

**Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка
Природничо-економічний факультет
Кафедра біології та екології**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ
ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З ДИСЦИПЛІНИ
«МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ВІРУСОЛОГІЯ»**

Кам'янець-Подільський – 2024

УДК 378.147.091.33:[579+578](075.8)
ББК 74.580.252.4+28я73

*Рекомендовано до друку вченою радою природничо-економічного факультету
Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка
(протокол № 3 від 28 березня 2024 року)*

Рецензенти:

Супрович Т.М., доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України ЗВО «Подільський державний університет»;

Любінська Л.Г., доктор біологічних наук, доцент, професор кафедри біології та екології Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка;

Гордій Н.М., кандидат біологічних наук, старший кафедри біології та екології Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка.

Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія»: навчально-методичний посібник / укладач В.А. Колодій. Кам'янець-Подільський : ФОП Гордукова І.Є., 2024. 60 с.

Методичні вказівки розроблені для здобувачів вищої освіти спеціальності 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини). У посібнику розміщено плани лабораторних занять, вказано поетапність їх виконання, визначені мета та матеріальне забезпечення.

Навчально-методичний посібник забезпечує самостійність здобувачів вищої освіти під час виконання робіт з мікробіології та вірусології передбачених робочою програмою.

Розробки лабораторних робіт можуть бути використані здобувачами вищої освіти інших спеціальностей, а також педагогами та учнями ліцеїв, гімназій, коледжів.

УДК 378.147.091.33:[579+578](075.8)
ББК 74.580.252.4+28я73
©Колодій В.А., 2024

ПЕРЕДМОВА

Навчальна дисципліна «Мікробіологія та вірусологія» – дисципліна циклу професійної підготовки бакалавра за спеціальностей 091 Біологія та 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини), обов'язкова компонента професійної підготовки.

Предметом вивчення навчальної дисципліни «Мікробіологія та вірусологія» є різноманіття мікроорганізмів, їх морфологічні, фізіологічні, біохімічні, генетичні, селекційні, систематичні та екологічні особливості, різноманітні методи та методики мікробіологічних досліджень, особливості метаболізму у різних груп мікроорганізмів, сучасний рівень і перспективи розвитку мікробіології в Україні та за її межами, сучасні методи досліджень в мікробіології та вірусології.

Метою дисципліни «Мікробіологія та вірусологія» є оволодіння здобувачами ВО сучасними знаннями з мікробіології та вірусології, які дадуть можливість майбутнім фахівцям застосовувати їх під час роботи; знаннями морфології і ультраструктури мікроорганізмів; їх процесами живлення, росту і розмноження; впливом на них чинників навколишнього середовища та взаємовідносини мікроорганізмів; знаннями про мікрофлору повітря, води, ґрунту; мікрофлору організму людини, тварин і рослин; патогенні мікроорганізми і небезпечні вірусні хвороби людини і тварин.

Здобувач освіти повинен знати: історію розвитку мікробіології та сучасний стан наукових досліджень; особливості будови та функціонування мікроорганізмів, структуру генетичного апарату прокариот та їх роль у процесах спадковості та мінливості; специфічні риси енергетичного та конструктивного метаболізму; особливості умов існування, форми взаємовідносин між мікро- та макроорганізмами з визначенням основних напрямів цих процесів; участь мікроорганізмів у кругообігу елементів; новітні принципи класифікації та ідентифікації прокариот; роль мікроорганізмів у народному господарстві, виникненні хвороб людини, тварин, рослин; способи боротьби з патогенною мікрофлорою; методи культивування та дослідження різних груп мікроорганізмів; методи визначення структурних та функціональних характеристик біологічних систем на різних рівнях організації.

Здобувач освіти повинен вміти: виготовляти прижиттєві та фіксовані препарати з мікробних культур та зафарбувати їх за методом Грама та Циль-Нільсена; вміти підготувати лабораторний посуд для стерилізації; виготовляти поживні середовища та стерилізувати їх; працювати в стерильних умовах; вміти проводити посів або пересів мікроорганізмів на живильні середовища, виділити чисту культуру мікроорганізмів та описати їх культуральні ознаки; виділяти мікроорганізми з об'єктів зовнішнього середовища; проводити вивчення фізіологічних властивостей різних груп мікроорганізмів з використанням елективних та диференційно-діагностичних середовищ; використовувати набуті знання для вирішення завдань викладання біології в середній школі та проведення експериментальних лабораторних досліджень.

Навчальна дисципліна «Мікробіологія та вірусологія» базується на знаннях курсів: «Основи наукових досліджень», «Цитологія та гістологія з основами

ембріології», «Основи медичних знань і безпека життєдіяльності», «Хімія», «Ботаніка», «Зоологія» та ін.

Вивчення дисципліни спрямоване на формування наступних компетентностей.

Інтегральна компетентність:

Здатність розв'язувати складні спеціалізовані завдання та практичні проблеми у галузі середньої освіти або у процесі навчання, що передбачає застосування теорій та методів біології, географії, освітніх наук, і характеризується комплексністю та невизначеністю педагогічних умов організації освітнього процесу в закладах загальної середньої освіти.

Загальні компетентності:

✓ Здатність застосовувати набуті знання в практичних ситуаціях.

✓ Здатність вчитися і оволодівати сучасними знаннями.

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності:

✓ Здатність оперувати біологічними поняттями, законами, концепціями, вченнями і теоріями біології для пояснення та розвитку в учнів розуміння цілісності та взаємозалежності живих систем і організмів.

✓ Здатність розкривати загальну структуру біологічної науки, сутність біологічних явищ, процесів і технологій та розв'язувати біологічні задачі.

✓ Здатність характеризувати досягнення біологічної науки та її роль у житті суспільства для збереження біорізноманіття.

✓ Здатність розуміти та вміти пояснити будову, функції, життєдіяльність, розмноження, класифікацію, походження, поширення, використання живих організмів і систем усіх рівнів організації.

✓ Здатність розуміти основи цілісної природничо-наукової картини світу через міжпредметні зв'язки.

✓ Здатність здійснювати безпечні біологічні дослідження в лабораторії та природних умовах, інтерпретувати результати досліджень.

✓ Здатність до комплексного планування, організації та здійснення навчальних проєктів, підготовки аналітичної звітної документації, презентацій.

Здобувачі вищої освіти мають отримати наступні програмні результати:

✓ Володіти біологічною термінологією, номенклатурою, вільно оперувати нею.

✓ Знати та розуміти основні концепції, теорії та загальну структуру біологічної науки, основні етапи її розвитку.

✓ Знати будову та основні функціональні особливості підтримання життєдіяльності живих організмів.

✓ Знати будову й функції організму людини, основи здорового способу життя.

✓ Виконувати експериментальні польові та лабораторні дослідження з біології, інтерпретувати результати досліджень.

✓ Володіти біологічною термінологією, номенклатурою, вільно оперувати нею.

Максимальний бал оцінки поточної успішності здобувачів ВО на навчальних заняттях – 12 (https://drive.google.com/file/d/1aD_jeL-

jGRbDW AegkQ58tdMxxbqQKuff/view).

Здобувачу ВО, який не виконав поточних завдань, не підготувався до навчальних занять, в журнал обліку роботи академічної групи ставиться 0 балів.

Здобувач ВО, знання, уміння і навички якого на навчальних заняттях за 12-бальною шкалою оцінено від 1 до 3 балів, вважається таким, що недостатньо підготувався до цих занять і має академічну заборгованість за результатами поточного контролю. Поточну заборгованість, пов'язану з непідготовленістю або недостатньою підготовленістю до навчальних занять, студент повинен ліквідувати. За ліквідацію поточної заборгованості нараховуються бали середнього (4, 5, 6), достатнього (7, 8, 9) та високого рівня (10, 11, 12).

Критерії оцінювання знань, умінь, навичок здобувачів вищої освіти

Рівні навчальних досягнень	Оцінка в балах	Критерії оцінювання
Початковий (понятійний)	1	Здобувач ВО володіє навчальним матеріалом на рівні засвоєння окремих термінів, фактів без зв'язку між ними: відповідає на запитання, які потребують відповіді „так” чи „ні”.
	2	Здобувач ВО не достатньо усвідомлює мету навчально-пізнавальної діяльності, робить спробу знайти способи дій, розповісти суть заданого, проте відповідає лише за допомогою викладача на рівні „так” чи „ні”; може самостійно знайти в підручнику відповідь.
	3	Здобувач ВО намагається аналізувати на основі елементарних знань і навичок; виявляє окремі закономірності; робить спроби виконання завдань репродуктивного характеру; за допомогою викладача виконує прості завдання за готовим алгоритмом.
Середній (репродуктивний)	4	Здобувач ВО володіє початковими знаннями, здатний виконати завдання за зразком; орієнтується в термінах, поняттях; самостійне опрацювання навчального матеріалу викликає значні труднощі.
	5	Здобувач ВО розуміє суть навчальної дисципліни, може дати визначення понять, категорій (однак з окремими помилками); вміє працювати з підручником, самостійно опрацьовувати частину навчального матеріалу; виконує прості завдання за алгоритмом, але окремі висновки є нелогічними та непослідовними.
	6	Здобувач ВО розуміє основні положення навчального матеріалу, може поверхнево аналізувати факти, явища, робить певні висновки; відповідь може бути правильною, проте недостатньо осмисленою; самостійно відтворює більшу частину матеріалу; вміє застосовувати знання під час виконання лабораторних завдань за алгоритмом, послуговуватися додатковими джерелами.
Достатній (алгоритмічно дієвий)	7	Здобувач ВО правильно і логічно відтворює навчальний матеріал, оперує базовими поняттями, встановлює причинно-наслідкові зв'язки між ними; вміє наводити приклади на підтвердження певних думок, застосовувати теоретичні знання у стандартних ситуаціях; самостійно користуватися додатковими джерелами; правильно використовувати термінологію; складати таблиці, схеми.

	8	Знання здобувача ВО досить повні, він вільно застосовує вивчений матеріал у стандартних ситуаціях; вміє аналізувати, робити висновки; відповідь повна, логічна, обґрунтована, однак з окремими неточностями; вміє самостійно працювати, може підготувати реферат і обґрунтувати його положення.
	9	Здобувач ВО вільно володіє вивченим матеріалом, застосовує знання у дещо змінених ситуаціях, вміє аналізувати і систематизувати інформацію, робить аналітичні висновки, використовує загальновідомі докази у власній аргументації; чітко тлумачить предметні поняття, категорії; може самостійно опрацьовувати матеріал, виконує прості творчі завдання; має сформовані типові навички.
Високий (творчо-професійний)	10	Здобувач ВО володіє глибокими і міцними знаннями та використовує їх у нестандартних ситуаціях; може визначати особливості процесів, фактів, явищ; робить аргументовані висновки; практично оцінює сучасні здобутки навчання екології; самостійно визначає мету власної діяльності; виконує творчі завдання; може сприймати іншу позицію як альтернативну; використовує знання, аналізуючи різні явища, процеси.
	11	Здобувач ВО володіє узагальненими знаннями з навчальної дисципліни, аргументовано використовує їх у нестандартних ситуаціях; вміє знаходити джерела інформації та аналізувати їх, ставити і розв'язувати проблеми, застосовувати вивчений матеріал для власних аргументованих суджень у практичній діяльності (диспути, круглі столи тощо); спроможний за допомогою викладача підготувати виступ на студентську наукову конференцію; самостійно вивчити матеріал; визначити програму своєї діяльності.
	12	Здобувач ВО має системні, дієві знання, виявляє неординарні творчі здібності в навчальній діяльності; використовує широкий арсенал засобів для обґрунтування та доведення своєї думки; розв'язує складні проблемні ситуації та завдання; схильний до системно-наукового аналізу та прогнозу явищ; уміє ставити і розв'язувати проблеми, самостійно здобувати і використовувати інформацію; займається науково-дослідною роботою; логічно та творчо викладає матеріал в усній та письмовій формі; розвиває свої здібності й схильності; використовує різноманітні джерела інформації; моделює ситуації в нестандартних умовах.

Рейтингова оцінка у балах (r_k) знань, умінь і навичок здобувача вищої освіти на навчальних заняттях із навчальної дисципліни обчислюється після проведення навчальних занять та ліквідації поточної заборгованості, пов'язаної із пропусками занять, непідготовленістю або недостатньою підготовленістю до них, за такою формулою:

$$r_k = (0,05r_k^c + 0,4) * R_k,$$

де r_k^c – середня оцінка навчальної діяльності здобувача на заняттях, тобто частка від ділення суми всіх (позитивних від 4 до 12) оцінок на їх кількість, R_k – максимально можливий бал оцінювання результатів навчальної діяльності з дисципліни чи змістового модуля.

Лабораторне заняття 1

ТЕМА: ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ОБЛАДНАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА РОБОТИ, ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ.

Мета: ознайомити студентів зі структурою та обладнанням мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки в лабораторії та правилами роботи.

Матеріальне забезпечення: обладнання лабораторії, лабораторний посуд, пробірки та чашки Петрі з культурами бактерій, таблиці.

Вступні пояснення

Мікробіологічна лабораторія – це самостійна структурна одиниця в системі медичної і санітарної служби району, області, країни. Основне завдання лабораторії – діагностика інфекційних захворювань людини та визначення санітарно-показових норм мікробіологічного забруднення об'єктів зовнішнього середовища.

Матеріалом для мікробіологічних досліджень служать кров, сироватка крові, молоко, сеча, фекалії, проби води, повітря, ґрунту, рослин.

Нормативні документи, у яких викладені обов'язкові норми з лабораторної діагностики містяться у законодавстві.

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає того, щоби приміщення, яке відведено під лабораторію, було ізольоване від житлових будинків, харчових складів, проїжджих доріг.

У лабораторії передбачають такі окремі ізольовані приміщення (кімнати):

1. Кімната, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів.
2. Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – бокс.
3. Автоклавна – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та живильних середовищ.
4. Мийна кімната.

Мікробіологічна лабораторія повинна бути укомплектована приладами й обладнанням, необхідним для роботи з різними групами мікроорганізмів з урахуванням особливостей їх біології, а також для проведення дослідів і виконання мікробіологічних аналізів різних матеріалів

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю повинен складатися з: автоклава (прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів), сухо-жарової шафи (прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду), термостата (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростата (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), ламінару (прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів), водяної бані, люмінесцентної камери для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, терезів, електричних шейкерів; мікробіологічних пробірок, колб, циліндрів різної форми й об'єму, піпеток різного об'єму, чашок Петрі різного діаметра, скляних лійок, предметних скелець з лункою та без – всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла, оскільки підлягають нагріванню; бактеріальних петель,

голок, шпателів металевих і скляних; ватно-марлевих та гумових пробок; засобів для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо). Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

Основне обладнання лабораторії: мікроскопи різних типів, термостати, сушильні шафи, автоклави, водяні бані, анаеростати, центрифуги, апарати Коха, дистилятори.

Завдання 1. Ознайомитися з будовою мікробіологічної лабораторії та приладами, які є у навчальній лабораторії та заповнити робочий зошит.

Особливістю бактеріологічної роботи є те, що людина постійно знаходиться у контакті зі збудниками захворювань, заразним матеріалом та хворими людьми. Тому співробітники повинні дотримуватись правил техніки безпеки, що запобігають зараженню працівника і розповсюдженню інфекції за межі лабораторії.

У навчальній мікробіологічній лабораторії здобувачі вищої освіти мають працювати за такими правилами:

Правила роботи і поведінки у лабораторії.

1. У приміщення лабораторії не дозволено входити без спецодягу.
2. Не дозволяється вносити у лабораторію сторонні речі.
3. У лабораторії забороняється палити, приймати їжу, зберігати продукти харчування.
4. Працювати на закріпленому за студентом місцем.
5. При виконанні бактеріологічних робіт необхідно суворо слідкувати за чистотою рук.
6. Всі посіви мають бути підписані.
7. Використані предметні скельця, мірні та пастерівські піпетки помістити в дезінфікуючий розчин.
8. Усі відпрацьовані матеріали ставити на спеціальний кювет для подальшого знешкодження.
9. При попаданні досліджуваного матеріалу на поверхню столу або руки повідомити викладача і під його контролем провести дезінфекцію.

Завдання 2. Записати правила роботи і поведінки у навчальній лабораторії мікробіології, заповнити журнал з техніки безпеки.

Збудники інфекційних захворювань за ступенем небезпеки для людини поділяють на 5 груп:

Група 1. Збудник чуми.

Група 2. Збудники холери, лептоспірозу, бруцельозу, туляремії, сибірки, сапу, мелоїдозу, епідемічного висипного тифу, епідемічних енцефалітів, гемарогічних лихоманок, гарячки Ку, лихоманки скелястих гір, орнітозів, гістоплазмозу, кокцидіозів, сказ, токсин ботуліновий.

Група 3. Збудники бактерійних (черевний тиф, дизентерія, дифтерія, туберкульоз), вірусних (поліомієліт, кір, грип, СНІД), рикетсіозних (захворювань), найпростіших (малярія, лейшманіоз), грибкових (актиномікоз, дерматомікози, бластомікоз).

Група 4. Збудники токсикоінфекцій та гострих бактеріальних отруень (сальмонели, стафілококи, вібріони, клостридії), ентеритів (ешеріхії, ентеро- та аденовіруси), септицемій і пневмоній (стафілококи, стрептококи, синьогнійна паличка).

Група 5. Облігатна непатогенна мікрофлора слизових покривів людей та тварин, а також мікроорганізми-показники санітарного стану зовнішнього середовища (ешеріхії, ентерококи, клостридії).

Роботу з культурами 1-ої та 2-ої груп можна проводити тільки з дозволу обласної режимної комісії СЕС.

Роботу зі збудниками 3-ої групи виконують відповідно з правилами техніки безпеки, виробничої санітарії та індивідуальної гігієни бактеріологічних лабораторій.

Робота з збудниками 4-ої та 5-ої груп вимагає додержання звичайного режиму роботи бактеріологічної лабораторії, який забезпечує надійний захист персоналу лабораторії від внутрішньолабораторних заражень у процесі самих досліджень і запобігає розповсюдженню інфекції за межі лабораторії.

Порядок зберігання культур. Культури мікроорганізмів зберігають у пробірках на щільних середовищах або в ампулах у ліофільному стані. Культури зберігають у холодильниках або у сейфах. Холодильники, сейфи з культурами 1-ої, 2-ої та 3-ої груп по закінченню робочого дня закривають на ключ та пломбують.

Облік культур та матеріалів. Усі культури мікроорганізмів 1-5 груп, які знаходяться в лабораторії, підлягають обов'язковій реєстрації у спеціальних журналах, сторінки яких пронумеровані, прошнуровані і закріплені сургучною печаткою. Культури збудників захворювань 1-2 груп і заражені ними тварини враховуються по кожному виду збудника окремо, мікроби 3-4 груп враховуються сумарно по кожному роду збудника. Мікроорганізми 5 групи спеціальному обліку не підлягають. Реєстрація їх ведеться в робочих журналах.

У навчальній мікробіологічній лабораторії дозволяється працювати з мікроорганізмами, що належать до 5 групи.

Завдання 3. Вивчити порядок зберігання патогенних культур у лабораторії. Класифікацію збудників інфекційних хвороб за небезпекою для людини. Заповнити табл. 1.

Таблиця 1

Класифікацію збудників інфекційних хвороб за небезпекою для людини

№ з/п	Група	Збудники
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		

Мікробіологічний словник: автоклав, мікроанаеростат, сухо-жарова шафа (піч Пастера), термостат, бактеріальна петля, чашка Петрі.

Контрольні запитання

1. Перелічіть вимоги до розташування мікробіологічних лабораторій.
2. Назвіть кімнати, з яких повинна складатися мікробіологічна лабораторія.
3. Охарактеризуйте завдання, які виконує мікробіологічна лабораторія.
4. Проаналізуйте обладнання, яке повинно бути у мікробіологічній лабораторії.
5. Перелічіть правила роботи і поведінки у мікробіологічній лабораторії.
6. Назвіть перелік груп мікроорганізмів по небезпеки для людини.
7. Перелічіть вимоги до зберігання та обліку культур мікроорганізмів.

Лабораторне заняття 2

Тема: БУДОВА СВІТЛОВОГО ТА ЕЛЕКТРОННОГО МІКРОСКОПІВ. МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ.

Мета: ознайомити здобувачів вищої освіти з будовою світлового та електронного мікроскопів, опанувати методiku роботи світлового мікроскопа у імерсійній системі. Вивчити різні форми бактерій по таблицях, діапозитивах, мазках-препаратах.

Матеріальне забезпечення: мікроскопи, зафарбовані мазки з різними формами бактерій, таблиці, слайди, імерсійна олія.

Вступні пояснення

Мікроскоп – оптичний прилад, призначений для вивчення об'єктів, які невидимі для неозброєного ока. В мікробіологічній практиці мікроскоп використовують для вивчення форми та будови клітин мікроорганізмів, спостереження за їх ростом і розвитком. Як відомо, конструкція світлового мікроскопа складається з механічної частини (основа мікроскопа, предметний столик, тубусотримач (штатив), тубус, кронштейн для конденсора, револьвер об'єктивів, гвинт для переміщення конденсора, рукоятки мікро- та мікрометричних гвинтів, клеми), оптичної частини (окуляр, об'єктиви, конденсор) і системи освітлення (дзеркало або освітлювач). Окуляри мікроскопа складаються з двох лінз і відрізняються збільшенням (7х, 10х, 15х), яке обирають в залежності від об'єкта дослідження. Об'єктиви – багатолінзові системи, в яких нижня лінза (фронтальна, та, що звернута до об'єкта) дає збільшення, а інші лінзи використовуються для корекції зображення. Найчастіше у мікробіологічній практиці використовують: 8х (10х) – мале збільшення, 40х (60х) – середнє збільшення і 90х (100х) – велике збільшення. Чим більше збільшення об'єктива, тим менше повинна бути відстань від об'єкта до фронтальної лінзи (наприклад, 13,8 мм для 8х і 0,12мм для 90х). Об'єктиви, в яких між фронтальною лінзою й об'єктом є повітря, називаються сухими, при роботі з ними частина світлових променів відхиляється та не попадає в око через різницю коефіцієнтів заломлення скла та повітря. Для зменшення кількості відхилених променів (і водночас покращення зображення об'єкта) використовують імерсійні системи з об'єктивами, фронтальну лінзу яких можна занурювати в імерсійну рідину; такі об'єктиви мають чорну стрічку на металевій оправі. Імерсійні рідини (гліцерин,

кедрове, вазелінове або терпенове масло) мають коефіцієнти заломлення, наближені до показника заломлення скла.

Найважливішими характеристиками мікроскопа є:

1) збільшення – здатність розсівати промені, що йдуть від об'єктиву. Воно визначається відношенням лінійних розмірів зображення до лінійних розмірів об'єкту. Збільшення залежить від кривизни лінзи – чим більше кривизна, тим більше збільшення. Загальне збільшення мікроскопа визначається добутком збільшень об'єктиву і окуляра. При цьому треба пам'ятати, що об'єктив збільшує об'єкт, що вивчається, а окуляр – зображення, отримане за допомогою об'єктиву, не додаючи до нього нових деталей, не виявлених об'єктивом;

2) якість зображення – характеризується чіткістю зображення і залежить від ступеня виправлення основних оптичних недоліків лінзи – сферичної і хроматичної аберації.

Сферична аберация – сильніше заломлення променів, що йдуть через периферичні зони лінзи в порівнянні з тими, що пройшли через її центральні ділянки. В результаті сферичної аберації зображення деталей об'єкту стає нечітким, розпливчатим. Зменшити сферичну аберацию можна шляхом підбору розсіюючих і збірних лінз різних по кривизні.

Хроматична аберация – розкладання променів білого кольору на спектр, унаслідок неоднакового заломлення променів з різною довжиною хвилі. Для цього виду аберації характерне спотворення кольору і зменшення чіткості зображення. Виправлення хроматичної аберації можливе при поєднанні лінз, виготовлених з різних видів оптичного скла, що мають неоднакові показники заломлення. Цей принцип використовується при конструюванні об'єктивів мікроскопа. У зв'язку з цим розрізняють ахроматичні системи з меншим ступенем виправлення хроматичної аберації і апохроматичні, де остання виправлена більшою мірою.

Інші види аберації – астигматизм, дисторсія мають менше значення в практиці мікроскопування;

3) роздільна здатність – характеризує здатність лінз давати роздільне зображення найбільш дрібних деталей об'єкту. Межа дозволу – це найменша відстань між двома точками об'єкту, при якому вони сприймаються роздільно. Роздільна здатність для світлового мікроскопа приблизно рівна половині довжини хвилі джерела світла і складає приблизно 0,2 мкм.

Електронний мікроскоп дає можливість отримати зображення об'єктів, величина яких в середньому має близько 0,1-0,7 нм. Така висока роздільна здатність пояснюється застосуванням електронних променів.

Джерелом електронів є електронна лампа без оболонки. Вольфрамова нитка катода під впливом нагрівання випромінює потік електронів, який прямує в тубус. В умовах вакууму електронні промені в магнітному полі поведуться подібно до променів видимого світла в скляній призмі. Тому електромагніти електронного мікроскопа називають лінзами. Розрізняють конденсорну, об'єктивну і проєкційну лінзи. Між конденсором і об'єктивом поміщають об'єкт. Електронний пучок спочатку фокусується конденсорною магнітною лінзою. Велика частина електронів, проходячи через об'єкт, фокусується другою

магнітною лінзою – об'єктивною, яка дає збільшене зображення об'єкту. Це зображення збільшується третьою магнітною лінзою – проєкційною. Електрони, які проходять через об'єкт, викликають свічення екрану, покритого люмінофором, проводячи на нім зображення об'єкту, тобто зображення виходить на люмінесцентному екрані. Його фотографують і, таким чином, предметом вивчення є електронна мікрофотографія. За допомогою електронного мікроскопа стало можливим вивчення ультраструктури клітин і їх похідних, макромолекул, вірусів і ін. субмікроскопічних утворень.

Перший електронний мікроскоп був збудований в 1931 році німецькими інженерами Ернестом Рускою і Максом Кнолем. Ернест Руска отримав за це відкриття Нобелівську премію з фізики в 1986 році.

В даний час існують два типи електронних мікроскопів:

- растровий електронний мікроскоп;
- просвічуючий електронний мікроскоп.

Так звані растрові (скануючі) електронні мікроскопи дозволяють отримати об'ємне зображення об'єктів, що вивчаються. Растровий електронний мікроскоп працює за принципом сканування електронним мікрозондом досліджуваного об'єкту, тобто послідовно «обмацувати» сфокусованим електронним променем окремі точки поверхні.

Головною перевагою растрової електронної мікроскопії є велика глибина різкості, широкий діапазон безперервної зміни збільшення і висока роздільна здатність.

Електронний мікроскоп, що просвічує, дозволяє отримати плоске зображення досліджуваного об'єкту.

Мікроскопія бактеріальних препаратів в імерсійній системі. У сучасних оптичних мікроскопах розподільна здатність об'єктивів дорівнює 0,0002 мм (0,2 мкм). Зафарбовані препарати розглядаються з використанням імерсійного об'єктиву MI-90. Для створення однорідного оптичного середовища наносять краплю імерсійної олії між фронтальною лінзою об'єктиву і препарату. Макроскопічним гвинтом об'єктив обережно занурюють в олію, спостерігаючи збоку. Дивлячись в окуляр проводять грубе фокусування, а мікрогвинтом – остаточне фокусування препарату.

Морфологія бактерій – це зовнішній вигляд бактерій, це те, що ми бачимо у мікроскоп.

Бактерії (лат. *bacteria* – паличка) – це одноклітинні прокаріотичні мікроорганізми розміром 0,1-28 мкм, які часто утворюють специфічні угруповання. За зовнішнім виглядом (морфологією) бактерії поділяються на такі основні групи: кулясті (коки), паличкоподібні, звивисті.

За характером поділу та розміщення розрізняють такі *коки*:

- мікрококи (розміщуються поодинокі, безладно), спричинюють запальні процеси;
- диплококи (розміщуються попарно, мають форму бобів),
- тетракоки розміщуються по чотири),
- сарцини (розміщені скупченнями по 18-32),

- стафілококи (розміщені у вигляді китиці винограду),
- стрептококи (розміщені короткими або довгими ланцюжками).

Палички, що не утворюють спор (аспорогенні), називають просто бактеріями (збудники дифтерії, чуми, кишкових захворювань).

Серед них розрізняють:

- коринобактерії (розширені на кінцях – *Corynebacterium diphtheriae*),
- фузобактерії (звужені на кінцях – *Fusobacterium necrophorum*).

Спорогенні палички, що живуть в аеробних умовах і утворюють спори, діаметр яких менший за діаметр клітини, називають бацилами (збудник сибірки).

Спорогенні анаеробні палички, які утворюють спори, діаметр яких більший за діаметр клітини і розташовані центрально, субтермінально і термінально, називають клостридіями. В залежності від розташування спори за формою вони нагадують барабанну паличку, веретено або тенісну ракетку (збудники правця, ботулізму, газової анаеробної інфекції).

Звивисті розподіляються на вібріони (мають вигляд коми), спірили (клітини мають 1-6 завитків), спірохети (мають більше 6 завитків).

Бактерії, які мають «незвичайну» форму клітини: тороїдні (форма зімкнутого або розімкнутого кільця); простекобактерії (мають вирости клітини); зіркоподібні, трикутні, квадратні. Також до незвичайних форм бактеріальних клітин можна віднести стебельцеві бактерії (рід *Caulobacter*), або бактероїди групи *Rhizobium* – V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

Монобактерії розміщуються хаотично (більшість бактерій), диплобактерії, або диплобацили, – попарно, стрептобактерії, або стрептобацили, – ланцюжком.

Короткі палички (кокобактерії) мають розміри до 1 мкм (збудники коклюшу, бруцельозу, туляремії), довгі – понад 3 мкм (клостридії, кишкові палички та ін.).

Завдання 1. Доповніть речення:

До механічної частини світлового мікроскопа належать.....

До оптичної частини світлового мікроскопа належать.....

Максимальне збільшення світлового мікроскопа складає.....

Мінімальне збільшення світлового мікроскопа складає.....

Обмеження розподільного збільшення залежить від.....

Завдання 2. Опанувати техніку мікроскопії в імерсійній системі.

1. Підготуйте мікроскоп до роботи.

2. Розгляньте зафарбовані мазки з різними формами бактерій в імерсійній системі мікроскопу.

3. Схематично зобразіть морфологічні форми мікроорганізмів.

Мікробіологічний словник: світловий мікроскоп, електронний мікроскоп, роздільна здатність, морфологія бактерій, мікрококи, диплококи, тетракоки, сарцини, стафілококи, стрептококи, коринобактерії, фузобактерії, бацили, клостридії.

Контрольні питання.

1. Перелічіть складові світлового мікроскопу.

2. Назвіть механічні частини мікроскопа: будову, призначення.

3. Охарактеризуйте оптичні частини мікроскопа: будову, призначення.

4. Вкажіть на особливості освітлювальний апарат мікроскопа: будову дзеркала і конденсора.
5. Дайте коротку характеристику основним властивостям лінз мікроскопа. Види аберації.
6. Назвіть види об'єктивів і окуляра, їх особливості.
7. Обґрунтуйте необхідність визначення збільшення і роздільної здатності мікроскопа.
8. Поясніть принцип роботи електронного мікроскопів
9. Охарактеризуйте особливості дослідження бактерій в імерсійній системі мікроскопа.
10. Назвіть форми бактерій за їх зовнішніми ознаками.
11. Розкажіть про будову бактеріальної клітини.

Лабораторне заняття 3

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ РУХЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ.

Мета: оволодіти методикою мікроскопічного дослідження бактерій у нативному (непофарбованому) вигляді, визначення рухливості у бактерій.

Матеріальне забезпечення: пробірки з сумішшю мікроорганізмів, імерсійна олія, предметні скельця, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, дезінфікуючий розчин (5% фенол) для предметних скелець, мікроскопи світлові.

Вступні пояснення

Мікроскопічне дослідження нативних (нефіксованих, непофарбованих) бактерій дозволяє охарактеризувати їх морфологічні особливості, не модифіковані під час фіксації (що інколи трапляється), та визначити їх здатність рухатися.

Значна кількість бактерій здатна активно рухатись завдяки наявності у них джгутиків – особливих циліндричних ниткоподібних структур, що відходять від базальних тілець цитоплазматичної мембрани. Довжина джгутиків значно перевищує величину мікробної клітини. Джгутики досить тонкі (0,03-0,06 мкм), і їх не видно у звичайному світловому мікроскопі, роздільна здатність якого становить 0,2 мкм. До складу джгутиків входить особливий білок флагелін, який є повноцінним антигеном і відрізняється від соматичних антигенів клітини.

Залежно від кількості джгутиків бактерії поділяють на: монотрихи – мають один джгутик на полюсі клітини; лофотрихи – мають пучок джгутиків на одному з кінців клітини; амфітрихи – являють собою перехідну форму і містять по одному джгутику або їх пучку на кожному полюсі; перитрихи – джгутики розміщено по всій поверхні мікробної клітини.

Завдання 1. Замалюйте у зошит схематичне розташування джгутиків на поверхні клітини.

Джгутики погано сприймають барвники, тому в лабораторних умовах використовують спеціальні методи фарбування (сріблення за Морозовим чи ін.). Проте з метою визначення рухливості частіше мікроскопують нативні

непофарбовані препарати. Для цього готують препарат «роздавлена крапля» або ж препарат «висяча крапля».

Для дослідження на рухливість підходять молоді (18-20 год) бульйонні культури або конденсат агарових культур. Як виняток, можна обережно суспендувати у фізіологічному розчині бактеріальну масу, вирощену на щільному середовищі, а одержану суспензію використати для дослідження бактерій на рухливість. Слід мати на увазі те, що вирощені на щільному середовищі деякі здатні до руху бактерії можуть її тимчасово втрачати та поновлювати при культивуванні на рідкому середовищі. На інтенсивність руху бактерій може впливати температура. Тому бажано предметне скло перед отриманням препарату злегка підігріти.

Методика «роздавлена крапля». Для приготування препарату «роздавлена крапля» краплю культури наносять на предметне скло, накривають покривним скельцем так, щоб рідина не вийшла за його межі.

Методика приготування препарату «висяча крапля». Краплю досліджуваної культури наносять на покривне скельце. Беруть спеціальне предметне скло з лункою. Краї лунки змащують вазеліном, а скло спрямовують лункою донизу, в напрямку краплі, (орієнтуючись таким чином, щоб крапля розмістилась у центрі лунки, злегка притискають і зразу ж перевертають.

Порядок дослідження препаратів обох типів у світловому мікроскопі.

1. Установлюють об'єктив малого збільшення (x8) і рівномірно освітлюють поле зору.

2. Опускають наполовину конденсор і злегка прикривають діафрагму.

3. Знаходять край краплі (має вигляд ламаної лінії), по один бік цього краю є багато дрібнесеньких краплинок конденсату, які осіли на внутрішній поверхні покривного скельця. По другий бік лінії видно рівномірний сіруватий фон. Це і є крапля. Знайдений край краплі переміщують у центр поля зору мікроскопа.

4. Переходять на сильніший сухий (x40), а при потребі й на імерсійний об'єктив (x90) і зміщують її до центру поля зору.

При цьому видно, що бактерії рухаються в різних напрямках з різною швидкістю. Справжній рух слід відрізнити від броунівського, зумовленого переміщеннями молекул рідини. У цьому випадку бактерії немовби «товчуться» на місці. Якщо столик мікроскопа стоїть нерівно, то всі бактерії рухаються в одному напрямку з однаковою швидкістю.

Завдання 1. Приготуйте препарат «висяча крапля» і замалуйте поле зору у мікроскопі.

Для збільшення контрастності досліджуваних об'єктів в надавленій чи висячій краплях можна застосувати прижиттєве забарвлення. Для цього використовують малотоксичні й майже нешкідливі барвники: метиленовий і толуїдиновий синій, конго і нейтральний червоний, акридиновий оранжевий, янус зелений та ін.

Для цього суспензію мікробів вносять у краплю 0,001 % водного розчину барвника, готують надавлену або висячу краплю і мікроскопують.

Завдання 2. Приготуйте препарат «висяча крапля» з метиленовим синім і замалуйте поле зору у мікроскопі.

Для визначення рухливості патогенних бактерій застосовують метод Шукевича.

Метод Шукевича – проводять посів дослідної культури уколом у напіврідкий МПА. При рості рухливих бактерій у середовищі спостерігається помутніння, дифузний ріст культури від лінії уколу; у протилежному випадку – ріст буде безпосередньо по уколу, а середовище прозоре.

Контрольні питання.

1. Назвіть форми бактерій за їх зовнішніми ознаками.
2. Розкажіть про будову бактеріальної клітини.
3. Проаналізуйте методи визначення рухливості бактерій.
4. Чим зумовлений самостійний рух мікроорганізмів?

Лабораторне заняття 4

Тема: МЕТОДИ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ. ПРОСТИЙ МЕТОД ФАРБУВАННЯ.

Мета: оволодіти методикою приготування мазка-препарату. Ознайомитися з основними фарбами, що використовують у бактеріології, засвоїти простий метод фарбування фіксованих мазків.

Матеріальне забезпечення: пробірки з сумішшю мікроорганізмів, імерсійна олія, предметні скельця, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, спиртівки, водні розчини фуксину та метиленової синьки, фільтрувальний папір, прилади для промивання мазків, пінцети, дезінфікуючий розчин (5% фенол) для предметних скелець.

Вступні пояснення

Взяття матеріалу: бактеріологічну петлю фламбують у полум'ї спиртівки, витягують корок з пробірки, яку тримають в лівій руці. Вводять петлю у пробірку, охолоджуючи її по внутрішній стінці пробірки. Беруть матеріал, виймають петлю, пропалюють край пробірки, закривають корком. Краплю матеріалу наносять на предметне скло для приготування мазка-препарату.

Приготування мазків з органів і тканин. Спочатку для знищення мікрофлори, що є на поверхні органів і тканин, місце взяття матеріалу припалюють розжареним шпателем і стерильним скальпелем роблять розріз, після чого із свіжорозрізаного місця профламбованою бакпетлею беруть матеріал. Його наносять на предметне скельце і тонким шаром рівномірно розмазують на поверхні площею 6 см². Можна взяти трохи пульпи з розрізу, перенести її в краплю фізрозчину на запасному склі, а потім з нього беруть і готують мазок.

Приготування мазка – відбитка. Стерильним скальпелем відрізають із середньої частини органу чи тканини невеликий шматочок матеріалу і за допомогою пінцету притискають його до предметного скельця.

Рідкий матеріал (гній, слиз, ексудат) наносять у вигляді краплі на середину предметного скла, зверху покривають іншим склом. Розтягнувши скельця у різні сторони, отримують два мазки.

При виготовленні мазків із крові, лімфи їх наносять у вигляді краплі на предметне скло з правої сторони і підводять до них під кутом 45° інше предметне скло з рівними краями або шліфувальне скло. Після розтікання краплі вздовж скла рівномірним рухом розподіляють її по предметному склу у вигляді тонкого мазка.

Завдання 1. Засвоїти відбір матеріалу та методи виготовлення фіксованих мазків і приготувати мазок з культури мікроорганізмів на щільному живильному середовищі.

Приготування мазка з мікробних культур.

1. На чисте знежирене предметне скло нанесіть краплю води.
2. Профламбованою петлею нанесіть дослідний матеріал на предметне скло і розподіліть його на предметному склі так, щоб отримати рівномірний мазок площею $1-1,5 \text{ см}^2$.
3. Зафіксуйте мазок над полум'ям спиртівки. Для цього предметного скло на протязі 3-5 секунд декілька разів проводять крізь полум'я. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале нагрівання скла недопустимо, так як при цьому настає деформація бактерій. Фіксований мазок готовий для фарбування.

Фіксація мазків хімічним шляхом:

1. Етиловий спирт 96° . Термін фіксації – 15-20 хв.
2. Суміш Нікіфорова (спирт-ефір). Термін фіксації 15-20 хв.
3. Метилловий спирт. Термін фіксації 1-5хв.

Завдання 2. Запишіть, які фарби використовують у бактеріологічному дослідженні.

Червоні _____

Фіолетові _____

Сині _____

Зелені _____

Жовті _____

Простий метод фарбування мазків полягає у тому, що висушений та зафіксований препарат фарбують *однією фарбою*: водним фуксином (1-2 хв), метиленовою синькою (3-5 хв) та інші. Промивають водою, висушують фільтрувальним папером та мікроскопують: під об'єктивом «40» знаходять потрібне місце, зсувають об'єктив в сторону не торкаючись тубуса, наносять краплю імерсійної олії, ставлять об'єктив «90» і мікрогвинтом проводять налаштування. Як правило, при правильній установці об'єктивів фокусні відстані співпадають. Якщо ж при обертанні мікрогвинта на $1/2-1$ оберта поле не стає контрастним, потрібно під контролем ока об'єктив погрузити в олію так, щоби він не торкався поверхні предметного скла. Далі повертаючи макрогвинт тільки доверху і дуже повільно, потрібно вловити поле, після чого встановити максимальну контрастність мікрогвинтом.

Після закінчення дослідження мазка, макрогвинтом на 2-3 см підіймають тубус, переводять на об'єктив самого малого збільшення, салфеткою знімають масло з імерсійного об'єктиву. Предметне скло з мазком опускають у дезрозчин.

Завдання 3. Зафарбуйте однією з фарб зафіксований препарат: водним фуксином (1-2 хв), метиленою синькою (3-5 хв) та інші. Промийте водою. Висушіть фільтрувальним папером. Розгляньте мікропрепарат під мікроскопом.

Мікробіологічний словник: морфологія бактеріальної клітини, мазок, фіксування мазка, барвники, імерсійна система мікроскопа.

Контрольні питання.

1. Перелічіть етапи виготовлення мазка для фарбування.
2. Охарактеризуйте прості методи фарбування бактерій.
3. Проаналізуйте як відбувається фіксація мазків хімічним шляхом.
4. Назвіть фарби, що використовуються для фарбування бактерій.

Лабораторне заняття 5

Тема: ФАРБУВАННЯ ЗА ГРАМОМ. КЛІТИННІ ВКЛЮЧЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Мета: засвоїти техніку фарбування бактерій за Грамом.

Матеріальне забезпечення: пробірки з сумішшю мікроорганізмів, імерсійна олія, вазелін, предметні скельця, бактеріологічні петлі, пастерки, спиртівки, набір фарб для фарбування за Грамом, фільтрувальний папір, прилади для промивання мазків, пінцети, дезрозчин (5% фенол) для предметних скелець. таблиці зафарбованих бактерій.

Вступні пояснення

Фарбування мікроорганізмів за Грамом має таксономічне значення. Воно широко застосовується в бактеріологічних лабораторіях і виконується з великою ретельністю та увагою. Фарбування за Грамом ґрунтується на будові клітинної стінки.

Клітинна стінка – ззовні клітина вкрита твердою, достатньо міцною оболонкою, товщиною 0,01-0,04 мкм, що складається з пептидоглікану. Він присутній тільки у прокариотів. Функція клітинної стінки: механічна, бар'єрна. Хімічний склад та будова клітинної стінки постійні для певного виду бактерій і є важливою діагностичною ознакою. Залежно від будови клітинної стінки бактерії поділяють на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Метод диференційного фарбування був запропонований Х. Грамом у 1884 р.

У грампозитивних прокариот клітинна стінка щільно прилягає до ЦПМ і під електронним мікроскопом має вигляд гомогенної електронно-щільної структури товщиною 20-80 нм. На долю пептидоглікану (основної складової клітинної стінки прокариот) припадає 50-90 %. Пептидоглікан пронизаний тейхейовими кислотами. У грамнегативних бактерій клітинна стінка має багатошаровий склад. Електронно-щільний шар товщиною 2-3 нм не щільно прилягає до ЦПМ. Назовні від пептидоглікану розташована зовнішня мембрана, яка має хвилястий вигляд. Між ЦПМ та зовнішньою мембраною клітини грамнегативних бактерій є електронно-прозорий проміжок, який називають периплазматичним.

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%, який

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

Завдання 1. Вивчити методику фарбування мікроорганізмів за Грамом і зафарбувати готовий мазок. Мікроскопувати, картину замалювати в робочий зошит.

Техніка фарбування за Грамом.

Хід роботи:

1. На фіксований мазок покладіть просочений фарбою генціанвіолету фільтрувальний папір.
2. Нанесіть декілька крапель дистильованої води і через 2 хв зніміть папір.
3. Нанесіть розчин Люголю (на 2 хв).
4. Нанесіть 96 % етиловий спирт (на 30-60 с).
5. Промийте мазок водою.
6. Нанесіть розчин фуксину (на 2 хв).
7. Промийте мікропрепарат водою.
8. Висушіть мазок фільтрувальним папером.
9. Розгляньте мікропрепарат під мікроскопом.

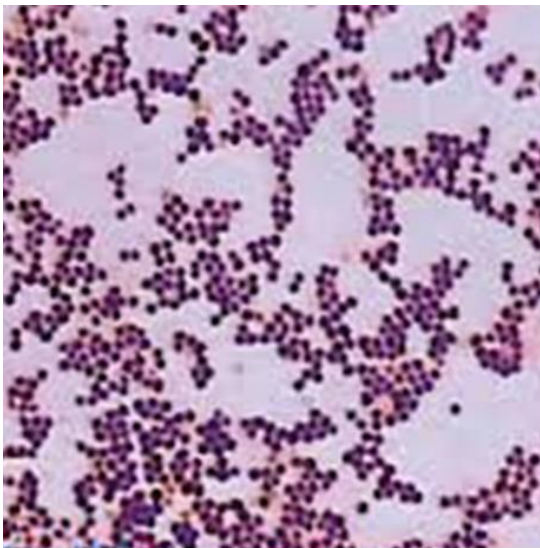


Рис. 1. Грампозитивні прокаріоти **Рис. 2. Грамнегативні прокаріоти**

Стафілококи повинні бути фіолетовими (грампозитивні) (рис.1), а кишкові палички – червоні (грамнегативні) (рис. 2).

Існує експрес-метод визначення грампозитивності в грамнегативності (жива культура грамнегативних бактерій утворює слиз при обробці 3% КОН протягом 5-10 секунд).

Завдання 2. За допомогою експрес-методу визначити до якого відділу належать запропоновані культури мікроорганізмів.

Експрес-метод диференціації грампозитивних і грамнегативних бактерій за допомогою 3% КОН.

Хід роботи:

1. На предметне скло нанесіть дві краплі 3% КОН.
2. В ці дві краплі внесіть культуру і петлю підтягніть вгору. Якщо за петлею тягнеться тяж, то клітини грамнегативні, грампозитивні бактерії слизового тяжу не утворюють.

Фарбування за Грамом лежить в основі штучного поділу бактерій на 4 відділи:

- I. *Gracilicutes* (грамнегативні, які мають клітинну стінку, фарбуються у червоний колір);
- II. *Firmicutes* (грампозитивні, які мають клітинну стінку, фарбуються у фіолетовий колір);
- III. *Tenericutes* (бактерії, які не мають клітинної стінки) – належать мікоплазми;
- IV. *Mendosicutes* (архебактерії).

Згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology всі бактерії об'єднані в царство Prokarya і поділяються на чотири відділи:

- 1) *Gracilicutes* (грам негативні еубактерії, які мають клітинну стінку);
- 2) *Firmicutes* (грам позитивні еубактерії, які мають клітинну стінку);
- 3) *Tenericutes* (еубактерії, які не мають клітинної стінки);
- 4) *Mendosicutes* (архебактерії).

Назви відділів бактерій утворені від латинських слів:

- ✓ *cutes* – шкіра;
- ✓ *gracilus* – тонкий, стрункий;
- ✓ *firmus* – міцний;
- ✓ *tener* – м'який, ніжний;
- ✓ *mendosus* – помилковий.

Сучасна класифікація бактерій

Прокаріоти в залежності від будови клітинної стінки розділенні на 17 розділів:

Розділ 1. Спірохети (5 родів).

Розділ 2. Аеробні (мікроарофільні), рухливі, вібрионоподібні грамнегативні бактерії (7 родів).

Розділ 3. Нерухомі (інколи рухомі) грамнегативні вигнуті бактерії (7 родів).

Розділ 4. Грамнегативні аеробні палички і коки (8 родин, у тому числі **Pseudomonadaceae**; 37 родів).

Розділ 5. Факультативно-аеробні грамнегативні палички (3 родини: **Enterobacteriaceae**, **Vibrionaceae**, **Pasteurellaceae**; 34 роди).

Розділ 6. Анаеробні грамнегативні, прямі та вигнуті палички (родина **Bacteroidaceae** – 13 родів).

Розділ 7. Сульфат- чи сірко відновлювальні бактерії (7 родів).

Розділ 8. Анаеробні грам негативні коки (родина **Veillonellaceae** – 3 роди).

Розділ 9. Рикетсії і хламідії (2 порядки, 4 родини, 3 триби, 15 родів).

Розділ 10. Мікоплазми. Відділ **Tenericutes**. Клас **Mollicutes** (3 родини, 6 родів).

Розділ 11. Ендосимбіоти найпростіших (війкових, джгутикових, амеб – 5 родів), грибів, комах та інших безхребетних.

Розділ 12. Грампозитивні коки (2 родини, 15 родів, в тому числі **Staphylococcus** і **Streptococcus**).

Розділ 13. Грампозитивні палички і коки, які утворюють спори (6 родів, в тому числі **Bacillus** і **Clostridium**).

Розділ 14. Не утворюючі спори грампозитивні палички (7 родів).

Розділ 15. Грампозитивні неправильні палички, не утворюючі спори (21 рід, в тому числі **Corynebacterium**).

Розділ 16. Мікобактерії (родина **Mycobacteriaceae**, **Mycobacterium**).

Розділ 17. Нокардіоподібні бактерії (9 родів).

В наш час редакція Bergey's Manual Trust переглянула існуюче видання «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» підготувала друге видання.

Прокаріоти потрапили в два великих домени:

Archaea і **Bacteria**.

Друге видання «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» повністю реорганізоване з урахуванням філогенетичної класифікації бактерій. В порівнянні з попереднім виданням воно розширене за рахунок опису більш ніж **2200 нових видів і 390 нових родів**. Крім того, в ньому проведена детальна обробка усіх вказаних найменувань і загальновідомих видів прокариотів, додана нова екологічна інформація і розширена вступна частина.

Том 1 «**The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**» був випущений у 2001 році, том 2 «**The Proteobacteria**» – в 2005 р.

Далі будуть випущені ще три томи:

3-й «**The Firmicutes**»

4-й «**The Actinobacteria**»

5-й «**The Plantomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacters, Bacteroidetes, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi and Gemmatomonadetes**».

До внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів належать запасні речовини (глікоген, крохмаль, гранульоза, волютин, білкові кристали, жири, сірка) та продукти метаболізму.

Запасні поліфосфати (волютин, метакхроматинові зерна, тільця Бабеша-Ернста, зараз найчастіше вживається назва – поліфосфатні гранули). Вперше були знайдені у бактерії *Spirillum volutans*. Це запасні поживні речовини мікроорганізмів у вигляді округлих тілець діаметром від 50 нм до 1 мкм, які складаються з конденсованих неорганічних фосфатів.

Поліфосфати використовуються клітиною для біосинтезу фосфоліпідів і нуклеїнових кислот, а у разі дефіциту АТФ – фосфорильна група переноситься на АДФ або АМФ. Таким чином, поліфосфатні гранули є макроергічною речовиною, що асимілює енергію. В клітинах поліфосфати визначаються завдяки здатності до метакхромазії (зміни кольору), при фарбуванні цих структур синіми

барвниками дають червоно-фіолетовий колір. Поліфосфатні гранули трапляються у багатьох мікроорганізмів – азотобактерій, сінної палички, в клітинах молочнокислих бактерій і дріжджів, а також у деяких патогенів – збудників дифтерії, сибірки. Причому, у бактерій гранули розташовані в цитоплазмі, зазвичай в центрі клітини, а в клітинах дріжджів – в вакуолях.

Запасні полісахариди – джерело енергії, в клітинах мікроорганізмів можуть накопичуватися у вигляді зерен крохмалю (ціанобактерії), гранульози – крохмалоподібної речовини (анаеробні спороутворювальні палички), або глікогену (бацили, дріжджі, ентеробактерії). Тваринний крохмаль, глікоген, в клітинах прокариот накопичується у вигляді гранул сферичної форми до 100 нм у діаметрі.

Жироподібні речовини – джерело вуглецю та енергії, утворюються в клітинах в результаті жирового переродження цитоплазми при старінні культури або при вирощуванні культури в умовах надлишку вуглецю та дефіциту азоту. Відкладаються в клітинах у вигляді гранул діаметром до 1 мкм, являють собою краплі полі- β -оксимасляної кислоти, оточені білковою мембраною і трапляються виключно у прокариотів. Окрім гранул полі- β -оксимасляної кислоти в клітинах мікроорганізмів можуть відкладатися ліпіди у вигляді воску (складні ефіри жирних кислот і спиртів), це притаманно дріжджам, нокардіям та іншим актинобактеріям.

Білкові кристали – структури, які формуються окремими видами спороутворювальних бактерій роду *Vacillus*, мають кубічну або тетрагональну форму, в клітині знаходяться поблизу спори, тому отримали назву – параспоральні тільця. Було встановлено, що білок, з якого утворюються дані структури викликає інтоксикацію шкідливих комах, тому чисті культури бактеріальних штамів-продуцентів білкових кристалів використовуються для виготовлення препаратів-інсектицидів.

Забарвлення волютину

Хід роботи

1. Виготовити мазок запропонованої культури, висушити та зафіксувати в полум'ї пальника.
2. На фіксований мазок нанести синьку Леффлера на 5-6 хв.
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена в бузково-блакитний колір, а зерна волютину – в червоно-фіолетовий.
5. Зробити схематичний малюнок з позначенням зерен волютину.

Забарвлення глікогену

Хід роботи

1. Виготовити мазок із запропонованої культури і висушити при кімнатній температурі.
2. Мазок зафіксувати 96% етиловим спиртом, для цього на сухий мазок нанести кілька крапель спирту та дочекатися повного його випаровування.

3. На фіксований спиртом мазок нанести 1-2 краплі розчину Люголю, накрити покривним склом, залишки рідини видалити фільтрувальним папером і через 10 хв препарат мікроскопіювати з імерсією.

4. Знайти в полі зору забарвлені в жовтувато-зеленуватий колір палички, в середині яких знаходяться гранули глікогену, забарвлені в коричнево-бурий колір.

5. Зробити схематичний малюнок з позначенням гранул глікогену.

Забарвлення жирів

Хід роботи

1. На предметне скло нанести невелику краплю рідкої запропонованої культури, яка була вирощена в умовах надлишку вуглецю.

2. Додати краплю барвника судан III і перемішати бактеріальною петлею.

3. Краплю накрити покривним склом і через 10-15 хв мікроскопіювати з імерсією.

4. Знайти в полі зору кулясті клітини, в яких цитоплазма безбарвна, а овальні тільця ліпідів набули оранжево-червоного кольору.

5. Зробити схематичний малюнок з позначенням жирових включень.

Забарвлення білкових кристалів

Хід роботи

1. Виготовити мазок із запропонованої культури і зафіксувати у полум'ї пальника.

2. Зафіксований мазок забарвити фуксином протягом 2-3 хв.

3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.

4. Зробити схематичний малюнок з позначенням параспоральних тілець.

Мікробіологічний словник: грампозитивні, грамнегативні бактерії, клітинна стінка, включення мікроорганізмів, запасні поживні речовини, волютин, гранульоза, полі- β -оксималяна кислота, параспоральні тільця

Контрольні питання

1. Назвіть постійні і непостійні органоїди бактеріальної клітини.

2. Охарактеризуйте складні (диференціюючі) методи фарбування.

3. Проаналізуйте експрес-метод диференціації грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Лабораторне заняття 6

Тема: СКЛАДНІ (ДИФЕРЕНЦІЮЮЧІ) МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ.

Мета: засвоїти техніку фарбування спор, призначення протрави, фарбування капсул. Засвоїти методи фарбування кислотостійких бактерій.

Матеріальне забезпечення. Пробірки з сумішшю мікроорганізмів, імерсійна олія, вазелін, предметні скельця, бактеріологічні петлі, пастерки, спиртівки, набір фарб для фарбування, фільтрувальний папір, прилади для промивання мазків, пінцети, дезрозчин (5% фенол) для предметних скелець. Таблиці зафарбованих кислотостійких бактерій, бактерій з капсулами, спорами.

Вступні пояснення.

До спороутворення здатна невелика кількість бактерій. Ендоспори утворюють представники невеликої кількості родів (близько 10) і переважно з циліндричною формою клітини, наприклад бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Amphibacillus*, *Sulfobacillus*, як виняток – спороутворювальні бактерії роду *Sporosarcina* мають кулясту форму клітин. Спори бактерій, на відміну від спор еукаріот, не є засобом розмноження, вони формуються ендогенно, тобто всередині материнської клітини та можуть мати центральне, субтермінальне (прикінцеве) або термінальне (кінцеве) положення. Діаметр спори може не перебільшувати ширину материнської клітини (бацилярний тип при центральному або субтермінальному положенні), а може перебільшувати (кlostридіальний тип при центральному або субтермінальному положенні), плектридіальний тип – при термінальному положенні).

Раніше вважалося, що у бактерій спори утворюються виключно у відповідь на виникнення несприятливих умов середовища, зараз же більшість вчених схиляється до думки, що ендоспори – це один з етапів розвитку популяції, хоча ця стадія не обов'язкова. Ендоспори, на відміну від вегетативних клітин бактерій, більш стійкі до підвищеної температури (навіть до 140°C), опромінення та дії хімічних речовин.

Спори містять до 90% води вегетативної клітини, але вода в них знаходиться у зв'язаному стані, раніше ж вважалося, що спори майже не містять води. Терморезистентність спор пов'язують із вмістом дипіколінової кислоти, якої немає у вегетативних клітинах; стійкість до дії хімічних речовин і опромінення пояснюється багат шаровими оболонками.

Спороутворення контролюється більш ніж 150 генами, причому кожен з етапів утворення спор контролюється певними оперонами. Процес спороутворення починається з ущільнення цитоплазми навкруги нуклеоїда, далі починається процес утворення *проспори*, при цьому цитоплазматична мембрана інвагінується, та в результаті під клітинною стінкою утворюються різні за розмірами дві структури, що оточені мембранами. На наступному етапі цитоплазматична мембрана більшої частини оточує меншу частину – формується проспора (структура, оточена подвійною мембраною всередині материнської клітини). Далі обидві мембрани починають синтез оболонки спори, а у більшості видів проміж мембран формується ще одна оболонка – кортекс. Окрім кортекса формуються внутрішня та зовнішня оболонки спори, а також екзоспоріум. Після того, як спора повністю сформувалася, настає лізис материнської клітини. Період спокою бактеріальних спор може тривати від кількох годин до сотень років. В одній бактерійній клітині утворюється завжди одна спора. Ендоспори бацил локалізуються у центрі і не перевищують діаметр материнської клітини. У кlostридій вони розташуються ексцентрично, термінально та субтермінально, завжди при цьому перевищуючи діаметр вегетативної клітини. Тому бацили різних видів, які містять спори, морфологічно між собою практично відрізнити важко, тоді як кlostридії мають форму веретена, ложки, ракетки або барабанної палички. Спора може мати форму кулі, циліндру тощо. Поверхня спор може бути гладкою або мати вирости у вигляді шипів, кутів зірки тощо. Всі ці

особливості характерні для виду і мають таксономічне значення. Зрілі спори погано фарбуються. Для виявлення спор та вивчення їх особливостей застосовуються спеціальні методи фарбування: Златогорова, Меллера, Ожежки.

Фарбування за Златогоровим. Висушений мазок 10 раз (замість 5) проводять над полум'ям спиртівки для того, щоб вбити спори та розрихлити їхню оболонку. Далі на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Циля і підігрівають до появи пари. Знімають папір, зливають залишки фарби, наносять на 10 с 2% сірчану кислоту, промивають водою. На 1 хв наносять розчин метиленової синьки. Промивають водою і висушують мазок фільтрувальним папером. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативна клітина – у синій.

Спосіб Мелера відрізняється від фарбування за Златогоровим тим, що на фіксований мазок наливають 5% розчин хромової кислоти, витримують хвилину, змивають кислоту водою – далі фарбують у тій же послідовності, що і за Златогоровим.

Метод Ожежки. На нефіксований мазок наливають 0.5% розчин соляної кислоти, 2-3 хв підігрівають над полум'ям спиртівки. Кислоту зливають, препарат промивають водою, просушують і фіксують над полум'ям. Далі фарбують за *Циль-Нільсеном*: на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Циля, підігрівають до появи пари. Знімають папір, після охолодження скла мазок промивають водою, знебарвлюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти або 3% розчином солянокислого спирту. Промивають водою і дофарбовують 3-5 хвилин метиленовою синькою.

Фарбування капсул. Капсула – це продукт оболонки. У деяких видів мікробів навколо клітин утворюється шар слизової речовини. У більшості мікробів капсула складається з поліцукридів, у окремих (збудник сибірки) – з поліпептидів і води. Капсула захищає клітину від висихання, несприятливих впливів макроорганізмів, зумовлює вірулентність, характеризується імунологічною специфічністю. Виявлення капсули має діагностичне значення. Капсульна речовина погано сприймає фарбу і для її виявлення застосовують складні методи: Міхіна, Романовського-Гімза, Буррі-Гінса та ін.

Фарбування за Міхіним. Мазок 2-3 хв фарбують метиленовою синькою, підігрівають до появи пари. Фарбу швидко змивають водою, висушують фільтрувальним папером. Капсули фарбуються у світло-рожевий, а бактерії – темно-синій колір.

Фарбування за Романовським-Гімза. Мазки висушують, 10 хв фіксують 96 % етиловим спиртом або сумішшю Нікіфорова. Розводять фарбу: на 1 мл бідистильованої води 1-2 краплі фарби (дистильована вода повинна бути тільки нейтральною). В чашку Петрі на сірники кладуть предметне скельце мазком донизу. Фарбують 20-30 хв, після чого фарбу змивають водою, висушують фільтрувальним папером. Капсули – блідо-рожеві, бактерії – сині.

Фарбування кислотостійких мікробів, які містять багато жировоскоподібних речовин. Ці бактерії (туберкульозна паличка) фарбуються дуже важко. Основний метод фарбування *Циль-Нільсена*: на фіксований мазок кладуть фільтрувальний папір і наносять розчин фуксину Циля. Мазок

підігривають до появи пари і залишають фарбу на препараті (без підігріву) ще на 2-3 хв. Знімають папір, препарат промивають водою, 3-5 с знебарвлюють 5% розчином сірчаної кислоти, 10-15 с промивають спиртом, далі водою. Дофарбовують на протязі 1-2 хв метиленовою синькою, змивають водою, висушують. Кислотостійкі форми – червоні, всі інші – сині.

Завдання 1. Ознайомтеся з перерахованими методами фарбування спор і капсул. Заповніть таблицю 1.

Таблиця 1

Властивості спор і капсул бактерій

№ з/п	Ознаки	Спора	Капсула
1.	Будова		
2.	Функція		
3.	Представники (роди м/о)		
4.	На чому ґрунтуються методи фарбування		
5.	Методи фарбування		

Завдання 2. Засвоїти методику фарбування спор за Златогоровим.

Техніка фарбування за Златогоровим.

Хід роботи:

1. На фіксований мазок покладіть фільтрувальний папір, нанесіть фуксин Циля і підігрійте до появи пари.

2. Зніміть папір.

3. Злийте залишки фарби.

4. Нанесіть 2% сірчану кислоту (на 10 с).

5. Промийте водою.

6. Нанесіть розчин метиленової синьки (на 1 хв).

7. Промийте водою.

8. Висушіть мазок фільтрувальним папером.

9. Розгляньте мікропрепарат під мікроскопом.

Мікробіологічний словник: ендоспора, капсула, хімічна протрава, фізична протрава, метахромазія, бацілярний, клостридіальний і плектридіальний типи спороутворення, терморезистентність спор.

Контрольні питання.

1. Поясніть роль капсули у життєдіяльності бактерій, охарактеризувати її хімічний склад.

2. В чому полягає процес утворення спор, структура та хімічний склад спори.

3. Проаналізуйте методи фарбування спор і капсул.

4. Обґрунтуйте, на чому ґрунтуються методи фарбування спор.

5. Охарактеризуйте, на чому ґрунтуються методи фарбування капсул.

Лабораторне заняття 7

Тема: МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ЛАБОРАТОРНОГО ПОСУДУ ТА ІНСТРУМЕНТІВ.

Мета: засвоїти правила миття, обробки та підготовки до стерилізації лабораторного посуду, інструментів, живильних середовищ тощо. Знезараження відпрацьованого біологічного матеріалу.

Матеріальне забезпечення: водяна баня, піч Пастера, автоклав, бактерицидна лампа, бактеріологічні фільтри, лабораторний посуд, скляний лабораторний посуд, пробірки з культурами бактерій, таблиці.

Вступні пояснення

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

Види стерилізації.

Фізичні методи включають:

- 1) стерилізацію сухим жаром (фламбування, сухим нагрітим повітрям),
- 2) стерилізацію вологим жаром (кип'ятіння, текучою парою при 100⁰С, дробову стерилізацію при температурі нижче ніж 100⁰С, стерилізацію парою під тиском з температурою вище 100⁰С, пастеризацію),
- 3) стерилізацію фільтруванням (бактеріологічні фільтри), ультрафіолетовими променями, ультразвуком.

Засоби стерилізації сухим жаром.

Фламбування – стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети і інші металеві предмети. Стерилізація *сухим нагрітим повітрям* здійснюється в спеціальних сушильних шафах (печі Пастера) з подвійними стінками. Зовні шафа облицьована теплонепроникним матеріалом, всередині – стінки металеві. В верхній частині шафи знаходиться термометр. Між теплонепроникною обшивкою і внутрішнім металом шафи на дні є автоматичний електронагрівальний елемент. В печі Пастера стерилізують чистий скляний посуд. Колби закривають ватними пробками, накривають паперовими ковпачками і зав'язують. Чашки Петрі і пастерівські піпетки завертають 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 155-160⁰С, експозиція 2 год, при 165-170⁰С – 1-1,5 год, при 180⁰С – 1 год. По закінченні часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45⁰С, шафу відкривають. Речовини що запалюються, живильні середовища, гумові предмети стерилізувати сухим жаром не можна.

Стерилізація текучою парою. В основу цього способу покладений засіб дробової стерилізації (розроблений Тиндалем, 1877) при різних температурних режимах не вище 100⁰С. Здійснюють стерилізацію в апараті Коха при 100⁰С 30-40 хв. Апарат являє собою металевий котел циліндричної форми з подвійним дном, що закривається кришкою з отвором для термометру і виходу пари. Всередині котла є спеціальна підставка з отвором для матеріалу, що стерилізують і нагрівальні елементи. На дно апарату наливають воду до рівня, про який судять за показами водомірної трубки.

Тиндалізація – дробова стерилізація при температурах нижче 100⁰С. Стерилізацію здійснюють в водяній бані. Принцип цього засобу той же, що і при стерилізації текучою парою. Кратність нагріву залежить від температур, що застосовуються: при 70-80⁰С на протязі 3 діб, 60-65⁰С – 5 діб, 56-58⁰С – 6-7 діб. В перший день матеріали стерилізують 2 год., в наступні дні – по одній годині. В проміжках між прогріванням матеріал, що стерилізується витримують при кімнатній температурі для проростання спор. За допомогою тиндалізації при 56-58⁰С стерилізують матеріали, що руйнуються при більш високій температурі (колоїдні розчини, сироватка крові і ін.).

Автоклавування – стерилізацію парою під тиском з високою температурою, здійснюють в спеціальному апараті – автоклаві. В основі цього засобу лежить нагрівання матеріалу, поміщеного в автоклав 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'єкту стерилізації швидко підвищується. Крім того, при конденсації пари відбувається зменшення його 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 нагріванню та не призводило до вилучення води з матеріалу, який стерилізується. Сучасні автоклави електричні. Промисловість випускає автоклави вертикальні і горизонтальні.

Вертикальний автоклав являє собою двостінний металевий котел циліндричної форми, що закривається герметично кришкою. Через спеціальний кран з вирвою між стінками заливають воду до певного рівня. Внутрішня стінка котла в верхній частині має отвір, в нижній частині котла – кран, через який при нагріванні води пара витісняє повітря з котла. Автоклав нагрівають включенням в електромережу. Автоклав завантажують матеріалом, кришку закривають герметично, закривають кран, через який заливають воду, нижній кран тимчасово залишається відкритим. При закипанні води між стінками автоклаву пара, що утворюється піднімається доверху і через верхній отвір внутрішньої стінки потрапляє всередину котла, поштовхами витісняючи повітря через нижній відкритий кран. Коли повітря все витиснеться і пара починає виходити рівним струменем, нижній кран закривають. В результаті тиск пари всередині автоклаву підвищується. Початком стерилізації вважають момент досягнення показань манометра заданої величини. Нагрів 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 і температура в автоклаві:

- $0,505 \times 10^5$ Па (0,5 атм) температура 110-112⁰С;
- $1,01 \times 10^6$ Па (1 атм) – 120-121⁰С;
- $1,515 \times 10^6$ Па (1,5 атм) – 124-126⁰С;
- $2,02 \times 10^6$ Па (2 атм) – 132-133⁰С.

Манометр показує тиск пари без врахування навколишнього атмосферного тиску (760 мм рт. ст.). По закінченні 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, оберігаючи 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 з рідиною.

В автоклаві стерилізують живильні середовища, що витримують нагрівання вище 100⁰С (МПА, МПБ, фізрозчин), скляний посуд, загорнутий в папір, перев'язочний матеріал, халати. Крім того, в автоклаві знезаражують використані бактеріальні культури, посуд. В цих випадках тиск пари і 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 і температури пари використовують різноманітні хімічні речовини (бензонафтол, сірка), які мають певну температуру плавлення.

Пастеризація – засіб запропонований Пастером з метою збереження живильної цінності харчового продукту (молоко, м'ясні, рибні і овочеві консерви), що знижується при кип'ятінні (руйнуються вітаміни і інші нестійкі до високої температури речовини). При пастеризації продукт нагрівають до 80⁰С 30 хв, після цього різко охолоджують (до 4-8⁰С). Пастеризацією досягається часткова стерилізація – гинуть вегетативні форми бактерій, а спори зберігаються. Різке охолодження і наступне зберігання при низькій температурі (4-5⁰С) 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. Дія фільтру полягає в механічній затримці і 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 і ін.). Фільтри бувають тверді – керамічні, азбестові і мембранні.

Більш частіше в роботі використовують фільтри Зейтца і мембранні фільтри, які вмонтовані в спеціальному утримувачі-вирві, вставленому в пробку, що закриває колбу Бунзена (товстостінна колба з тубусом). *Стерилізація за допомогою хімічних речовин* в лабораторній практиці має обмежене застосування і 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 56⁰С). Вакцини і лікувальні сироватки консервують фенолом (0,25-0,5%-вим), хлороформом (0,5%), формаліном (0,05%).

Хімічні речовини застосовують в лабораторіях і для дезінфекції.

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

Завдання 1. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Фізичні методи стерилізації

№ з/п	Ознаки	Піч Пастера	Автоклав	Апарат Коха
1.	Будова			
2.	Об'єкт стерилізації			
3.	Режим стерилізації			

Завдання 2. Підготувати і простерилізувати скляний лабораторний посуд.

Мікробіологічний словник: автоклав, мікроанаеростат, сухо-жарова шафа (піч Пастера), термостат, бактеріальна петля, чашка Петрі, живильні середовища, стерилізація, тиндалізація, дезінфекція.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення понять «стерилізація», «дезінфекція», поясніть їх застосування у практиці.

2. Охарактеризуйте будову і призначення автоклава, печі Пастера та апарата Коха.

Лабораторне заняття 8

Тема: ВИМОГИ ДО ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ЇХ ПРИГОТУВАННЯ ТА КЛАСИФІКАЦІЯ.

Мета: вивчити види і призначення живильних середовищ, навчитися готувати звичайні, спеціальні, диференціально-діагностичні і синтетичні середовища, опанувати методи приготування живильного середовища..

Матеріальне забезпечення: зразки сухих живильних середовищ фабричного виробництва, компоненти живильних середовищ – агар-агар, желатина, пептон, сіль, ваги, наважки, чашки Петрі, пробірки, ватно-марльові корки.

Вступні пояснення

Для розмноження мікробів в лабораторії їх вирощують на живильних середовищах у термостатах. Живильні середовища за консистенцією бувають щільні та рідкі. За складом: білкові, безбілкові та мінеральні (розчини). За походженням: природні – тваринного походження (молоко, яйця, жовч, кров, кров'яна сироватка) та рослинного походження (овочі, плоди, соки, зерно гороху тощо). Широке застосування знайшли штучні середовища тваринного походження (МПА, МПБ, МПЖ) та рослинного (настої і відвари сіна, соломи, дріжджів, пивне сусло).

Будь-яке живильне середовище повинно відповідати наступним вимогам:

1. Містити поживні речовини необхідні для росту даного мікроорганізму в певних пропорціях.

2. Бути прозорим – ця вимога тільки для тих середовищ, на яких вивчаються культуральні і біохімічні властивості (МПА, МПБ, МПЖ, вуглеводні середовища).

3. Бути стерильним.

4. Повинно мати певну реакцію рН=7,2-7,4.

5. Щільне середовище – бути вологим, оскільки мікроорганізми засвоюють речовини з розчинів голозойним шляхом.

Живильні середовища за своїм призначенням поділяють на звичайні (прості), кольорові і спеціальні.

До простих відносять молоко, картоплю, МПБ, МПЖ, МПА.

Кольорові – це середовища з індикаторами, які змінюють свій колір при виділенні продуктів життєдіяльності мікробів – кислот, ферментів. Кольорові живильні середовища (Гіса) використовують для визначення цукролітичних властивостей бактерій.

Середовища для визначення ферментації вуглеводів: агар Ендо – бактерії, які розкладають лактозу, фарбують середовище в червоний колір, а бактерії, які не розкладають лактозу – утворюють безбарвні колонії. Середовище Левина – має фіолетовий колір; бактерії розкладаючі лактозу утворюють сині або чорні колонії, а не розкладаючі – безбарвні.

Спеціальні середовища готують для тих мікроорганізмів, які не ростуть на звичайних середовищах.

Живильні середовища для вирощування анаеробів: Кітт-Тароцці, кров'яний цукровий агар, мозкове середовище. Середовища для вирощування грибів: Сабуро, агар Чапека.

Завдання 1. Вивчити вимоги і класифікацію живильних середовищ, заповнити табл. 1.

Таблиця 1

Поживні середовища

№ з/п	Класифікація за призначенням	Представники
1.	Універсальні для аеробів	
2.	Універсальні для анаеробів	
3.	Елективні	
4.	Диференційно-діагностичні	

Завдання 2. Вибрати один зразок сухого живильного середовища фабричного виробництва, переписати з нього в лабораторний зошит склад, техніку виготовлення його та приготувати 100 мл живильного середовища (рідке – в пробірках, щільне – в чашки Петрі).

Контрольні запитання

1. Назвіть вимоги до живильного середовища, та поясніть чим вони обумовлені.

2. На чому ґрунтується класифікація живильних середовищ.

3. Наведіть приклади живильних середовищ та поясніть їх належність до певної групи.

4. Охарактеризуйте будову і призначення автоклава та печі Пастера.

Лабораторне заняття 9

Тема: МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ.

Мета: ознайомитися з будовою термостата, анаеростата і їх призначенням; засвоїти техніку посівів бактерій на живильні середовища.

Матеріальне забезпечення: пробірки з МПБ, МПА скошений та стовпчиком, пробірки з культурами мікроорганізмів, бактеріологічні петлі, ексикатор.

Вступні пояснення

Посіви для вирощування аеробів здійснюють як з нативного матеріалу, що надсилається в лабораторію, так і з вже наявних бактеріальних культур. Посіви з проб матеріалу, що надійшов в лабораторію, проводять пастерівською піпеткою, з бактерійної маси – бактеріологічною петлею. Посів обов'язково потрібно робити над полум'ям спиртівки.

Завдання 1. Провести посів культур бактерій на рідкі і щільні живильні середовища.

Лабораторна робота 1

Техніка посіву мікробів в рідке середовище

Хід роботи

1. У ліву руку візьміть пробірки з живильним середовищем і матеріалом, який досліджується, в праву – петлю для переносу матеріалу в середовище і корки від пробірок.

2. Біля полум'я спиртівки внесіть в пробірку з матеріалом петлю, візьміть одну краплю, обережно переносіть в пробірку із стерильним середовищем, злегка занурюючи в нього.

3. Обережно вийміть петлю, закрийте корками пробірки.

4. Петлю профламбуйте над полум'ям спиртівки.

5. Стежте, щоб корки не змокрили.

Лабораторна робота 2

Техніка посіву мікробів на щільне середовище

Хід роботи

1. У ліву руку візьміть пробірки з мікробною культурою і стерильним МПА, тримаючи скошеною поверхнею МПА доверху, корками в бік полум'я спиртівки.

2. У відкриту у полум'ї пробірку з мікробною культурою, яку засівають, обережно опустіть профламовану петлю, злегка торкаючись до поверхні вмісту пробірки, і, взявши культуру, перенесіть її в іншу пробірку зі стерильним середовищем.

3. Петлю опустіть до дна пробірки, занурте в конденсаційну рідину і зробіть посів штрихом – зигзагоподібними рухами проведіть петлею вверх вздовж поверхні середовища.

4. Проведіть корки над полум'ям і закрийте пробірки.
5. Профламбуйте петлю.
6. Всі засіяні пробірки покладіть в термостат для вирощування.

Культивування мікроорганізмів відбувається в термостатах при певних температурах. Збудників хвороб теплокровних тварин культивують при 37-38⁰С, людини – 36-37⁰С, бджіл – 34-35⁰, грибів – 28-30⁰С.

Крім забезпечення температурного режиму, необхідно враховувати тип дихання мікроорганізмів: при аеробному типі дихання ніяких додаткових умов створювати не потрібно. Для анаеробів необхідно вилучити доступ вільного кисню повітря. З цією метою використовують ексікатор. З ексікатора фізичним, хімічним або біологічним методом видаляють повітря і ставлять його в термостат.

Фізичний – за допомогою насоса викачують повітря, хімічний – на дно ставлять чашку Петрі з хімічними речовинами, які активно зв'язують кисень повітря (пірогалол + їдкий натр), біологічний – на одну половину поживного середовища засівають аеробний мікроб, а на другу – анаеробний.

Контрольні питання.

1. Охарактеризуйте призначення живильних середовищ і вимоги до них.
2. Назвіть живильні середовища.
3. Поясніть як культивують аероби та анаероби.
4. Проаналізуйте методи Пастера та Дригальського.
5. Дайте визначення понять вид, клон, штам, варіант, чиста культура.

Лабораторне заняття 10

Тема: МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ БАКТЕРІЙ.

Мета: вивчити методи отримання чистої культури мікроорганізмів бактеріологічним та біологічним способами.

Матеріальне забезпечення: предметні та покривні скельця, культури мікроорганізмів в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ.

Вступні пояснення

Виділення чистих культур. Вид – це сукупність мікроорганізмів, які мають однакове походження і генотип, подібну будову та функціональні ознаки. Ріст мікробних клітин одного виду на щільному або рідкому живильному середовищі називають **чистою культурою**.

Культури мікробів одного виду, які вилучені з різних джерел, або з одного й того ж джерела, але в різні часи називають **штамом**.

Бактерії одного виду, які виростили на щільному середовищі складають **колонію**.

Чисті культури необхідні для ідентифікації виду мікроорганізмів. Належність мікробної культури до певної систематичної групи (класу, родини, роду, виду, варієтету) встановлюють шляхом вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних ознак.

Завдання 1. Проведіть посів культури бактерій на МПА методом Дригальського.

Лабораторна робота 1
Виділення чистої культури засобом Дригальського
Хід роботи

1. Розділіть олівцем по склу Чашку Петрі з МПА зі зворотної сторони на 4-ри сектори.

2. Візьміть бактеріологічною петлею краплю матеріалу, що досліджується і внесіть на поверхню агару у першій сектор, зигзагоподібно проведіть посів культури від периферії до центру.

3. Цією же петлею, не опалюючи її, засійте послідовно по поверхні середовища у другому, третьому та четвертому секторах.

4. Розмістіть після посіву чашку у термостаті вверх дном.

У випадках необхідності *відділення спорових форм від видів, які не утворюють спори*, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогривають її в водяній бані при 80⁰С 30-40 хв. – вегетативні форми мікроорганізмів гинуть, спори зберігаються життєздатними. Далі прогріту суспензію висівають методом Дригальського.

Хімічний засіб полягає в тому, що хімічні речовини в певній концентрації додають до живильних середовищ. Дія цих речовин на різні види мікробів неоднакова: одні види гинуть (бактерицидна дія), інші – затримуються в своєму рості (бактеріостатична дія), а на треті ці речовини не виявляють згубного впливу. На цьому принципі засноване застосування вибіркових і елективних середовищ.

Біологічний засіб дозволяє виділити чисту культуру тільки патогенних (хвороботворних) мікроорганізмів: матеріал, що досліджується (суспензія тканини, суспензія бактерій) вводять чутливій тварині (біла миша, морська свинка, голуб, кріль). Тварини гинуть, їх розтинають, і посіви з внутрішніх органів дозволяють виділити чисту культуру.

Отримання чистої культури анаеробів. Принцип зберігається той же, що і при роботі з аеробами, тільки використовують спеціальні середовища: застосовуючи засіб Дригальського, посів проводять на глюкозо-кров'яний агар в чашках Петрі, які після цього поміщають в умови анаеробіозу (в ексикатор, мікроанаеростат). Користуються також засобом посіву на середовище Вільсона-Блера. Коли зростають окремі чорні колонії, їх пересівають в середовище Кітт-Тароцці, одержуючи таким чином чисту культуру. Для цієї ж мети може служити біологічна проба: матеріалом що досліджується (або змішаною культурою) заражають чутливу лабораторну тварину. Після її загибелі і розтину – проводять посіви в середовище Кітт-Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на глюкозо-кров'яний агар, як згадано вище.

Контрольні питання

1. Назвіть місця культивування мікроорганізмів.

2. Перелічіть умови, які необхідно створити для культивування мікроорганізмів.

Лабораторне заняття 11

Тема: КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Мета: визначити культуральні властивості мікроорганізмів отриманих на попередніх заняттях.

Матеріальне забезпечення: предметні та покривні скельця, культури мікроорганізмів в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ.

Вступні пояснення

Культуральні властивості – це характеристика росту мікроорганізмів на живильних середовищах. Кожний вид бактерій по своєму росте на живильних середовищах і це – є індивідуальна ознака.

Зростання мікроорганізмів в рідких живильних середовищах не характеризується великою різноманітністю. При макроскопічному дослідженні (неозброєним оком) відзначають *характер і ступінь помутніння середовища*: рівномірне (дифузне), інтенсивне, помірне, слабке і у вигляді опалесценції.

Зростання культури в рідкому середовищі може бути поверхневим у вигляді *плівки* на всій поверхні середовища, підійматися (загинатися) на стінки пробірки або займати тільки частину поверхні середовища, не доходячи до стінки пробірки.

Враховують *колір плівки* (блакитний, жовтуватий, сірий, білий), товщину (тонка, товста, груба), характер поверхні плівки (складчаста, зморшкувата, гладка, сітчаста, пухнаста), консистенцію (крихка, ослизла).

Культури мікробів деяких видів в рідкому середовищі утворюють *осад* – він може бути численний і незначний, щільний (компактний), пухкий, зернистий, у вигляді шматочків вати, пластівців, ослизлий. За кольором – білий, жовтий, матовий, зеленуватий, сіруватий та ін. При струшуванні осад або розбивається, створюючи рівномірне помутніння середовища, або утворюються великі або ж дрібні пластівці, грудки; ослизлий осад може підійматися уверх в вигляді «коси» з помутнінням середовища, або воно при цьому залишається прозорою.

Зростання культури в рідкому середовищі може бути пристінним. Воно супроводжується прикріпленням та розмноженням мікробів на склі (на стінках пробірок) з утворенням характерного матового нальоту, дрібних пластівців, зерен.

Зростання мікробів в напіврідкому середовищі, що не володіють рухливістю, відбувається за уколом у вигляді білуватого стрижня. Навколишнє середовище при цьому залишається прозорим. Рухомі мікроорганізми викликають помутніння напіврідкого агару різної інтенсивності, що розповсюджується у вигляді «хмарок».

Посів мікробів в МПА, МПЖ (стовпчиком) роблять уколом суворо по центру в глибину середовища або в безпосередній близькості до стінки пробірки.

Зростання мікробів на щільних живильних середовищах (МПА) супроводжується утворенням *колоній* – скупчень мікробів, що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини. Колонії характеризуються великою різноманітністю, можуть бути ізольованими і злитими. Вивчення їх проводять неозброєним оком і з допомогою мікроскопу або лупи. Звичайно задалегідь відзначають характер зростання – численний, помірний, незначний;

після цього враховують наступні ознаки:

1) **форма** – правильна (овальна, округла), неправильна (зіркоподібна, гілляста та ін.);

2) **розмір** (вимірюють з допомогою лінійки або окуляру-мікрометра мікроскопу) – великі (діаметр понад 4 мм), середні (діаметр 2-4 мм), дрібні (діаметр 1-2 мм) і дрібні – росяні (діаметр менше 1 мм);

3) **край колонії** – рівний (S-форма), шорсткий (R-форма), хвилястий, бахромчастий, зубчастий, локоноподібний;

4) **прозорість і блиск** – прозора, напівпрозора, мутна колонія;

5) **колір** – сірувато-білий, безбарвний, білий, кремовий, оранжевий, блакитний, зелений, золотистий, жовтий, червоний, синій, чорний та ін. Колір колоній культури бактерій залежить від кольору пігменту, який вони виробляють;

6) **профіль** (рельєф) (визначають у відбитому світлі) – опуклий, плоский, конусоподібний, кратероподібний, з валиком по колу;

7) **поверхня** – гладка, горбкувата, зморшкувата, складчаста, з концентричними колами;

8) **консистенція** (визначають дотиком до поверхні колонії бактеріологічною петлею) – щільна (легко знімається з агару або вростає в товщу середовища), крихка, ослизла (тягуча, прилипає до петлі), тістоподібна, олієподібна;

9) **структура** – однорідна, волокнувата, плівчаста, зерниста.

При перегляді колоній під мікроскопом чашки Петрі розміщують на предметний столик дном уверх, а пробірки з агаровою культурою – скошеною поверхнею агару донизу. На поверхні агару при посіві штрихом бактерії ростуть у вигляді ізольованих колоній або утворюють суцільний наліт з рівними, хвилястими, краями. Інколи цей наліт буває дифузним, перистим і ризоїдним (деревоподібним). При цьому відзначають колір, характер поверхні, консистенцію, прозорість штриху.

Колонії вивчають у віці однієї доби!

Культуральні властивості анаеробів вивчають на середовищі Цейслера. Вони утворюють десять видів колоній. Для ветлікаря мають значення шість з них:

1. Гудзикоподібні підвищення. Колонії оточені великою коричнево-болотистою непрозорою зоною *Clostridium perfringens*.

2. Округлі, кореневоподібні, безбарвні або ніжно сірі колонії – *Cl. botulinus*, *Cl. oedematiens*.

3. Вуалеподібні із зрізаними краями колонії, часто з ніжними відростками, безбарвні. Легкий гемоліз – *Cl. tetani*, *Vibrion septique*.

4. Колонії мають вигляд перламутрового гудзика і форму виноградного листа. Плоскі з підвищеннями в центрі, ніжно синьо-фіолетового відтінку. Незначний гемоліз – *Cl. chauvoei*.

5. В'язкі, іноді у вигляді твердих бородавок колонії, білі або непрозорі. Часто вузька інтенсивна зона гемолізу – *Cl. sporogenes*.

6. Білі, ніжно блакитні або безбарвні майже круглі, дуже дрібні колонії (*Cl. histolyticum*, а іноді *Cl. tetani*).

Завдання 1. Відмітити характер росту на рідкому і щільному живильних середовищах. Результати спостережень занести в таблицю 1.

Таблиця 1

Культуральні властивості мікроорганізмів

№ з/п	Ознаки	Щільне ПС	Рідке ПС
1.	Прозорість		
2.	Плівка		
3.	Осад		
4.	Колір		
5.	Форма колонії		
6.	Розмір колонії		
7.	Край колонії		
8.	Поверхня колонії		
9.	Консистенція колонії		

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте особливості росту мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі.
2. Назвіть, що утворюють бактерії на щільному поживному середовищі.

Лабораторне заняття 12

Тема: ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Мета: вивчити цукролітичні, протеолітичні, редуційні властивості мікроорганізмів отриманих на попередніх заняттях і визначити їх видову належність по визначнику.

Матеріальне забезпечення: предметні та покривні скельця, культури мікроорганізмів в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ, середовища з різними вуглеводами, молоко з метиленовою синькою, агар Ендо, агар Левина, кров'яний агар, фільтрувальний папір, просочений 12% водним розчином щавлевої кислоти і 10% розчином оцтовокислого свинцю, пробірки і чашки Петрі з посівами попереднього заняття, набори для фарбування за Грамом.

Вступні пояснення

Біохімічна активність мікроорганізмів дуже різноманітна і зумовлена наявністю у них специфічних ферментних систем, а також умовами навколишнього середовища. Ферменти відіграють велику роль у життєдіяльності мікробів. Вони беруть участь у різноманітних біохімічних реакціях, що лежать в основі живлення, дихання, зростання і розмноження мікроорганізмів. В лабораторній мікробіологічній практиці вивчення біохімічних властивостей бактерій є одним з найважливіших диференціально-діагностичних засобів точного розпізнавання збудника інфекційної хвороби.

Здатність мікроорганізмів використовувати як єдине джерело карбону вуглеводи і багатоатомні спирти визначають різними шляхами, готуючи спеціальні поживні середовища, до складу яких входять перелічені сполуки. Найпростіше – використовують готові середовища Гісса.

Цукролітичні властивості – це здатність мікроорганізмів гідролізувати цукри і багатоатомні спирти. Виявляють при посіві бактерій на диференціально-діагностичні середовища з різними вуглеводами і індикатором. Частіше застосовують середовище Гісса (з індикатором Андраде). Набір середовищ Гісса з різними вуглеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, цукроза, маніт, дульцит та ін.), стерильне знежирене просте молоко, молоко з лакмусом, молоко з метиленовим синім – називають *строкатим рядом*. Посіви культур здійснюють за звичайною методикою бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Після інкубування в термостаті враховують результат ферментації вуглеводів: зміна кольору живильного середовища (в червоний колір з індикатором Андраде) означає розщеплення вуглеводу і утворення в середовищі кислих продуктів розпаду. Якщо при розщепленні даного вуглеводу утворюється не тільки кислота, але й газоподібні речовини, останні виштовхують частину рідини з поплавця, і міхурці газу збираються у його верхній частині.

Більшість гетеротрофних бактерій здатні засвоювати азоторганічні сполуки (білки, пептони та ін.). У процесі ферментативного гідролізу білків звільняються амінокислоти, які можуть бути асимільовані клітиною безпосередньо в процесах біосинтезу або підлягають розщепленню на більш прості сполуки. У бактеріологічній практиці ця здатність лежить в основі протеолітичних властивостей мікроорганізмів.

Протеолітичні властивості – це здатність мікроорганізмів гідролізувати білки. Визначають на МПЖ. Посів мікробів в МПЖ стовпчиком проводять уколом, зануривши голку (або петлю) з культурою, що досліджується, вглиб живильного середовища до дна пробірки. В тих пробірках, де під дією ферментів бактерій відбудеться протеоліз желатини, середовище розріджується. Мікроби різноманітних видів розріджують МПЖ неоднаково. Одні з них у вигляді вирви (збудник сибірки), інші – у вигляді «панчохи» (стафілококи). Буває розрідження пошарове (синьогнійна паличка та ін.).

Ступінь протеолізу і глибину розщеплення білка у різних видів бактерій визначають шляхом утворення кінцевих продуктів розпаду (індол, сірководень, аміак та ін.)

Індол визначають різноманітними способами. Найбільш доступним і зручним вважається спосіб з використанням індикатору (фільтрувальний папір), просоченого 12%-вим розчином щавлевої кислоти. За наявності індолу нижня частина індикаторного паперу фарбується в рожевий колір.

Визначення сірководню проводять за допомогою індикатора (фільтрувальний папір, просоченого 10%-вим розчином оцтовокислого свинцю). При наявності сірководню відбувається почорніння фільтрувального паперу (утворюється сірчистий свинець чорного кольору).

Редукуючі властивості мікробів – це здатність мікроорганізмів знебарвлювати органічні барвники. Визначають на молоці з метиленовою

синькою, малахітовою зеленню, нейтральним червоним та ін., на підставі зміни кольору органічної фарби. Петлю культури, що досліджується, висівають в молоко з фарбою, інкубують в термостаті 24 год. Під впливом мікробних ферментів барвник відновлюється, відбувається його знебарвлення або зміна вихідного кольору.

Гемолітичні властивості мікробів – це здатність мікроорганізмів руйнувати еритроцити. Бактерії деяких видів в процесі життєдіяльності продукують особливі речовини, гемотоксини (білкової природи), що руйнують оболонку еритроцитів. Для визначення гемолітичної активності бактеріальні культури висівають на живильні середовища, що містять 5% дефібрированої крові (частіше кров'яний МПА). При зростанні мікроорганізмів, що володіють гемолітичними властивостями, навколо колонії в результаті лізису еритроцитів утворюється зона гемолізу: прозора зона (безбарвна або пофарбована).

Завдання 1. Потрібну колонію пересійте в пробірки з середовищами для визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів. Поставте у термостат. Заповніть таблицю 1.

Таблиця 1

Визначення цукролітичних властивостей бактерій

№ з/п	Вуглевод (багатоатомний спирт)	Гідроліз
1.	Глюкоза	
2.	Лактоза	
3.	Сахароза	
4.	Мальтоза	
5.	Маніт	
6.	Сорбіт	

Завдання 2.

1. Бактеріологічною петлею зробіть посів отриманої чистої культури у пробірку з МПБ.

2. Закріпіть фільтрувальні папери, просочені індикаторами для визначення індолу, сірководню. Поставте в термостат на 24-48 годин.

3. Результати спостережень занесіть в таблицю 2.

Таблиця 2

Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів

№ з/п	Ступінь протеолізу	Спостерігається/не спостерігається
1	МПЖ	
2	Аміак	
3	Сірководень	
4	Індол	

Питання для самоконтролю

1. Які вуглецевмісні сполуки здатні використовувати мікроорганізми?

2. Яким чином досліджують здатність мікроорганізмів засвоювати вуглецевмісні сполуки?
3. Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.
4. Методи визначення індолу, аміаку, сірководню.

Лабораторне заняття 13

Тема: МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТАГОНІЗМУ У МІКРООРГАНІЗМІВ.

Мета: вивчити поняття про антагонізм у бактерій та поняття про антибіотики та опанувати методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

Матеріальне забезпечення: пробірки з чистою бактеріальною культурою в МПБ, МПА, на строкатому ряді та в МПБ з індикаторами, набір обладнання «робочого місця бактеріолога», мікроскопи, чашки Петрі з МПА, паперові диски, просочені антибіотиками

Вступні пояснення

Антагонізм мікробний – пригнічення життєдіяльності одного мікроба іншим. Одна з форм взаємин мікробів в асоціаціях.

Механізми антагонізму:

- конкуренція за поживний субстрат (різна швидкість росту),
- виділення мікробами-антагоністами кислот, спиртів, лугів,
- виділення мікробами-антагоністами антибіотиків та бактеріоцинів,
- хижацтво.

Мікроорганізми – антагоністи широко представлені у ґрунті, ризосфері рослин.

Завдання 1. Провести посів на живильне середовище бактерій для виявлення антагоністичних відносин за М.С. Єгоровим.

Виділення мікробів-антагоністів із ґрунту. На поверхню поживного середовища в чашках Петрі висівають різні мікроорганізми. Засіяні чашки ставлять у термостат при температурі 28-37°C на 2 доби. На «газоні», що виріс на поживному середовищі, розміщують маленьку грудочку іншої колонії (завбільшки з просяне зерно). «Газон» використовується у цьому випадку як тест-організм. Чашки Петрі знову ставлять в термостат на 2-3 доби при такій самій температурі. Якщо довкола колоній антагоністів утворились прозорі зони лізису (загибелі) тест-мікробів, то антагоністів виділяють у чисті культури і вивчають.

Виявлення антагоністичних взаємовідносин. Чашки Петрі заливають стерильним поживним середовищем (МПА, МПЖ та ін.) і залишають для застигання протягом 5-10 хв. На поверхні вже твердого поживного середовища висівають різні бактерії у двох напрямках. Засіяні чашки позначають і кладуть у термостат з температурою 28°C. Через 1-2 доби вивчають результати дослідження. Якщо на поживному середовищі в зоні стикання посівів досліджуваних культур буде спостерігатися слабкий ріст або його зовсім не буде, то між цими мікроорганізмами існують антагоністичні взаємовідносини.

Явище антагонізму між мікроорганізмами лежить в основі використання

антибіотиків.

Антибіотики (грец. *anti* – проти, *bios* – життя) – це специфічні сполуки біологічного походження, які згубно впливають на мікроорганізми. Для них характерна специфічність, а саме вибірковість дії на певні види мікроорганізмів. Термін «антибіотики» в 1942 році запропонував S.A. Waksman.

Класифікують антибіотики, за походженням, за спектром дії і за механізмом дії, за хімічною структурою тощо.

За походженням антибіотики поділяються на ті, що виробляються мікроорганізмами, антибіотики із рослин (звіробой – іманін, часнику – аліцин, безсмертника – аренарін) і тварин (риб – екмолін). Найбільш представницька група антибіотиків – це антибіотики мікробного походження.

Близько 70% антибіотиків, які використовуються в медицині виділено з актиноміцетів: стрептоміцин, неоміцин, канаміцин, тетрациклін, еритроміцин та ін.

Велика кількість антибіотиків, які надзвичайно широко використовуються в медицині виробляються грибами: пеніцилін, ампіцилін, оксацилін, ампіокс, цефалоспорін та ін.; значно менше антибіотиків, що утворюються бацилами (граміцидин, поліміксин В і М, субтілін та ін.).

За спектром дії антибіотики поділяються на антибактеріальні (згубно впливають на бактерії – стрептоміцин, левоміцетин, бензилпеніцилін, тетрациклін), протигрибкові (пригнічують ріст грибків – ністатин, леворін) і протипухлинні (затримують розмноження клітин злоякісних пухлин – брунеоміцин, рубоміцин).

Антибіотики, які активні лише до грампозитивних або грамнегативних мікроорганізмів, називають препаратами вузького спектру дії (бензилпеніцилін, поліміксин), а ті, які затримують ріст і розвиток і одних, і других – широкого спектру дії (тетрациклін, стрептоміцин, гентаміцин, неоміцин).

За механізмом дії антибіотики поділяються на препарати, які:

- порушують синтез бактеріальної клітинної оболонки (пеніциліни, циклосерін, цефалоспорини та ін.);
- порушують синтез білка в бактеріальній клітині (стрептоміцин, левоміцетин, тетрацикліни та ін.);
- порушують цілісність цитоплазматичної мембрани (поліміксин, ністатин та ін.);
- пригнічують синтез нуклеїнових кислот в клітинах (рифампіцин, протипухлинні антибіотики).

Чутливість виділених патогенних культур бактерій у баклабораторії перевіряють на чутливість до антибіотиків методом дифузії в агар за допомогою паперових дисків просочених антибіотиками або за допомогою серійних розведень (метод Коха).

Завдання 1. Виконати лабораторну роботу 1.

Лабораторна робота 1

Виявлення чутливості отриманих культур до антибіотиків методом дифузії в агарі

Хід роботи

1. Змийте фізіологічним розчином агарову культуру, що досліджується і приготуйте суспензію.

2. 1 мл суспензії засійте суцільним шаром в чашку з МПА, надлишок рідини заберіть за допомогою піпетки.

3. Засіяні чашки підсушіть в термостаті при 37⁰С 15-30 хв.

4. Диски просочені антибіотиками стерильним пінцетом розкладіть на відстані 2 см від краю.

5. У одній чашці одночасно розміщуйте 4-5 різних антибіотиків.

6. Чашки з дисками витримайте при кімнатній температурі 2-3 год і далі – у термостаті 14-15 год при температурі 37⁰С.

За величиною затримки росту збудника судять про його чутливість до відповідного антибіотику. Мікроорганізм вважається чутливим до антибіотику, якщо зона затримки росту дорівнює 15-25 мм, малочутливим – до 15 мм, резистентним при відсутності зони затримки росту.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть типи взаємовідносин мікроорганізмів.
2. Поясніть термін мікробний антагонізм.
3. Охарактеризуйте походження антибіотиків.
4. Перелічіть та проаналізуйте методи визначення антагонізму у бактерій.

Лабораторне заняття 14

Тема: МІКРОФЛОРА ПОВІТРЯ ЖИТЛОВИХ ПРИМІЩЕНЬ. ЗБУДНИКИ ПОВІТРЯНО-КРАПЕЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ.

Мета: вивчити методи бактеріологічного дослідження повітря житлових приміщень. Вивчити біологічні властивості збудника туберкульозу людини.

Матеріальне забезпечення: чашки Петрі з МПА, плакати, презентаційний матеріал.

Вступні пояснення.

Повітря несприятливе середовище для існування мікроорганізмів. Мікроби потрапляють у повітря з ґрунту, з поверхні рослин, з води. Кількість та склад мікрофлори у повітрі не постійні. Для санітарної оцінки повітря враховують кількість мікробів у 1 м³.

Седиментаційний метод Коха полягає у тому, що чашки Петрі з МПА залишають відкритими на 5-10 хв в приміщенні. Для визначення цим способом санітарно-показових мікроорганізмів (гемолітичних, стафілококів, стрептококів) чашки Петрі з кров'яним агаром залишають відкритими упродовж 40 хв. Після цього чашки закривають, ставлять у термостат на 24 год, підраховують колонії мікробів.

Щоб визначити мікробне число у повітрі (кількість бактерій, що містяться в 1 м³), його підраховують по формулі Омелянського. Правилком Омелянського

передбачається, що на поверхні агару у чашці Петрі з площею 100 см² за 5хв з повітря осідає така кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря.

При санітарно-бактеріологічній оцінці повітря по наявності патогенних мікроорганізмів (мікобактерій туберкульозу, збудників пастерельозу, бруцельозу та ін.) використовують спеціальні (елективні) середовища. Після інкубації в термостаті проглядають колонії, що вирости, виділяють характерну для цього виду мікроба колонію і вивчають її; з неї готують мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують. Колонію пересівають для одержання чистої культури з наступною її ідентифікацією.

Таблиця 1

Критерій для оцінки повітря житлових приміщень*

Повітря	Літній режим		Зимовий режим	
	мікробне число	гемолітичних стрептококів	мікробне число	гемолітичних стрептококів
Чисте	менше 1500	менше 16	менше 4500	менше 35
Забруднене	більше 2500	більше 36	більше 7000	більше 124

* Кількість мікроорганізмів на 1 м повітря, за А.І. Шафіром.

Завдання 1. Вивчити методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря.

Лабораторна робота 1.

Визначення забрудненості повітря в аудиторії мікробіології седиментаційним методом

Хід роботи

1. Відкрийте чашки Петрі з МПА та залиште їх відкритими на 5-10 хв в приміщенні.

2. Закриті чашки поставте у термостат на 24 год.

3. Підрахуйте колонії мікробів.

Для визначення мікробного числа (МЧ) використовують правило Омелянського, за яким передбачається, що на поверхні агару у чашці Петрі з площею 100 см² за 5 хв з повітря осідає така кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря.

Вступні пояснення

Туберкульоз – інфекційна, з хронічним перебігом хвороба людини, тварин, у тому числі птахів, яке характеризується утворенням туберкул (горбів, вузлів) і казеозних туберкульозних вогнищ. Збудників туберкульозу людини і великої рогатої худоби відкрив Р. Кох в 1882р.

Морфологія. Мікобактерії туберкульозу – кислото-, спирто- і лугостійкі мікроорганізми, нерухомі, спор і капсул не утворюють, джгутиків не мають. Їхня типова форма – рядкові або злегка вигнуті палички із закругленими кінцями.

У електронному мікроскопі мікобактерії усіх видів мають вид палички з закругленими кінцями. Проте зустрічаються нерідко вигнуті й овальні форми. Розміри клітин однієї і тієї ж культури можуть значно варіювати – довжина від 1,5 до 4, ширина від 0,2 до 0,5 мкм. Встановлено філогенетичну близькість туберкульозних мікобактерій із променистими грибами-актиноміцетами. Ця подібність виявляється в повільному розвитку мікобактерій на елективних

живильних середовищах, а також у способі розмноження, поліморфності і здатності за певних умов іноді утворювати ниткоподібні гіллясті форми з колбовидними здуттями на кінцях, що нагадують актиноміцети.

Мікобактерії характеризуються високим вмістом ліпоїдів, внаслідок цього повільно сприймають анілінові барвники. Їх фарбування можливе із застосуванням карболової кислоти при підігріванні. На цьому заснований метод забарвлення мікобактерій по Цілю-Нільсену.

Мікобактерії фарбують за Грам-Муха, при цьому вони набувають зернистості і темно-фіолетовий колір.

Для їх швидкого виявлення у різноманітних об'єктах використовують люмінесцентний метод Полякової, в основі якого лежить здатність мікобактерій зафарбовуватися люмінесцентними барвниками (родамин-аураміном) і давати золотаво-жовтий колір під впливом ультрафіолетового опромінення. Метод має високу чутливість, дає кольорове зображення об'єкта, дослідження ведеться при середніх збільшеннях, що дає можливість переглянути більше поле, чим при звичайній мікроскопії, що потребує імерсії.

На рідких живильних середовищах, мікобактерії людини утворюють коси, джгути, завитки, скупчення, що мають, як правило, орієнтований ріст. Це явище назване корд фактором і пов'язано з цілісністю ліпідних структур, розташованих на поверхні клітини, і властивий тільки вірулентним мікобактеріям.

Культивування. Мікобактерії туберкульозу спроможні розмножуватися в аеробних умовах на відповідних елективних живильних середовищах, що містять у визначених сполученнях вуглець, азот, водень і кисень. З мінеральних речовин життєво необхідними виявилися магній, калій, сірка і фосфор. Стимулюючий вплив на ріст туберкульозних мікобактерій мають солі заліза і деякі інші елементи. Для здійснення біохімічних процесів у мікобактерій необхідною умовою є оптимальна температура: 37-38⁰С для людського, 38-39⁰С для ВРХ і 39-41⁰С для пташиного видів.

Для культивування мікобактерій використовують живильні середовища: прості і елективні. До простих відносять: гліцериновий МПБ і гліцериновий МПА. З елективних середовищ використовують Петраньяні, Левенштейна, тощо.

Зростання мікобактерій туберкульозу на рідких ЖС з гліцерином з'являється через 7-30 днів і більш у вигляді плівки. *Mycobacterium tuberculosis* – утворює товсту складчасту плівку, що піднімається на стінки посудини. *Myc. bovis* – плівку петльовану з бородавчатими виростами, а *Myc. avium* на 7-10 добу тонку, ніжну, білувату а до 21 добу – потужну зморшкувату плівку.

На щільних середовищах спочатку утворюються ледве помітні мікроколонії, які з часом збільшуються і набувають дрібних або великих розмірів. Стають блискучими або матовими, можуть бути гладкими (S-форма) або жорсткуватими (R-форма). Можуть бути у вигляді поодиноких відокремлених або ж суцільно скупчених, зморшкуватого нальоту білого або білого з жовтуватим відтінком, або ж іншого кольору.

Завдання 2. Запишіть біологічні властивості патогенних мікобактерій у робочий зошит.

Контрольні питання.

1. Перелічіть, які мікроорганізми постійно перебувають у повітрі.
2. Поясніть чи є повітря сприятливим середовищем для бактерій.
3. Проаналізуйте методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря.
4. Назвіть, які тест-мікроби визначають у повітрі.
5. Дайте визначення поняттю туберкульоз.
6. Охарактеризуйте морфологію збудника туберкульозу людини.
7. Перелічіть біологічні властивості збудника туберкульозу людини.
8. Обґрунтуйте, на яких середовищах культивують збудника туберкульозу людини.

Лабораторне заняття 15

ТЕМА: МІКРОФЛОРА ВОДИ. ЗБУДНИК ЛЕПТОСПИРОЗУ.

Мета: ознайомитися з правилами відбору проб води для бактеріологічного дослідження, вивчити методи бактеріологічного дослідження води, вивчити біологічні властивості збудника лептоспірозу.

Матеріальне забезпечення: водопровідна вода у колбі, стерильні пробірки, стерильні градуйовані піпетки, стерильні чашки Петрі, МПА, агар Ендо, таблиці.

Вступні пояснення

Санітарно-бактеріологічне дослідження води. З відкритих водосховищ проби води відбирають з глибини 10-15 см від поверхні і, на відстані 10-15 см від дна. Із водопроводу воду беруть в стерильні флакони з притертим корком ємністю 0,5 л, а з глибини водосховища – прив'язаним до жердини батометром або скляною посудиною з притертим корком, до якої прикріплений шнур. Водопровідну воду наливають після попереднього пропалювання крану і витікання перших порцій води з нього на протязі 10-15 хв. Воду з колодязя необхідно брати до початку користування ним або через 10-12 год після припинення користування. Проміжок часу з моменту взяття проби до бактеріологічного дослідження не повинен перевищувати 2 год (при температурі 1-5⁰С можна зберігати до 6 год).

Визначення загальної кількості бактерій у воді. Загальна кількість бактерій у воді показує кількість бактерій у 1 мл води. Воду перед посівом розводять стерильною водопровідною водою 1:10, 1:100 і далі в залежності від забруднення. З кожної проби беруть для посіву не менше двох різних розведень. Воду з артезіанських свердловин та водопроводів можна засівати не розводячи, в кількості 0.5-1 мл. Воду що досліджують добре перемішують і проводять посів у чашки Петрі: 1 мл води градуйованою піпеткою переносять в стерильну чашку, злегка піднявши її кришку. Після цього в чашку наливають 10-12 мл розплавленого та прохолодженого до 45⁰С МПА, чашку закривають і коловими рухами ретельно перемішують МПА з водою.

Чашки ставлять в термостат на добу. По кількості колоній, що вирости судять про кількість мікробів у воді. Загальна кількість бактерій в 1 мл водопровідної води не повинна перевищувати 100 (від 100 до 1000 колоній – вода сумнівна, від 1000 і більше – не придатною до споживання), а відкритих

водосховищ – не більш 1000.

Визначення колі-титру води. Наявність у воді кишкової палички є наслідком фекального забруднення і вказує на можливість обсіменіння води патогенними мікроорганізмами. Ступінь забрудненості води кишковою паличкою характеризують колі-титром, що є найменшою кількістю води, в якій виявляють кишкову паличку, або колі-індексом (кількістю кишкової палички, що міститься в 1000 мл води). Для визначення колі-титру використовують бродильну пробу і засіб мембранних фільтрів.

Суть бродильної проби полягає в тому, що воду, яка досліджується в певній кількості висівають на середовище накопичення, після цього за наявності зростання, характерного для кишкової палички, пересівають на диференціально-діагностичні середовища. Беруть три обсяги водопровідної води по 100 мл, три – по 10 мл і три – по 1 мл. Воду в цій кількості висівають в колби і пробірки з глюкозо-пептонним або лактозо-пептонним середовищем з індикатором і «поплавцем». Усі посіви ставлять в термостат на 24 год. За відсутності зростання мікробів, утворення кислоти і газу – результат негативний (вода доброякісна). З пробірок, в яких є зростання бактерій (помутніння і зміна кольору середовища), проводять посів штрихом на поверхню середовища Ендо або Левина і ставлять в термостат на 16-18 год. З колоній, характерних для бактерій групи кишкової палички, готують мазки, фарбують, мікроскопують. Культуру вивчають за оксидазним тестом – фільтрувальний папір змочують розчином нафтол-диетіл-пфенілендіаміна. Після цього 2-3 ізольовані колонії кожного типу з агару Ендо знімають петлею і переносять штрихом на змочений реактивом папір. Відсутність зміни в забарвленні паперу (негативний результат оксидазної проби) а наявність грамнегативних паличок в препараті (мазку) свідчать про зростання кишкової палички.

Титр кишкової палички для водопровідної води допускається не менше 333 мл, для води відкритих водосховищ – орієнтовно не менше 111 мл.

Засіб мембранних фільтрів частіше застосовують в лабораторній практиці. Полягає він у тому, що певний обсяг води пропускають під тиском через фільтри, виготовлені з нітроцелюлози, з наступним накладенням їх матовою стороною на поверхню агару Ендо. Їх витримують у термостаті 18-24 год. Після цього підраховують кількість колоній, визначають колі-титр і колі-індекс.

Завдання 1. Засвоїти способи відбору проб води для санітарно-бактеріологічного дослідження та виконати лабораторну роботу 1.

Лабораторна робота 1

Визначення мікробного числа водопровідної води

Хід роботи

1. У пробірку мірною піпеткою внесіть 9 мл стерильної води (весь посуд стерильний).
2. В цю ж пробірку внесіть 1 мл водопровідної води, перемішайте.
3. Відберіть піпеткою 1 мл і внесіть у стерильні чашки Петрі.
4. Залийте у чашку розплавлене і охолоджене до 45°C стерильне середовище МПА та обережно нахилийте і обертайте чашки для перемішування суміші.

5. Після застигання середовища чашки помістіть у термостаті при температурі 37°C на 2-3 доби.

6. Підрахуйте кількість колоній і помножте кількість колоній на відповідне розведення.

Пояснення. Лептоспіри викликають лептоспіроз – інфекційну природно-осередкову хворобу тварин і людини, що характеризується короткочасною лихоманкою, анемією, жовтухою, гемоглобінурією, геморагічним діатезом, некрозом слизових оболонок і шкіри, атонією органів травлення, абортами. Хвороба може протікати безсимптомно. Збудника відкрили Інад і Ідо у 1914-1915 рр.

Лептоспіри відносяться до родини *Leptospiraceae* (*leptos* – тонкий, *spira* – виток, спіраль) і роду *Leptospira*, що включає два види: патогенний – *L. interrogans* – і сапрофітний – *L. biflexa*. Патогенний вид поданий 183 сероварами, що по складу антигенів об'єднані в 25 серологічних груп.

У інфекційній патології тварин найбільше значення мають серогрупи: *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*.

Морфологія. Лептоспіри – спіралеподібна бактерія діаметром 0,1-0,25 і довжиною 15-30 мкм, що утворюють біля 20 дрібних, тісно розташованих первинних завитків і 1-2 повторних, що надають клітині форму букв Г, S, С. Осьова нитка складається з двох фібрил. У темному полі вони мають вид тонких, сріблених ниток із стовщеними і загнутими у виді гачків. У клітин деяких штамів кінці прямі.

Лептоспіри характеризуються активною рухливістю. Головним типом руху є обертово-поступальний. Спор не утворюють. Грамнегативні, погано зафарбовуються аніліновими барвниками, по Романовському-Гимзі – у червоний колір, але фіксація різко змінює їхню морфологію; використовують також метод імпрегнації сріблом.

Культивування. Лептоспіри – хемоорганотрофні факультативно-анаеробні бактерії. Культивують їх в аеробних умовах при температурі 28-30°C на спеціальних середовищах, що містять 5-10 % сироватки крові кролика або вівці, дистильовану, водопровідну, криничну воду або фосфатний буфер (рН=7,2-7,6). До них відносять середовища: Уленгута, Терскіх, Ферворта-Вольфа, Любашенко й ін. Розмноження лептоспір звичайно починається через 7-20 днів, іноді 1-2 місяці. Середовище при цьому не змінюється і наявність росту визначають мікроскопією в темному полі. На щільних середовищах лептоспіри утворюють колонії S-, O- і R-форм. S-форма – типова вірулентна, її колонії прозорі, у виді диска з рівним краєм.

Завдання 2. Перепишіть з презентаційних слайдів біологічні властивості лептоспір у робочий зошит.

Контрольні питання.

1. Назвіть мікроорганізми, які постійно перебувають у воді.
2. Обґрунтуйте чи є вода сприятливим середовищем для бактерій.
3. Перелічіть методи санітарно-бактеріологічне дослідження води.
4. Поясніть поняття колі-титр і колі-індекс.
5. Дайте визначення поняття лептоспіроз.

6. Поясніть морфологію збудника лептоспірозу людини.
7. Назвіть біологічні властивості збудника лептоспірозу людини.
8. Обґрунтуйте, на яких середовищах культивують збудника лептоспірозу людини.

Лабораторне заняття 16

Тема: МІКРОФЛОРА ҐРУНТУ. ЗБУДНИКИ ҐРУНТОВИХ ІНФЕКЦІЙ.

Мета: ознайомитися з правилами відбору ґрунту для бактеріологічного дослідження, вивчити методи бактеріологічного дослідження ґрунту, вивчити які збудники є у ґрунті.

Матеріальне забезпечення: наважки ґрунту, стерильна вода у колбі, марлева салфетка, стерильні: колби для приготування суспензії, мірні циліндри, піпетки на 1 мл, чашки Петрі, пробірки з середовищем Кеслера, МПА, агар Ендо, Левина.

Вступні пояснення

Ґрунт – найважливіший елемент місць зростання наземних рослин та життя тварин. З усіх природних середовищ найбільша кількість мікроорганізмів знаходиться у ґрунті, який, за висловом А.Л. Ячевського, є резервуаром, де існують та розмножуються численні мікроби нашої планети що відіграють важливу роль у створенні його родючості та кругообігу речовин у природі. Відомо, наприклад, що в 1 г чорнозему нараховується десятки мільярдів мікробних клітин, а загальна маса їх нерідко досягає до 10 т/га.

Найважливішим з едафічних факторів життя мікроорганізмів у ґрунті є ґрунтовий розчин, що містить органічні, мінеральні і газоподібні сполуки. Волога не тільки здійснює безпосередній фізіологічний вплив на мікробіологічну активність, а й видозмінює інші важливі екологічні фактори – температуру, аерацію ґрунту, засвоєння джерел живлення мікробами і рослинами, зумовлює рухливість хімічних елементів і транспортування їх до асиміляційних органів.

Загальну кількість мікроорганізмів визначають двома способами: підраховують клітини і роблять посів на штучні живильні середовища. При підрахунку клітин визначають кількість мікробів у досліджуваній наважці ґрунту. Висівають мікроорганізми, щоб встановити їх видовий склад і кількість. Наведені способи визначення кількості мікроорганізмів у ґрунті дають лише відносиний показник густоти мікробного населення.

Кількісний та якісний склад мікроорганізмів залежить від багатьох умов; клімату, характеру покривної рослинності, фізико-хімічних властивостей, типу механічного складу ґрунту та інших екологічних факторів.

Найбільша кількість мікроорганізмів знаходиться в поверхневому шарі ґрунту (на глибині до 30 см); у більш глибоких горизонтах мікробів значно менше. Так, на глибині 1-2 м зустрічаються поодинокі популяції бактерій, грибів, актиноміцетів, протозоа тощо, а на глибині 6 м їх не знаходять.

Велике значення мають мікроорганізми для життя рослинного світу. В результаті їх життєдіяльності вищі рослини забезпечуються придатними для засвоєння органічними, мінеральними та азотистими сполуками.

Наявність у ґрунті патогенних мікроорганізмів небезпечна для людини та тварин. До типових ґрунтових патогенів належать збудники сибірки, правця, газової гангрені та злоякісного набряку. Деякі інфекції називають навіть ґрунтовими, як, наприклад, сибірку, емфізематозний карбункул, правець, спорові форми яких можуть зберігатися в ґрунті десятиріччями. З неспоривих мікробів у ґрунті можуть бути збудники туберкульозу, сальмонельозу, бешихи свиней тощо. Ґрунт є природним середовищем, де починається і завершується життєвий цикл багатьох видів грибів (сажкових, іржастих, борошністоросяних тощо). Ґрунтові мікроорганізми, зокрема мікроміцети, є основним джерелом контамінації різних субстратів, в тому числі вегетуючих рослин пасовищ, листяного опаду, поживних решток, зерна, грубих кормів, а також продуктів харчування, сільськогосподарської та промислової сировини. Частки ґрунту, попадаючи на сіно, соломі, зерно під час збору врожаю, переносять на них численну кількість бактерій, а також спор різних видів грибів, в тому числі і токсикогенних, які не тільки знижують харчову цінність кормів, але й зумовлюють їх токсичні властивості. Тому корми певною агробіоценозу (з врахуванням типу ґрунту, видів рослин тощо) характеризується неоднаковим складом видів мікроміцетів (залежно від екотопу). З ґрунту мікроби надходять у воду та повітрі.

Завдання 1. Вивчіть методику відбору зразків ґрунту для визначення мікробіоти ґрунту та виконайте лабораторну роботу.

Лабораторна робота 1.

Визначення мікробного числа ґрунту

Хід роботи:

1. Із зразка досліджуваного ґрунту відважте 1 г і зробіть серію розведень у стерильній воді для одержання ґрунтової витяжки. Розведення готують так: у мірну колбу об'ємом 100 мл внесіть 1 г ґрунту, додайте 99 мл стерильної води і збовтуйте впродовж 3 хв (весь посуд стерильний). Потім відстоюйте 15 хв і робіть розведення 1:100 000. Для виготовлення кожного наступного розведення беріть окрему піпетку.

2. У чашки Петрі піпеткою внесіть 1 мл ґрунтової суспензії і розподіліть рівномірно по дну, вилийте розплавлений МПА і, обережно похитуючи її, перемішайте поживне середовище з ґрунтовою суспензією.

3. Після застигання середовища чашки Петрі поставте у термостат при температурі 28-30°C на 3-5 діб.

4. Підрахуйте кількість колоній і помножьте на ступіть розведення.

Контрольні питання.

1. Перелічіть мікроорганізми, які постійно перебувають у ґрунті.
2. Проаналізуйте чи є ґрунт сприятливим середовищем для бактерій.
3. Назвіть методи санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту.
4. Поясніть термін перфрінгенс-титр ґрунту.
5. Охарактеризуйте збудники інфекцій, які є у ґрунті.

Лабораторне заняття 17

Тема: МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МОЛОКА ТА МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ.

Мета: ознайомитися з мікрофлорою молока та методами її визначення.

Матеріальне забезпечення: чисті культури (у пробірках) молочнокислого бродіння: кефірних дріжджів, предметні скельця, мікробіологічні петлі, чашки Петрі, зливні містки, барвник – метиленовий блакитний, мікроскопи, імерсійна олія.

Вступні пояснення

Молоко є найціннішим продуктом харчування людей. З нього виготовляють широкий асортимент високоцінних молочних продуктів: масло, сир, сметану, вершки, кефір, кисле молоко, різноманітні молочні консерви і багато чого іншого. Висока біологічна і харчова цінність молока полягає в тому, що воно містить всі необхідні речовини у формі, яка легко засвоюється організмом. Молочні продукти часто застосовуються як дієтичні, а кисломолочні – і як лікувальні засоби.

Молоко є добрим живильним середовищем для розвитку більшості мікроорганізмів, які вносяться із закваскою, також для тих, що надходять із зовнішнього середовища. Умовно мікрофлору, яка потрапляє в молоко й молочні продукти, поділяють на групи: *технічно-важливу* (корисну, або бажану, і шкідливу, або небажану), *санітарно-показову* й *умовно-патогенну та патогенну*. Технічно бажані мікроорганізми мають *корисні* властивості та використовуються в молочній промисловості у складі заквасок для кисломолочних продуктів.

Молочнокислі мікроорганізми – специфічна група мікроорганізмів, що зумовлюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів молока до молочної кислоти. Поряд з основним продуктом бродіння – молочною кислотою - утворюються й побічні продукти: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, етиловий спирт та ін.

Молочнокислі бактерії за формою поділяють на дві групи – кулясті (лактококи) і циліндричні (лактобактерії).

Молочнокислі стрептококи: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*.

Молочнокислі палички: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*.

За температурним режимом культивування молочнокислі мікроорганізми поділяються на *мезофільні*, для яких оптимальна температура росту становить від 20 до 30°C, і *термофільні* – оптимальна температура росту яких 40-45°C.

Залежно від продуктів, які накопичуються в процесі бродіння, усі молочнокислі бактерії поділяють на дві групи:

1) *гомоферментативні* – при зброджуванні вуглеводів молока утворюють як основний продукт розпаду молочну кислоту та незначну кількість інших продуктів;

2) *гетероферментативні* – крім молочної кислоти, утворюють значну кількість інших речовин: кислоти, спирт, вуглекислий газ тощо.

Мікроорганізми, що належать до інших груп, викликають вади або псування молока й молочних продуктів мікробного походження (технічно небажані) та беруть участь у формуванні показників якості та безпеки готової молочної продукції (санітарно-показові та умовно патогенні та патогенні мікроорганізми).

Санітарно-показові мікроорганізми в молочних продуктах свідчать про санітарно-гігієнічний стан виробництва на молокопереробному підприємстві.

У нашій країні санітарно-показовими мікроорганізмами для оцінки санітарного стану молока і молочних продуктів є бактерії групи кишкової палички (БГКП). Їх кількість є показником ступеня забрудненості продуктів виділеннями людини і, відповідно, ступеня їх безпечності для споживачів.

Тому наявність БГКП нормують для всіх без винятку молочних продуктів. Умовно-патогенні мікроорганізми є збудниками токсикозів та токсикоінфекцій. Деякі умовно-патогенні мікроорганізми здатні розмножуватися в молочних продуктах, впливати на їхні органолептичні показники та накопичувати токсини. У більшості молочних продуктів для оцінки їх якості визначають наявність золотистого стафілококу *Staphylococcus aureus*.

Патогенні мікроорганізми – збудники інфекційних захворювань – у молоці і молочних продуктах не розмножуються, проте тривалий час можуть зберігати свою життєздатність та створювати небезпеку для споживачів. Серед патогенних мікроорганізмів в усіх молочних продуктах нормується наявність сальмонел.

Завдання 1. Приготуйте препарати з кисломолочних продуктів, проведіть мікроскопію і замалюйте збудників процесу (молочнокислий стрептокок, болгарська і ацидофільна палички).

Лабораторна робота 1.

Мікроскопія молока (кефіру)

Хід роботи:

1. Досліджуваний кисломолочний продукт мікробіологічною петлею наносять на предметне скло і розподіляють тонким шаром на його поверхні.
2. Висушують і фіксують. (Фіксувати краще спиртом-ефіром, при цьому розчиняються крапельки жиру, поліпшується фон. Але можна фіксувати і над полум'ям спиртівки).
3. Мазок зафарбуйте метиленовим блакитним протягом 2-3 хв.
4. Мікроскопуйте в імерсійній системі.

Мікроскопічна картина: на ясно-блакитному фоні добре видно фарбовані в синій колір ті форми мікробів, які містяться в досліджуваному продукті.

Загальне мікробне обсіменіння молока визначають за допомогою редуктазної проби. Проба на редуктазу з метиленовим блакитним є непрямим показником бактерійного обсіменіння непастеризованого молока.

Завдання 2. Поставити редуктазну пробу з непастеризованим молоком

Лабораторна робота 2.

Проба на редуктазу з метиленовим блакитним

Хід роботи:

1. В хімічну пробірку налийте 1 мл робочого розчину метиленового блакитного і 20 мл досліджуваного молока. Пробірка повинна бути щільно закрита корком.

2. Після перемішування вмісту пробірку поставте у водяну баню з температурою 38°C.

3. Через 20 хвилин, через 2 години і через 5 годин 30 хвилин спостерігають за знебарвленням вмісту пробірки.

Час знебарвлення вмісту пробірки пов'язаний з кількістю мікроорганізмів в молоці, які виробляють фермент редуктазу. За часом знебарвлення встановлюють приблизне бактерійне обсіменіння молока і його доброякісність.

Час знебарвлення	Кількість бактерій / мл	Якість молока	Клас
Понад 5 год 30 хв	Менш 500 000	гарне	I
Від 2 год. до 5 год 30 хв	Від 500 000 до 4 млн.	задовільний	II
Від 20 хв до 2 год	Від 4 млн. До 20 млн.	погане	III
Менше 20 хв	Більше 20 млн.	дуже погане	IV

Контрольні питання.

1. Назвіть групи мікроорганізмів, що містяться в молоці й молочних продуктах.

2. Перелічіть та дайте коротку характеристику методам визначення мікрофлори молока та молочних продуктів.

Лабораторне заняття 18

Тема: МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ М'ЯСА

Мета: ознайомитися з мікрофлорою м'яса та методами визначення його мікробного обсіменіння.

Матеріальне забезпечення: 200 г свіжого м'яса, предметні скельця, мікробіологічні петлі, чашки Петрі, зливні містки, фарбник – метиленовий блакитний, мікроскопи, імерсійна олія.

Вступні пояснення

У крові і м'язах здорових тварин мікроорганізми, як правило, відсутні. Значний вміст мікробів у м'ясі і м'ясопродуктах пояснюється забрудненням їх під час обробки. У крові і м'язах виявляються лише у хворих і ослаблених тварин, через неможливість спричинити опір проникненню мікробів з кишечника у кров. Під час первинної переробки худоби мікроби потрапляють на поверхню туші зі шкіри тварин, кишечника, із знарядь забою і обробки, з обладнання, повітря, рук персоналу та інших джерел. По лімфатичних і кровоносних судинах під час знекровлення туш мікроби можуть проникати з повітрям в середину.

М'ясо і м'ясопродукти є хорошою живильною середою для розвитку мікроорганізмів. Тому з метою збереження якості м'яса і м'ясопродуктів їх піддають засолу, холодильному зберіганню і іншим видам консервації.

При органолептичному дослідженні м'яса звертають увагу на зовнішній вигляд, запах і консистенцію м'язової тканини на поверхні та розрізі. Метод мікроскопічного аналізу свіжості м'яса базується на визначенні кількості

бактерій та ступеня розпаду м'язової тканини шляхом мікроскопії мазків-відбитків. Необхідно приготувати два мазки-відбитки: один з поверхневого шару, другий з глибоко розташованих шарів м'язів.

Завдання 1. Визначити мікробне обсіменіння м'яса.

Лабораторна робота 1.

Бактеріоскопічне дослідження м'яса

Хід роботи:

1. Поверхню досліджуваних м'язів обробіть тампонами, змоченими спиртом, виріжте стерильними ножицями шматочки розміром 2,0X1,5X2,5 см.
2. Поверхнями зрізів прикладіть м'ясо до предметного скла.
3. Препарат підсушіть на повітрі.
4. Зафарбуйте за Грамом.
5. Зробіть мікроскопію в імерсійній системі. Розгляньте по 10 полів зору.

Препарати-відбитки із свіжого м'яса забарвлюються погано. При мікроскопії препаратів з поверхневого шару м'яса виявляють поодинокі палички або коки; в препаратах з глибоких шарів у більшості випадків мікрофлора відсутня.

Препарати-відбитки з м'яса сумнівної свіжості забарвлюються добре. В полі зору препарату, зробленого з поверхневого шару м'язів, виявляють до 10 мікроорганізмів, а в препаратах з глибоких шарів до 20-30 мікробів (переважно коки).

Препарати-відбитки із зіпсованого м'яса забарвлюються інтенсивно, на склі помітні залишки тканин м'яса, що розклались. У кожному полі зору мікроскопа при дослідженні препаратів, одержаних з поверхневих і глибоких шарів м'язів, у середньому виявляють понад 30 мікробів (переважно палички).

Контрольні питання.

1. Назвіть джерела потрапляння мікроорганізмів у м'ясо.
2. Як проводять бактеріоскопічне дослідження м'яса

Лабораторне заняття 19

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОФЛОРИ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ.

Мета: ознайомитися з мікробними асоціаціями на тілі людини.

Матеріальне забезпечення: мікроскопи і накривні скельця; МПА в чашках Петрі, спиртівки; фуксин.

Вступні пояснення

У процесі еволюції кожна група організмів повинна була пристосовуватися не тільки до неживої природи, а й до інших організмів довкілля. В умовах біологічної конкуренції значна частина мікроорганізмів пристосовується до існування в тісній тривалій асоціації з різними макроорганізмами. Мікрофлора людського організму якраз і є результатом взаємного пристосування макро- і мікроорганізмів в процесі еволюції.

Переважає більшість постійної нормальної мікрофлори тіла людини, яка складає близько 500 видів, адаптувалася до життя в певних його ділянках. Загальна вага нормальної мікрофлори дорослої людини складає близько 2-3 кг.

Разом з цим на людське тіло потрапляє також багато випадкових мікроорганізмів, які не входять до складу його нормальної мікрофлори. Остання характеризується сталістю, нагадуючи щось подібне до ектосимбіозу мікробів з організмом людини.

Мікрофлору здорової людини можна умовно розділити на 3 групи:

– випадкові мікроорганізми (транзиторні), що нездатні до тривалого існування в організмі і швидко гинуть;

– постійно існуючі в організмі, корисні для людини (здатні розщеплювати та засвоювати поживні речовини, синтезувати вітаміни, виступати як антагоністи патогенних мікробів, напр. біфідобактерії);

– постійно існуючі, але принципово небезпечні для людини, так звані умовно-патогенні мікроорганізми (проявляють свої хвороботворні властивості при зниженні резистентно-сті організму, зміні складу нормальної мікрофлори та ін. умов).

Макроорганізм і його нормальна мікрофлора в звичайних умовах знаходяться у стані динамічної рівноваги. Симбіотичні відношення між ними склалися та закріпилися у процесі тривалого еволюційного розвитку. Бактерії нормальної мікрофлори не спричиняють захворювань, якщо вони випадково не потрапляють у захищені ділянки людського тіла або якщо не настають різкі фізіологічні зміни в організмі. Кожна частина тіла людини забезпечує особливу екологічну нішу, для якої характерна певна мікрофлора. Перебуваючи в стані еубіозу – динамічній рівновазі з макроорганізмом, нормальна мікрофлора тіла людини має важливе значення, оскільки є антагоністом гнильної мікрофлори.

До складу мікрофлори тіла людини належать такі найпоширеніші представники мікросвіту: *Sarcina*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* (шкіра), *Neisseria*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Spirillum*, *Spirochaeta* (ротова порожнина), *Staphylococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* (дихальні шляхи), *Sarcina*, *St. faecalis*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium Perfringens*, *Candida* (шлунково-кишковий тракт) та багато інших.

Ознайомлення з мікрофлорою тіла людини має дуже важливе значення, оскільки порушення санітарно-гігієнічного режиму є причиною різних важких захворювань, особливо шлунково-кишкових (дифтерія, холера та інші). Мікрофлору тіла людини можна визначати різними методами. Для цього роблять посіви з пальців рук, зіву, випорожнень тощо.

Мікрофлора кишечника – мікроорганізми, що звичайно живуть у травній системі та виконують ряд корисних функцій для своїх господарів, частина нормальної флори. Кількість і різноманітність мікроорганізмів у різних відділах травного тракту залежить від багатьох факторів, зокрема рН, активності перистальтики, а також дієти і взаємодії з іншими мікроорганізмами. Так у шлунку, в зв'язку з високою кислотністю і швидкою перистальтикою, флори майже немає, в той час як повільні рухи і нейтральне рН товстого кишківника і нижніх відділів тонкого сприяють інтенсивному розмноженню різноманітних мікроорганізмів.

Кількість мікробів у кишківнику людини сягає близько 10^{14} , тобто приблизно у десять разів перевищує кількість власних клітин організму. Більшу

частину кишкової флори становлять бактерії, з них також на 60% (сухої маси) складаються фекалії. Ці бактерії за найпоширенішими оцінками належать до 500 різних видів, але пропонуються інші цифри – від 300 до 1000. Проте, ймовірно, що 99% всієї мікрофлори припадає на 30-40 видів. До флори кишківника також входять дріжджі. Маса всієї мікрофлори кишківника людини складає приблизно 200 грам.

Дослідження свідчать, що стосунки між кишечником і флорою не є просто *коменсалізмом*, (тобто нешкідливим співіснуванням), але скоріше формою *мутуалізму* – взаємовигідними відносинами. Хоча люди можуть вижити і без флори кишечника, мікроорганізми виконують для хазяїна низку корисних функцій, наприклад анаеробне травлення невикористаного матеріалу, що супроводжується синтезом деяких жирів, які можуть бути використані клітинами слизової оболонки кишки, і вітамінів (Н, В₉, В₅, В₂, В₁, В₆, В₁₂, К), хоч їх і недостатньо щоб повністю забезпечити добові потреби людини. Крім того мікрофлора забезпечує тренування імунної системи, запобігає зростанню шкідливих видів, полегшує симптоми діареї і закрепів, запальних захворювань кишківника, виразок, алергій, непереносимості лактози.

В нормі надмірному росту бактерій у тонкій кишці перешкоджають:

- нормальна секреція соляної кислоти (попереджує розмноження бактерій у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту);
- ілеоцекальний клапан (попереджує надходження бактерій з товстої кишки в тонку);
- нормальна пропульсивна моторика тонкої кишки (попереджує застій кишкового вмісту).

Біфідо- та лактобактерії мають виражену антагоністичну активність у відношенні патогенних бактерій, регулюють кількісний та якісний склад кишкової мікрофлори у нормі, затримують ріст та розмноження у ньому патогенних та умовно-патогенних мікробів.

Кишкові сапрофіти у порівнянні з патогенними бактеріями, містять велику кількість ферментів, розмножуються більш активно, тому легше утилізують поживні речовини та кисень. Вони виробляють різноманітні бактерицидні та бактериостатичні речовини.

У шлунку в нормі за рахунок кислого середовища кількість мікробів незначна (лактобацили, стрептококи, сарцини).

Дванадцятипала кишка та проксимальний відділ тонкої кишки в здорових людей стерильні за рахунок наявності в них агресивних травних ферментів.

У дистальній частині тонкої кишки у 1 мл вмісту нараховується 10^7 - 10^8 мікробів, у рівній кількості аеробів та анаеробів. У 1 мл вмісту дистального відділу товстої кишки знаходиться 10^9 - 10^{12} мікробів близько 400 видів. Найбільша щільність заселення мікрофлорою спостерігається у прямій кишці.

Усі мікроорганізми, що у нормі заселяють товсту кишку, ділять на три групи:

- основну (біфідобактерії та бактероїди),

- супутню (молочнокислі бактерії та штами кишкової палички, ентерококи),
- остаточну (стафілококи, гриби, протеї).

Завдання 1. Виконати лабораторну роботу 1. Описати морфологію мікроорганізмів зубного нальоту.

Лабораторна робота 1

Дослідження мікроорганізмів зубного нальоту

Хід роботи

1. На предметне скло пастерівською піпеткою нанесіть краплю стерильної води.
2. Стерильною зубочисткою зніміть зубний наліт і внесіть його в краплю води.
3. Рівномірно розподіліть зубний наліт у воді і зробіть фіксований мазок.
4. Після охолодження мазка зафарбувати за Грамом.

Завдання 1. Виконати лабораторну роботу 2.

Лабораторна робота 2

Визначення мікрофлори шкіри

Хід роботи:

1. Зробіть посів на МПА у чашках Петрі доторканням пальців до поверхні поживного середовища (утворення так званих «відбитків»).
2. Засіяні чашки Петрі розмістіть у термостаті при температурі 37°C на 24 год.
3. Вийміть чашки і тримайте їх протягом 2-3 днів при кімнатній температурі. За цей час утворюються колонії сарцин, стафілококів, різних пігментних бактерій, цвільових і дріжджових грибів тощо. З метою ідентифікації найпоширеніших мікроорганізмів вивчають їхні культуральні, морфологічні та інші властивості.

Контрольні питання.

1. Перелічіть порожнини організму людини в нормі вільні від мікробіоти.
2. Назвіть мікроорганізми, які є мешканцями ротової порожнини.
3. Проаналізуйте мікрофлору, яка присутня на шкірі.

Список використаних та рекомендованих джерел

1. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Звір Г.О. Санітарна мікробіологія : підручник. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2016. 347 с.
2. Капрельянц Л.В., Єгорова А.А., Труфкаті Л.В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і вірусології : навч. посіб. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2018. 136 с.
3. Люта В.А., Кононов О.В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія: підручник. К.: ВСВ «Медицина», 2017. 576 с. URL: <https://www.twirpx.com/file/2727919/grant/>
4. Мікробіологія : навчальний посібник. Т.М. Чорна. Ірпінь: УДФСУ, 2020. 412 с. URL: https://shron1.chtyvo.org.ua/Chorna_Tetiana/Mikrobiolohiia.pdf
5. Мікробіологія : підруч. для студентів вищ. навч. закл. / Н.І. Філімонова, Л.Ф. Сілаєва, О.М. Дика та ін. ; за заг. ред. Н.І. Філімонової. 2-ге вид. Харків: НФаУ: Золоті сторінки, 2019. 676 с. URL: <https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/10/mikrobiolohiia-2019.pdf>
6. Мікробіологія. Том 1 : підручник / Сергійчук М.Г., Сківка Л.М., Сергійчук Т.М. та ін. К. : ФОП Маслаков, 2020. 500 с. URL: https://drive.google.com/file/d/1Gq2e5eP97RWrVoFph_Fh552A1MgTFZrs/view
7. Мікробіологія. Том 2: підручник / Сергійчук М.Г., Сківка Л.М., Сергійчук Т.М. та ін. К. : ФОП Маслаков, 2020. 348 с. URL: <https://drive.google.com/file/d/1OheSi4fvaA6GSDySmAyJqgXp8e4KxIdM/view>
8. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. 312 с. URL: <http://repository.vsau.org/getfile.php/25443.pdf>
9. Стасенко А.А. Місцевий імунітет [Електронний ресурс] : навч. посіб.; ННЦ «Інститут біології та медицини», К. : 2021. 153 с. URL: https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Microbiologiya/Library/Stasenko_Mistseviy_imunitet.pdf
10. Тестові завдання для самоконтролю знань з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія» [Електронний ресурс] / уклад.: Т.М. Супрович, В.А. Колодій. Кам'янець-Подільський: Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка, 2021. 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. URL: <http://elar.kpnu.edu.ua/xmlui/handle/123456789/8289>
11. Фізико-хімічні методи в мікробіологічних та імунологічних дослідженнях: навч. посіб./ П.П. Зелена, О.С. Моложава, М.П. Рудик, Л.М. Сківка, Ю.М. Юмина. К.: Видавець Кравченко Я.О., 2019. 167 с. URL: <https://drive.google.com/file/d/1z2oSbF7UQUhUd4gTIUCTgthZKLOGrWXt/view>
12. Фурзікова Т.М., Сергійчук М.Г., Власенко В.В. та ін. Мікробіологія. Практикум. Київ: Фітоценологія, 2006. 210 с.
13. Чорна Т.М. Мікробіологія : навчальний посібник; Університет державної фіскальної служби України. Ірпінь : УДФСУ, 2020. 412 с. URL: http://ir.nusta.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/4851/1/4573_IR.pdf

14. Шамрай С.М., Леонтьев Д.В. Вірусологія: підручник. Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, 2020. 244 с. URL: <https://www.twirpx.com/file/3295230/>
15. Boone, David R.; Castenholz, Richard W. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2001. Vol. 1. P. 721. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-21609-6>
16. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Introductory Essays / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2005. Vol. 2A. P. 304. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/0-387-28021-9>
17. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. The Gammaproteobacteria / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2005. Vol. 2B. P. 1108. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/0-387-28022-7>
18. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. The Proteobacteria / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2005. Vol. 2C. P. 1388. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/0-387-29298-5>
19. Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Whitman, W.B.; Hedlund, B.P.; Paster, B.J.; Staley, J.T.; Ward, N.; Brown, D.; Parte, A. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2010. Vol. 4. P. 908. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68572-4>
20. Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. The Firmicutes / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2009. Vol. 3. P. 1450. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68489-5>
21. Whitman, W.B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.-J.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W.; Suzuki, K.-i.; Parte, A. The Actinobacteria / George M. Garrity. 2nd. New York: Springer, 2012. Vol. 4. P. 1750. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68233-4>

ЗМІСТ

Передмова	3
Лабораторне заняття 1. Організація та обладнання мікробіологічної лабораторії. Правила роботи, техніка безпеки	7
Лабораторне заняття 2. Будова світлового та електронного мікроскопів. Морфологія бактерій	10
Лабораторне заняття 3. Визначення рухливості бактерій	14
Лабораторне заняття 4. Методи виготовлення препаратів для мікроскопічного дослідження. Простий метод фарбування	16
Лабораторне заняття 5. Фарбування за Грамом. Клітинні включення мікроорганізмів	18
Лабораторне заняття 6. Складні (диференціюючі) методи фарбування	23
Лабораторне заняття 7. Методи стерилізації живильних середовищ, лабораторного посуду та інструментів	27
Лабораторне заняття 8. Вимоги до живильних середовищ, їх приготування та класифікація	30
Лабораторне заняття 9. Методи виділення і культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах	32
Лабораторне заняття 10. Методи отримання чистої культури бактерій	33
Лабораторне заняття 11. Культуральні властивості мікроорганізмів	35
Лабораторне заняття 12. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів	37
Лабораторне заняття 13. Методи визначення антагонізму у мікроорганізмі	40
Лабораторне заняття 14. Мікрофлора повітря житлових приміщень. Збудники повітряно-крапельних інфекцій	42
Лабораторне заняття 15. Мікрофлора води. Збудник лептоспірозу	45
Лабораторне заняття 16. Мікрофлора ґрунту. Збудники ґрунтових інфекцій	48
Лабораторне заняття 17. Мікробіологічний аналіз молока та молочних продуктів	50
Лабораторне заняття 18. Мікробіологічний аналіз м'яса	52
Лабораторне заняття 19. Дослідження мікрофлори організму людини	53
Список використаних та рекомендованих джерел	57

Кам'янець-Подільський національний університет імені Івана Огієнка

Навчальне видання

Колодій Валентина Анатоліївна,
кандидат біологічних наук,
старший викладач кафедри біології та екології
Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка

Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з дисципліни
«Мікробіологія та вірусологія»
Навчально-методичний посібник

Підписано до друку 30.08.2024 р.
Формат 60x84\16
Гарнітура Times New Roman.
Папір офсетний. Друк офсетний.
Ум. друк. арк. 3,49. Тираж 100 прим.

Віддруковано згідно з наданим оригінал-макетом
ФОП Гордукова І.Є.
Згідно виписки з ЄДРПОУ від 10.06.2015 р.
м. Кам'янець-Подільський, вул. Привокзальна, 20
тел. 098 627 00 79, drukruta@ukr.ne