складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів (азбест, каолін). Мікроорганізми затримуються фільтрами внаслідок адсорбції та механічного утримування всередині матриксу фільтра. Дія мембранних фільтрів залежить, головним чином, від розміру пор (фільтри з ацетилцелюлози).

Фільтрування проводять за допомогою спеціального роз'ємного пристрою, який закріплюється у товстостінній скляній колбі Бунзена з відростком (рис. 4). Фільтруюча пластинка розміщується між верхньою та нижньою частинами роз'ємного фільтрувального пристрою. Скляний відросток колби Бунзена приєднується до насосу (вакуумного або водоструменевого), який створює у колбі необхідне розрідження. Перед роботою весь прилад стерилізується.

Рис. 4. Пристрій для фільтрування.

Фільтруванням стерилізують термолабільні субстрати – розчини вітамінів, антибіотиків, деякі розчини для ін'єкцій та ін.

2) ***Стерилізація газами, опромінюванням.*** Газами стерилізують обладнання та матеріали тоді, коли іншими способами їх простерилізувати неможливо. Найчастіше для цього використовують окис етилену, а також формальдегід. Зважаючи на те, що окис етилену токсичний та вибухонебезпечний, процес стерилізації проводиться висококваліфікованим персоналом у спеціальних камерах та пристосованих для цього приміщеннях.

Як стерилізуючі агенти використовують також неіонізуюче (інфрачервоне, ультрафіолетове), іонізуюче випромінювання (β-частки, рентгенівське випромінювання, γ-промені) та ультразвук.

Опроміненням стерилізують вироби медичного призначення, антибіотики, гормони, вітаміни, перев'язочний матеріал, одноразове пластмасове обладнання. Стерилізацію опроміненням проводять у виробничих умовах.

Практичне завдання.

1. Підготувати посуд до стерилізації, простерилізувати його в сушильній шафі.
2. Простерилізувати різними методами рідке поживне середовище та оцінити якість стерилізації.

Хід роботи.

1. Виготовити ватно-марлеві корки для пробірок та колб (див. рис. 5). В піпетки вставити ватні фільтри і загорнути їх в паперову обгортку. Надіти паперові ковпачки на колби із ватно-марлевими корками. Десять пробірок із корками та чашки Петрі загорнути у паперові пакети. Посуд покласти до сушильної шафи та стерилізувати 2 години при температурі 160^0С.

Рис. 5. Етапи виготовлення ватних корків.

2. Свіжовиготовлений м'ясний бульйон розлити у 12 стерильних пробірок. Чотири пробірки кип'ятити 30 хв. Інші чотири – простерилізувати в автоклаві 15 хв. при 1 атмосфері. Останні чотири пробірки залишити без обробки. Після цього всі пробірки помістити у термостат при температурі 28–30^0С і спостерігати за ними протягом 4–5 діб, відмічаючи зміни, які відбуваються в пробірках. Результати досліджень свідчать, що тільки після автоклавування поживне середовище надовго залишається стерильним. При інших методах обробки у пробірках спостерігається утворення плівок та каламуті внаслідок розмноження бактерій.

Оформлення результатів роботи.

1. Стерильний посуд підготувати до наступних занять.

2. Оцінку якості стерилізації поживного середовища в залежності від методів обробки оформити у вигляді наступної таблиці:

Тип стерилізації	**Наявність мікробного росту**
Автоклавування (1 атм., 15 хв.)	
Кип'ятіння (30 хв.)	
Контроль (без обробки)	

Л а б о р а т о р н а р о б о т а № 2 .

Будова мікроскопу. Види мікроскопії. Виготовлення препаратів мікроорганізмів. Живі препарати. Фіксовані препарати. Морфологія мікроорганізмів. Прості та складні методи фарбування.

Мета роботи. Ознайомитися із будовою оптичного мікроскопу і навчитися працювати з ним. Провести мікроскопію живих та готових фіксованих препаратів мікроорганізмів. Освоїти техніку виготовлення мазків. Навчитися підбирати методи фіксації препаратів та барвники для їх фарбування. Ознайомитися з простими та складними методами фарбування.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскопи; 2) предметові та покривні скельця; 3) бактеріологічні петлі; 4) скляні палички; 5) пальники; 6) препарувальні голки; 7) кедрова олія; 8) розчин фарб метиленової синьки, фуксину тощо; 9) набір реактивів для фарбування за Грамом (водний фуксин, розчин Люголя, спирт 96^0, папірці за Синьовим, насичені генціан-віолетом); 10) кристалізатори; 11) промивалки; 12) стерильна вода; 13) готові фіксовані препарати мікроорганізмів; 14) бактеріальні культури; 15) культури мікроскопічних грибів.

Можливості людського ока обмежені природою. Його ***роздільна здатність*** – 0,2 мм (на відстані 25 см від об'єкту). Тобто людське око здатне формувати зображення двох точок окремо, якщо вони знаходяться на відстані не менш, ніж 0,2 мм.

Для того, щоб збільшити роздільну здатність людського ока, люди здавна почали використовувати збільшувальне скло (лінзи). Фактично, це були перші найпростіші мікроскопи. Вони надавали можливість розгледіти нові деталі, які не було видно неозброєним оком. Лупи, що являють собою просто двоопуклу лінзу в оправі, використовуються і зараз (наприклад, зоологами, щоб розгледіти будову комахи, ботаніками та в інших подібних випадках, коли необхідно розгледіти більш крупні, ніж мікроорганізми, об'єкти). Щоб дістати велике збільшення, застосовують мікроскоп, який у принципі являє собою комбінацію двох оптичних систем – об’єктива і окуляра, – розділених значною відстанню.

Термін мікроскоп вперше було запропоновано у 1646 р. німецьким вченим Кірхером та польським астрономом Гевелієм. Він походить від грецького: *"micros"* –малий та *"skopeo"* – дивлюсь.

Загалом, прогрес у розвитку оптичної техніки був наслідком бурхливого розвитку в різноманітних галузях науки — астрономії, фізиці, географії та був викликаний практичними потребами, насамперед, мореплавства.

Рис. 6. Загальний вигляд сучасного світлового мікроскопу серії „БІОЛАМ” (МБР-1).

Важливим етапом у розвитку оптичної мікроскопії була ідея принципової можливості ***комбінування різноманітних лінз.*** Так, у 1590 р. голландські шліфувальники скла Ганс та Захарій Янсени показали, що збільшене за допомогою однієї лінзи зображення предмета, в свою чергу, можна збільшити за допомогою другої лінзи. Таким чином було відкрито принцип, який згодом став основою виготовлення будь-якого складного оптичного мікроскопу.

Честь відкриття мікроорганізмів належить голландському природознавцю А. Левінгуку. Для своїх досліджень він використав простий мікроскоп власної конструкції, який збільшував об'єкти спостереження у 300 разів.

Перші мікроскопи були далекі від досконалості. Об'єкт в них можна було розглядати лише у віддзеркаленому світлі, а формуванню чіткого зображення заважали явища хроматичної та сферичної аберації.

Суть ***хроматичної аберації*** полягає у тому, що складне біле світло, проходячи через лінзу, яку можна уявити як систему призм, розкладається на спектр, завдяки чому зображення, що формується, стає кольоровим.

Сферична аберація полягає в тому, що промені світла, потрапляючи на різні частини лінзи, заломлюються неоднаково, в залежності від товщини лінзи. В результаті проекція (зображення) точки виникає не у вигляді точки, а у вигляді шару розсіяння. З часом ці та інші конструкційні недоліки мікроскопу було успішно усунено. І зараз усі сучасні мікроскопи влаштовано принципово однаково і фактично являють собою лише "покращенні" моделі старих.

Мікроскоп складається з двох частин – механічної та оптичної (Рис. 7).

Механічна частина кріпиться до **штативу,** який, складається з **ніжки** (або підставки) та **колонки,** з'єднаної з ніжкою за допомогою шарніру. До колонки прикріплено **тубус з револьвером.**

Тубус пересувається вниз та вгору по кремальєрі за допомогою макрометричного гвинта. В штатив вмонтовано також мікрометричний гвинт (для тонкого настроювання мікроскопу). Повний оберт мікро гвинта переводить тубус на 0,1 мм. Найчіткіше зображення, коли віддаль від об'єкта до об'єктива дорівнює фокусній віддалі об'єктива.

Револьвер з отворами для об'єктивів розміщений на нижній частині тубуса.

До механічної частини мікроскопа відноситься також **предметовий столик** із пристроями для утримання та пересування об'єктів.

Оптична частина включає окуляри, об'єктиви та освітлювальні пристрої. з: ***освітлювального апарату*** **(дзеркала і конденсора –** системи з 2 двоопуклих лінз - фокусує світло на об'єкті, що важливо для його більш чіткого зображення). Ірисова діафрагма знаходиться перед нижньою лінзою конденсора. З її допомогою регулюється світловий пучок, що потрапляє до конденсора.

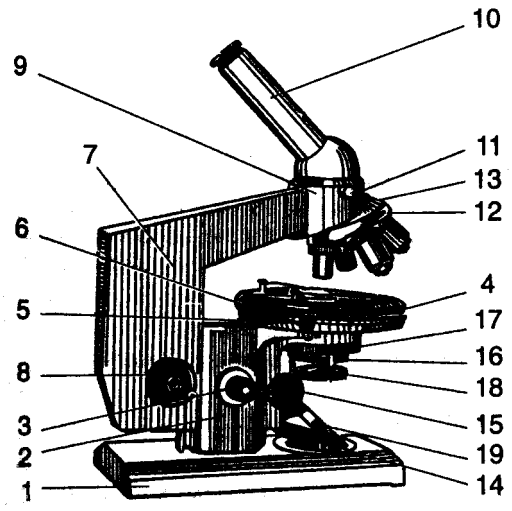


Рис. 7. Схема біологічного мікроскопу МБР-1.

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

Об'єктиви складаються із системи оптичних лінз. Зовнішня лінза об’єктива, повернена до препарату називається фронтальною. Крім неї до складу оптичної системи об’єктиву входять корекційні лінзи. Їхня функція в об’єктиві зводиться до нівелювання аберації. Збільшення ж об’єкту відбувається лише за допомогою фронтальної лінзи. лише На об’єктиви нанесено цифри, які означають кратність збільшення (8×, 40×, 90×). Об’єктиви із збільшенням від 8× до 40× називають ***„сухими”***. При роботі з ними між препаратом і фронтальною лінзою об’єктива знаходиться повітря. Ці об’єктиви необхідні для мікроскопіювання відносно великих об’єктів (гриби, дріжджі) та для знаходження потенційно цікавих полів зору на препараті. При мікроскопіюванні за допомогою сухої системи світлові промені, проходячи через неоднакові за оптичною густиною середовища (скло має коефіцієнт заломлювання 1,52, а повітря – 1,0), відхиляються та розсіюються на межі цих середовищ і, таким чином, повністю не потрапляють до об'єктиву. Це призводить до недостатнього освітлення поля зору та, у кінцевому випадку до зниження роздільної здатності об'єктива. Саме ***імерсійні об'єктиви*** (*immersio* – заглиблюватися,

поринати) покликані збільшити цю роздільну здатність. Це досягається за рахунок розташування між об'єктом спостереження та фронтальною лінзою об'єктива прозорої речовини, показник заломлювання якої близький до показника заломлення скла. Такі речовини називають ***імерсійними рідинами:*** кедрове масло (1,52); гліцерин (1,4); воду (1,3). До імерсійних відносяться об’єктиви із збільшенням, більшим за 90×. На відміну від сухих об’єктивів, вони позначені чорною смужкою. Якщо нанести краплину імерсійної рідини між конденсором та предметним склом та між об'єктом та об'єктивом, тоді оптична система мікроскопу буде являти собою єдину систему, яка не буде викликати відхилення світлового променя, така система називається імерсійною. Імерсійні системи мають важливе значення для підвищення роздільної здатності мікросокпа.

Окуляр складається з очної та збирної лінз (х7, х10). Загальне збільшення даного мікроскопу розраховується як добуток показників збільшення окуляра та об'єктива. Межа видимості – 0,25 мкм (половина довжини світлової хвилі).

Об’єктив і окуляр мікроскопа змінні, так що можна застосувати різні комбінації залежно від конкретного завдання дослідження.

Електронний мікроскоп. Через те, що числову апертуру не можна значно підвищувати, то єдиний спосіб збільшити роздільну здатність мікроскопа – це перейти до коротших хвиль.

Застосування ультрафіолетових променів, що вимагає виготовлення оптики мікроскопа з відповідних матеріалів (кварц, флюорит) або використання відбивної оптики, обмежене довжинами хвиль 2 500 – 2 000 Å, бо більшість об’єктів, які спостерігають, дуже поглинає короткий ультрафіолет. Отже, на цьому шляху роздільну силу можна збільшити приблизно в два рази, що і здійснено в сучасних ультрафіолетових мікроскопах.

Застосування ультрафіолету дає ще одну важливу перевагу. Багато біологічних об’єктів у всіх своїх частинах однаково прозорі для видимого світла, внаслідок чого у видимому світлі їх спостерігати важко. Але ультрафіолетове світло дає значну відмінність у показнику поглинання різних частин об’єкта, так що відповідні мікрофотографії виходять досить контрастними.

Для подальшого збільшення роздільної здатності мікроскопа слід було б використати рентгенівські промені. Але виготовити відповідну оптику, щоб діставати зображення в рентгенівських променях, дуже важко. Однак розвиток фізики дав змогу використовувати замість хвильового випромінювання корпускулярне, так як закони поширення найлегших частинок (електронів) відповідають законам поширення дуже коротких хвиль. Довжина хвилі, що відповідає електронам дуже мала – вона має порядок

кількох сотих ангстрема, що в 10 000 – 100 000 раз менше, ніж довжина хвилі оптичного мікроскопу. Таким чином, теоретична роздільна сила електронного мікроскопу перевищує роздільну силу оптичного мікроскопа в кілька тисяч разів. Інакше кажучи, якщо в оптичному мікроскопі ми спроможні розрізняти деталі порядку 2 000 – 3 000 Å, то за допомогою електронного мікроскопа можна сподіватись мати зображення об'єктів порядку 1 Å, тобто побачити атоми і молекули.

Дослідження мікроорганізмів проводять у живому або фіксованому (забарвленому) стані.

Живі препарати використовуються для вивчення розмірів, форми, структури, рухливості, характеру розмноження, відношення клітин до різноманітних подразників (хімічних, фізичних і т.д.).

Типами живих препаратів є "роздавлена" та "висяча" краплина. Такі препарати можна фарбувати лише наднизькими концентраціями барвників – від 0,0001% до 0,001%.

Для того, щоб добре роздивитись форму багатьох (особливо мілких та слабко забарвлених) мікроорганізмів, їх необхідно пофарбувати. Для цього використовують ***фіксовані забарвлені препарати.*** Такі препарати готують у декілька етапів: виготовлення мазка, висушування, фіксація та забарвлення.

Більшість барвників, які застосовуються у мікробіологічній практиці, є сполуками бензолу та його гомологів, які отримують або шляхом хімічного синтезу, або з кам'яновугільної смоли. Вони можуть бути лужними, кислими чи нейтральними.

В лабораторних умовах можна швидко визначити який характер (кислий чи лужний) має водний розчин того чи іншого барвника. Для цього на фільтрувальний папір наносять краплю досліджуваного барвника. Так як фільтрувальний папір заряджений негативно, то при лужних властивостях барвника вода розтікається у вигляді незабарвленої зони навкруги фіксованої плями барвника, а при кислих – вода та барвник розтікаються однаково. Лужні барвники поєднуються з речовинами клітини, які мають кислі властивості, а кислі – з речовинами лужного походження.

У практиці мікробіологічних досліджень найчастіше використовуються лужні барвники. Це пов'язано з тим, що більшість бактерій несуть на поверхні клітини від'ємний електричний заряд, а в їх цитоплазмі переважають речовини з кислими властивостями.

Виходячи із спорідненості речовини клітини до лужних, кислих або нейтральних барвників, існують відповідно поняття: *базофілія, ацидофілія та нейтрофілія.* Але такий поділ є досить умовним, так як більшість речовин клітини – це амфотерні сполуки, тобто вони можуть набувати кислих, лужних або нейтральних властивостей із зміною значень pH.

Використання різноманітних барвників, їх концентрація та тривалість дії обумовлюються особливостями досліджуваних структур, завданням дослідження (яку із структур необхідно виявити) та властивостями барвників.

Наприклад, у випадку, коли препарати крім бактерій містять живі тканини, або клітинні елементи, то в якості барвника використовують метиленову синьку.

У мікробіологічній практиці найбільш використовуваними барвниками є:

- *червоні* – фуксин лужний та фуксин кислий, нейтральний червоний, конго червоний, еозин К, еритрозин;
- *сині* – метиленовий синій та толуїдиновий синій;
- *зелені* – малахітовий зелений та брильянтовий зелений;
- *фіолетові* - генціан фіолетовий та гематоксилін;
- *коричневі* — лужний коричневий та хрізоїдин;
- *жовті* – пікринова кислота, флуоресцеїн;
- *чорні* – нігрозин водорозчинний, судан-3 і т.п.

Але крім простих, у мікробіології досить широко застосовуються і складні методи фарбування, зокрема фарбування за Грамом. Цей метод фарбування має важливе діагностичне значення. По відношенню до фарбування за Грамом всі мікроорганізми діляться на дві групи: *грампозитивні* ($Г^+$, фірмакутні) та *грамнегативні* ($Г^-$, грацилікутні). Існує також група *грамваріабельних* мікроорганізмів, у яких відношення до фарбування за Грамом змінюється впродовж росту та розвитку клітин (наприклад, коринеподібні бактерії).

Цей метод фарбування вперше був запропонований у 1884 р. датським вченим Х. Грамом для виявлення бактерій у гістологічних зрізах. Сутність цього методу полягає в тому, що барвники трифенілметанового ряду (генціан фіолетолвий, кристалічний фіолетовий та метиловий фіолетовий) у комплексі з йодом затримуються клітинними стінками $Г^+$ бактерій навіть при знебарвлювані спиртом. Такі бактерії залишаються забарвленими у синьо-фіолетовий колір. $Г^-$ ж бактерії при дії спирту знебарвлюються і їх виявляють додатково забарвлюючи контрастним барвником (водним фуксином). Тобто, $Г^-$ бактерії стають червоно-рожевими.

Таким чином, в основі методу фарбування за Грамом лежать особливості хімічного складу та структури клітинних стінок бактерій. При обробці бактерій спиртом відбувається набухання пептидоглікану та зменшення діаметру пор клітинної стінки, що в цілому веде до зменшення проникності клітинної стінки. Так як $Г^+$ бактерії характеризуються високим вмістом

пептидоглікану муреїну (50-80%, а іноді – до 95% усієї маси клітинної стінки), то в результаті обробки спиртом, стінки їх стають майже непроникними для барвників і вони не вимиваються.

У $Г^-$ бактерій вміст пептидоглікану малий (5-10% загальної маси клітинної стінки), тому під дією спирту її проникність тільки збільшується за рахунок розчинення та вимивання ліпідного шару клітинної стінки (який досягає *22%* від її загальної маси).

Так як основну роль у фарбуванні за Грамом відіграє клітинна стінка, то протопласти $Г^+$ бактерій стають $Г^-$. Сферопласти (клітини, у яких частково відсутня або порушена клітинна стінка) усі $Г^-$.

$Г^+$ та $Г^-$ бактерії відрізняють за рядом ознак: **структурними** (товщиною та макромолекулярною будовою клітинної стінки, структурними елементами клітини); **хімічними** (вмістом та складом пептидогліканів, полісахаридів, білків, ліпополісахаридів клітинних стінок); **фізіологічними** (відношенню до барвників, поверхневого натягу, тиску, ультразвуку, ізоелектичною точкою, кислото- та лугостійкістю і т.і.).

Як правило, більшість коків, спороутворюючих паличок є $Г^+$, а звивисті форми та неспороутворюючі палички – $Г^-$. Але серед них є певні виключення. Наприклад, серед коків $Г^-$ є бактерії родів *Neisseria* (збудники менінгіту та гонореї), *Methylococcus* (які як єдине джерело вуглецю та енергії використовують метан та метанол). Серед неспороутворюючих паличок $Г^+$ є бактерії роду *Lactobacillus* (молочнокислі бактерії) та інші.

Потрібно підкреслити, що фарбування за Грамом є діагностичною ознакою лише по відношенню до прокаріот, які мають клітинну стінку, і не може бути використана у таксономії мікоплазм та еукаріот.

Існує багать модифікацій методу фарбування за Грамом. Але найбільш розповсюдженою є модифікація Синьова.

Практичне завдання.

1. Розглянути морфологію готових забарвлених препаратів.
2. Виготовити препарат „роздавлена краплина” із цвільових грибів.
3. Виготовити препарат „висяча краплина” із хлібопекарських дріжджів.
4. Виготовити мазок бактерій *E. coli* або *B. subtilis*. Пофарбувати мазок водним фуксином або метиленовим синім. Розглянути під мікроскопом, використовуючи імерсію.
5. Виготовити мазок суміші сарцини та кишкової палички. Пофарбувати за Грамом (у модифікації Синьова). Розглянути під мікроскопом (імерсія).

Хід роботи.

1. **Порядок роботи з світловим мікроскопом:**
   - Встановити освітлення.
   - Обережно, під контролем ока опустити тубус.
   - Знайти зображення на малому збільшенні.
   - Рухаючи предметний столик, знайти відповідне місце на препараті і перевести на велике зображення.
   - Після закінчення роботи витерти об'єктив сухою ганчіркою.

2. Для виготовлення препарату **„роздавлена краплина”** на середину стерильного предметного скла наносять бактеріологічною петлею краплину суспензії досліджуваної мікробної культури. Якщо мікроби ростуть на твердому поживному середовищі, то перед тим на предметне скло наносять краплинку стерильної води, а вже потім вносять бактеріальну масу. Краплю накривають покривним скельцем таким чином, щоб під ним не утворювалися пухирці повітря, і вивчають під мікроскопом.

3. Препарат „висяча краплина” виготовляють на спеціальному предметному склі з луночкою. Краї луночки змазують вазеліном. На середину покривного скельця наносять бактеріологічною петлею невеличку краплю досліджуваного матеріалу, скельце швидко перевертають крапелькою вниз і накривають ним лунку так, щоб крапля була в центрі і не торкалася його дна (див. рис. 8).

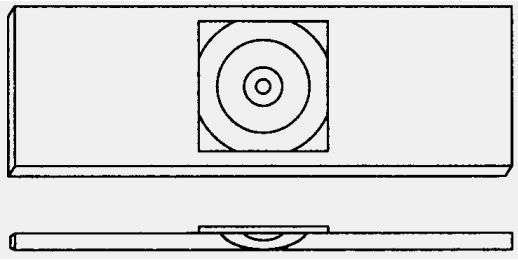


Рис. 8. Виготовлення препарату „висяча краплина”.

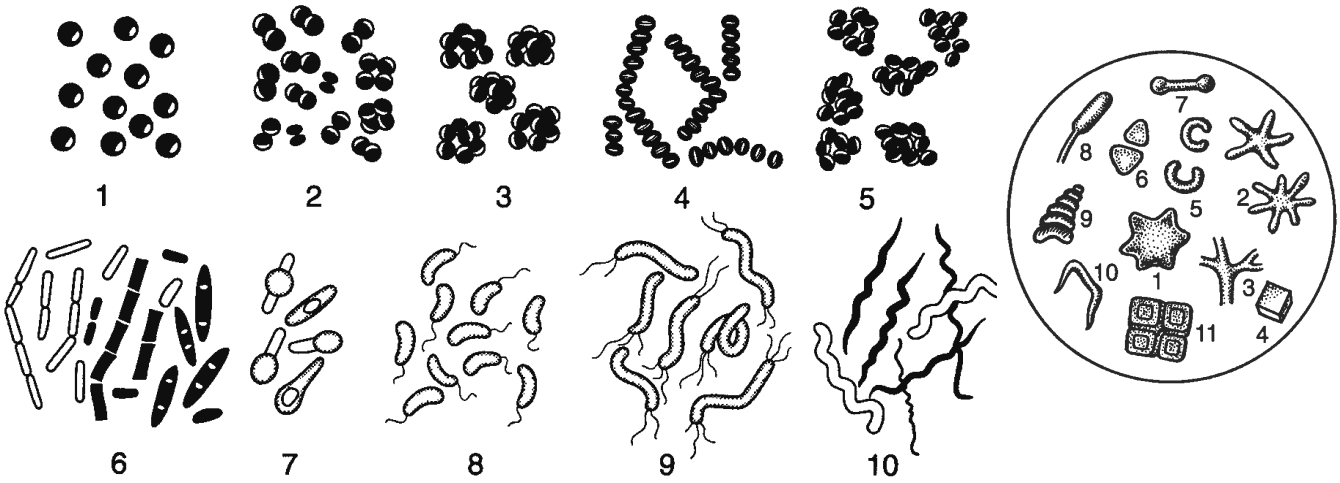


Рис. 9. Основні (*А*) та рідко зустрічні (*Б*) морфологічні форми бактерій:
***А*:** 1 – монококи; 2 – дипло- та тетракоки; 3 – сарцини; 4 – стрептококи; 5 – стафілококи; 6,7 – паличкоподібні бактерії; 8 – вібріони; 9 – спірили; 10 – спірохети;
Б: 1 – бактерії, подібні до шестикутної зірки; 2 – бактерії, які утворюють вирости (простеки); 3 – бактерії, які галузяться; 4 – пластинчасті клітини архебактерій; 5 – тороїди; 6 – трикутні; 7 – гантелеподібні бактерії; 8 – стебельцеві бактерії; 9 – трихоми нециліндричні; 10 – червоподібні бактерії; 11 – клітини, з'єднані в пластинки.

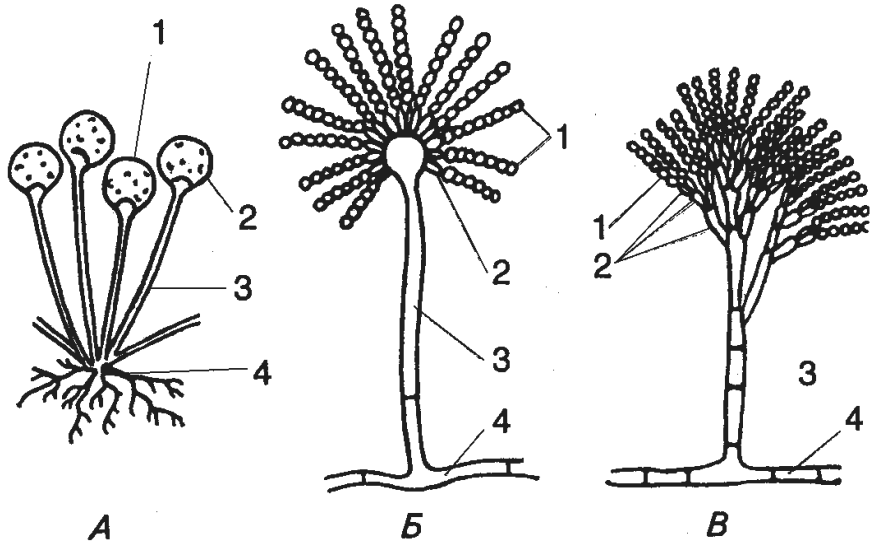


Рис. 10. Міцеліальні мікроскопічні гриби та їх морфологія:
***А – різопус*:** 1 – спорангій; 2 – спори; 3 – спорангієносець;
Б – аспергіл; ***В – пеніцил***: 1 – конідії; 2 – стеригми; 3 – конідієносець; 4 – вегетативні гіфи.

4. **Етапи виготовлення мазків:**

Готують мазки на чистих знежирених предметних скельцях із мікробних суспензій або культур, які вирощувались на твердих поживних середовищах. Коли необхідно вивчити природне розташування мікроорганізмів у колоніях, вирощених на поверхні твердого поживного середовища, то виготовляється препарат-відбиток.

Висушують мазки при кімнатній температурі (щоб не порушити форму мікробних клітин). На наступному етапі мазки фіксують. Фіксація препаратів виконує відразу з функції: *клітини міцно прикріплюються до поверхні скла, підвищується їх спорідненість до барвника, та, нарешті, клітини гинуть*, що важливо при роботі з патогенними мікроорганізмами.

Найбільш простий спосіб фіксації – ***жаром*** – для вивчення морфології клітин (але порушується їх будова (структура)). Інші способи фіксації – хімічними речовинами (рідкими та порою). З цією метою використовується 96% етиловий спирт (5-10 хв.), суміш Нікіфорова (абсолютний етиловий спирт : ефір = 1 : 1 (10-15 хв.), безводний метиловий спирт (3-5 хв.), ацетон (5 хв.) та ін.

Фіксовані препарати **фарбують** (рис. 11) водним фуксином або метиленовим синім. Після чого їх можна розглядати під мікроскопом, використовуючи імерсію**.**

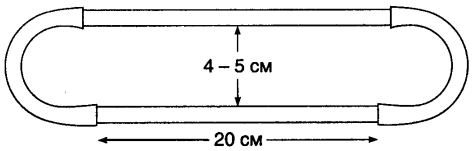


Рис. 11. Штатив для предметних скелець (використовується при фарбуванні мазків).

5. **Фарбування бактерій за Грамом (модифікація Синьова)**.

- Виготовити мазок. (Мазки повинні бути тонкими, з рівномірно розподіленими по поверхні скла клітинами, без скопичень (а особливо без шматочків агару), так як останні перешкоджають оцінці результату фарбування), мазок висушити на повітрі. Зафіксувати жаром (3-4 рази пронести через полум'я газового пальника).

- На мазок покласти папірець Синьова (з розчином кристалічного фіолетового). Нанести на папір воду. Витримати 2-4 хв.
- Обережно зняти папірці. Злити надлишок фарби. **Не промиваючи препарат водою !!!,** налити розчин Люголя *(KI + I)* на 1-2 хв. (до почорніння препарату).
- Злити надлишок розчину Люголя та нанести на препарат 1-2 краплини 96^0 етилового спирту на 20-50 с.
- Препарат швидко (щоб не збільшувати експозицію дії спирту) та ретельно, промити водою.
- Препарат додатково пофарбувати водним розчином фуксину (2-3 хв.).
- Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером та мікроскопіювати з об'єктивом 90× та імерсійною системою.

Оформлення результатів роботи.

1. Замалювати морфологічні форми бактерій та морфологію пліснявих грибів (див. рис. 9–10).
2. Виготовлені самостійно препарати живих мікроорганізмів роздивитися на малому (×8) та великому (×20) збільшеннях та замалювати.
5. Замалювати профарбовані мікроорганізми і визначити їх морфологічну будову.
6. Знайти спори у суспензії *B. subtilis* (на малюнку позначити їх стрілками).
7. Замалювати кольоровими олівцями (синім та червоним) колір трьох типів мазків, виготовлених з наданих викладачем бактеріальних суспензій.
8. Визначити яке забарвлення за Грамом мають бактерії *E. coli* та *S. flava*. Записати в зошиті.

Л а б о р а т о р н а р о б о т а № 3.

Методи культивування мікроорганізмів.

Мета роботи. Навчитися готувати поживні середовища для культивування мікроорганізмів з різноманітними харчовими потребами. Оволодіти технікою культивування мікроорганізмів на різноманітних поживних середовищах.

Матеріали та обладнання: 1) термостат; 2) пальники; 3) технічні та аналітичні терези; 4) важки; 5) вазелінова олія (стерильна); 6) чашки Петрі; 7) шпателі для відбору реактивів; 8) скальпелі; 9) бактеріологічні петлі; 10) препарувальні голки; 11) шпателі Дригальського; 12) стерильні піпетки; 13) конічні колби (0,2–0,5 л); 14) стакани з термостійкого скла на 250 мл; 15) мірні циліндри на 250 та 500 мл; 16) лійки; 17) вата, марля, фільтрувальний папір; 18) скляні палички для перемішування; 19) стерильний посуд для розливу середовищ; 20) стерильні пробірки; 21) індикаторний папір для перевірки pH; 22) агар-агар; 23) сухий порошок МПА; 24) пептон; 25) стандартизована суміш для приготування пептонної води; 26) дистильована вода; 27) дезинфікуючий розчин для інвентарю; 28) 30% розчин NaOH; 28) 10% розчин HCl; 29) набір реактивів: $NaCl$, $NaNO_3$, KH_2PO_4, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2SO_4, $CaCO_3$; 30) глюкоза (або сахароза); 31) картопля; 32) житній хліб; 33) культури бактерій на МПА; 34) мул з акваріуму.

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмам, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні і неорганічні субстрати, які надають їм енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи для харчування мікроорганізми отримують з навколишнього середовища. При культивуванні в лабораторних умовах використовують **поживні середовища**, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітин потребують для свого розвитку макроелементи (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) та мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь тощо). Для деякий мікроорганізмів додатково необхідні фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) і вітаміни. Отже, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту і розвитку мікроорганізмів.

Поживні середовища мають відповідати таким вимогам:

- містити всі необхідні джерела макро- та мікроелементів, а за необхідності – вітаміни і фактори росту;
- усі сполуки, які входять до їх складу, мають бути у певному збалансованому співвідношенні;
- містити у своєму складі необхідну кількість води;
- мати оптимальні для мікроорганізмів значення *pH* та *Eh*;
- бути ізотонічними, тобто мати такий самий осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- бути стерильними.

Середовища, які використовуються в мікробіології, поділяють на групи за такими критеріями: походження, консистенція, призначення (Табл. 1).

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів, для визначення їх фізіолого-біохімічних особливостей тощо.

Напіврідкі середовища містять 0,75–1% агар-агару (полісахариду, який отримують з бурих водоростей, температура плавлення біля 100^0C) або 5–7,5% желатини (речовини білкової природи, яку отримують із сполучної тканини тварин, температура плавлення 25^0C) і використовуються для визначення газоутворення та характеру росту мікроорганізмів.

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

Таблиця 1

Класифікація поживних середовищ

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

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

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

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

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

Середовища загально призначення використовують для культивування більшості відомих мікроорганізмів. Наприклад, МПБ, МПА, МПЖ.

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

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

Джерелами вуглецю можуть бути органічні речовини – цукри, спирти, органічні кислоти, амінокислоти та неорганічні – карбонати, діоксид та монооксид вуглецю.

Джерелами азоту можуть бути неорганічні сполуки (амонійні солі, нітрати, молекулярний азот) та неорганічні (амінокислоти). Найдоступнішим джерелом азоту для мікроорганізмів є амонійний азот, який має ступінь окислення (N^{3-}), бо саме в такому вигляді він включається в процес біосинтезу амінокислот. Для включення нітратного азоту в біосинтез мікроорганізмам потрібно спочатку його відновити з N^{5+} до N^{3-}. Цей процес називається асиміляторною ***нітратредукцією*** і потребує затрат енергії. Зв'язування молекулярного азоту називається ***азотфіксацією*** і є ще більш енергозатратним, тому азотфіксація притаманна лише певним мікроорганізмам. Деякі мікроорганізми використовують як джерело азоту амінокислоти, які одночасно можуть бути і джерелом вуглецю.

Універсальним джерелом фосфору для мікроорганізмів є фосфатні солі.

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

Речовини, що поглинаються мікроорганізмами, мають забезпечити їх енергією, необхідною для активного біосинтезу, відновленими еквівалентами (тобто електронами), які потрібні для функціонування дихального ланцюга, фотосинтетичних електронтранспортних систем та процесів анаболізму, та вуглецем, який є основним клітинним компонентом. За джерелом енергії мікроорганізми поділяють на хемо- та фототрофів. Хемотрофи одержують енергію за рахунок хімічних реакцій, а фототрофи – у результаті перетворення енергії світла. За походженням джерела електронів мікроорганізми поділяють на органо- та літотрофів. Органотрофи одержують електрони в процесі окислення органічних сполук, а літотрофи – неорганічних. За походженням джерела вуглецю мікроорганізми поділяють на авто- та гетеротрофів. Автотрофи споживають неорганічні джерела вуглецю, а гетеротрофи – органічні.

На відміну від інших організмів, мікроорганізми мають дуже різноманітні варіанти метаболізму (Табл. 2).

Таблиця 2

Типи метаболізму мікроорганізмів

		ДЖЕРЕЛА ЕЛЕКТРОНІВ	**ДЖЕРЕЛА ВУГЛЕЦЮ**	
			Органічні речовини	***Неорганічні речовини***
ДЖЕРЕЛА ЕНЕРГІЇ	**Енергія хімічних реакцій**	***Органічні речовини***	Хемоорганогетеротрофи	Хемоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини	Хемолітогетеротрофи	Хемолітоавтотрофи
	Енергія світла	***Органічні речовини***	Фотоорганогетеротрофи	Фотоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини	Фотолітогетеротрофи	Фотолітоавтотрофи

Загальна назва, що характеризує метаболічні особливості мікроорганізму, складається з 4 коренів, наприклад, хемо-літо-гетеро-трофи:

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

Культивуванням називається вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах. Методи культивування є дуже різноманітними і служать різним цілям: наприклад, у виробництві антибіотиків або інших біологічно активних речовин, умови культивування (склад середовища, (t^0, pH та ін.) націлені на одержання метаболітів (продуктів виділення мікроорганізмів, що накопичуються у культуральній рідині або безпосередньо у мікробних клітинах). У виробництві ж дріжджів умови культивування націлені на одержання максимальної біомаси.

Дуже велике значення для культивування має також поживне середовище. Поживні середовища діляться на **т в е р д і** (з агар-агаром) та **рідкі.**

На твердих середовищах головним досягненням є можливість одержання окремих колоній. *Колонія* – це потомство однієї клітини, яка потрапила на агаризоване середовище. За виглядом колоній можна розрізнити окремі види мікроорганізмів.

На *рідких* середовищах це неможливо. Рідке середовище із клітинами, що там ростуть називається культуральною рідиною.

Мікробіолог повинен добре володіти технікою посіву на рідкі і тверді середовища.

Усі роботи проводять перед полум'ям пальника, де утворюється стерильна зона і де можна простерилізувати головний інструмент мікробіолога — мікробіологічну петлю. Крім того, на полум'ї при посіві пропалюють корки та краї пробірок.

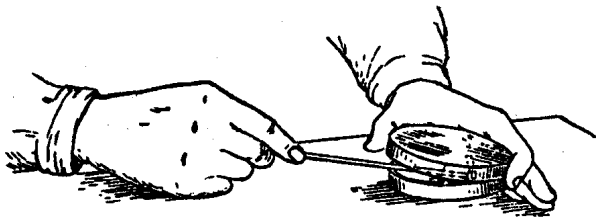


Рис. 12. Посів на пластинку МПА в чашку Петрі.

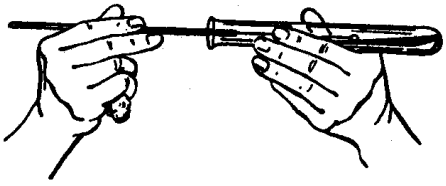


Рис. 13. Посів мікроорганізмів на скошений агар у пробірку.

При роботі із стерильними середовищами потрібно звернути особливу увагу на те, що:

** при розливі стерильних середовищ пробірки обов'язково потрібно тримати в нахиленому положенні (для запобігання залітання спор із повітря), а у чашок Петрі – ніколи повністю не відкривати кришку;*

** перед пересівом бактерій потрібно обов 'язково охолодити петлю, а після пересіву обов 'язково її простерилізувати і поставити в штатив;*

** при мірному розливі поживних середовищ або бактеріальних суспензій потрібно відкривати піпетку не з носика, а з протилежного боку.*

Глибинний посів використовують для одержання як аеробів (ростуть на поверхні чашки), так і анаеробних організмів (ростуть у товщі агару, на дні чашки).

Якщо потрібно одержати глибинний посів на рідкому середовищі**,** то колбу з культурою треба весь час струшувати на качалці (наприклад, для вирощування мікроскопічних грибів).

** В процесі посіву факультативних анаеробів (дріжджі) голкою у товщу стовпчика потрібно звернути увагу на те, що пробірку необхідно тримати догори ногами для запобігання потрапляння у пробірку забруднювачів з повітря!*

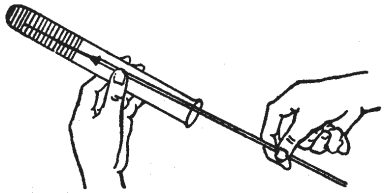


Рис. 14. Посів мікроорганізмів уколом у стовпчик МПА.

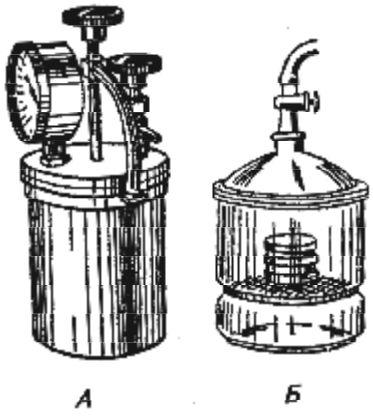
При посіві анаеробних мікроорганізмів головною метою є одержання середовища без кисню. Для цього:

а) розливають нагріте середовище, заливають його стерильною олією і через олію роблять засів;

б) вносять рідке або тверде середовище в пробірку, продувають його аргоном або азотом із балона, герметично перекривають корком. В середовища можна додавати деякі відновники, що поглинають залишки кисню (наприклад, Fe^{2+}, пірогалол, цистеїн та т.ін.) (рис. 15);

Рис. 15. Культивування анаеробів при поглинанні кисню лужним розчином пірогалолу.

в) але найпростіший спосіб – це високий стовпчик, перекритий гумовим корком;



г) чашки з анаеробами наливають агаром "під кришки" та вміщують:

– в анаеростат (ємність, з якої насосом відкачується повітря);

– вакуумний ексикатор, на дно якого можна помістити хімічні поглиначі кисню (гіпосульфіт *Na*, пірогалол і т.ін.) (рис. 16);

д) для облігатних анаеробів існує складна техніка культивування в атмосфері інертного газу, з постійною перевіркою на відсутність кисню.

Рис. 16. Металевий мікроанаеростат (*А*), скляний вакуумний ексикатор (*Б*).

Посів на чашку мікроскопічних грибів за допомогою гачка. Для посіву мікроскопічних грибів у чашку Петрі, чашку необхідно перевернути догори дном і в такому вигляді відкрити в межах стерильної зони. Кінчиком гачка, на якому містяться спори, конідії або грибний міцелій, потрібно доторкнутися до центру агарового диску. Чашку Петрі (у перевернутому вигляді) помістити в термостат і культивувати при $t = 24 \pm 2^0$C (з метою запобігання осідання грибних конідій та спор на поверхню агару).

Практичне завдання.

Приготувати наступні поживні середовища та зробити необхідні мікробіологічні посіви:

1. Щільне натуральне загальновживане середовище – м'ясо-пептонний агар (МПА).
2. Рідке натуральне загальновживане середовище – пептонну воду.
3. Щільне натуральне середовище – картопляний агар.
4. Щільне натуральне середовище – хлібний агар.
5. Щільне синтетичне селективне середовище – середовище Чапека.
6. Щільне синтетичне селективне середовище – середовище Ешбі.
7. Розлити розплавлене середовище на косяк та чашку Петрі.
8. Розлити КГА в пробірку стовпчиком і після його застигання уколом засіяти туди дріжджі.
9. Пересіяти культуру мікроорганізму із пробірки в пробірку штрихом.
10. Розлити стерильною піпеткою по 2 мл МПБ в стерильну пробірку і далі в це рідке середовище засіяти культуру з косяка.
11. Розсіяти ґрунтову бовтанку (0,2 мл) шпателем Дригальського по поверхні чашки Петрі з МПА.
12. Розсіває ґрунтову бовтанку методом виснажуючого штриха на поверхню чашки Петрі.
13. Розлити КГА в стерильну маленьку чашку Петрі і в центр гачком посіяти гриб.
14. Зробити глибинний посів ґрунтової бовтанки у чашку Петрі.
15. Зробити посів мулу з акваріуму на наявність анаеробів у високий стовпчик під гумовий корок.

Хід роботи.

1. Для приготування **м'ясо-пептонного агару (МПА)** використовують виготовлений промисловим способом сухий порошок, який містить усі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю та простотою приготування. До його складу входять, г/л:
   - *гідролізат м'яса або риби* – 17,9;
   - *пептон* – 10,0;
   - *NaCl* – 5,0;
   - *агар*-агар – 20,0.

   Указану в інструкції кількість сухого порошку слід розмішати в колбі з 1000 мл холодної дистильованої води. Перевірити pH за допомогою індикаторного паперу й за необхідності довести його до 7,2–7,4 розчином *NaOH*. Потім, при постійному перемішуванні, довести розчин до кипіння та до повного розчинення інгредієнтів. Отримане середовище профільтрувати в гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр. Стерилізувати при 121^0C (при 1 атм в автоклаві) протягом 15–20 хв.

2. Для приготування **пептонної води** до дистильованої води необхідно додати 1% пептону та 0,5% *NaCl* або розчинити в дистильованій воді стандартну суміш, виготовлену промисловим способом. Встановити значення pH на рівні 7,2–7,4 розчином *NaOH*. У разі застосування стандартного середовища, суміш прокип'ятити упродовж 3 хв. Потім розчин профільтрувати через паперовий фільтр і простерилізувати при 121^0C (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

3. Для приготування **картопляного агару** 200 г *картоплі* (добре помитої та очищеної) подрібнити, залити 1 л водогінної води, кип'ятити 15 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водогінною водою до початкового рівня, додати 0,2% *NaCl* та 2% *агар-агар*. Нагріти, постійно

перемішуючи, до повного розплавлення агару, за необхідності знову профільтрувати. Установити значення pH на рівні 7,0. Середовище простерилізувати при 121^{0}C (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

4. Для приготування **хлібного агару** 200 г *житнього хліба* („Московський") залити 1,3 л водогінної води, дати настоятися протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після цього рідину злити, профільтрувати через марлю, а потім – через паперовий фільтр. На 1 л рідини додати 5 г *глюкози* та 2% *агар-агару*. Нагріти до повного розплавлення агару. Установити pH 5,0. Середовище простерилізувати при 116,5 ^{0}C (при 0,75 атм в автоклаві) 20 хв.

5. Для приготування синтетичного середовища Чапека в 1 л дистильованої води розчинити солі, виміряти pH, за необхідності довести значення pH до рівня 5,0–6,0, додати агар-агар, витримати протягом 15–20 хв. для його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати $CaCO_3$ (крейду) за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5 ^{0}C (при 0,75 атм в автоклаві) 10 хв.

Компоненти середовища, г/л:
- $NaNO_3$ – 2,0
- KH_2PO_4 – 1,0
- KCl – 0,5
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01
- *сахароза або глюкоза* – 0,03
- $CaCO_3$ – 3,0
- *агар*-агар – 20,0.

6. Для приготування синтетичного середовища Ешбі в 1 л водогінної води розчинити солі, виміряти pH, за необхідності довести значення pH до рівня 7,3–7,6, додати агар-агар, витримати упродовж 15–20 хв. для його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати $CaCO_3$ за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5 ^{0}C (при 0,75 атм в автоклаві) 10 хв.

Компоненти середовища, г/л:
- KH_2PO_4 – 0,2
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2
- K_2SO_4 – 0,1
- $NaCl$ – 0,2
- $CaCO_3$ – 5,0
- *сахароза* – 20,0
- *агар*-агар – 20,0.

Оформлення результатів роботи.

1. Записати в зошит прописи для виготовлення рідких та агаризованих поживних середовищ різного призначення. Виготовлені, промарковані та простерилізовані поживні середовища здати викладачу для виконання наступних лабораторних робіт.
2. Здати викладачу пробірки та чашки з посівами. Через 2-4 дні (для грибів – через тиждень) спостерігати ріст мікроорганізмів на різних середовищах.
3. За характером росту дріжджів при посіві голкою у стовпчик агару встановити їх відношення до кисню.
4. За ростом бактерій в МПБ встановити їх відношення до кисню.
5. Ретельно розглянути колонії аеробних мікроорганізмів, які виросли на поверхні МПА і колонії мікроаерофілів в товщі агарового стовпчика під гумовим корком.
6. Висновки, зроблені за результатами та аналізом посівів сформулювати та записати у зошит.

Л а б о р а т о р н а р о б о т а № 4 .

Розповсюдження мікроорганізмів у природі.

Мета роботи. Оволодіти підходами та методиками, за допомогою яких виділяють мікроорганізми з різноманітних середовищ існування. Навчитися проводити санітарний аналіз ґрунту.

Матеріали та обладнання: 1) мікроскопи; 2) предметові та покривні скельця; 3) пальники; 4) кедрова олія; 5) розчин фарб метиленової синьки; 6) кристалізатори; 7) промивалки; 8) стерильний посуд: стаканчики, чашки Петрі, пробірки, колби; 9) шпателі Дригальського; 10) бактеріологічні петлі; 11) скляні градуйовані піпетки; 12) пальники; 13) фарфорова ступка з товкачиком; 14) дезинфікуючий розчин для інвентарю; 15) технічні терези та важки; 16) гумові груші; 17) шпателі для відбору ґрунтових зразків.

Мікроорганізми зустрічаються у природі всюди. Найбільша кількість мікроорганізмів зосереджена у ґрунтах, де вони сорбуються на часточках ґрунту. Кількість їх вимірюється у 10^3-10^6 на 1 г ґрунту. В ґрунтах можна знайти будь-які фізіологічні групи мікроорганізмів. Саме у ґрунтах мікроорганізми ведуть велику роботу по мінералізації органічних речовин (целюлози, сечовини та ін. природних речовин) та продуктів штучного синтезу (пестицидів, нафтопродуктів).

Мікроорганізми, що знаходяться у повітрі, мають здатність осідати. В чистому повітрі їх мало, а у повітрі, забрудненому пилом та аерозолями – набагато більше.

Мікроорганізми зосереджені також в організмі людини та тварин, а також пов'язані з рослинними організмами. Найбільша кількість мікроорганізмів знаходиться у ризосфері рослин.

Існує багато методів виділення мікроорганізмів з природних джерел.

П О В І Т Р Я . Найпростіший метод, який дає уяву про мікрофлору повітря називається методом Коха. Для цього чашки Петрі із стерильним агаром діаметром 10 см з МПА залишають на деякий час відкритими: зазвичай на 20 хв.; на одну годину – на дуже чистому повітрі (морське повітря); на 10 хв. – на забрудненому повітрі. Після експозиції кришки на чашках закривають і залишають чашки в термостаті при t^0 25-30^{0}С.

Гриби розвиваються переважно на кислих середовищах; бактерії – на нейтральних. Серед сапрофітів повітря на МПА постійно розвиваються різні кокові форми (зокрема, жовта сарцина, білий та рожевий мікрокок, спорові палички, цвілі). Це якісний метод. Кількісний метод затруднений, так як потребує спеціальної апаратури.

Ґ Р У Н Т . Існує багато методів виявлення гетеротрофних мікроорганізмів. Найбільш розповсюджений – метод серійних (граничних) розведень (рис. 17). Для цього наважку ґрунту (5 *г*) розтирають пестиком у фарфоровій ступці у 50 мл стерильної води. Переносять зразок в 100 мл колбочку і після цього послідовно проводять ґрунтову бовтанку через ряд пробірок, розводячи пробу. Паралельно таку ж наважку ґрунту ставлять на 2 год. на висушування до сушильної шафи на 105^{0}С до постійної ваги. Потім ґрунтова суспензія з останньої пробірки об'ємом 0,1 мл наноситься на поверхню чашки Петрі і розтирається шпателем Дригальського по всій поверхні чашки. Через 3-5 діб ведеться підрахунок окремих колоній, які виросли на чашці та перераховується кількість бактерій на 1 г сухого ґрунту.

Наприклад, із пробірки № 4 на чашці виросло 43 колонії (це означає,що в 1 мл бовтанки пробірки № 4 знаходиться 430 мікробних клітин).

Отже, у пробірці № 3 в 1 мл знаходиться 4 300 клітин мікроорганзімів;
у пробірці № 2 — " — 43 000 клітин;
у пробірці № 1 — " — 430 000 клітин;
а у колбочці — " — 4 300 000 клітин.
Таким чином, в 1 г ґрунту містилося 43 000 000 клітин мікроорганізмів.

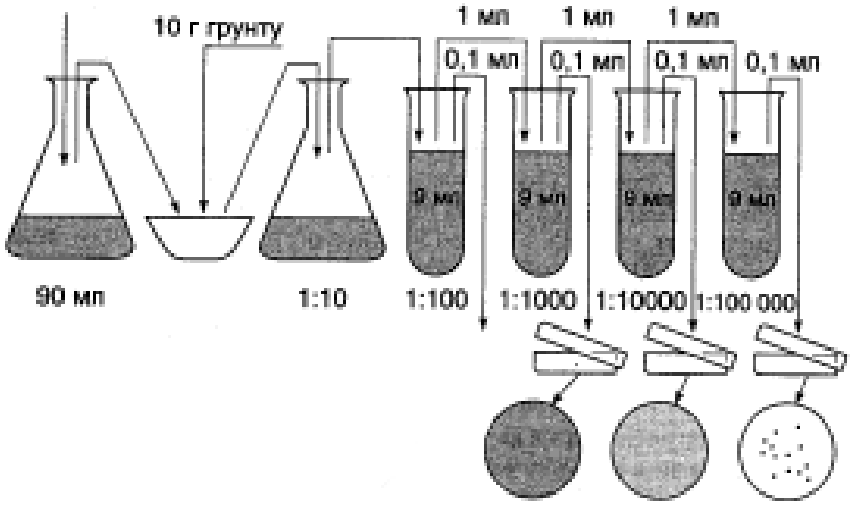


Рис. 17. Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової бовтанки у чашки Петрі.

М І К Р О Ф Л О Р А Т І Л А . На тілі мікроорганізми існують на шкірі, на слизових оболонках, в кишковому тракті, на зубах.

Практичне завдання.

1. Встановити на 20 хв. відкриту чашку Петрі с МПА для виявлення мікроорганізмів повітря.
2. Зробити наважку ґрунтів різних типів (по 5 гр). Виготовити ґрунтову бовтанку і провести її через ряд пробірок, роблячи серійні (граничні) розведення. Потім висіяти по 0,1 мл бовтанки із пробірок №№ 4, 5, 6 шпателем Дригальського.
3. Залишити на чашці Петрі „відбиток” своїх пальців.
4. Зробити мазок зубного нальоту, забарвити його метиленовим синім і розглянути епітеліальні та бактеріальні клітини. Замалювати.

Хід роботи.

1. Встановити на 20 хв. відкриту чашку Петрі з МПА для виявлення мікроорганізмів повітря.
2. Зробити наважку ґрунтів різних типів (по 5 гр). Виготовити ґрунтову бовтанку і провести її через ряд пробірок, роблячи серійні (граничні) розведення. Потім висіяти по 0,1 мл бовтанки із пробірок №№ 2, 3, 4 шпателем Дригальського.
3. Залишити на чашці Петрі „відбиток” своїх пальців.
4. Зробити мазок зубного нальоту (див. рис. 18), забарвити його метиленовим синім і розглянути епітеліальні та бактеріальні клітини. Замалювати.

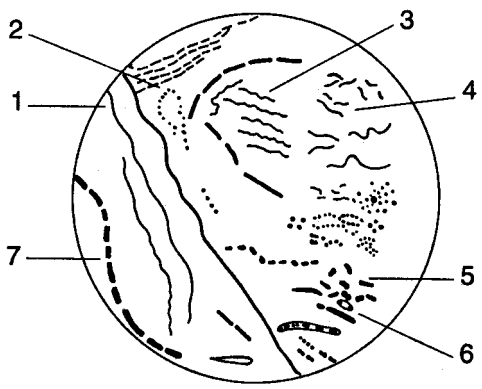


Рис. 18. Мікрофлора зубного нальоту (за Зіковим та співавт., 1997):
1 – *Leptothrix*; 2 – *Diplostreptococcus*; 3 – *Borrelia buccalis*; 4 – *Treponema microdentinum*; 5 – *Diplococcus*; 6 – *B. fasiforme*; 7 – *B. macsimum buccalis.*

Оформлення результатів роботи.

1. Роздивитися морфологічну різноманітність мікрофлори повітря. Описати мікроорганізми повітря, звертаючи увагу на співвідношення грибів та бактерій.

2. Представити результати аналізу мікрофлори ґрунту у вигляді наступної таблиці:

Розведення	**Кількість колоній на поверхні МПА**	**Кількість гетеротрофних бактерій в 1 *г* ґрунту**
1 : 10^3		
1 : 10^4		
1 : 10^5		

3. Замалювати мікрофлору зубного нальоту. Знайти бактеріальні та епітеліальні клітини. Відзначити їх відмінності.

Л а б о р а т о р н а р о б о т а № 5 .

Мікрофлора води. Санітарний аналіз води.

Мета роботи. Навчитися проводити санітарний аналіз води.

Матеріали та обладнання: 1) стерильний посуд: стаканчики, чашки Петрі, пробірки, колби; 2) шпателі Дригальського; 3) бактеріологічні петлі; 4) скляні градуйовані піпетки; 5) пальники; 8) дезинфікуючий розчин для інвентарю; 9) гумові груші; 10) мембранні фільтри; 11) фільтрувальний апарат; 12) водоструменевий насос; 13) шпателі для відбору ґрунтових зразків; 14) спеціальні флакони для відбору зразків води.

Величезна кількість та різноманіття мікробного світу зустрічається в природних водах, де мікроби зосереджені у вигляді зависі, або адсорбовані в мулі. Серед водних мікроорганізмів зустрічаються ті, що постійно проживають у водоймах і такі, що потрапляють туди із стічними водами.

Аналіз води поділяється на 2 етапи:

1) Вивчення водних мікроорганізмів-сапротрофів. Для обліку цієї групи мікроорганізмів користуються методом серійних розведень із висівом на МПА. Чим більше у воді сапрофітних мікробів, тим сильніше вона забруднена.

2) Санітарно-гігієнічний аналіз води – це аналіз на виявлення у воді збудників таких захворювань як дизентерія, черевний тиф, холера (тобто, кишкових захворювань). Пряме виявлення збудників цих захворювань у воді дуже складне і займало б дуже багато часу, тому про їх наявність судять то наявності у воді санітарно-показового мікроорганізму — *Escherichia coli.*

E. coli, подібно до збудників кишкових захворювань, потрапляє у водоймища (річки, озера) з фекальними масами та побутовими стічними водами, її наявність свідчить про забруднення води фекальними масами, а значить є ймовірність перебування там збудників кишкових захворювань.

Подібно до хвороботворних кишкових бактерій, *E. coli:* а) Г-негативна; б) аероб або факультативний анаероб; в) росте на фуксино-сульфітному агарі з лактозою (середовище Ендо), утворюючи там характерні темно-червоні колонії з металевим блиском.

Колі-індекс – це кількість колі-бактерій у 1л води, а ***колі-титр*** – кількість мл води, у яких нараховується 1 колі-бактерія.

Наприклад, у воді виявлено 20 кишкових паличок у 1 л води. Тоді, колі-індекс такої води – 20, а колі-титр – 50, тобто 1 колі-бактерія знаходиться у 50 мл води.

Практичне завдання.

1. Зробити санітарний аналіз різних типів води (водопровідної, артезіанської, стічної і т.д.).

Хід роботи.

1. Для проведення санітарно-гігієнічного аналізу води скористатись методом мембранних фільтрів.

Послідовність проведення санітарно-гігієнічного аналізу води:

1) Мембранні фільтри № 3 вміщують у дистильовану воду і кип'ятять 15 хв. тричі. Після І і ІІ-го кип'ятіння воду зливають. Після останнього кип'ятіння фільтри залишають у воді.
2) Фільтрувальний апарат (див. рис. 2) стерилізують кип'ятінням або пропалюванням. На столик апарата стерильним пінцетом вміщують мембранний фільтр. На фільтр встановлюють і закріплюють воронку.
   Воду відфільтровують за допомогою водоструменевого смоку. ***Фільтрують:***
   - водопровідну воду в об'ємі 500 мл;
   - артезіанську – 500 мл;
   - річкову воду – 100 мл.

   Для можливості наступного підрахунку мікробних колоній кожен тип води профільтровують у різних об’ємах на 4 фільтри:
   - артезіанську – 0,5 мл; 5 мл; 50 мл; 500 мл;
   - водопровідну – 0,5 мл; 5 мл; 50 мл; 500 мл;
   - річкову – 0,1 мл; 1 мл; 10 мл; 100 мл.
3) Фільтри накладають на середовище Ендо (свіжоприготоване) та вміщують у термостат.
4) Через 24-48 год. розглядають колонії: червоні з металевим блиском, червоні без металевого блиску, рожеві. Експресне встановлюють їх Грам-приналежність.
5) Грам-негативні колонії відсівають у пробірки з глюкозо-пептонним середовищем і ставлять у термостат (43^0С) на 24 год. Про присутність кишкової палички судять по її росту при $t = 43^0$С (сапрофіти із води не ростуть при такій температурі) та по газоутворенню.
6) Якщо підтверджується, що підозрілі колонії – кишкова паличка, то встановлюють її колі-індекс та колі-титр.

Оформлення результатів роботи.

1. Представити результати кількісного обліку мікроорганізмів води у формі таблиці:

Зразок води	**Кількість бактерій на чашці Петрі**	**Кількість бактерій в 1 *мл* води**
Водогінна вода		
Артезіанська вода		
Річкова вода		

2. Підрахувати колі-титр та колі-індекс у досліджених зразках води. Результати занести до таблиці:

Тип зразка	Досліджений об'єм, *мл*	Кількість колі-морфних бактерій на фільтрі	Колі-титр	Колі-індекс
Водогінна вода	0,5			
	5			
	50			
	500			
Артезіанська вода	0,5			
	5			
	50			
	500			
Річкова вода	0,1			
	1			
	10			
	100			

Лабораторна робота №6.

Дослідження промислових мікроорганізмів.

Мета роботи. Ознайомитися із основними групами мікроорганізмів, які використовуються в біотехнологічних процесах.

Матеріали та обладнання: 1) чашки Петрі; 2) пробірки; 3) конічні колби об'ємом 250 мл; 4) градуйовані піпетки; 5) предметові скельця; 6) мікробіологічні петлі, гачки та шпателі; 7) 7-добова культура цвільового гриба *Aspergillus niger*; 8) 1-добові культури *Bacillus subtilis, Escherichia coli,* та *Ps. aeruginosa* в пробірках з МПА; 9) паперові диски з антибіотиками; 10) пробірки з *Actinomyces vulgaris* на рідкому середовищі; 10) фарбники: фуксин водний та метиленовий синій.

Мікроорганізми широко використовуються людиною в різних галузях промисловості:

- харчовій (виробництво кисломолочних продуктів, виробництво спирту, вина, пива, оцту, органічних кислот і т.п.);
- фармацевтичній (одержання пробіотиків, антибіотиків, вітамінів, ферментів, стероїдів);
- в процесах очищення стічних вод від важко деградабельних природних і синтетичних сполук.

Одержання промислових штамів мікроорганізмів – результат кропіткої роботи мікробіологів по його виділенню, селекції та підтримання в активному стані.

Різні молочнокислі продукти одержують при скисанні молока із додаванням відповідних заквасок, які являють собою певну суміш молочнокислих бактерій. Природне скисання молока здійснюють так звані “дикі штами”.

У виробництві спирту та пива зброджування субстрату здійснюють дріжджі.

Збудниками оцтовокислого бродіння є бактерії, які широко розповсюджені в природі. Вони зустрічаються в ґрунті, на поверхні фруктів та ягід. Їх легко виділити із слабоалкогольних напоїв, що забродили.

Мікроскопічні гриби є продуцентами різноманітних органічних кислот (молочної, лимонної, ітаконової, глюконової та ін.). Інтенсивність виділення кислот залежить від складу середовища.

Цвільові гриби роду *Penicillium* відомі як виробники антибіотику пеніциліну. Крім цвільових грибів антибіотичні речовини синтезують стрептоміцети, бактерії родів *Bacillus, Pseudomonas* та ін.

Продуцентів антибіотиків виділяють, вивчивши спершу явище антагонізму.

Деструктори важкодеградабельних органічних природних сполук (нафта, лігнін) і синтетичних сполук (похідні фенолу, синтетичні ПАР і т.п.) виділяють із відповідних стічних вод, активного мулу та з ґрунтів, які забруднені цими речовинами. Мікроорганізми-деструктори використовують для локальних установок по мікробіологічному очищенню деяких категорій стічних вод, для збагачення активного мулу та створення мікробних препаратів для очищення води.

Практичне завдання.

1. На знежирених предметних скельцях зробити мазки і порівняти молочнокислу мікрофлору з кефіру, кисляку, розсолу із кислих огірків або капусти. Замалювати мікрофлору зразків.
2. Визначити оптимальний склад середовища для утворення органічних кислот мікросокпічним грибом *Aspergillus niger*. Представити отримані результати у вигляді таблиці.
3. Поставити дослід для визначення антагонізму між культурами *B. subtilis, E. coli, A. vulgaris.*
4. Провести дослід для виділення мікроорганізмів-антагоністів із ґрунту.
5. Визначити чутливі до антибіотиків мікроорганізми методом паперових дисків.
6. Виявити мікроорганізми-деструктори СПАР в ґрунті та серед тест-культур.

Хід роботи.

1. Мазки з кефіру, кисляку і розсолу виготовляють за загальноприйнятим методом (див. лабораторну роботу № 2). Фарбують мазки метиленовим синім і розглядають під імерсійним об'єктивом мікроскопу. При мікроскопіюванні звертають увагу на співвідношення кокових та паличковидних бактерій в різних мазках, виявляють клітини дріжджів в мазках з кефіру. Після ретельного проглядання замальовують мікрофлору молочно-кислого бродіння.

2. Готують спорову суспензію гриба *A. niger* зі споровим навантаженням 1-2 млрд. спор/мл. Спорову суспензію слід готувати з використанням стерильного фізіологічного розчину, контролюючи кількість спор підрахунком в камері Горяєва за загальноприйнятим методом.

   В стерильні конічні колби ємністю 250 мл вносять по 100 мл рідкого середовища наступного мінерального складу (г/л):

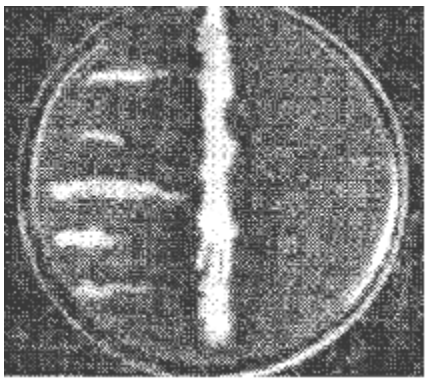
ü $NaNO_3$ –	2,0	
ü KH_2PO_4 –	1,0	
ü $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ –	0,5	pH =5,0–6,0
ü $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ –	0,5	
ü $FeCl_3$ –	0,03	

   В середовище додають сахарозу – до остаточної концентрації в середовищі: 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 г/л.

   Середовища з різною концентрацією сахарози (по 3 повторності) засівають стандартизованою споровою суспензією *A. niger*: 5 мл спорової суспензії на 100 мл середовища, після чого витримують їх в термостаті протягом 7 діб при $t^0 = 24 \pm 2\ ^0$C. Після формування на поверхні середовища щільної плівки грибного міцелію, культуральну рідину зливають та відтитровують 0,1 N *NaOH* для визначення її загальної кислотності. Титрування проводять до нейтральної реакції за універсальним індикатором. Середовище, де кислотність виявиться вищою, за вмістом цукру вважається оптимальним для утворення органічних кислот даною культурою.

3. Для **визначення антагонізму між різними культурами**, студенти одержують від викладача готові чашки Петрі із твердим стерильним середовищем і однодобові культури мікроорганізмів.

   3.1. Визначення антибіотичної активності мікробів-антагоністів методом перпендикулярних штрихів (рис. 19). Обережно, стерильним скальпелем на поверхні середовища біля краю чашки Петрі, роблять ринвичку, куди вносять культуральну рідину з пробірки, де попередньо вирощувався актиноміцет.



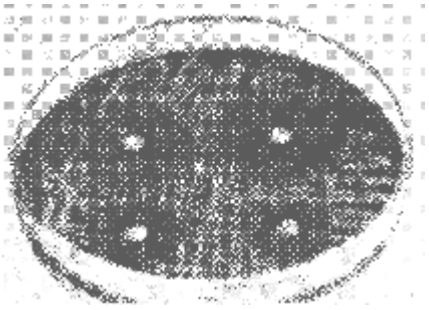
   Це роблять піпеткою, акуратно, щоб рідина потрапила саме у заглиблення в агарі. Після цього, перпендикулярно до ринви підсівають штрихом суспензії *B. subtilis* та *E. coli* ($1 \cdot 10^9$ клітин/мл), які студенти готують за допомогою бактеріального стандарта.

Рис. 19. Визначення антибіотичної активності мікробів-антагоністів методом перпендикулярних штрихів (за М.С. Єгоровим, 1965).

Чашки з посівами переносять у термостат і витримують 1–2 доби при t^0 = 37 ± 2 ^{0}C, після чого визначають наявність у культуральній рідині актиноміцета антибіотичних речовин. Якщо культуральна рідина, що продифундувала в товщу агару, містить антибіотичні для певної культури речовини, то саме ця чутлива бактерія не дасть росту по штриху в зоні дифузії. Студенти повинні відмітити, який із випробуваних тест-об'єктів виявився найбільш чутливим до дії актиноміцета.

3.2. Виділення мікроорганізмів-антагоністів із ґрунту. Чашки з МПА засівають газоном (за допомогою шпателя Дригальського) культурами ***E. coli*** та ***B. subtilis*** і вміщують в термостат на 1–2 доби. На газон, який виріс, розкладають шматочки свіжого ґрунту. Якщо в ґрунті є мікроорганізм-антагоніст, то його шматочки виявляються оточеними зонами лізису тест-культури. З цих зон виділяють і культуру мікроорганізму-антагоніста.

3.3. Визначення чутливості бактерій до різних антибіотиків (рис. 20). Чашки з МПА засівають суспензією культур ***B. subtilis, E. coli*** та ***St. aureus*** ($1 \cdot 10^9$ клітин/мл) і відразу ж після посіву на поверхню чашки накладають паперові диски, насичені розчинами антибіотиків (пеніциліну, левоміцетину, тетрацикліну). Через добу спостерігається добре виражені зони затримки росту чутливих культур навкруги деяких дисків, в той час як нечутливі до антибіотиків мікроорганізми ростуть безпосередньо навкруги дисків.



Студенти повинні виявити до яких антибіотиків нечутливі досліджувані тест-культури та виміряти діаметр зон відсутності росту.

Рис. 20. Визначення чутливості бактерій до різних антибіотиків

4. Для виявлення штамів-деструкторів синтетичних поверхнево-активних речовин потрібно приготувати рідке поживне середовище наступного складу (г/л):

ü NH_4Cl – 1,0 ü K_2HPO_4 – 0,7 ü KH_2PO_4 – 0,3 ü $NaCl$ – 0,1 ü $FeCl_3$ – 0,01 ü Додецилсульфат *Na* (*ДСН*) – 0,5	pH = 7,2

Середовище розливають у стерильні колби і вносять по 1 мл суспензії культур ***E.coli, Ps. aeruginosa, B. subtilis*** та 1 мл ґрунтової бовтанки окремо в кожну колбу. Колби вміщують в термостат і через 3 доби спостерігають, чи є серед випробуваних мікроорганізмів деструктори *ДСН*. Ефективну деструкцію визначають за відсутністю піноутворення в колбах і наявності мікробного росту. Якщо деструкція пройшла в колбі із ґрунтовою бовтанкою, із неї на чашки з агаризованим середовищем аналогічного складу висівають мікроби петлею методом виснажуючого штриха. Колонії, що сформуються на такому середовищі, будуть колоніями бактерій-деструкторів.

Оформлення результатів роботи:

1. В зошиті замалювати мікрофлору молочно-кислого бродіння (рис. 21).

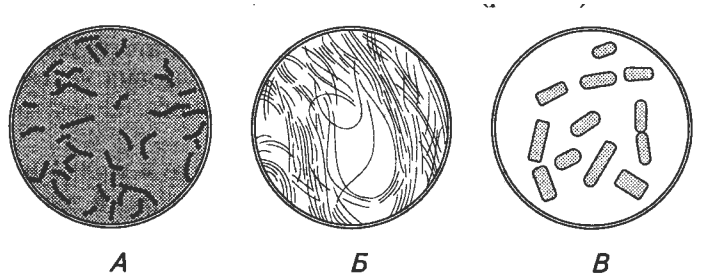


Рис. 21. Мікрофлора молочнокислого бродіння:
А – молочний стрептокок (Streptococcus lactis);
Б – болгарська паличка (Lactobacillus bulgaricus);
В – молочна цвіль (Oidium lactis).

2. В таблиці відмітити кількість 0,1 N *NaOH*, що пішло на титрування проб:

Вміст цукру в середовищі, *г/л*	**Загальна кислотність** (в *мл* 0,1 N *NaOH)*
0	
1	
5	
10	
20	
50	
100	
200	

Зробити висновок про оптимальну кількість сахарози для найліпшого кислотоутворення даною культурою.

3. Занести результати виявленої антибіотичної активності культур у таблицю:

Антагоніст	**Тест-культура**	**Розмір зони відсутності росту** (по штриху, ***мм***)
Actinomyces vulgaris	***B. subtilis***	
	E. coli	

Антибіотик	**Розмір зони затримки росту (*Æ , мм*)**	
	B. subtilis	***E. coli***
Пеніцилін		
Левоміцетин		
Тетрациклін		

4. Записати, який з досліджених мікроорганізмів виявився найбільш активним деструктором додецилсульфату натрію.

Л а б о р а т о р н а р о б о т а № 7 .

Фізіологічні групи мікроорганізмів. Накопичувальні культури.

Мета роботи. Навчитися виділяти з природних джерел в селективних умовах різні фізіологічні групи бактерій.

Матеріали та обладнання: 1) технічні терези; 2) pH-метр; 3) мікросокпи; 4) стерильний посуд: чашки Петрі, пробірки, колби, піпетки; 5) мікробіологічні петлі; 6) набори реактивів для приготування селективних середовищ; 7) реактив Неслера; 8) реактив Грисса; 9) зразки ґрунтів; 10) донний мул з акваріуму; 11) зразки річкової води; 12) сира нафта; 13) фільтрувальний папір.

Мікроорганізми відіграють глобальну роль у біосфері, беручи участь в розкладанні органічних речовин. Кругообіг головних біогенних елементів (*C, N, P, S*) пов'язаний з діяльністю мікроорганізмів.

Мікроорганізми, що здійснюють певний процес перетворення речовини, відносяться до однієї ***фізіологічної групи***. Одну фізіологічну групу можуть складати мікроби, що належать до різних таксонів. Так, наприклад, в фізіологічну групу азотфіксаторів входять аеробні види роду *Azotobacter*, симбіотичні з рослинами бульбочкові бактерії роду *Rhizobium* та анаеробні мікроорганізми, що належать до роду *Clostridium*.

Різні фізіологічні групи приймають участь в перетвореннях безазотових і азотвмісних органічних речовин та в перетвореннях неорганічних сполук.

Серед перетворювачів безазотових речовин відомі групи мікроорганізмів, які розкладають целюлозу, крохмаль, жири, а також збродджують різні природні сполуки до певних продуктів (спиртове, молочнокисле, оцтове, маслянокисле бродіння і т.д.).

Фізіологічні групи амоніфікаторів, нітріфікаторів, азотфіксаторів, денітрифікаторів забезпечують кругообіг азоту в природі.

Перетворення сірковмісних речовин здійснюють фізіологічні групи сульфатвідновлюючих бактерій і групи мікроорганізмів, здатних окислювати сірководень до сірки, а сірку – до сірчаної кислоти.

Окремі фізіологічні групи мікроорганізмів спеціалізуються на перетворенні неорганічних речовин (силікатів, сполук фосфору, заліза тощо).

Для виділення в лабораторних умовах мікроорганізмів, що належать до певної фізіологічної групи, користуються селективними середовищами. Склад такого „вибіркового" середовища забезпечує умови лише для росту необхідних досліднику бактерій, а супутня мікрофлора на них не розвивається.

За допомогою селективних умов можна створити ***культури накопичення*** певних груп бактерій. Так, якщо внести змішану популяцію бактерій (наприклад, ґрунтову бовтанку) в середовище, яке не містить джерел азоту, то в ньому не зможе розвиватися переважна більшість мікроорганізмів, а лише ті, що здатні фіксувати азот з повітря. Тобто – в цьому випадку накопичення азотфіксуючих бактерій буде обумовлене хімічним складом середовища.

Для селекції анаеробних бактерій культуру накопичення необхідно витримувати в безкисневих умовах, де не розвинуться аеробні форми.

Бактерії, що мешкають в кишковому тракті, можна накопичувати в середовищах при $t^0 = 41–42^0$C і в присутності жовчних солей, до яких, на відміну від інших бактерій, вони нечутливі і т.д.

Практичне завдання.

1. Приготувати селективне середовище для накопичення целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Визначити, які фактори зумовлюють селективність середовища.
2. Одержати накопичувальну культуру маслянокислих бактерій. Розглянути збудники бродіння під мікроскопом.
3. Зробити накопичувальну культуру для мікроорганізмів-нафтоокисників.
4. Приготувати селективне середовище Ешбі, для накопичення аеробних азотфіксуючих мікроорганізмів роду *Azotobacter*. Розглянути азотобактерії під мікроскопом.
5. Одержати накопичувальну культуру бактерій-амоніфікаторів. Перевірити виділення аміаку за допомогою реактиву Неслера.
6. Визначити наявність в зразках ґрунту і води денітрифікуючих бактерій.
7. На селективному середовищі Старкей накопичити і виявити сульфатредукуючі бактерій.

Хід роботи.

1. Для виділення аеробних целюлозоруйнівних бактерій готують рідке середовище на стерильній водопровідній воді, куди додають:

ü NH_4Cl – 0,1 %	pH = 7,0 – 7,2
ü K_2HPO_4 – 0,05 %	

Як єдине джерело вуглецю додаємо целюлозу у вигляді паперового фільтру. 50 мл приготованого середовища заливають у 3 конічні колби об’ємом 250 мл, на дно колби опускають складчатий паперовий фільтр (рис. 22). Середовище у колбах засівають грудками лісового, городнього та садового ґрунтів, після чого термостатують при $t^0 = 26–27^0$C впродовж 4–5 діб. Спостерігають за змінами фільтру. Поступово на папері на рівні рідини утворюються кольорові плями колоній целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Потім папір опадає та ослизнюється.

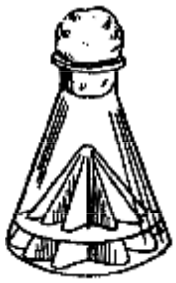


Рис. 22. Колба для вирощування аеробних бактерій, що розкладають клітковину.

Другий метод накопичення целюлозоруйнівних бактерій полягає в накладанні смужок фільтрувального паперу на зволожений ґрунт в чашках Петрі. Папір міцно притискають до ґрунту та слідкують, щоб ґрунт не пересихав. Через кілька діб на смужках целюлози розвивається целюлозоруйнівна мікрофлора. Міксобактерії *Mycococcus hutchinsonii* утворюють на папері жовті ослизнені зони, що повільно розповсюджуються по поверхні усієї смужки. *Sporocytophaga ellipsospora* утворює зони оранжевого кольору. Культури *Cellvibrio* більш сухі, швидше розмножуються та розкладають папір на окремі волокна.

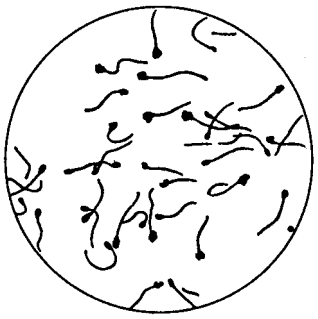


Рис. 23. Збудник розкладання целюлози (культура *Cellvibrio*).

2. **Маслянокисле бродіння** здійснюють спороносні анаеробні бактерії роду *Clostridium*. Їх можна легко виділити з ґрунту. Бактерії з роду *Clostridium* здатні фіксувати азот з повітря, тому джерело азоту в селективне середовище для їх вирощування можна не додавати. Для вирощення накопичувальної культури беруть бульбу картоплі, чистять, але не миють, розрізають її на невеличкі кубики, які вміщують у велику пробірку. В пробірку додають нестерильну водопровідну воду на 2/3 довжини і вносять трошки крейди (для нейтралізації оцтвової та масляної кислот, що утворюються). Пробірки термостатують при t^0 = 25–30^{0}С. Через 1–2 доби росту на поверхні шматочків картоплі відмічають плівку аеробних бактерій, а про початок бродіння свідчить виділення пухирців газу. Далі, по ходу підсилення процесу бродіння, виділяється багато піни та утворюється масляна кислота, яку виявляють за характерним неприємним запахом. Бактерії роду *Clostridium* розглядають при мікроскопії осаду – це довгі палички. Спороносні клітини мають вид веретена або барабанних паличок (така форма зумовлюється плектридіальним розміщенням спор) (рис. 24).

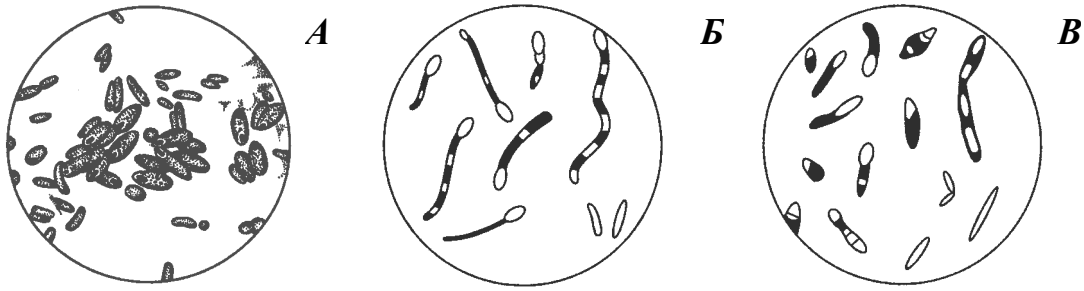


Рис. 24. Збудники маслянокислого бродіння: *А – Clostridium pasteurianum*; *Б – Clostridium pectinivorum*; *В – Clostridium felsinerum*.

3. Для одержання накопичувальної культури **нафтоокислюючих бактерій**, в підготовлені колби розливають середовище, в яке додають сиру нафту, як єдине джерело вуглецю та енергії. Склад середовища наступний, г/л:

- NH_4Cl – 1,0
- K_2HPO_4 – 1,0
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01
- $CaCl_2$ – 0,01
- *Мікроелементи*: *Mn, Mo, Cu, Co, Zn* (у вигляді неорганічних солей) – по 0,02–0,5 *мг* кожного
- *Сира нафта* – 0,5.

Середовище заражують активним мулом, або грудками ґрунту чи зразками води, що були забруднені нафтою та нафтопродуктами.

Колби вміщують у апарат для струшування і спостерігають за мікробним ростом протягом 7–10 діб. В тих зразках, де середовище стає каламутним – розвиваються нафтоокислюючі мікроорганізми.

4. Для одержання **азотфіксуючих бактерій** використовують селективне безазотне середовище Ешбі наступного складу, *г/л*:

- K_2HPO_4 – 0,2
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2
- $NaCl$ – 0,2
- K_2SO_4 – 0,1
- *глюкоза (*або *манніт)* – 20,0
- *крейда* – 5,0
- *агар*-агар – 20,0

Стерильне середовище Ешбі розливають в чашки Петрі. На поверхні застиглого середовища розкладають грудочки *родючого* ґрунту, після чого термостатують за t^0 = 25–28^{0}С. Через 4–5 діб навкруги деяких ґрунтових грудочок з'являються ослизненні колонії азотобактера. В тому випадку, коли колонії належать до виду *Azotobacter chroococcum,* вони з часом набувають бурого забарвлення. З колоній виготовляють мазок та розглядають його під мікросокопом.

5. Для накопичення **бактерій-амоніфікаторів** користуються середовищами, що містять білок або пептон. На водопровідній воді готують пептонну воду, додаючи

до неї 0,5% пептона та 0,5% *NaCl*. Середовище кип'ятять 15 хв., фільтрують, щоб воно було повністю прозорим, розливають в пробірки по 5–7 мл і стерилізують. В пробірки засівають ґрунтову бовтанку. Ознаками розвитку амоніфікуючих бактерій є помутніння середовища, утворення плівок, осаду і позитивна реакція на аміак з реактивом Несслера на 5–6 день культивування.

6. Для виявлення і накопичення **мікроорганізмів-денітрифікаторів** в м'ясо-пептонний бульон додають 0,5% KNO_3 та 1% агар-агар. Стерильне середовище розливають в пробірки і засівають їх зразками ґрунту, річкової або озерної води. Після засіву на поверхню середовища обережно заливають шар стерильного мінерального масла для того, щоб створити анаеробні умови для мікробів-денітрифікаторів. Пробірки вміщують в термостат та спостерігають за процесом відновлення нітрату. Ознаками процесу денітрифікації буде поява нітритів, азоту, можливо і аміаку.

   Наявність нітритів виявляють якісно з використанням реактиву Грисса, який при додаванні в культуральну рідину з нітратами дає червоне забарвлення. Інтенсивне газоутворення вільного азоту виявляється по розривам агаризованого середовища та збиранню пухирців на межі агар—масло.

7. При відновленні сульфатів, сірководень, що утворюється, із залізом дає чорний осад сульфіду заліза. Відновлення сульфатів протікає одночасно з окисленням органічних речовин (наприклад, жирних кислот).

   Виявлення і накопичення **сульфатредукуючих бактерій** проводять на рідкому середовищі Старкей, г/л:

   - NH_4Cl – 1,0
   - K_2HPO_4 – 0,5
   - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,0
   - Na_2SO_4 – 0,5
   - $CaCl_2$ – 0,1.
   - *60% молочнокислий Na* – 6,0 *мл.*

   Після стерилізації даного середовища в нього додають залізо у вигляді 10% розчину солі Мора. Сіль Мора додають по краплям, слідкуючи щоб в середовищі не почав випадати осад.

   В стерильні пробірки додають по 0,2–0,4 мл донного мулу, потім доливають їх до країв середовищем Старкей і перекривають стерильними гумовими корками. Пробірки витримують в термостаті при t^0 = 28–30^{0}С. При наявності в мулі сульфатредукуючих бактерій, через 2–3 доби середовище починає темніти (до

повного почорніння) внаслідок утворення сульфіду заліза і в пробірках відчувається характерний запах сірководню.

Оформлення результатів роботи.

Результати дослідження основних фізіологічних груп мікроорганізмів необхідно оформити у вигляді таблиці:

№ завдання	Тип середовища	Характер мікробного росту	Чим зумовлена селективність даного середовища
1.	***Для целюлозоруйнуючих мікроорганізмів***		
2.	***Для збудників масляно-кислого бродіння***		
3.	***Для нафтоокислюючих мікроорганізмів***		
4.	***Середовище Ешбі (для азотфіксуючих бактерій)***		
5.	***МПБ; пептонна вода (для бактерій-амоніфікаторів)***		
6.	***МПБ+KNO_3 (для мікроорганізмів-денітрифікаторів)***		
7.	***Середовище Старкей (для сульфатредукуючих бактерій)***		

Список рекомендованої літератури

1. *Андреюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін.* Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. – К.: Обереги, 2001. – 238 с.
2. *Антипчук А.Ф.* Водная микробиология. – К.: Кондор, 2005. – 256 с.
3. *Вершигора А.Е., Бранцевич Л.Г., Василевская И.А. и др.* Общая микробиология. – К.: Вища школа, 1988. – 343 с.
4. *Возная Н.Ф.* Химия и микробиология воды. – М.: Высшая школа, 1979. – 340 с.
5. *Голубовская Э.К.* Биологические основы очистки воды. – М.: Высшая школа, 1978. – 268 с.
6. *Гончарук В.В., Чернявская А.П., Жукинский В.Н. и др.* Экологические аспекты современных технологий охраны водной среды. – К.: Наукова думка, 2005. – 400 с.
7. *Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. – М.: Академия, 2003. – 464 с.
8. *Поздеев О.К.* Медицинская микробиология. – М.: ГЭОТАР-Мед., 2001. – 768 с.
9. *Радченко О.С., Степура Л.Г., Кривець І.О., Ставська С.С.* Очистка стічних вод: методичні рекомендації до спецпрактикуму «Очистка стічних вод». – К.: ВПЦ «Київський університет», 2005. – 35 с.
10. *Сергійчук М.Г.* Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження. – К., 2001. – 232 с.
11. *Шлегель Г.* Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 565 с.