

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами першого рівня вищої освіти (бакалавр) спеціальності 203 «Садівництво, плодовоовочівництво та виноградарство»

УМАНЬ – 2024

Методичні вказівки підготували:

В. П. Карпенко – доктор с.-г. наук, професор кафедри біології Уманського національного університету садівництва

Р. М. Притуляк – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри біології Уманського національного університету садівництва

Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри біології (протокол від 6 серпня 2024 року № 1).

Схвалено науково-методичною комісією факультету плодоовочівництва, екології та захисту рослин

Протокол від 9 серпня 2024 року № 1

Рецензенти:

В. П. Патика – доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України;

С. В. Суханов– кандидат біологічних наук, доцент кафедри захисту і карантину рослин УНУС.

Карпенко В. П., Притуляк Р. М.

Мікробіологія з основами вірусології. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами першого рівня вищої освіти (бакалавр) спеціальності 203 «Садівництво, плодоовочівництво та виноградарство». Умань, 2024. 65 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
Лабораторна робота №1.	
Правила техніки безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії.	
Обладнання лабораторії і робочого місця мікробіолога.	5
Ознайомлення з будовою і роботою світлового мікроскопу.	
Виготовлення препаратів живих клітин мікроорганізмів.	
Лабораторна робота №2.	
Фіксація мікроорганізмів. Просте і складне забарвлення за Грамом.	16
Живильні середовища. Стерилізація.	
Лабораторна робота №3.	
Методи відбору і підготовки проб з різних об'єктів для мікробіологічних аналізів. Посів мікроорганізмів із плодів, овочів, ґрунтів і зерна для визначення їх чисельності методом розведень.	29
Посів мікроорганізмів з води та повітря.	
Лабораторна робота №4.	
Кількісний облік мікроорганізмів, висіяних із плодів, овочів, ґрунтів, зерна води і повітря.	
Пересів мікроорганізмів із однієї колонії на різні живильні середовища для визначення виду.	37
Лабораторна робота №5.	
Ідентифікація мікроорганізмів. Форми бактерій і мікроскопічних грибів.	39
Лабораторна робота №6.	
Дослідження збудників молочнокислого бродіння. Постановка досліду на маслянокисле бродіння та нітрифікацію у ґрунті.	51
Лабораторна робота №7.	
Дослідження збудників маслянокислого бродіння та нітрифікації у ґрунті.	54
Лабораторна робота №8.	
Вивчення морфологічної будови мікроорганізмів – збудників хвороб рослин та псування різних за призначенням видів сировини (плоди, овочі, зерно) та готових продуктів (клостридії, мезофільні і термофільні бацили, мікроскопічні гриби і дріжджі).	57
Лабораторна робота №9.	
Закладання дослідів на вивчення санітарно-бактеріологічного стану обладнання, інвентаря, тари, рук обслуговуючого персоналу (МАФАНМ, БГКП).	
Дослідження забрудненості зерна і борошна картопляною паличкою.	58
Лабораторна робота №10.	
Підрахунки і дослідження мікроорганізмів, висіяних з обладнання, тари, інвентаря та рук обслуговуючого персоналу. Санітарно-бактеріологічна оцінка одержаних даних. Дослідження забрудненості зерна і борошна грибною мікробіотою.	61
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	65

ПЕРЕДМОВА

Мікробіологія з основами вірусології – одна із фундаментальних та основних дисциплін біології, яка вивчає світ бактерій (мікроорганізмів). Метою дисципліни є вивчення студентами будови, систематики, фізіології, живлення, розмноження, генетики, екології мікроорганізмів, дослідження закономірностей їх життєдіяльності та ролі у кругообігу речовин в природі, методів мікробіологічних досліджень та вміння їхнього застосування.

Швидкий розвиток сучасної мікробіології та її методів вимагає постійного оновлення та модернізації навчальної літератури та матеріальної бази. Методичні рекомендації складено відповідно до програми курсу «Мікробіологія з основами вірусології» і є методичним посібником для студентів із спеціальності 203 «Садівництво, плодоовочівництво та виноградарство» під час проведення лабораторних занять. Методичні рекомендації розраховано на виконання студентами загальновідомих методів, які є класичними і не вимагають специфічного та складного обладнання.

При складанні методичних вказівок враховано досягнення мікробіології в напрямках дослідження структури і функцій бактеріальних клітин, фізіології обміну речовин у мікроорганізмів, їх ролі в ґрунтових процесах і житті рослин.

Наведено методи мікроскопічних досліджень, вивчення морфології мікроорганізмів; техніки посівів і виділення чистих культур, їх ідентифікації; методи виділення мікробіоти повітря, ґрунту, води, обладнання; дослідження видів бродіння та перетворення азоту у ґрунті.

Освоєння студентами цих навиків дає змогу застосовувати їх як для виконання лабораторних робіт, так і в подальшій науково-дослідній та виробничій роботі.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

**Правила техніки безпеки при роботі в мікробіологічній лабораторії.
Обладнання лабораторії і робочого місця мікробіолога.**

**Ознайомлення з будовою і роботою світлового мікроскопу.
Виготовлення препаратів живих клітин мікроорганізмів.**

Матеріали і обладнання: добові культури мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*; мікроскопи; об'єкт-мікрометри; окуляр-мікрометри; предметні скельця; б) покривні скельця; предметні скельця з лункою посередині; пробірки з фізіологічним розчином; 9) водні розчини барвників (фуксину нейтрального, метиленового синього, генціан-віолету); бактеорологічні петлі; спиртівки.

Вказівки до виконання роботи.

Сучасна мікробіологічна лабораторія є комплексом приміщень, устаткування і приладів, що дозволяють використовувати різні прийоми для вирощування бактерій, виділених з чистих культур, вивчення морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних і молекулярно-генетичних властивостей. Лабораторії включають кімнати для мікробіологічних досліджень і підсобні приміщення.

Під робочі кімнати відводять світлі, просторі приміщення, стіни яких на висоту до 170 см від підлоги фарбують в світлі тони масляною фарбою або викладають кахляною плиткою, а підлогу покривають лінолеумом. Такого роду обробка дозволяє проводити вологе прибирання із застосуванням дезинфікуючих розчинів (найчастіше для цього використовують 3% розчин соди або ультрафіолетове випромінювання бактерицидних ламп). Для зручності дезинфекції столів, що знаходяться в лабораторії, їх покривають пластиком. Лабораторні приміщення обладнуються шафами і полицями для зберігання апаратури, посуду, фарб і реактивів. Кімнати лабораторії повинні добре провітрюватися, бути сухими і світлими. У число робочих приміщень входять наступні кімнати: для посіву мікроорганізмів, термостат, для виготовлення середовищ, для мікроскопії, для центрифугування, для біохімічних досліджень і ін.

До підсобних приміщень відносяться: автоклавна або стерилізаційна – для стерилізації середовищ, посуду, знищення відпрацьованого матеріалу; мийна, обладнана для миття посуду; приміщення для виготовлення, розливу і зберігання живильних середовищ; приміщення для зберігання реактивів, посуду, апаратури і господарського інвентарю; віварій для утримання піддослідних тварин.

Для забезпечення стерильності роботу з мікроорганізмами краще проводити в спеціальних скляних або напівскляних камерах-боксах, які бувають різних розмірів. У боксах вмонтовані ультрафіолетові лампи-випромінювачі, які знищують мікроорганізми в повітрі і на поверхні предметів.

До складу оснащення мікробіологічної лабораторії повинні обов'язково входити газові або спиртні пальники.

Велике значення для успішної роботи має правильна організація **робочого місця мікробіолога**. Лабораторний стіл повинен бути добре освітлений сонячним або штучним світлом. За кожним студентом на весь період практикуму закріплюється постійне робоче місце. Залежно від теми заняття робоче місце оснащується необхідними матеріалами і устаткуванням: газовим пальником або спиртівкою, штативом під пробірки, стерильними пробірками, бактеріологічною петлею і голкою, скляними шпателями, піпетками градуйованими і Пастера, ланцетом, ножицями, банкою з ватою, фільтрувальним папером, набором фарб і реактивів для забарвлення препаратів, предметними і покривними стеклами, установкою для забарвлення і промивання препаратів, мікроскопом, флаконом з імерсійним маслом, банкою з дезінфікуючим розчином, олівцями по склу і ін. (рис. 1).

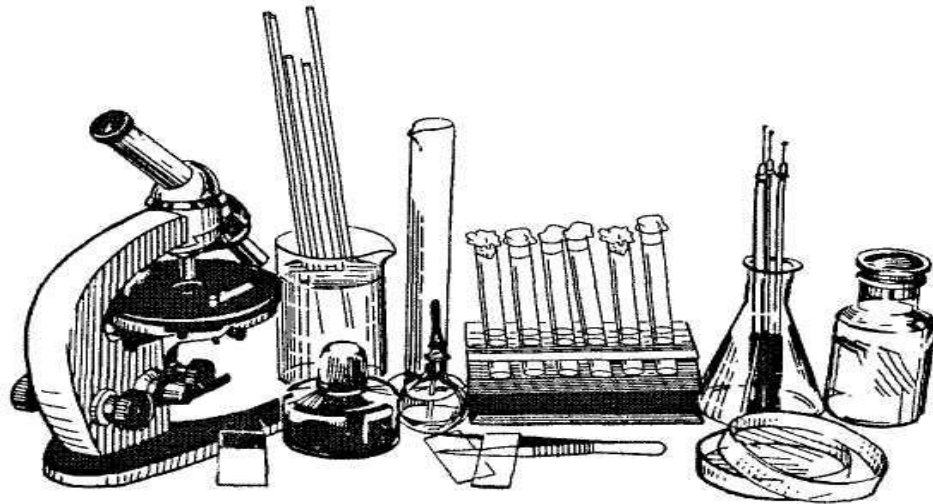


Рис. 1. Обладнання робочого місця студента.

Бактеріологічні голки, шпатель і петлі, за допомогою, за допомогою яких робляться посіви мікробів з колоній і суспензій досліджуваних культур, виготовляються з платиного дроту, який закріплюється в спеціальних металічних тримачах або впаюється в скляні палички (рис. 2).

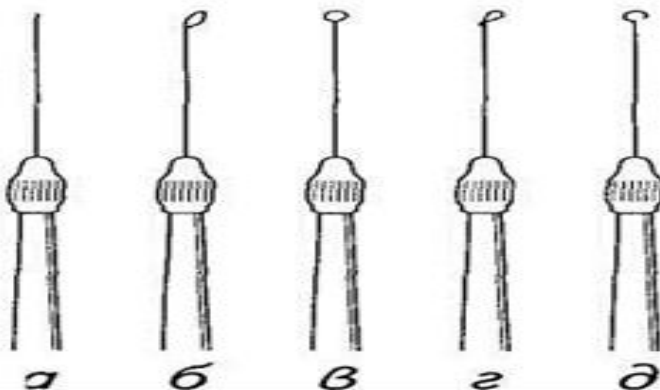


Рис. 2. Бактеріологічні голка, шпатель і петлі

а – голка, б – шпатель, в-д – петлі (в – правильно зроблена; г,д – неправильно зроблені).

Правила роботи і техніка безпеки в мікробіологічній лабораторії.

1. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі і класти на столи сумки, портфелі та інші особисті речі.

2. У мікробіологічній лабораторії дозволяється працювати тільки в халатах і косинках (шапочках), які захищають одяг і волосся від забруднення мікроорганізмами, а також перешкоджають розповсюдженню їх за межі лабораторії.

3. За кожним студентом закріплюється постійне робоче місце і мікроскоп. Робоче місце під час занять повинне зберігатися у повному порядку.

4. На всіх пробірках і чашках обов'язково пишеться назва мікроорганізму, дата його посіву, прізвище студента, номер групи.

5. У ході роботи бактеріологічні петлі і голки стерилізують прожарюванням у полум'ї пальника. Використані шпатели, предметні і покривні скельця, піпетки розмішують у банки з дезінфікуючим розчином (чисті знежирені предметні і покривні скельця зберігають у банках з притертими пробками. Класти на стіл названі предмети категорично забороняється.

6. У разі попадання досліджуваного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат або взуття необхідно негайно провести дезінфекцію.

7. У лабораторії категорично забороняється вживати їжу. Не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів).

8. Після закінчення дослідження (заняття) робоче місце дезінфікується використаний матеріал і інші предмети здаються лаборантові, миються з милом руки.

9. Результати дослідження обов'язково протоколюються. У протоколі вписуються теми заняття, поставлене завдання і короткий опис ходу роботи. При мікроскопічному дослідженні препаратів мікроорганізмів результати заносяться в протокол у вигляді малюнка з повною назвою об'єкту по-латині. Робиться загальний висновок за наслідками дослідження.

10. На кожне заняття в групі призначаються чергові. Під час роботи вони стежать за виконанням кожним студентом правил роботи і поведінки в лабораторії. Після закінчення заняття чергові здають відпрацьований матеріал на стерилізацію, вимикають газові крани, світло і провітрюють приміщення.

Будова оптичного мікроскопу. Сучасний мікроскоп з'явився в кінці ХІХ сторіччя. Його виникнення пов'язане з оптичними роботами М. В. Ломоносова, Ейлера і інших, а подальший розвиток визначився винаходом освітлювального апарату (конденсор Аббе), особливих систем об'єктивів (апохромати) та інших важливих пристосувань до мікроскопа. Мікроскопи досягли досконалості і забезпечені не тільки освітлювачем і мікрометричним гвинтом, але і хрестоподібним столиком, що обертається, і рядом інших пристосувань. Головними елементами конструкції сучасного мікроскопа є: механічна і оптична частина (рис. 3).

Штатив складається з двох частин: тримача труби мікроскопа та ніжки штатива. Тримач труби з'єднаний з ніжною штатива особливим гвинтом. Він має заокруглену форму. Приблизно на висоті нижньої частини ручки до тримача труби мікроскопа прироблений предметний столик, на який кладуть предметне скло з об'єктом для мікроскопічного дослідження.

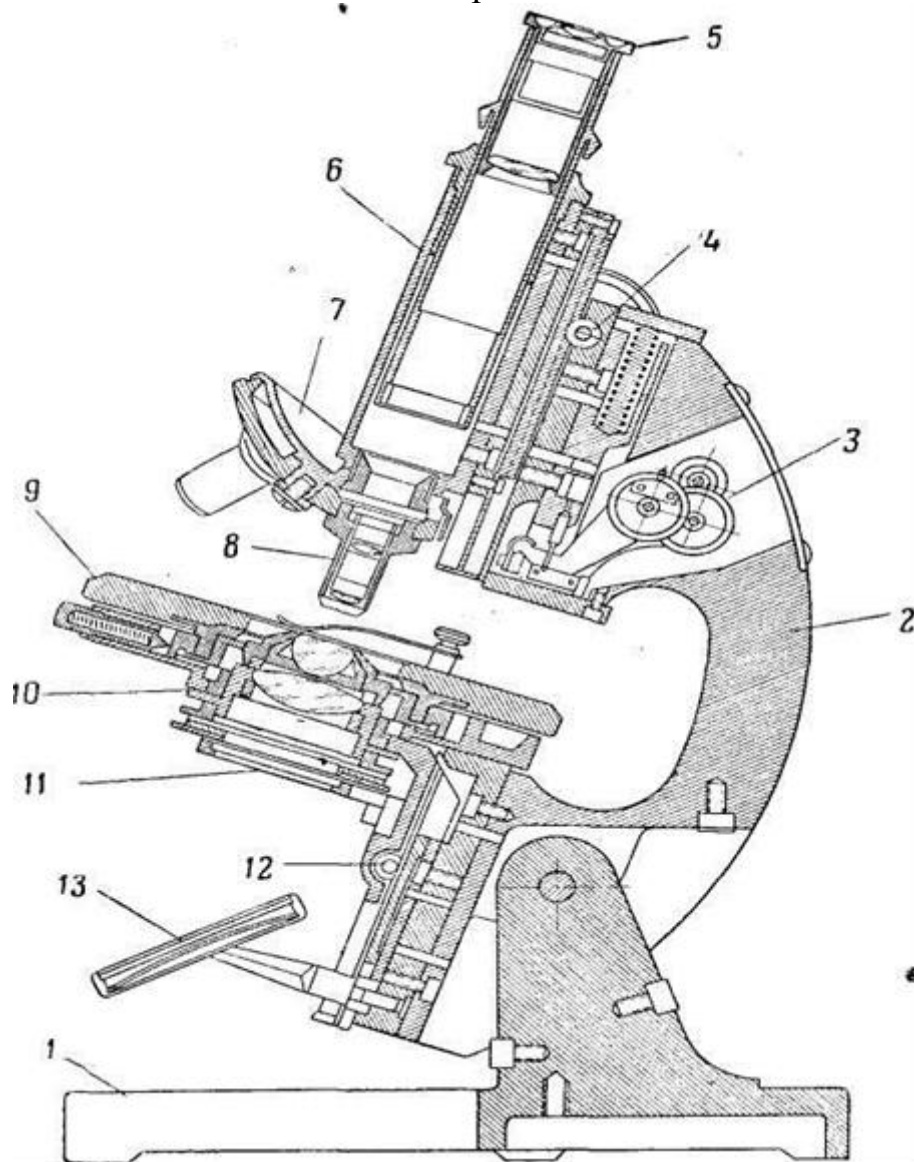


Рис. 3. Розріз світлового мікроскопу:

1 – основа штатива, 2 – тубусотримач, 3 – мікрометричний механізм, 4 – кремальєра, 5 – окуляр, 6 – тубус, 7 – револьвер, 8 – об'єктив, 9 – предметний столик, 10 – конденсор, 11 – світло-фільтр, 12 – кремальєра конденсора, 13 – дзеркало

Оскільки нижній гвинт, що зв'язує тримач труби мікроскопа з ніжною штатива влаштований за типом шарніру, то мікроскоп можна нахилити під кутом в межах між вертикальним і горизонтальним положенням. При цих нахилах труби мікроскопа автоматично нахилляється і предметний столик, залишаючи препарат в перпендикулярному положенні по відношенню до оптичної осі мікроскопа. При роботі в нахиленому положенні шарнір повинен міцно закріплювати тримач труби. Особливо важлива ця стійкість при

використанні різних приставок до мікроскопа (біокулярна приставка, фотографічний окуляр і т. д.), оскільки їх вага може викликати зсув тримача і порушити хід спостереження.

Предметний столик мікроскопа може бути повністю металевим, покритим спеціальним лаком, або частково зробленим з іншого матеріалу (верхній круг). На предметному столику завжди є пара металевих пружинних затискачів, значення яких полягає в тому, щоб міцно утримувати препарат у певному положенні під час дослідження. При знятті затискачів з предметного скла препарат може вільно переміщатися по столику мікроскопа.

У хороших мікроскопах предметний столик завжди робиться або обертовим або центрованим, що рухається в двох взаємно перпендикулярних напрямках. В останньому випадку він називається хрестоподібним столиком.

Хрестоподібний столик призначається для систематичного вивчення препарату, а також для швидкого виявлення певного місця на препараті при повторних спостереженнях. Рухома частина цього столика може рухатися за допомогою двох гвинтів, зазвичай розташованих з правого боку.

Труба мікроскопа рухається вгору і вниз за допомогою гвинтів двох систем. Для грубого пересування служить **зубчатка**, або **кремальєра**, що приводиться в рух двома бічними гвинтами. Труба мікроскопа складається з двох частин, що входять одна в одну. Вгорі вона має пристосування для міцного утримання окуляра. При користуванні масляною імерсією найкраще зображення буде при довжині труби від верхнього краю оправы об'єктиву в 160 мм (у наших біологічних мікроскопах, а також мікроскопах Цейсса і Рейхерта; у мікроскопах Лейтца ця довжина відповідає 170 мм).

Оптична частина мікроскопа складається з окуляра, що знаходиться на верхньому кінці труби мікроскопа, об'єктиву, що знаходиться на нижньому кінці труби мікроскопа та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач) що розміщується під столиком мікроскопа. Найбільш важливою і цінною частиною мікроскопа є об'єктив. Він складається з ряду спеціально відшліфованих лінз, розміщених в циліндричній оправі. На верхньому кінці оправы має гвинтову різьбу, за допомогою якої об'єктив і пригвинчується до револьвера. Збільшене зображення предмету виходить біля верхнього кінця труби, де воно сприймається окуляром і збільшується ще раз. Таким чином в око спостерігача потрапляє двічі збільшене зображення предмету. Як відомо, будь-яке збільшене зображення предмету за допомогою лінз з сферичними поверхнями має два недоліки. Перший з них відомий як сферична аберация, а другий – хроматична аберация.

Основні правила роботи з світловим мікроскопом. Перед початком роботи вибирають місце подалі від прямого сонячного світла і встановлюють мікроскоп перед собою так, щоб було зручно дивитися в окуляр. Револьвер треба перевести у таке положення, в якому проти тубуса міститься об'єктив з найменшим збільшенням ($8\times$). При роботі з біокулярною насадкою спочатку необхідно відрегулювати віддаль між окулярами відповідно до відстані між очима спостерігача так, щоб поля зору обох окулярів злилися в одне. Потім регулюють освітлення. Для цього, дивлячись лівим оком в окуляр, повертають

плоску поверхню дзеркала, щоб світло сонця або електричної лампи, відбиваючись від поверхні дзеркала, яскраво і рівномірно освітлювало все поле зору. Аби домогтися цього, треба повністю підняти конденсор, опустити об'єктив (8^x) на відстань 0,5–1 см від предметного столика, вийняти окуляр і, дивлячись у тубус, повертанням дзеркала вловити зображення джерела світла. Після цього знову вставити окуляр і починати вивчення досліджуваного об'єкта. Під час роботи з освітлювачем кращі результати отримують при встановленні освітлення за системою Келлера, яка ґрунтується на одержанні чіткого зображення джерела світла (спіралі лампи) на діафрагмі конденсора та одержанні такого ж зображення ірисової діафрагми освітлювача у площині препарату.

Імерсійні системи. Роздільну здатність мікроскопа можна збільшити, використовуючи сильніші джерела освітлення, помістивши між конденсором і наочним столиком, а також між спостережуваним об'єктом і фронтальною лінзою об'єктиву прозора речовина, що має показник заломлення світла, близький до такого для скла. З цією метою використовують оптично прозорі **імерсійні рідини**: кедрове масло ($n=1,52$), гліцерин ($n=1,4$), воду ($n=1,3$) і ін. Якщо краплю кедрового масла нанести між конденсором і наочним склом і між об'єктом, що знаходиться на наочному склі, і об'єктивом, тоді конденсор — кедрове масло — предметне скло — кедрове масло — фронтальна лінза об'єктиву будуть єдиною системою, що не викликає відхилення світлового променя і названу імерсійною.

У разі використання імерсійної системи тубус мікроскопа обережно опускають вниз так, щоб кінчик об'єктиву занурився в кедрове масло. Опускати об'єктив занадто низько і сильно тиснути на покривне скельце не можна, оскільки є небезпека не тільки роздавити покривне скло, але і передню лінзу об'єктиву. В останньому випадку об'єктив зовсім вибуває з ладу. Після опускання потрібно підняти тубус мікроскопа вгору (обертаючи кремальєру на себе) доти, поки в полі зору не з'являться зображення. Щоб не «пройти» мимо поля зору, необхідно обертати кремальєру дуже повільно і обережно. Ні в якому випадку не слід швидко опускати трубу мікроскопа. За такої системи роботи об'єктив легко ушкоджується і виходить з ладу.

Як тільки буде знайдено поле зору за допомогою кремальєри, підбирають за допомогою освітлювача Аббе і дзеркала освітлення і приступають до установки на найбільшу чіткість і ясність поля зору і об'єкту за допомогою мікрометричного гвинта.

При роботі з імерсійними об'єктивами між об'єктивом і препаратом повинне бути кедрове масло. Це важливо тому, що показник заломлення кедрового масла відповідає показнику заломлення скла, що усуває втрату світла за рахунок розсіяння при переході з одного фізичного середовища в інше з різними показниками заломлення (скло і повітря), а це дуже важливо при роботі з сильними об'єктивами, що мають велику кривизну лінз за малого їх діаметра, що пропускає порівняно мало світла.

Після встановлення препарату на найбільшу різкість приступають до дослідження об'єкту. З цієї метою спочатку обстежують об'єкт за допомогою

сухої системи об'єктиву, що дає мале збільшення. При цьому дослідженні відбираються потрібні місця на препараті, і лише після цього починається вивчення об'єкту за допомогою сильної сухої системи об'єктиву або ж імерсійного об'єктиву. В обох випадках точне наведення препарату на фокус проводять мікрометричним гвинтом (при роботі із слабкими сухими об'єктивами достатня точність наведення виходить і за допомогою кремальєри).

Під час роботи з цими об'єктивами рука спостерігача повинна постійно приводити в дію мікрометричний гвинт і послідовно встановлювати у фокусі то одну, то іншу ділянку препарату, що привертає увагу. Для полегшення цієї роботи бажано мікрометричний гвинт спочатку встановити посередині того простору, в межах якого він може працювати (цей простір спеціально відмічається на тримачі труби мікроскопа спеціальними рисками). При зміні об'єктивів досліджуване місце на препараті слід виставити точно посередині поля зору і лише після цього повернути револьвер. Зазвичай об'єктиви вивірені на револьвері так, що при переході з одного збільшення на інше препарат знаходиться у фокусі. Виключенням з цього правила є (імерсійні) об'єктиви.

Внаслідок високої числової апертури робоча відстань у них дуже невелика. Тому їх не вдається вирівняти в однаковій мірі з іншими об'єктивами. Вони, як правило, робляться трохи коротшими за інші об'єктиви, і тому наведення препарату на фокус за допомогою мікрометричного гвинта при використанні цих об'єктивів стає необхідним. Перед переведенням препарату на ці об'єктиви на поверхню покривного скла (при дослідженні препаратів живих бактерій) або на самий препарат (при дослідженні фіксованих і забарвлених препаратів, що не вимагають тривалого зберігання) наносять краплю кедрової олії. В неї занурюють імерсійний об'єктив до контакту з кедровою олією. Після цього, дивлячись в окуляр, повільно опускають трубу мікроскопа до появи у полі зору потрібного зображення предмету і потім наводять на фокус за допомогою мікрометричного гвинта. Торкатися об'єктивами поверхні покривного скла не рекомендується, оскільки при цьому неминуча поява подряпини на зовнішній лінзі об'єктиву.

Щоб використовувати повну силу імерсійного об'єктиву, потрібно нанести краплю кедрової олії на поверхню верхньої лінзи конденсора. Після цього конденсор опускають на кілька міліметрів нижче рівня предметного столика мікроскопа, кладуть на останній предметне скло з препаратом і кедровою олією і піднімають знов конденсор доти, поки не встановиться оптичний контакт з предметним склом через шар кедрової олії.

Якщо під час дослідження необхідно провести ще й вимірювання величини об'єкту, то для цієї мети користуються окулярними мікрометрами. Вони являють собою круглу скляну пластинку, посередині якої нанесена лінійка в 5 мм завдовжки, розділена на 0,1 мм. Окулярний мікрометр може бути вставлений в будь-який окуляр після вигвинчування очної лінзи окуляра. Він накладається на діафрагму окуляра діленнями вниз.

У тих випадках, коли потрібно провести обрахунок числа об'єктів у полі зору мікроскопа, користуються окулярними сітками. Це округла скляна пластинка з нанесеною на неї сіткою поділок, що вставляється в окуляр так, як і

окулярний мікромметр. Величина ділення сітки повинна бути заздалегідь встановлена за допомогою об'єктного мікромметра для різної комбінації окуляра і об'єктиву. Окулярні сітки досить часто мають поділки, що рівні 2 діленням об'єктного мікромметра при окулярі, що дає власне збільшення в 9 разів (№ IV) і об'єктиві з фокусною відстанню в $\frac{1}{12}$ дюйма. Площа кожного квадратику такої сітки відповідатиме $0,02 \text{ мм} \times 0,02 \text{ мм} = 0,0004 \text{ мм}^2$. Цей квадратик повторюватиметься на площі в 1 см^2 250 000 разів, а на площі звичайного препарату в 4 см^2 – 1 000 000 разів. Кожна клітина бактерії в квадратику окулярної сітки відповідатиме 1 мільйону клітин на препараті. При такому співвідношенні величин виходить зручний коефіцієнт для розрахунку кількості бактерій на препараті.

При цій же системі окуляра і об'єктиву діаметр поля зору рівний 16 поділкам об'єктного мікромметра, а його площа рівна $0,02 \text{ мм}^2$. На 1 см^2 таке поле зору повторюватиметься 5 000 рази, а на площі препарату в 4 см^2 – 20 000 рази.

Виготовлення препаратів живих клітин мікроорганізмів методами «роздавленої» та «висячої» крапель. У мікробіологічній практиці, залежно від мети досліджень, використовують мікроскопію як живих культур мікроорганізмів, так і фіксованих. Використовуючи ці методи, отримують інформацію про розмір клітин, їх форму, будову а також про деякі процеси життєдіяльності мікроорганізмів (спороутворення, ділення, рух та ін.)

Препарати для мікроскопії готують на предметних скельцях, при дослідженні живих культур мікроорганізмів використовують ще й покривні скельця. Предметні та покривні скельця мають бути гарно очищені та знежирені.

Виготовлення мікроскопічного препарату здійснюється наступним чином:

1. Приготувати предметні і покривні скельця для мікроскопії. Вони повинні бути чистими і добре знежиреними, щоб нанесена на них крапля рівномірно розтікалася. Досягається це кількома способами:
 - прокип'ятити скельця 15 хв у 1% розчині соди або в мильній воді, сполоснути водопровідною водою, помістити на 5–10 хв у слабку хлористоводневу кислоту і добре промити дистильованою водою.
 - витримавши скельця заздалегідь 2 год. у концентрованій сірчаній кислоті або хромовій суміші. Після цього промити їх в проточній воді, прокип'ятити в 2 %-му розчині луку протягом 10 хв, ретельно промити проточною, а потім дистильованою водою.
 - Натерти робочу поверхню скла шматочком мила, а потім ретельно витерти її сухою серветкою.

Чисті скельця зберігати в посудині з притертою пробкою в суміші рівних об'ємів спирту і ефіру або в 96%-му спирті.

Послідовність відбору і нанесення зразка мікроорганізмів на предметне скло наведено на рис. 4.

В незабарвленому стані мікроорганізми досліджують шляхом виготовлення препаратів методом «роздавлена» та «висяча крапля».

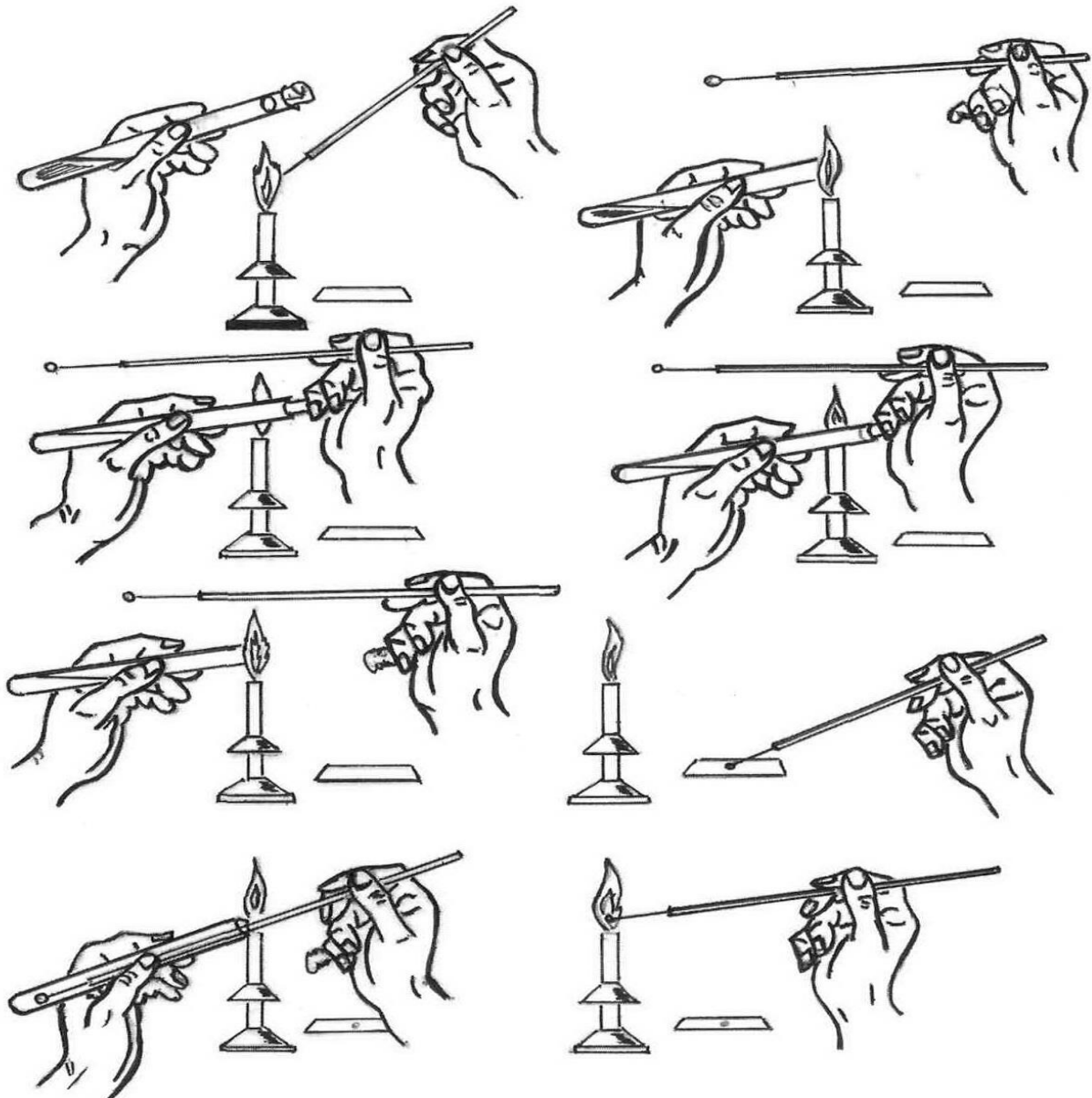


Рис. 4. Послідовність нанесення зразка мікроорганізмів на предметне скло

Виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «роздавлена крапля».

На чисте і знежирене предметне скло препарувальною петлею нанести досліджувану культуру (культуру дріжджів). Якщо мікроорганізми знаходилися в суспензії (у рідкому живильному середовищі), їх наносять безпосередньо на предметне скло. Якщо ж матеріал узятий з щільного живильного середовища, тоді його внести до нанесеної задалегідь на предметне скло краплю стерильної водопровідної води, стерильного фізіологічного розчину або бульйону. Можна також з культури, вирощеної на щільному живильному середовищі, задалегідь приготувати суспензію мікроорганізмів. Для цього в пробірку з мікроорганізмами, що вирости на косому агарі, внести 4–5 мл стерильного

фізіологічного розчину або водопровідної води і, обертаючи пробірку між долонями, змити клітини мікроорганізмів з поверхні середовища.

На предметне скло на край краплі опустити ребром під кутом 45° покривне скло і, обережно нахилиючи, покласти його на краплю так, щоб під ним не утворилися бульбашки повітря (рис. 5).

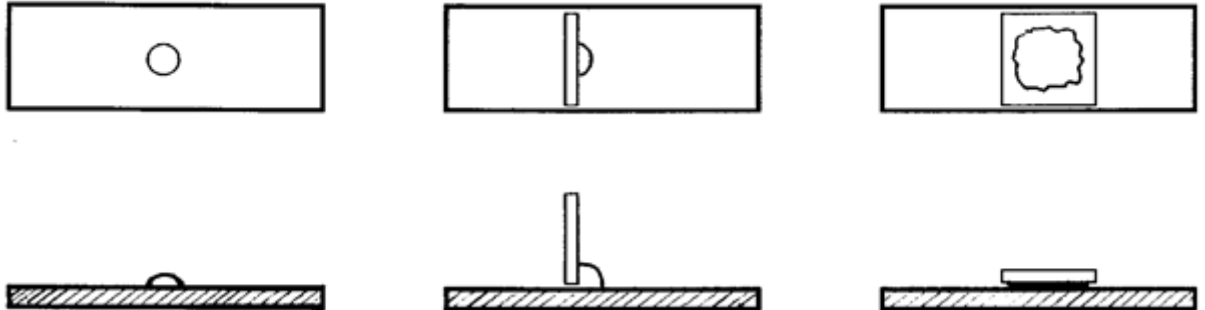


Рис. 5. Схема виготовлення препарату «роздавлена крапля».

Краплю потрібно брати такої величини, щоб вона заповнювала весь простір між покривним і предметним склом і не виступала за краї покривного скла. Якщо рідина буде нанесена в надлишку, її необхідно видалити за допомогою смужок фільтрувального паперу.

Препарат живих клітин мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати та підписати.

Виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «висяча крапля». Для виготовлення препарату «висяча крапля» взяти скло з шліфованою лункою. Краї лунки змастити вазеліновим маслом, гліцерином або просто водою. На покривне скло стерильно в центр нанести краплю досліджуваного матеріалу (культуру дріжджів). Потім предметне скло перевернути лункою вниз і помістити на покривне так, щоб крапля знаходилася в центрі лунки, не стикаючись з її краями. Предметне скло легенько притиснути до покривного і перевернути. У герметичній камері, що утворилася, крапля не висихає, що дозволяє спостерігати за мікроорганізмами тривалий час (рис. 6).



Рис. 6. Схема виготовлення препарату «висяча крапля»

Препарат живих клітин мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати та підписати.

Прижиттєве забарвлення клітин мікроорганізмів.

Препарат з прижиттєвим забарвленням мікроорганізмів готується подібно до препарату методом „роздавлена крапля”.

На чисте і знежирене предметне скло препарувальною петлею нанести досліджувану культуру (культуру дріжджів). Якщо мікроорганізми знаходилися

в суспензії (у рідкому живильному середовищі), їх наносять безпосередньо на предметне скло. Якщо ж матеріал узятий з щільного живильного середовища, тоді його внести до нанесеної заздалегідь на предметне скло краплю стерильної водопровідної води, стерильного фізіологічного розчину або бульйону.

На предметне скло на край краплі опустити ребром під кутом 45° покривне скло і, обережно нахилиючи, покласти його на краплю так, щоб під ним не утворилися бульбашки повітря. Краплю потрібно брати такої величини, щоб вона заповнювала весь простір між покривним і предметним склом і не виступала за краї покривного скла. Якщо рідина буде нанесена в надлишку, її необхідно видалити за допомогою смужок фільтрувального паперу.

Поряд з покривним склом на предметне скло нанести краплину барвника, а з іншої сторони покривного скла покласти смужку фільтрувального паперу, щоб він відтягував рідину з-під покривного скла, а під покривне скло потрапляв водний розчин барвника.

Порядок дослідження виготовлених препаратів живих клітин під мікроскопом.

1. Заздалегідь виконати налаштування освітлення мікроскопа. З цією метою з тубуса вийняти окуляр і, спостерігаючи прямо в об'єктив, встановити дзеркало так, щоб джерело світла було в центрі об'єктиву.

2. Після попереднього налаштування освітлення на предметний столик мікроскопа покласти препарат і закріпити його клемами.

3. Дослідити препарат, користуючись сухим об'єктивом ($40\times$). За допомогою макрометричного гвинта опустити об'єктив до препарату, не допускаючи дотику його з покривним склом (або предметним). Після цього, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта поволі підняти об'єктив вгору до появи контурів об'єкту у полі зору мікроскопа. На цьому етапі за допомогою конденсора шляхом переміщення його вгору або вниз додатково відрегулювати інтенсивність освітлення. Потім обертанням макрометричного гвинта добитися якнайкращої чіткості зображення.

4. При переході від малого збільшення до великого об'єкт встановити строго по центру поля зору і лише після цього за допомогою револьвера поміняти об'єктив. В цьому випадку препарат (об'єкт) залишається у фокусі, що полегшує подальше його дослідження.

5. При переході на імерсійний об'єктив після того, як препарат встановлений в центрі поля зору, за допомогою макрометричного гвинта підняти об'єктив на 2–3 см від предметного скла і нанести на мазок скляною паличкою краплю імерсійного масла. За допомогою револьвера встановити в робоче положення об'єктив $90\times$ і, обертаючи макрометричний гвинт за годинниковою стрілкою, занурити його в імерсійну рідину, уникаючи при цьому дотику до поверхні предметного або покривного скла. Цей етап слід контролювати, дивлячись на об'єктив збоку. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта поволі піднімати об'єктив до появи у полі зору контурів зображення об'єкту або забарвленої плями. Після цього чіткість зображення коректувати за допомогою макрометричного гвинта.

6. При зміні препарату або після закінчення мікроскопіювання тубус мікроскопа підняти, препарат зняти з предметного столика і, якщо дослідження проводилося з імерсійною системою, фронтальну лінзу об'єктиву ретельно очистити від масла, протерши серветкою, змоченою у бензині.

Виготовлені препарати «роздавлена крапля» і «висяча крапля» переглянути спочатку з об'єктивами 20^x або 40^x, а потім з імерсійним об'єктивом.

Фіксовані забарвлені препарати мікроскопіювати спочатку з об'єктивом 40^x, потім – з об'єктивом 80^x. У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а забарвленими виявляються клітки мікроорганізмів.

7. Всі проглянуті під мікроскопом препарати замальовати. Під кожним малюнком вказати назву об'єкту і збільшення мікроскопа, при якому розглядався препарат.

Питання для самоконтролю:

1. Які правила роботи в мікробіологічній лабораторії?
2. Назвіть основні складові біологічного мікроскопа.
3. З яких частин складається механічна частина мікроскопа?
4. З яких частин складається оптична частина мікроскопа?
5. Як визначається загальне збільшення мікроскопа?
6. Що входить до складу освітлювальної системи мікроскопа?
7. З якою метою готують препарати живих клітин мікроорганізмів?
8. З якою метою препарат живих клітин мікроорганізмів готується методом «роздавлена» крапля?
9. Перерахуйте етапи виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «роздавлена» крапля.
- 10.3 якою метою препарат живих клітин мікроорганізмів готується методом «висяча» крапля?
11. Перерахуйте етапи виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «висяча» крапля.
- 12.3 якою метою проводять прижиттєве забарвлення клітин мікроорганізмів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Фіксація мікроорганізмів. Просте і складне забарвлення за Грамом. Живильні середовища. Стерилізація.

Матеріали і обладнання: добові культури мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*; мікроскопи; об'єкт-мікрометри; окуляр-мікрометри; предметні скельця; покривні скельця; водні розчини барвників (фуксину нейтрального, метиленового синього, генціан-фіолету); 96% спирт; розчин Люголя або йоду; оцтова кислота; бактеорологічні петлі; спиртівки.

Вказівки до виконання роботи.

Фіксація мікроорганізмів.

Після виготовлення препарату приступають до його фіксації. Фіксація препарату має на меті:

1. Вбити мікроорганізми;
2. Забезпечити їх кращий контакт зі склом і тим самим зберегти препарат від змивання;

3. Зробити мазок більш сприятливим до фарбування, оскільки мертва протоплазма краще фарбується, ніж жива. Найчастіше для фіксації використовується висока температура. З цією метою захоплюють препарат великим і вказівним пальцями і 3–4 рази проводять через полум'я спиртівки. Ступінь нагрівання визначається шляхом дотику предметного скла до шкіри. Якщо за контакту скла з рукою відчувається легкий опік, препарат вважається зафіксованим. Хоча цей прийом фіксації і набув широкого поширення в мікробіологічних лабораторіях, проте слід пам'ятати, що він не використовується у випадках, коли дослідник вивчає будову бактерійної клітини.

При вивченні структури бактерійної клітини слід користуватися хімічними засобами фіксації. Найбільш поширеними хімічними фіксаторами є наступні:

Етиловий спирт. Зазвичай використовується міцний (95%) розчин спирту, оскільки він дуже швидко вбиває клітини бактерій. В окремих випадках користуються також абсолютним спиртом. Його готують з 95% спирту шляхом обезводнення останнього щойно прожареним мідним купоросом. Прожарювання цієї солі проводиться в тиглі або у фарфоровій чашці до повного побіління її. На 1 л спирту зазвичай використовують близько 150 г безводного мідного купоросу. Зневоднений спирт завжди зберігається в скляній банці з пришліфованою пробкою і з невеликою кількістю прожареного купоросу на дні. За фіксації препарат обливають декількома краплями спирту, витримують декілька хвилин і потім зливають спирт.

Суміш рівних об'ємів етилового спирту і ефіру. При фіксації цією сумішшю препарат обливають декількома краплями суміші і дають їм випаруватися.

Ацетон. При фіксації ацетоном препарат тримають декілька хвилин (до 5 хвилин) покритим міцним розчином цієї речовини.

Формалін. Фіксацію цією речовиною ведуть, прикріплюючи мокрі покривні стекла до кришки чашки Петрі мазком донизу. При додаванні в цю чашку формаліну і слабкому підігріванні її виходитимуть пари формаліну, які і проведуть фіксацію мазків.

Осмієва кислота. Для фіксації застосовують 1–2% розчин осмієвої кислоти. Ця речовина володіє здатністю досить швидко фіксувати клітини бактерій, не впливаючи на їх будову. Тому осмієву кислоту досить часто використовують у мікробіологічній практиці. Техніка роботи з цим фіксатором

зводиться до наступних операцій: у чашку Петрі поміщають годинне скло з невеликою кількістю скляної вати. Па вату наливають деяку кількість 1–2% розчину осмієвої кислоти, зверху на годинникове скло накладають предметне скло з вологим мазком і після цього чашку Петрі закривають кришкою. Через 1–2 хвилини препарат виймають з чашки Петрі і висушують. Деякі автори рекомендують після такої фіксації обробити препарат протягом 5–10 хвилин слабким розчином перекису водню і добре промити.

Суміші фіксуючих речовин. Ці суміші особливо широко застосовуються в мікробіологічній практиці при цитологічних дослідженнях. Таких суміші пропонується дуже багато, але кожна з них дає бажані результати тільки в окремих випадках. Тому, залежно від поставлених дослідником завдань, доводиться користуватися то однією, то іншою сумішшю фіксуючих речовин. Найчастіше використовується наступна суміш:

3% розчин двохромокислого калію – 7 мл

1% розчин хромової кислоти – 7 мл

2% розчин осмієвої кислоти – 4 мл

Ця суміш вважається добрим фіксатором при різних цитологічних дослідженнях.

Просте і складне забарвлення за Грамом.

Просте забарвлення клітин мікроорганізмів.

1. За допомогою стерильної препарувальної петлі або піпетки Пастера нанести на знежирене предметне скло краплю бактеріальної суспензії. Матеріал із щільних живильних середовищ узяти препарувальною петлею і внести його до краплі стерильної водопровідної води, заздалегідь нанесену на предметне скло. Мікробний матеріал рівномірно тонким шаром розтерти на площі 1,5–2,0 см².

2. Висушити виготовлений мазок за кімнатної температури.

3. Після висушування мазків зафіксувати їх на полум'ї спиртівки. Тримаючи скло мазком вгору, тричі пронести його через полум'я спиртівки. Щоб уникнути перегріву мікроорганізмів, час прямої дії полум'я не повинен перевищувати 3–4 с.

4. Препарат розмістити мазком вгору на місток з двох паралельних скляних паличок, сполучених гумовими трубками і що знаходяться на стінках кювети або кристалізатора.

5. Піпеткою нанести на мазок 2–3 краплі водного розчину фуксину так, щоб фарба покрила весь мазок. Фарбувати протягом 2–3 хв.

6. Легким потоком води змити з препарату фарбник. Змивати до безбарвної води.

7. Препарат висушити на повітрі або легко промокнути фільтрувальним папером. Краї скла і тильну сторону добре протерти серветкою або фільтрувальним папером.

8. Фіксований та забарвлений препарат клітин мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати і підписати.

У мікробіологічній практиці при забарвленні фіксованих препаратів мікроорганізмів користуються як основними, так і кислими барвниками.

З основних барвників (ядерних) найчастіше застосовуються нейтраль-рот, сафранін, фуксин (червоні фарби), генціан-віолет, далія, метил-віолет, кристал-віолет (фіолетові фарби), метиленова синь (синя фарба), малахітова зелень, янусгрюн (зелені фарби) і везувін, хризоїдин (коричневі фарби).

З кислих фарб (протоплазматичних) широко застосовуються кислий фуксин, еозин, еритрозин (червоні фарби), конго, пікринова кислота (жовті фарби) нігрозин (чорна фарба). Користуючись комбінацією контрастних кольорів кислих та основних барвників, можна провести певну диференціацію структурних частин клітини (ядра, протоплазми і т.д.).

Найбільш вживані у мікробіологічній практиці барвники.

1. Метиленова синька. Насичений водний розчин містить 2 г фарби на 100 мл води. Спиртово-водні розчини для різних цілей готуються з різною міцністю (1 мл насиченого спиртного розчину на 10 мл води, на 100 мл і т. д.). Фарбує в слабко синій колір.

2. Фуксин. Червона фарба, що характеризується високою міцністю. Використовуються водні розчини від 1:10 до 1:100. Спиртово-водні розчини готуються з 10 мл насиченого спиртного розчину в 100 мл води. Часто уживається також карболовий фуксин Циля, який готується з 10 мл насиченого спиртного розчину фуксину в 100 мл 5% карболової кислоти. Спочатку до спиртового розчину фуксину додають 5,0 г карболової кислоти, а потім потрохи доливають 100 мл води. Після 24-годинного настоювання фарбу фільтрують і зберігають у склянці з притертою пробкою. Досить часто її розбавляють водою в 5 разів.

3. Метил-віолет (піоктанін). Неочищений препарат цього барвника називається генціан-віолет. Цей барвник часто застосовується при мікробіологічних дослідженнях. Готується так само, як і метиленова синька або фуксин (водні і спиртні розчини 1:10 або 1:100). Метил-віолет у комбінації з йодом дає забарвлення, що міцно утримується деякими бактеріями і застосовується для спеціального забарвлення бактерій за Грамом.

4. Еритрозин. За кількісного обліку бактерій у ґрунті методом прямого підрахунку препарати забарвлюються карболовим еритрозином. Розчин цієї фарби дуже повільно забарвлює клітини бактерій, в даному випадку він зручний тому що ним погано фарбуються ґрунтові частинки. Для приготування карболового еритрозину користуються наступними речовинами:

Дистильована вода – 100 мл

Карболова кислота (фенол) – 5 г

Еритрозин – 1,5 г

Після розчинення карболової кислоти і еритрозину рідині дають відстоятися і після цього користуються нею для забарвлення препаратів бактерій з ґрунтової бовтанки.

При вивченні внутрішнього вмісту мікробної клітини дуже часто користуються барвниками спеціального складу, що дають диференційоване забарвлення різних частин плазми. З цих фарб найбільш споживаними є

наступні.

5. Гематоксилін (для забарвлення ядерної речовини). Цю фарбу готують таким чином: 2 г гематоксиліну розчиняють в 12 мл абсолютного спирту і змішують розчин з 200 мл концентрованого розчину залізо-аміачних квасців. Суміш витримують на повітрі 3–4 доби. Після фільтрації до неї додають 50 г гліцерину і 50 г метилового спирту і витримують суміш до утворення темного забарвлення, а потім знов фільтрують і розбавляють водою по потребі. За необхідності отримати швидко забарвлення слід застосовувати міцні розчини барвника. При сильному розбавленні вона зафарбовує повільнішим (іноді цілими днями).

6. Судан III. Застосовується для забарвлення крапель жиру. Цей барвник готують шляхом розчинення 0,1 г судан III в 200 мл 90% спирту або концентрованої молочної кислоти.

Складне забарвлення фіксованих препаратів мікроорганізмів за Грамом.

Для розпізнавання бактерій велику користь приносить забарвлення їх за Грамом, оскільки різні види бактерій неоднаково відносяться до цього забарвлення. Суть цього прийому зводиться до наступних операцій:

1. Висушений і фіксований препарат бактерій впродовж 1–2 хвилин забарвлюють сумішшю насиченого розчину генціан-віолету (II мл) в аніліновій воді (100 мл).

2. Препарат промивають водою і обробляють протягом 1-2 хвилин розчином йоду в йодистому калії (1 г йоду +2 г йодистого калію в 300 мл води).

3. Препарат промивають водою та обробляють 95% спиртом від 0,5 до 1 хвилини; час знебарвлення має велике значення, тому за цією операцією необхідно ретельно стежити.

4. Промивши препарат водою, додатково забарвлюють його фуксином.

5. Забарвлений препарат клітин мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати і підписати.

Всі бактерії, що фарбуються грампозитивно, утворюють нерозчинне з'єднання фарби з йодом і не знебарвлюються спиртом. У них залишається темно-фіолетове забарвлення. У бактерій, що фарбуються за Грамом негативно, з'єднання фарби з йодом розчиняється в спирту, і вони матимуть тільки колір додаткової фарби (фуксину). Під мікроскопом вони матимуть червоне або коричневе забарвлення. Об'єктом для забарвлення за Грамом може бути плівка оцтових бактерій з дріжджами на поверхні кислого пива або слабкого виноградного вина. Дріжджі будуть забарвлені в темно фіолетовий колір (позитивне забарвлення за Грамом), а оцтовокислі бактерії – в червоний (негативне забарвлення за Грамом). За правильністю операцій при фарбуванні бактерій за Грамом зручно стежити таким чином: на предметне скло наносять рядом мазок бактерій, що позитивно забарвлюються за Грамом, мазок бактерій, що негативно забарвлюються за Грамом та мазок досліджуваних мікроорганізмів. Якщо всі операції були проведені правильно, то контрольні мазання мазки будуть мати відповідне їм забарвлення.

З ґрунтових бактерій позитивно забарвлюються за Грамом всі коки, майже всі аеробні спороносні палички (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides* і ін.), деякі безспорові палички (наприклад, флюорисціюючі бактерії), а також актиноміцети, дріжджі, *Oidium lactis* та інші. З бактерій, що негативно забарвлюються за Грамом, можна вказати *Bact. coli*, *Bact. aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bact. pyocyaneum*, різні види *Spirillum* та інші.

Забарвлення спор мікроорганізмів складним діагностичним методом.

Спору у своєму тілі при настанні несприятливих умов здатні створити паличковидні мікроорганізми роду бацил, а також маслянокислі мікроорганізми.

Забарвлення спор маслянокислих мікроорганізмів ґрунтується на тому, що оболонка спори є дуже щільною і важкопроникною для різних речовин, зокрема і для барвників. У зв'язку з цим спора дуже довго і важко фарбується, але також протягом досить тривалого часу зберігає набутий колір.

Цитоплазма клітин мікроорганізмів у порівнянні з спорою легко фарбується і також швидко знебарвлюється. Завдяки цьому при проведенні фарбування маслянокислих мікроорганізмів цитоплазма і спора набувають різних кольорів.

Суть фарбування спор маслянокислих мікроорганізмів складним діагностичним методом зводиться до наступних операцій:

1. Висушений і зафіксований препарат маслянокислих мікроорганізмів протягом 10–15 хв. фарбують розчином барвника фуксин червоний. Потім препарат промивають водою.

2. На препарат на 3–5 хв. наносять кілька крапель концентрованої оцтової кислоти (для пом'якшення оболонки спори). Кислоту змивають водою.

3. На препарат на 3–5 хв. наносять розчин барвника метиловий синій. Потім препарат промивають водою.

4. Забарвлений препарат клітин маслянокислих мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати і підписати.

Живильні середовища і методи стерилізації.

Живильними середовищами в мікробіології називають середовища, що містять різні сполуки складного або простого складу, які застосовуються для розмноження бактерій або інших мікроорганізмів у лабораторних і промислових умовах.

Будь-яке живильне середовище має відповідати наступним вимогам: містити всі необхідні для розмноження певних мікроорганізмів речовини в легко доступній формі, мати оптимальну вологість, в'язкість, рН, бути ізотонічним і по можливості прозорим.

Ряд живильних середовищ готують безпосередньо в мікробіологічних лабораторіях із продуктів тваринного або рослинного походження (яловиче м'ясо, молоко, яйця, сироватка крові, дріжджі, казеїн) або зі штучно отриманих із цих продуктів речовин (пептон, пептид-аміно-пептид, дріжджовий і кукурудзяний екстракти).

Велике значення має наявність у живильному середовищі факторів росту, які відіграють роль каталізаторів метаболітичних процесів, головним чином вітамінів групи В, ніотинової кислоти та ін.

За консистенцією живильні середовища можуть бути **твердими, рідкими й напіврідкими**.

Тверді середовища готують шляхом додавання до рідкого середовища 1,5–2% агару, напіврідкі – 0,3–0,7% агару, який являє собою продукт переробки особливого виду морських водоростей і в застиглому стані надає середовищу щільності. Агар плавиться при температурі 80–86°C і застигає за температури близько 40°C.

У деяких випадках для одержання щільних живильних середовищ використовують желатин (10–15%). Такі природні середовища, як згорнута сироватка крові, згорнутий яєчний білок, самі по собі є щільними. У бактеріологічній практиці найчастіше використовують сухі живильні середовища які виготовляються в промислових масштабах – триптичні гідролізати дешевих нехарчових продуктів (рибні відходи, мясокостне борошно, технічний казеїн) і живильний агар. Сухі середовища можуть зберігатися протягом тривалого часу, зручні при транспортуванні й мають відносно стандартний склад.

За цільовим призначенням живильні середовища ділять на **основні, елективні й диференційно-діагностичні**.

Основними називаються середовища, що використовуються для культивування багатьох бактерій, це триптичні гідролізати рибних продуктів або казеїну. Такі середовища є основою для виготовлення більш складних: цукрових, кров'яних, сироваток, що задовольняють потреби живлення більш вимогливих патогенних бактерій. У якості основних іноді використовують синтетичні живильні середовища, виготовлені з наважок певних мінеральних солей, до яких додають амінокислоти, вітаміни, глюкозу. До них також можна додавати пептон, кукурудзяний або дріжджовий екстракт і інші живильні речовини. Синтетичні середовища найчастіше застосовують у науково-дослідній практиці, а синтетичні середовища зі згаданими екстрактами в у мікробіологічній промисловості при одержанні антибіотиків, вакцин і інших препаратів.

Виготовлення живильних середовищ

Основні середовища. Пасту триптичного гідролізату розчиняють у певному об'ємі дистильованої води, встановлюють рН, розливають у відповідний посуд, закривають ватно-марлевими пробками й стерилізують в автоклаві. Порошок живильного агару вносять у певний об'єм води й кип'ятять протягом 10–15 хв, після чого розливають у чашки Петрі або пробірки. Для готування скошеного живильного агару пробірки з розлитим агаром залишають застигати в похилому положенні на столі.

Кров'яні та сироваткові середовища. До розплавленого й охолодженого до 45–50°C живильного агару стерильно додають 5–10% дефибринованої крові або в такій же кількості сироватку крові

Середовища з вуглеводами. До живильного агару або бульйону додають 0,5–1% глюкози або іншого вуглеводу. Стерилізацію роблять текучою парою або парою під тиском 0,5 атм.

Елективні живильні середовища. Пептонна вода 1%, рН 8,0. Елективна для холерного вібріона, який розмножується дуже швидко, випереджаючи ріст інших мікробів. Лужна реакція середовища не перешкоджає росту холерних вібріонів, але гальмує ріст інших мікроорганізмів.

Лужний агар. Щільне середовище: живильний агар, рН 7,8, елективний для холерного вібріона.

Середовище Леффлера. Суміш 1 ч. кінської сироватки й 3 ч. цукрового бульйону, застиглого в пробірках, елективна для дифтерійних паличок. Швидкий ріст цих мікроорганізмів (4–6 год) забезпечує елективність середовища.

Середовище Мюллера. Елективне для тифопаратифозних бактерій, які менш чутливі у порівнянні з кишковою паличкою, до тетратионату натрію (це з'єднання утворюється в живильному бульйоні, куди додають розчин Люголя й сірчистого натрію).

Жовтково-сольовий агар (ЖСА). Містить підвищені концентрації хлориду натрію (8–10%), які не перешкоджають розмноженню стафілококів, що створює елективність цього середовища для даних мікроорганізмів.

Диференційно-діагностичні середовища.

Середовища Гісса. До 1% пептонної води додають 0,5% певного вуглеводу (глюкоза, лактоза, мальтоза, маніт і ін.) і індикатор Андреде (кислий фуксин в 1 Н. розчині NaOH); розливають по пробірках, у які поміщають поплавок (трубка довжиною близько 3 см, один кінець якої запаятий) для вловлювання газоподібних продуктів, що утворюються при розкладанні вуглеводів. Стерилізацію проводять текучою парою або парою під тиском в 0,5 атм; поплавок при цьому заповнюється живильним. середовищем Середовище при рН 7,2–7,4 безбарвне. При розкладанні вуглеводів набуває червоного кольору. Промисловість випускає у вигляді порошку напіврідкі середовища з вуглеводами й індикатором ВР. Індикатор ВР при нейтральній реакції середовища безбарвний, у кислому середовищі він має синій колір, у лужному – червоний. Газ, що утворюється, розриває стовпчик напіврідкого агару.

Середовище Ендо. Випускається у вигляді порошку, який складається з висушеного живильного агару з 1% лактози й індикатору — основного фуксину, знебарвленого сульфідом натрію. Перед використанням певну наважку порошку вносять у дистильовану воду, кип'ятять, а потім розливають по чашках Петрі. Щойно зварене середовище безбарвне або має блідо-рожевий колір. При рості лактозопозитивних бактерій їх колонії забарвлюються в темно-червоний колір з металевим блиском; лактозонегативні бактерії утворюють безбарвні колонії

Середовище Левіна. Випускається у вигляді порошку й складається з висушеного живильного агару з лактозою, Na_2HPO_4 , метиленового синього і еозину. Готується так само, як і середовище Ендо. Середовище темно-

фіолетового кольору. Лактопозитивні бактерії утворюють колонії насиченого синього кольору, лактозонегативні – безбарвні колонії

Середовище Плоскирева (бактоагар Ж). Випускається в сухому виді й містить живильний агар з лактозою, брильянтовим зеленим, солями жовчних кислот, мінеральними солями й індикатором (нейтральний червоний). Це середовище є не тільки диференційно-діагностичним, але й селективним, тому що пригнічує ріст багатьох мікроорганізмів (кишкова паличка та ін.) і сприяє кращому росту деяких хвороботворних бактерій (збудники черевного тифу, паратифів, дизентерії). Лактозонегативні бактерії утворюють на цьому середовищі безбарвні колонії, а лактозопозитивні — червоні.

Стерилізація (знищення мікроорганізмів) – один з необхідних елементів мікробіологічної роботи й основа консервування харчових продуктів.

Під знищенням мікроорганізмів мають на увазі незворотну втрату їх здатності до росту й розмноження; у лабораторних умовах це звичайно означає втрату здатності до утворення колоній.

Звільнення якого-небудь матеріалу від живих мікроорганізмів або їх спор називають знезараженням або стерилізацією. Від стерилізації слід відрізнити часткове знезараження (пастеризацію), а також консервування. Якщо стерильне середовище або мікробна культура забруднюється мікроорганізмами, що випадково потрапили в неї, то говорять про контамінацію, або забруднення.

В основі стерилізації лежить здатність певних чинників викликати загибель мікроорганізмів та їх спор. Агенти, що викликають загибель мікробних клітин, називаються бактерицидними. В якості стерилізуючи використовують в першу чергу ті з них, для яких не виникає потреба наступного видалення з матеріалу, що стерилізується. До таких агентів належить висока температура, промениста енергія, деякі леткі хімічні речовини. Рідину можна простерилізувати фільтруванням.

Мікроорганізми виявляють різну чутливість до методів їх знищення. Ефективність різних агентів, застосовуваних для знищення мікроорганізмів, характеризують величиною D_{10} (час, необхідне для того, щоб у певній популяції за певних умов середовища викликати загибель 90% клітин).

Повна або часткова стерилізація здійснюється за допомогою вологого жару, сухого жару, фільтрації, опромінення або різних хімічних засобів.

Основні методи стерилізації.

Прожарювання в полум'ї спиртівки. Відбувається на відкритому полум'ї спиртівки або газового пальника. Таким чином стерилізують бактеріологічні петлі, голки, кінчики пінцетів, пробкові свердла, деякі інші металеві предмети. В мікробіологічній практиці часто користуються бактеріологічними або препарувальними петлями, за допомогою яких здійснюють відбір мікробіологічного матеріалу. Виготовляється бактеріологічна петля з платинового або ніхромового дроту довжиною 8-10 см, один з кінців якого загнутий у вигляді кола, а інший закріплюється в спеціальному металевому тримачі.

Стерилізація кип'ятінням. Проводиться в стерилізаторі на слабкому полум'ї для запобігання розбризкування рідини. Початком стерилізації

вважається момент закипання води у стерилізаторі. Після припинення кип'ятіння кип'яток зливають, а інструменти беруть стерильним пінцетом. Кип'ятінням стерилізують металеві інструменти (ножиці, скальпелі, пінцети), гумові рукавички і пробки, деякі інші предмети. Інструменти, що мають металеві частини, стерилізують в 2%-му розчині гідрокарбонату натрію, який запобігає появі іржі.

Стерилізація вологим жаром під тиском (автоклавування).

Базується на прогріванні якого-небудь матеріалу насиченою парою за тиску вище атмосферного. Відомо, що температура насиченої пари залежить від тиску – з підвищенням тиску її температура зростає. Тому що з підвищенням тиску температура кипіння рідин підвищується, з'являється можливість стерилізувати їх при 100 °С і вище, не допускаючи кипіння а, отже, випаровування й розбризкування.

Тривалість стерилізації парою під тиском залежить від хімічного складу матеріалу, що стерилізується, видів мікроорганізмів, що перебувають у ньому, а також від об'єму (теплоємності) посуду, у якому проводять стерилізацію. Умови підвищеного тиску насиченої пари створюють у спеціальних товстостінних апаратах, що герметично закриваються – автоклавах. Вони бувають різної конструкції, але їх принципова схема однакова. Це дві камери — більша (робоча або стерилізаційна) і маленька (водопарова), що з'єднуються між собою трубопроводом з краном. Водопарова камера з'єднується також із зовнішнім середовищем трубкою з водомірним склом, краном і лійкою, через яку вона заповнюється дистильованою водою. Робоча камера, у яку поміщають матеріал, що стерилізується, обладнана краном для виходу повітря, манометром для визначення тиску пари й запобіжним клапаном для виходу пари за надмірного зростання тиску. Нагрівання води у водопаровій камері здійснюється за допомогою вмонтованих у неї електродів і регулюється автоматично. Початком стерилізації вважається той момент, коли стрілка манометра вкаже заданий тиск. Цей тиск підтримують шляхом регулювання підігріву. По закінченню часу стерилізації підігрів припиняють. Необхідно дочекатися, коли тиск в автоклаві зрівняється з атмосферним. Потім відкривають кран для відведення пари. Тільки після зниження тиску до нуля й виходу пари повільно відкривають кришку автоклава. До роботи з автоклавом допускаються особи, що пройшли спеціальне навчання.

Перевірка ефективності теплової стерилізації. Через те, що при автоклавуванні бактерицидну дію здійснюють високі температури й насичена пара, а в більшості автоклавів (з міркувань простоти й безпеки) вмонтовані лише манометри, часто виникає необхідність переконатися й тому, що матеріал піддався впливу температури протягом достатнього періоду часу. Контроль температури в автоклавах здійснюється за допомогою спеціальних термоіндикаторів — термочутливих фарб, що змінюють колір після дії стерилізуючої температури, або речовин (сірка, цукор), що плавляться тільки при певних температурах.

Контроль ефективності бактерицидної дії високих температур здійснюють шляхом розміщення поряд з матеріалом, який підлягає стерилізації,

смужки паперу, на який нанесено спори стійких до нагрівання бактерій, наприклад, *Bacillus subtilis* або ампули, що містять спори *B. stearotherophilus*, які належать до числа найбільш терmostійких. Після закінчення стерилізації смужки паперу або ампули поміщають в умови, сприятливі для проростання спор.

Тиндалізація. Нерідко вдається досягти того ж ефекту стерилізацією в текучій парі при 100°C (тиндалізація). Рідина стерилізується в цьому випадку при 100°C три дні підряд по 30 хв щодня; у проміжках між нагріваннями її зберігають у термостаті, для того щоб спори проросли, а потім вегетативні клітини були знищені при наступному нагріванні.

Стерилізація вологим жаром (текучою парою). Проводиться в апараті Коха або в автоклаві при відкритому випускному крані. Апарат Коха являє собою металевий порожнистий циліндр із подвійним дном і електронагрівальним обладнанням. Простір між верхньою й нижньою пластинками дна заповнюється на $\frac{2}{3}$ водою. У кришці апарата вмонтований термометр і є отвори для виходу пари. В апараті Коха стерилізують головним чином живильні, середовища, властивості яких змінюються за температур вище 100 °С. Обробку матеріалу текучою парою використовують для проведення дробної стерилізації. При цьому матеріал, найчастіше живильні середовища, зазнає три- або чотириразової обробки вологим жаром при температурі 56–75 °С протягом однієї години з інтервалом в 24 год, протягом яких підтримується температура, сприятлива для проростання спор. Пророслі зі спор вегетативні клітини швидко гинуть за наступного нагрівання матеріалу.

Пастеризація або неповна стерилізація. Для багатьох цілей задовольняються частковою стерилізацією, тобто знищенням вегетативних форм мікроорганізмів. Такого ефекту звичайно досягають шляхом пастеризації – витримування протягом 5–10 хв при 75 або 80°C. Пастеризацією частково стерилізують молоко, однак щоб не зіпсувати його смаку, час обробки в цьому випадку скорочують. Застосовують два методи пастеризації молока: короткочасне нагрівання (20 хв при 71,5–74°C) і сильне нагрівання (2–5 хв при 85–87°C). Стерилізації молока домагаються в результаті надсильного нагрівання. При цьому в молоко вводять перегріту водяна пару, доводячи температуру суміші до 135–150°C. Молоко зазнає дії цієї температури протягом 1–2 с. Потім, пропускаючи молоко через форсунку, знижують тиск і одночасно охолоджують молоко, при цьому з нього відділяється вода, введена у вигляді пари.

Консервування ягід і кісточкових плодів теж слід розглядати як часткову стерилізацію. При звичайному нагріванні консервних банок протягом 20 хв за 80°C гинуть тільки вегетативні клітини й спори багатьох грибів, у той час як спори бактерій залишаються життєздатними. Проростанню бактеріальних спор перешкоджають низькі значення рН, обумовлені присутністю кислот у фруктовому соці. На пастеризованій полуниці часто з'являється так званий «полуничний гриб» *Byssochlamys nivea*.

Стерилізація сухим жаром. Відбувається у сушильних шафах та печах Пастера. Максимальна температура у сушильній шафі сягає 200°C. Гарячим

повітрям в сушильній шафі стерилізують скляний посуд (пробірки, лійки, піпетки, стакани, конічні колби Ерленмеєра, колби Бунзена). Перед стерилізацією посуд старанно миють і висушують. Під час висушування спори бактерій переносять високу температуру протягом тривалого часу.

Зазвичай тривалість стерилізації за температури 160⁰С – 2 години, за 165 – 1 година, 180 – 40 хв, а за 200⁰С – 10–15 хв. Слід мати на увазі, що при температурі 170⁰С папір і вата жовтіють а за більш високих температур – обуглюються. По закінченню стерилізації сушильну шафу виключають, але його дверцята не відкривають до повного охолодження, оскільки холодне повітря може викликати утворення тріщин на гарячому посуді. Стерилізація жаром основана на коагуляції клітинних білків.

Фільтрація. Розчини, що містять термолабільні речовини, зручніше за все стерилізувати фільтруванням. Неглазуровані порцелянові циліндри (свічки Шамберлана) застосовувалися вже в лабораторії Пастера. У лабораторіях для стерилізації питної води використовують фільтри Беркефельда (із пресованого кізельгуру). Часто використовують також азбестові пластинки (у фільтрах Зейца), скляні фільтри й мембранні фільтри. Деякі з них випускаються з різною величиною пор, що дозволяє навіть розділяти організми різної величини й форми.

Опромінення. Для повної або часткової стерилізації застосовують ультрафіолетові, рентгенівські й гамма-промені. У лабораторних умовах найбільше значення мають ультрафіолетові промені. Опромінення використовується для часткової стерилізації приміщень, при цьому бактерії гинуть дуже швидко, а спори грибів, менш чутливі до ультрафіолету, значно повільніше. Іонізуюче випромінювання застосовують для стерилізації харчових продуктів і інших компактних матеріалів.

Хімічні засоби. При стерилізації харчових продуктів, лікарських препаратів і різного роду приладів, а також у лабораторній практиці виправдало себе застосування окису етилену, який вбиває й вегетативні клітини, і спори, але діє тільки в тому випадку, якщо у матеріалі, що стерилізується, міститься деяка кількість (5–15%) води. Окис етилену застосовують у вигляді газової суміші.

Ряд хімічних агентів сповільнює або повністю гальмує ріст мікроорганізмів. Якщо та або інша речовина пригнічує ріст бактерій, а після його видалення ріст знову відновлюється, то говорять про бактерицидну дію. Бактерицидні речовини викликають загибель клітин. Той або інший ефект, однак, залежить від концентрації діючої речовини. Крім того, серед бактерій існують форми, стійкі до загальних клітинних і метабоітичних отрут (таким, як фенол або окис вуглецю) і навіть здатні використовувати їх як джерела енергії.

Підготовка посуду для стерилізації.

У мікробіологічній практиці широко використовують бактеріальні пробірки, різноманітні колби, чашки Петрі, піпетки (як звичайні, так і пастерівські). Стерилізація посуду відбувається в сушильних шафах. Посуд перед стерилізацією відповідним чином готують:

Перш за все посуд ретельно миють і обдають киплячим розчином 1%

НСІ. Іноді посуд кип'ятять у водному розчині, що містить 6% $K_2Cr_2O_7$ та 6% концентрованої H_2SO_4 а потім багаторазово промивають водою. Вимитий посуд слід добре просушити.

Пробірки та колби закривають ватними пробками або спеціальними металевими ковпачками, які запобігають потраплянню мікроорганізмів з повітря.

За підготовки посуду до стерилізації спочатку роблять ватні пробки, закривають ними пробірки та колби. Потім пробірки пачками загортають в папір, а на колби поверх ватних пробок одягають паперові ковпачки.

Чашки Петрі перед стерилізацією загортають у папір по одній, дві або три чашки в один пакет.

Підготовка бактеріологічної піпетки до стерилізації полягає також в тому, що в широкий її кінець вносять невеликий шматочок вати. Після цього кожен піпетку окремо обгортають папером. Кілька піпеток загортають в спільний пакет і перев'язують. Інколи для стерилізації піпеток використовують металеві футляри.

Контроль на стерильність посуду, наприклад піпеток, виконують наступним чином: з партії простерилізованого посуду відбирають 2–3 піпетки і за дотримання умов стерильності, що запобігають потраплянню сторонньої мікрофлори, в піпетку з пробірки набирають стерильний м'ясо-пептонний бульйон і потім виливають його назад до пробірки. Пробірку з м'ясо-пептонним бульйоном переносять в термостат. Якщо середовище лишається прозорим (ріст мікроорганізмів відсутній), то контрольовані піпетки були стерильними, що і є показником правильно виконаної стерилізації.

Питання для самоконтролю:

1. Які Ви знаєте методи фіксації препаратів мікроорганізмів?
2. Які з них належать до хімічних?
3. Чим зумовлюється різниця у забарвленні грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів?
4. Які етапи складного забарвлення фіксованого препарату мікроорганізмів за Грамом?
5. Чим зумовлена різниця у забарвленні спори і цитоплазми у маслянокислих бацил?
6. Що таке живильні середовища?
7. Які вимоги до живильних середовищ?
8. Яким чином готуються щільні живильні середовища й для чого вони використовуються?
9. Чому в якості ущільнювача для живильних краще середовищ використовувати агар-агар, а не желатин?
10. На які групи діляться живильні середовища за походженням і складом?
11. Що таке синтетичні середовища й у яких випадках вони застосовуються?
12. Що таке стерилізація? Які методи стерилізації Вам відомі?

13. Якими методами можна стерилізувати посуд?
14. Якими з відомих Вам способів можна стерилізувати живильні середовища
15. Як готуються живильні й середовища посуд для стерилізації?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Методи відбору і підготовки проб з різних об'єктів для мікробіологічних аналізів. Посів мікроорганізмів із плодів, овочів, ґрунтів і зерна для визначення їх чисельності методом розведень. Посів мікроорганізмів з води та повітря.

Матеріали і обладнання: стерильні запаковані комплекти чашок Петрі; пробірки, що містять 9 мл стерильної води; колби, що містять 99 мл стерильної води; стерильні запаковані піпетки на 1 мл; овочі, фрукти; ґрунт різного гранулометричного складу; зерно різних культур; штативи паперові етикетки; клей ПВА; живильні середовища; пакувальний папір; апарат для збовтування рідини; електронні ваги.

Вказівки до виконання роботи.

Цей метод за своєю точністю дає тільки орієнтовні дані, переважно про кількість аеробних мікробів у ґрунті. Проте внаслідок простоти і доступності його дуже часто застосовують у навчальних мікробіологічних лабораторіях. Згідно з цим методом ґрунтову суспензію висівають на тверді поживні середовища, вирощують на них колонії, підраховують та аналізують вирощені мікроорганізми.

Проведення роботи. Із зразка досліджуваного ґрунту або зерна відважують 1 г і роблять серію розведень у стерильній воді для одержання витяжки. Розведення готують так: у стерильну мірну колбу об'ємом 100 мл вносять 1 г ґрунту або зерна, додають 99 мл стерильної води і збовтують впродовж 3 хв. Потім відстоюють 1,5 хв. і роблять наступне розведення (рис. 36).

Для виготовлення кожного наступного розведення беруть окрему стерильну піпетку. У три стерильні чашки Петрі стерильною піпеткою вносять 1 мл ґрунтової суспензії (наприклад, 1:100 000) і розподіляють рівномірно по дні. Розплавлене стерильне середовище (МПА, БПА, КАА, ґрунтовий агар) із пробірки виливають у чашку і обережно перемішують поживне середовище з ґрунтовою суспензією плавними коливаннями. Після застигання середовища для видалення крапель води з кришок чашки Петрі підсушують, позначають і ставлять у термостат при температурі 28–30°C на 3–5 діб.

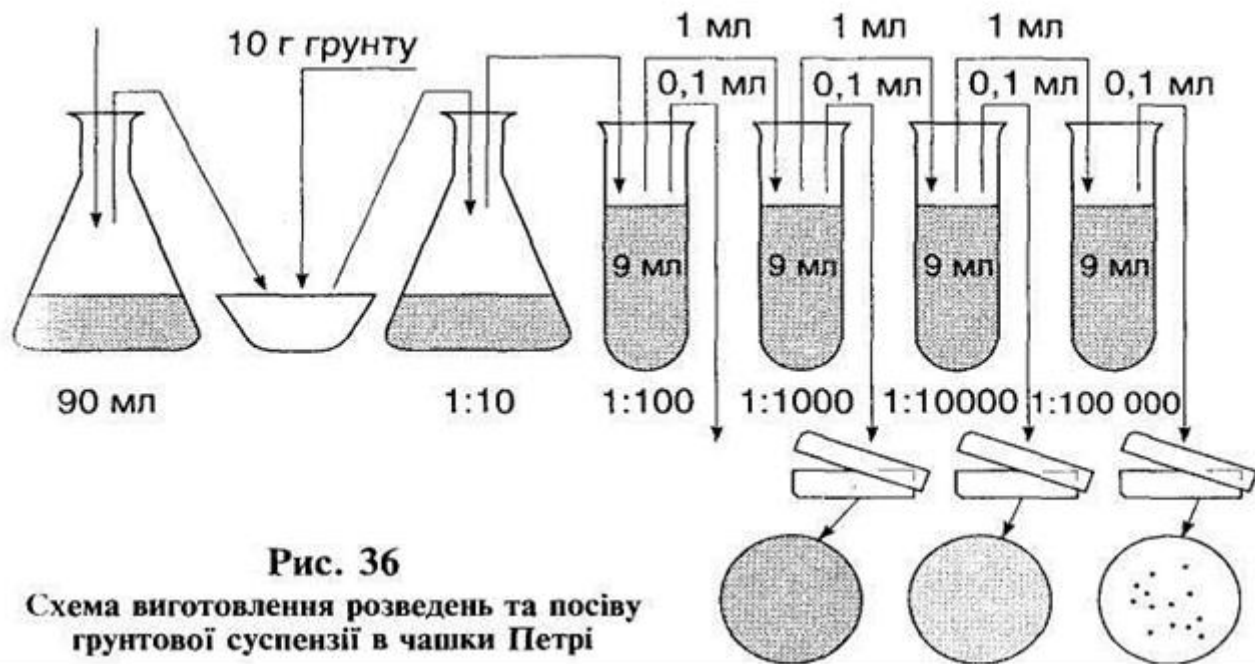


Рис. 36

Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової суспензії в чашки Петрі

Потім підраховують (без відкривання кришки чашки) кількість колоній, що вирости на агарових пластинках. Найкращі результати одержуються при утворенні на чашках 20–50 колоній бактерій і 20–30 колоній грибів. Для підрахунку кількості колоній зручно користуватися спеціальними приладами для підрахунку колоній. Якщо на площі чашки Петрі виростало дуже багато колоній, то для полегшення підрахунку її ділять на сектори, підраховують кількість пророслих колоній в одному секторі та перемножують отримане число на кількість секторів.

По закінченні підрахунків колоній визначають середнє з 3-х чашок і множать на розведення, взяте для аналізу. У такий спосіб одержують кількість аеробних мікробів у 1 г наважки. Для точного визначення кількості мікроорганізмів у 1 г ґрунту їх чисельність визначається в 1 г повітряно-сухого, а найточніших – абсолютно сухого ґрунту. Для таких розрахунків треба водночас визначати вологість ґрунтової проби.

Постановка досліду для визначення кількості мікроорганізмів в воді і повітрі.

Посів мікроорганізмів з води різних джерел.

Метод пластинок. Облік мікроорганізмів у воді можна виконувати різними методами. Якщо облік виконують за методом пластинок, то чинять так само, як було описано при посіві бактерій з ґрунту і зерна за цим методом. виключають лише першу операцію – зважування. Пробу води в 1 мл або 10 мл відбирають стерильною піпеткою і розводять в 99 або 90 мл стерильної водопровідної води. Потім готують ті ж розведення, що й з ґрунтом та зерном, висівають на м'ясо-пептонний агар і обраховують кількість пророслих колоній

Така ж техніка посіву мікроорганізмів з гноївки, розсолу та інших рідких середовищах.

Посів мікроорганізмів з повітря різних приміщень.

З метою проведення посіву мікроорганізмів з повітря беруть пробірку з 10 мл стерильної водопровідної води і через неї просмоктують за допомогою аспіратора певний об'єм повітря. Щоб в стерильній воді лишилися всі мікроорганізми, які є у повітрі, в пробірку занурюють дві трубки. Одна з них, сполучена з повітрям, опускається до дна, а інша, з'єднана з аспіратором, закінчується одразу під пробкою. Після просмоктання повітря всі мікроорганізми лишаються у воді. Їх кількість визначається за методом пластинок так само, як і у воді після виготовлення відповідних розведень або ж наступною фільтрацією на целюлоїдних фільтрах.

Більш простий метод осідання Коха, але він непридатний для кількісного обліку мікроорганізмів у повітрі. За допомогою цього методу можна лише виявити, що повітря тих чи інших приміщень насичене мікроорганізмами. З цією метою беруть чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром і протягом певного проміжку часу лишають відкритою на повітрі (5-10 хв.). За 5 хв. на відкриту поверхню площею 100 см² може потрапити така кількість мікроорганізмів, що міститься в 0,01 м³. Мікроорганізми, що осіли разом з пилом на агарову пластинку, будуть на ній розвиватися і дадуть різноманітні колонії, часто з пігментацією різних кольорів.

Методи визначення кількості мікроорганізмів у ґрунті.

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

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

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

Відбір проб ґрунту. Дослідження мікрофлори ґрунту будь-яким згодом дає надійні результати тільки тоді, коли правильно відібрано ґрунтові зразки. При дослідженні оранки знімають верхній шар і відбирають пробу з глибини всього орного шару. При визначенні мікрофлори ґрунтового профілю роблять ґрунтовий розріз і відбирають проби з генетичних горизонтів (знизу доверху).

Рекомендується використовувати стерильний бур, лопату та ніж. Відібрані зразки вміщують у стерильні скляні колби або в стерильні

поліетиленові мішечки з етикетками, де позначено місце відбору, шар горизонту тощо. Аналіз зразків необхідно проводити в той же день. Допускається витримування зразків у холодному приміщенні не більше двох діб. При висушуванні зразків кількість мікробів різко знижується.

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

Бактеріоскопічний метод С. М. Виноградського (в модифікації О. Г. Шульгіної).

Виготовляють мікропрепарати з ґрунтової суспензії і фарбують еритрозином. Кількість бактерій у ґрунті визначають прямим підрахунком під мікроскопом.

Із середньої проби ґрунту відважують 5 г, розмелють у ступці та вносять у конічну колбу об'ємом 250-300 мл, додають 50 мл стерильної водогінної води і збовтують протягом 5 хв за допомогою ротатора. Після осідання великих частинок (протягом 5 с) стерильною градуйованою мікропіпеткою відбирають 0,01 мл завислої суспензії та наносять її на знежирене предметне скло. До суспензії на склі додають краплю 0,01% розчину агару (агар заздалегідь промивають і виготовляють на дистильованій воді). Суспензію перемішують з агаром і стерильним накривним скельцем розподіляють по предметному склу за допомогою трафарету на площі 1 см².

Після цього препарат підсушують, фіксують 96% спиртом і фарбують карболовим еритрозином (занурюють скло в розчин барвника і витримують протягом 30 хв, а при потребі й до 24 год). Залишок фарби змивають, занурюючи препарат у воду (тильною стороною), підсушують і вивчають під мікроскопом за допомогою імерсійної системи. Кількість мікроорганізмів визначають за такою формулою:

$$x = q \cdot \frac{S_m \cdot 10^8 \cdot C}{S_{пз} \cdot V}$$

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

Приклад. Щоб дістати точний результат, роблять підрахунок кількості мікробів у 100 полях зору мікроскопа (якщо в препараті мало бактерій). І визначають їх середню кількість в 1 полі зору або на 1 клітинку окулярної сітки. Далі визначають площу поля зору за формулою $S = \pi r^2$ або площу клітинки окулярної сітки. Щоб одержати величину радіуса, вимірюють діаметр поля зору за допомогою об'єкт-мікромметра. Знаючи площу поля зору або клітинки окулярної сітки можна визначити і кількість бактерій в 1 г ґрунту.

Наприклад, на 1 клітинку окулярної сітки припадає 2,5 бактерії, то на всьому препараті їх буде наступна кількість:

$$2,5 \times 250\,000 \times 4 = 2\,500\,000 \text{ бактерій,}$$

а в 1 г ґрунту – $2\,500\,000 \times 1\,000 = 2\,500\,000\,000$

у даному випадку клітинка окулярної сітки має сторону в 0,02 мм, тобто її площа дорівнює $0,0004\text{ мм}^2$. на кожному квадратному сантиметрі може розміститися 250 000 клітинок, а на площі препарату (4 см^2) – 1 000 000 разів. Так як 0,01 мл суспензії, що використовувалася для виготовлення препарату, містить в собі 0,001 г ґрунту, то отриману кількість треба помножити ще на 1000 (тобто 1 бактерія в клітинці окулярної сітки відповідає 1 млрд. Бактерій в 1 г ґрунту).

Недоліком методу Виноградського є неможливість розмежувати живі і мертві клітини бактерій.

Метод пластинок обростання (за М. Г. Холодним).

На відміну від наведених вище, цей метод дає можливість вивчати цілі мікробні асоціації безпосередньо в ґрунті, тобто в природному середовищі.

Хід роботи. На рівній поверхні ґрунту роблять гострим ложем розріз, глибина якого залежить від досліджуваного ґрунтового горизонту. До вертикальної стінки зрізу щільно прикладають стерильне знежирене предметне скло, на 2–3 см нижче від поверхні ґрунту. Зверху зріз закривають ґрунтом. Місце, де встановлено скло, позначають. Залежно від мети дослідження скло витримують у ґрунті 10–15 діб, а іноді й кілька місяців. Після цього з однієї сторони скла риють ямку і в неї перекидають скло, верхня сторона якого і досліджується. Поверхню скла, що була притулена до стінки ґрунтового розрізу, висушують на повітрі. Протилежну сторону скла витирають сухою ганчіркою. Препарат фіксують на полум'ї спиртівки. Потім предметне скло занурюють у банку з водою верхньою стороною донизу, внаслідок чого великі частинки ґрунту відмокають і падають на дно, а мікроби та дрібні частинки залишаються на склі. По закінченні промивання, препарат фарбують карболовим еритрозином (витримують від 30 хв до 24 год), висушують і вивчають під мікроскопом з імерсійною системою. Якщо до предметного скла була прикріплена смужка фільтрувального паперу, то через два місяці вона буде розкладена і на забарвленому препараті можна помітити волокна целюлози, покриті целюлозоруйнівними бактеріями. При мікроскопії ванні препарату відмічають характер мікрофлори, щільність обростання та домінуючі форми.

Метод Ланге-Поздєєвої.

На відміну від метода Холодного, за такого методу в ґрунт закладаються не предметні скельця, а чашки Петрі з відповідним агаровим поживним середовищем. З цією метою заздалегідь готуються чашки Петрі з відповідними стерильними середовищами. Середовища рекомендується розливати товстим шаром, особливо за тривалих досліджень.

Хід роботи. У ґрунті роблять на бажану глибину ямку, одну сторону якої рівно зрізають стерильним ножом як і при закладці предметних скелець за методикою Холодного. Чашку відкривають і притискають до цієї стінки ямки так, щоб середовище було обернене до ґрунту. Краї чашки злегка вдавлюють в ґрунт до тих пір, коли середовище не буде торкатися ґрунту. Позаду чашки

вставляють етикетку, що виступає над поверхнею ґрунту, а ямку знову засипають.

Через певний проміжок часу ямку розкопують, етикетку виймають, краї чашки підкопують зі всіх сторін і чашку легко відділяють від ґрунту. Великі шматочки, що будуть заважати подальшим дослідженням, видаляють пінцетом.

Шляхом подальшого безпосереднього мікроскопування колоній, виготовлених з цих препаратів, можна виявити мікроорганізми, що беруть участь в змінах закладеної в ґрунт речовини, а також прослідкувати за взаємовідносинами мікроорганізмів та зміною поколінь. Змінюючи склад поживних середовищ, можна прослідкувати за розвитком різноманітних груп мікроорганізмів.

Груповий аналіз мікрофлори ґрунту.

Диференційоване виділення з ґрунту різних фізіологічних груп мікроорганізмів та їхній аналіз можливі за використання різних поживних середовищ.

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

Можна рекомендувати виявити і вивчити такі фізіологічні групи: спороносні та неспороносні (пігментоутворюючі) форми бактерій на МПА; групу бацил на МПА + сусло-агар, міксобактерії на картопляному агарі, актиноміцети на КАА, гриби на сусло-агаровому середовищі тощо.

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

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

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

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

Посів на сусло-агар. На цьому середовищі можна виділити низку ґрунтових грибів: *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizobium*, *Alternaria*, *Frichoderma* та ін.

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

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

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

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

Облік бактерій у ризосфері за методом М.О. Красильникова.

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

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

Облік ризосферної і кореневої мікрофлори за К. З. Теппер.

Зона ґрунту довкола коренів дістала назву ризосфери. Її мікрофлора набагато різноманітніша за мікрофлору ґрунті у взагалі. Тут трапляються різні види бактерій, грибів, водоростей ніщо. Коренева система виділяє в ґрунт різні речовини, якими живляться мікроорганізми. Це переважно неспоронні сапрофіти. У свою чергу рослини дістають від мікроорганізмів продукти мінералізації органічних решток, а також фізіологічно-активні речовини і типу

ауксинів і вітамінів), які покращують кореневе живлення, стимулюють процеси росту і розвитку рослин.

Для кількісного та якісного вивчення ризосферної і кореневої мікрофлори широко застосується метод послідовних відмивань коренів, розроблений К.З.Теппер.

Хід роботи. Викопають рослину з монолітом ґрунту і стерильним пінцетом обережно звільняють корені від прилиплого до них ґрунту. Потім стерильним ножом зрізують молоді корінці і наважку в 1 г переносять стерильним пінцетом у першу колбу з 99 мл стерильної дистильованої води.

Суміш у колбі збовтують впродовж 2 хв, після чого за допомогою стерильного сталевого гачка обережно переносять корінці в другу колбу, додають 99 мл стерильної дистильованої води і знову збовтують 2 хв. У такий спосіб повторюють сім разів. У останню, сьому колбу, перед стерилізацією бажано додати 3–5 г добре промитого стерильного кварцового піску, який допомагає краще відділяти мікроорганізми, що перебувають у тісному контакті з коренями.

Після цього з кожної колби окремо стерильною піпеткою відбирають 0,05 мл відмивної води і наносять її на поверхню агарової пластинки (МПА або КАА) в чашці Петрі, за допомогою стерильного шпателя розтирають її по поверхні поживного середовища. Посів кожного розведення роблять 4–5 разів, використовуючи для кожного і розведення окрему піпетку і окремий шпатель Дригальського.

Засіяні чашки розміщують у термостаті при температурі 28–30°C і витримують протягом 3–5 діб. По закінченні інкубації здійснюють кількісний і якісний аналіз колоній, які вирости.

Аналіз результатів досліду показує, що з відмиванням коренів кількість бактерій не зменшується, а в деяких випадках, навпаки, спостерігається її збільшення. На чашках, що відповідають першим відмиванням, виявляються великі колонії спороносних мікробів, а з наступним відмиванням кількість бацил зменшується, а дрібних колоній неспороносних форм, зокрема з родів псевдомонад і мікобактерій, досить чітко збільшується.

Для більш точного визначення кількості мікробів у ризосфері та на коренях суспензію з першого відмивання додатково збовтують 5 хв, роблять розведення і висівають на агарові пластинки. Вміст решти шести колб зливають в одну, із цієї суміші також готують розведення і висівають їх на поживне середовище в чашках Петрі. Всі операції повторюють так, як із попередніми розведеннями.

Для перерахунку мікроорганізмів на 1 г абсолютно сухого ґрунту ризосфери кількість колоній, які вирости на агарових пластинках, множать на 20 (щоб встановити кількість мікробів у 1 мл) і на ступінь і розведення. Одержані результати ділять на масу абсолютно сухого ґрунту. Кількість ризосферного ґрунту в першій колбі знаходять за різницею початкової наважки і наважки відмитих коренів (для цього) з останньої порції відмивної води корені витягують, обсушують

фільтрувальним папером і зважують). Для визначення кількості мікроорганізмів, яка відповідає 1 г корінців, кількість колоній, які виростили на поживному середовищі в чашках, множать на 20, на ступінь розведення і на 600 (шість змивів по 100 мл) та ділять на масу сирих коренів.

Питання для самоконтролю:

1. З якою метою здійснюється посів мікроорганізмів?
2. Що таке метод розведень?
3. Як виконується посів мікроорганізмів з води?
4. Як виконується посів мікроорганізмів з повітря?
5. Які є методи визначення кількості мікроорганізмів у ґрунті?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Кількісний облік мікроорганізмів, висіяних із плодів, овочів, ґрунтів, зерна води і повітря.

Пересів мікроорганізмів із однієї колонії на різні живильні середовища для визначення виду.

Матеріали і обладнання: чашки Петрі з пророслими колоніями мікроорганізмів; бактеорологічні петлі; спиртівки; сірники; штативи; пробірки з наступними середовищами: МПБ, МПБ + глюкоза, МПБ + селітра, молоко, МПЖ, МПА, косий агар; пакувальний папір; термостат.

Вказівки до виконання роботи.

Облік мікроорганізмів висіяних із плодів, овочів, ґрунтів, зерна води і повітря.

Облік мікроорганізмів у ґрунті та зерні.

Обраховуємо кількість колоній мікроорганізмів у чашці Петрі. Для спрощення обрахунків чашку Петрі можна розділити на сегменти, знайти кількість пророслих колоній мікроорганізмів в одному сегменті, помножити на їх число та на ступінь розведення, вказаний на кришці чашки Петрі. Отриманий результат заносимо до таблиці.

Облік мікроорганізмів у воді:

Обраховуємо кількість колоній мікроорганізмів у чашці Петрі. Для спрощення обрахунків чашку Петрі можна розділити на сегменти, знайти кількість пророслих колоній мікроорганізмів в одному сегменті, помножити на їх число. Отриманий результат заносимо до таблиці.

Облік мікроорганізмів у повітрі:

Обраховуємо кількість колоній мікроорганізмів у чашці Петрі. Для спрощення обрахунків чашку Петрі можна розділити на сегменти, знайти кількість пророслих колоній мікроорганізмів в одному сегменті, помножити на їх число. Знаходимо площу чашки Петрі за формулою $S = \pi r^2$ (діаметр стандартної чашки Петрі = 10 см). Далі за пропорцією знаходимо, яка кількість

мікроорганізмів могла б прорости на площі у 100 см^2 (що дорівнює кількості мікроорганізмів в $0,01 \text{ м}^3$ повітря). Відповідно, отримане число множимо на 100 та записуємо до таблиці 1.

1. Кількісний облік мікроорганізмів у ґрунті, зерні, воді, повітрі

	Кількість мікроорганізмів в 1 г ґрунту (зерна), КУО			Кількість мікроорганізмів в 1 мл води, КУО	Кількість мікроорганізмів в 1 м^3 повітря, КУО
	ступінь розведення				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
Бактерії					
Мікрومیцети					

Приклад. В чашці Петрі виявлено 3568 пророслих колоній мікроорганізмів (колонієутворювальних одиниць – КУО), площа чашки Петрі – 70 см^2 . Яка кількість мікроорганізмів міститься в 1 м^3 повітря, з якого виконано посів?

1. Складаємо пропорцію:

$$3568 \text{ колоній} - 70 \text{ см}^2$$

$$X \text{ колоній} - 100 \text{ см}^2$$

$$X = 3568 \times 100 / 70 = 5097,14 \text{ шт.}$$

2. Знаходимо кількість мікроорганізмів в 1 м^3 повітря:

$$5097,14 \times 100 = 509714 \text{ шт/м}^3$$

2. Пересів бактерій з однієї колонії на різні поживні середовища для визначення виду.

Пересів мікроорганізмів з однієї і тієї ж колонії на різні поживні середовища виконують з метою подальшого визначення виду мікроорганізмів за культуральними, морфологічними і фізіологічними ознаками.

З метою пересіву серед чашок Петрі відбирають одну, де знаходиться найбільш розвинена колонія мікроорганізмів, щоб потім з неї виконати пересів на різні поживні середовища.

Хід роботи. Стерильною препарувальною петлею (з цією метою її прожарюють у полум'ї спиртівки) відбирають часточку колонії і переносять на поживні середовища у різних пробірках. Перед кожним новим відбором часточки колонії препарувальну петлю прожарюють на полум'ї спиртівки.

Пересів мікроорганізмів на середовище м'ясо-пептонний бульон (МПБ).

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і вносимо у верхній шар середовища МПБ.

Пересів мікроорганізмів на середовище МПБ+глюкоза.

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і вносимо у верхній шар середовища МПБ + глюкоза.

Пересів мікроорганізмів на середовище МПБ+селітра.

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і вносимо у верхній шар середовища МПБ +селітра.

Пересів мікроорганізмів на молоко.

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і вносимо у верхній шар молока.

Пересів мікроорганізмів на середовище м'ясо-пептонна желатина (МПЖ).

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і пересіваємо на середовище МПЖ шляхом проколювання петлею верхнього шару середовища на глибину 1–2 мм.

Пересів мікроорганізмів на середовище м'ясо-пептонний агар (МПА).

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і пересіваємо на середовище МПА шляхом проколювання петлею з часточкою колонії живильного середовища до дна пробірки (прокол у стовпчик).

Пересів мікроорганізмів на середовище косий агар.

Прожареною препарувальною петлею відбираємо часточку колонії і проводимо пересів, здійснюючи петлею з часточкою колонії зигзагоподібні рухи по поверхні агару.

Всі пробірки з середовищами одразу після пересіву закриваємо ватно-марлевими пробками, запаковуємо у папір і підписуємо. Для розвитку мікроорганізмів пробірки з середовищами переносять у термостат за температурою 28–30°C.

Питання для самоконтролю:

1. Як проводиться облік мікроорганізмів у ґрунті або зерні?
2. Як проводиться облік мікроорганізмів у воді?
3. Як проводиться облік мікроорганізмів у повітрі?
4. З якою метою виконується пересів мікроорганізмів?
5. Яка техніка пересіву мікроорганізмів на різні живильні середовища?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Ідентифікація мікроорганізмів. Форми бактерій і мікроскопічних грибів.

Матеріали і обладнання: бактеорологічні петлі; спиртівки; сірники; штативи; пробірки з живильними середовищами, на які було виконано пересів: МПБ, МПБ + глюкоза, МПБ + селітра, молоко, МПЖ, МПА, косий агар.

Вказівки до виконання роботи.

Визначення виду мікроорганізмів за морфологічними, культуральними та фізіологічними ознаками.

Морфологічні ознаки. Зовнішня форма бактерій надзвичайно одноманітна, а фізіологічні особливості їх надзвичайно різноманітні, у силу

чого визначення їх видової належності – досить важка й трудомістка робота. При визначенні родин і родів можна обмежуватися одними морфологічними ознаками, серед яких найбільш важливі наступні:

1. **Форма клітини** (куляста, паличкоподібна, витка);
2. **Тип росту** (окремі клітини, клітини, зчеплені попарно, ланцюжки, кубики);
3. **Розміри клітини в мікронах**;
4. **Форма краю клітини** (увігнутий кінець, зрізаний під кутом і закруглений кінець клітини);
5. **Наявність спор і їх стійкість до високої температури**;
6. **Рухливість і тип джгутування** (один джгутик, пучок джгутиків на одному кінці клітини або джгутування по всій поверхні клітини).

Джгутики виявляються тільки за спеціальних заходах фарбування клітини або обробки її солями срібла. В останньому випадку мазок фіксують 2% осміевою кислотою й занурюють на півгодини за кімнатної температури (або на 5 хвилин при нагріванні) у суміш 60 мл 20% розчину таніну, 30 мл 2% осміевої кислоти й 4–5 крапель міцної оцтової кислоти. Після цього препарат ретельно промивають водою й абсолютним спиртом (кілька секунд) і на 1–2 хвилини занурюють в 0,5% розчин азотнокислого срібла (AgNO_3). Наступне промивання роблять у розчині наступного складу: галової кислоти – 5,0 г, таніну – 3,0 г, оцтовокислого натрію – 10 г, дистильованої води – 350 мл. Із цього розчину препарат знову занурюють у розчин срібла доти, поки рідина не почне чорніти. Почорнілий препарат миють дистильованою водою й розглядають під мікроскопом.

Для визначення стійкості спор до високої температури користуються наступним простим методом: капіляр стерильної піпетки зламують біля кінця й занурюють його в емульсію бактерій із спорами. Рідина всмоктується в капіляр, а кінчик запаюється. Після цього на піпетку надягають коркову пробку як поплавок і капіляр занурюють у водяну баню з певною температурою (від 90 до 100°C). Витримавши капіляр у воді певний час (наприклад 1–5 хвилин при 100°), стерилізують його спиртом і ефіром і, зламавши кінчик, його вміст видувають у чашку Петрі з відповідним для даного організму живильним середовищем. Якщо в чашці Петрі розвинуться колонії мікроорганізмів, то дана температура не є згубною для досліджуваних спор.

Культуральні ознаки. Крім морфологічних ознак, дуже важливе значення при визначенні виду бактерій мають також культуральні й фізіологічні ознаки. З культуральних ознак найбільш істотні такі:

а) Тип росту на рідких поживних середовищах (МПБ):

1. **Плівка** різної густини та консистенції утворюється при поверхневому розвитку мікроорганізмів, яким характеризуються анаероби. Вона може бути ніжною та тонкою, зникати при збовтуванні пробірки (так ростуть клітини *Bac. subtilis*). Для грибів характерне утворення щільної, сухої та шкрястої плівки. Вона легко знімається у вигляді круглого диску, що відповідає діаметру пробірки.

2. **Каламуть** з рівномірним помутнінням рідкого середовища (слабка, помірна, сильна) характерна для факультативних анаеробів.
3. **Осад** утворюється при рості анаеробних мікроорганізмів біля дна пробірки. Осад може бути густим або зрідженим, крихтовидним, гомогенним, волокнистим або у вигляді великих клаптів. Осад різниться за консистенцією. Він може бути в'язким, слизистим, крихким або пастоподібним.
4. **Пристінковий ріст** характерний для деяких бактерій та актиноміцетів. У цьому випадку утворюються рихлі клапті або компактні зерна, що прикріплюються до внутрішньої поверхні стінок посуду.
5. **Колір і запах** середовища.
6. **Ріст на молоці:** молоко звертається чи ні і чи має місце пептонізація казеїну.

б) **Типи колоній на мясо-пептонній желатині (МПЖ) або мясо-пептонному агарі (МПА):**

1. **Величина колонії:** визначається її діаметром. Розрізняють точкові колонії $d < 1$ мм, дрібні $d = 1-2$ мм, середні $d = 2-4$ мм, великі $d = 4-6$ мм. Колонії мікроорганізмів не бувають нескінченними, їх ріст обмежується багатьма факторами: швидко вичерпуються запаси поживних речовин в агарі навколо колонії, навколо колонії та під нею накопичуються токсичні продукти метаболізму. Розміщені поряд колонії мікроорганізмів конкурують між собою за елементи живлення.
2. **Поверхня колонії:** блискуча, гладка, шорстка, зморшкувата, горбиста, з концентричними колами або радіально розділена.
3. **Структура колонії:** однорідна, дрібно- або крупнозерниста (рис. 8).

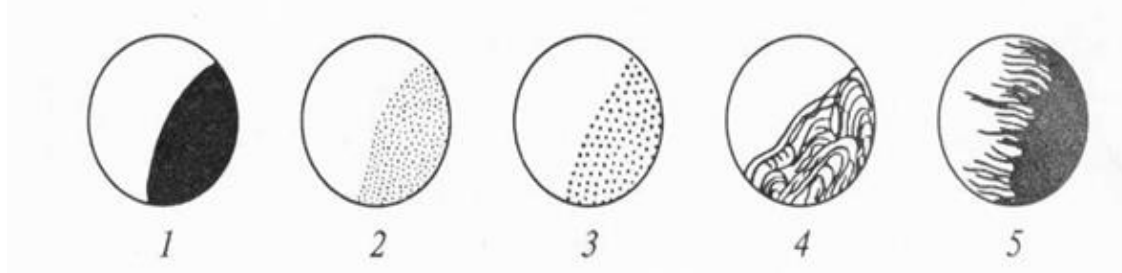


Рис. 8. Структура колонії: 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струмениста; 5 – волокниста.

4. **Рельєф або профіль колонії** характеризується її підвищенням над поверхнею живильного середовища. Розрізняють куполоподібні, конусоподібні, плоскі, кратероподібні та інші колонії (рис. 9).

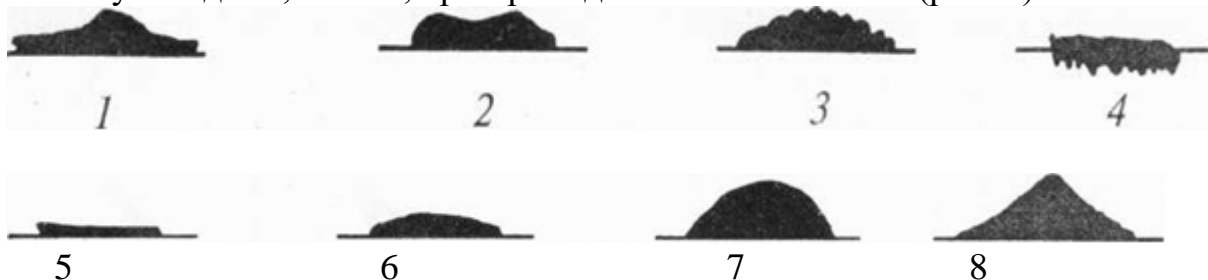


Рис. 9. Профіль колоній: 1 – зігнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбистий; 4 – вростаючий у субстрат; 5 – плоский; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний.

5. Характер краю колонії: визначають при дослідженні колонії під мікроскопом. Розрізняють рівні краї у вигляді чітко вираженої лінії, нерівні – хвилясті, зубчасті, ворсисті (рис. 10).

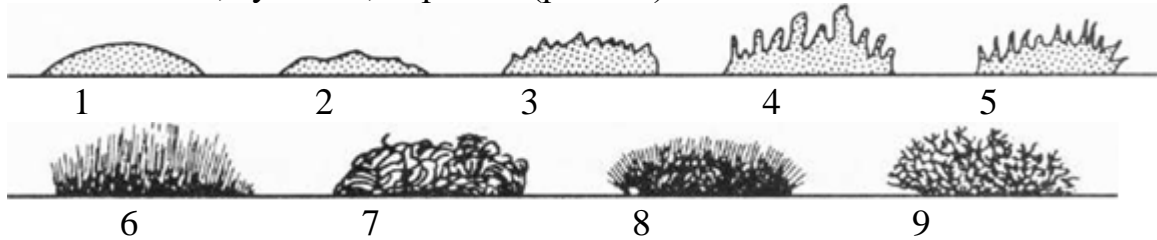


Рис. 10. Край колонії:

1 – гладкий; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий;
4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий;
8 – ворсинчастий; 9 – гіллястий.

6. Консистенція колонії досліджується дотиком до неї або взяттям з неї проби матеріалу препарувальною петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути щільною, м'якою, врослою в агар, слизистою (липне до петлі), тягучою, плівковою (знімається вся), крихкою (легко руйнується препарувальною петлею).

7. Форма колонії може бути округла, амебовидна, неправильна, ризоїдна і т.д. (рис. 11).

8. Колір колонії: безкольорові (брудно-білі колонії відносять до безкольорових) або пігментовані – білі, жовті, золотисті, оранжеві, бузкові, червоні, чорні. Детально відмічають виділення пігменту в субстрат. При описі колоній актиноміцетів відмічають пігментацію повітряного та субстратного міцелію, а також виділення пігментів у середовище.

9. Характер розрідження желатини навколо колонії.

10. Характер розвитку при посіві уколом в мясо-пептонну желатину.

11. Тип розрідження желатини при посіві уколом (рис. 12).

12. Тип росту на мясо-пептонному косому агарі (будова колонії й характер росту при посіві штрихом на косому агарі форма колонії, характер краю колонії, колір пігментації (рис. 13).

Фізіологічні ознаки. Серед фізіологічних ознак, дуже важливих для визначення видової приналежності бактерій, основними є наступні:

а) Відношення мікроорганізмів до джерел вуглецю. Для встановлення, які джерела вуглецю споживаються даною бактерією, готується синтетичне живильне середовище. До цього мінерального середовища додають у кількості 1% джерело вуглецю, що досліджується:

1) гексози – глюкоза, галактоза (при речовин у середовищі стерилізацію ведуть при 100°C у кип'ятильнику Коха);

2) пентози;

3) дисахаридидсахароза, мальтоза, лактоза;

4) поліцукри: декстрин, крохмаль, целюлеза;

- 5) солі органічних кислот: мурашиної, оцтової, масляної, бурштинової, яблучної, винної, лимонної й інших кислот;
 6) спирти: етиловий спирт, гліцерин, еритрит, маніт, дульцит;
 7) жири, глюкозиди та інші органічні сполуки.

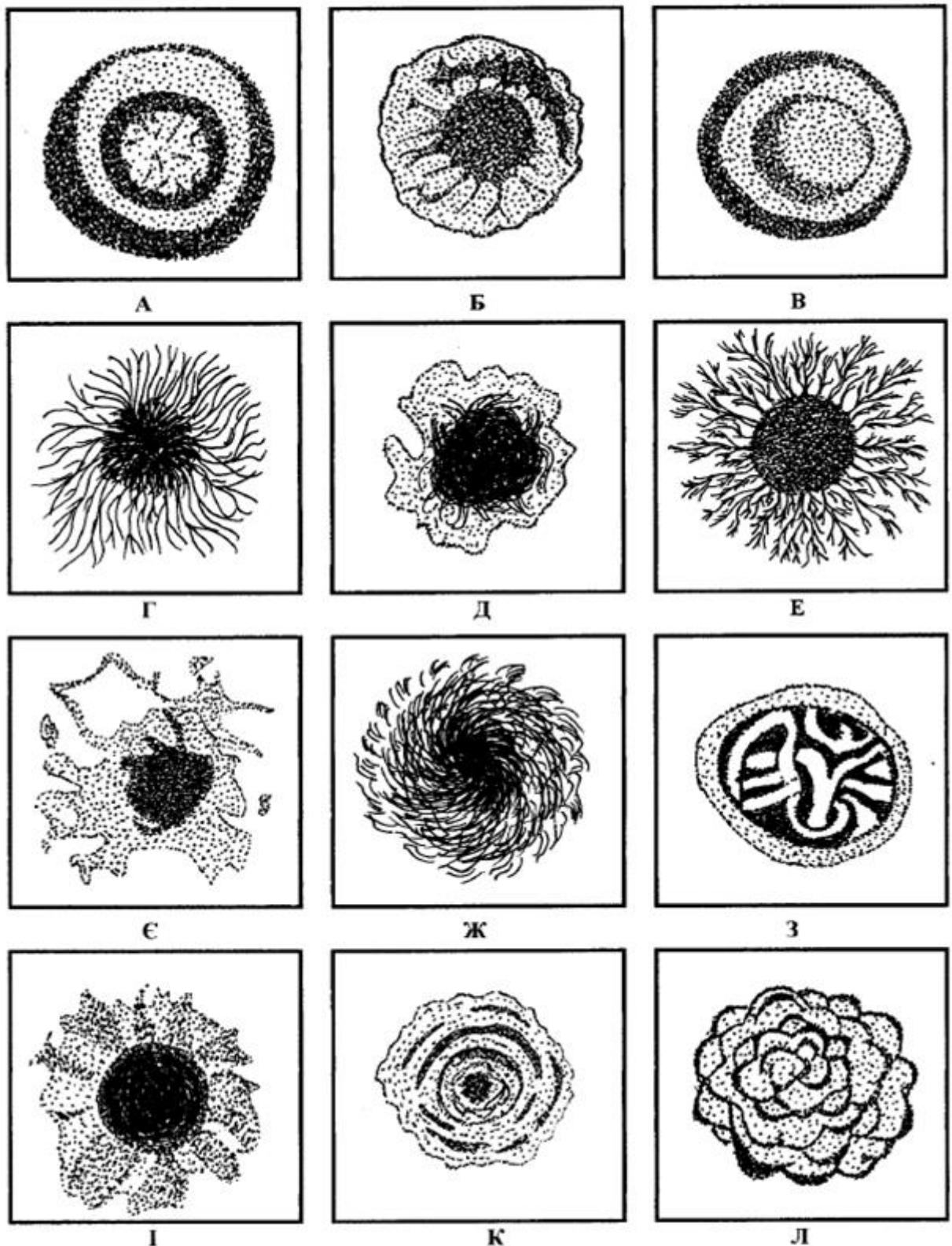
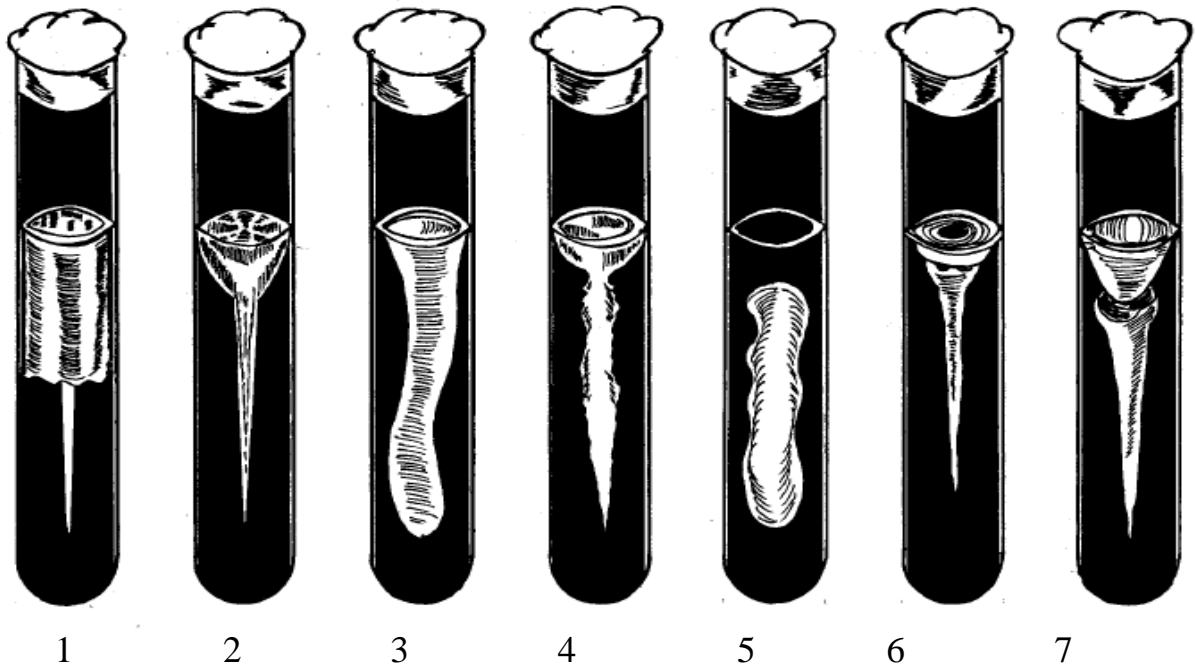


Рис. 11. Форма колонії

а – округла; б – округла з фестончатим краєм; в – округла з валиком по краю; г, д – ризоїдні; е – з ризоїдним краєм; є – амебовидна; ж – ниткоподібна; з – складчата; і – неправильна; к – концентрична; л – складна.



1

2

3

4

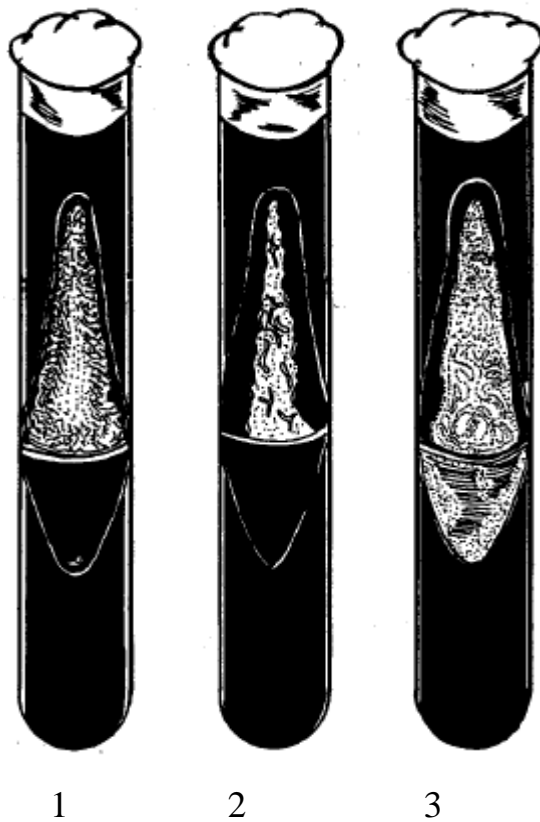
5

6

7

Рис. 12. Типи розрідження желатину:

1 – пошарове; 2 – лейкоподібне; 3 – мішкоподібне; 4 – ріпоподібне; 5 – міхуроподібне; 6, 7 – кратероподібне



1

2

3

Рис. 13. Ріст бактерій на косому агарі при посіві штрихом:
1 – *Bacillus mycoides*; 2 – *Bacillus vulgaris*; 3 – *Bacterium vulgare*

б) Джерела азоту. У якості джерел азоту зазвичай використовують пептон, аспарагін, глікоколь, сечовину, аміачні й азотнокислі солі,

молекулярний азот. Кожне із зазначених джерел азоту (крім атмосферного азоту) додається в кількості приблизно 0,1–0,2% на об'єм живильної рідини

в) газоутворення – за використання вуглеводів, що додаються до мясо-пептонному бульйону (з них попередньо видаляють цукор зброджуванням за допомогою кишкової палички) можуть виділятися гази. Для їхнього виявлення використовують або посів уколом в агарове середовище в пробірці (при утворенні газів стовпчик агару розривається) або за допомогою «поплавків». Поплавок занурюють в пробірку запаєним кінцем догори так, щоб він повністю заповнився середовищем. Газ, що виділяється, накопичується у поплавку у вигляді бульбашок (рис. 14).

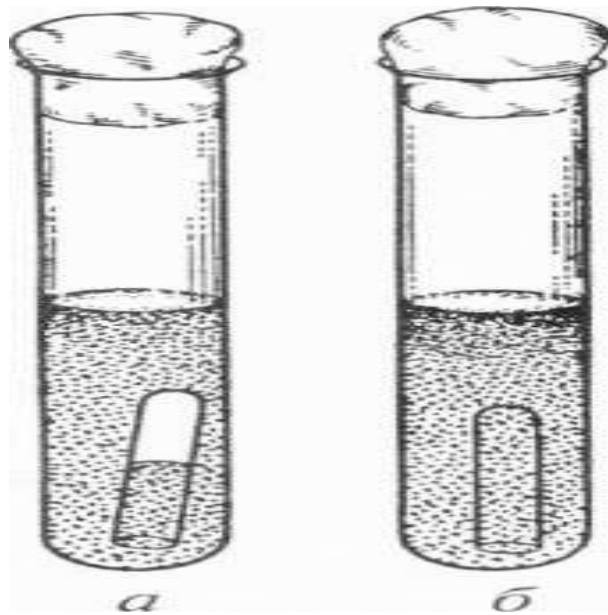


Рис. 14. Накопичення газів у поплавку:

а – ріст культури супроводжується газоутворенням; б – газоутворення відсутнє

г) кислотоутворення – за посіву на живильних середовищах, що містять вуглеводи, досить часто утворюються ще й органічні кислоти. Їх посилене накопичення спостерігається зазвичай при додаванні в середовище крейди. Наявність кислот у культурі легко виявляється на середовищах без крейди по титруванню їх децинормальним лугом (вихідне середовище повинна бути відтитрована при постановці досліду), а при наявності крейди – по пробі на розчинний кальцій у середовищі (до 5 мл середовища додають 1 мл концентрованого розчину щавлевокислого амонію, у присутності кислот з'являється білий осад, нерозчинний у воді при підкисленні оцтовою кислотою).

д) інші продукти життєдіяльності бактерій. З інших продуктів життєдіяльності бактерій встановлюють наявність у середовищі спиртів (відгін частини нейтрального середовища з наступною пробєю на спирт), аміаку (проба з реактивом Несслера), сірководню (проба з оцтовокислим свинцем), індолу (проба з азотистою кислотою), продуктів відновлення азотної кислоти (проба з «цинк-йод-крохмалем» на азотисту кислоту). Крім того, виявляється

відновлювальна здатність досліджуваної бактерії по знебарвленню метиленової сині.

е) відношення до кисню. Для встановлення, яке відношення даного мікроорганізму до кисню, роблять посів його уколом у пробірку з агаровим або желатиновим середовищем. Аероби розвиваються у верхній частині уколу, факультативні анаероби у середній частині уколу, а облигатні анаероби – в нижній частині уколу (рис. 15).

ж) стійкість до різних факторів зовнішнього середовища (до температури, світла, концентрації солей, до висушування, заморожуванню й до різних антисептиків). Для встановлення стійкості мікроорганізму до цих факторів вирощують культуру на живильному середовищі з додаванням різних речовин або ж висушують і заморожують культуру разом з живильним середовищем та устанавлюють життєздатність досліджуваної бактерії.

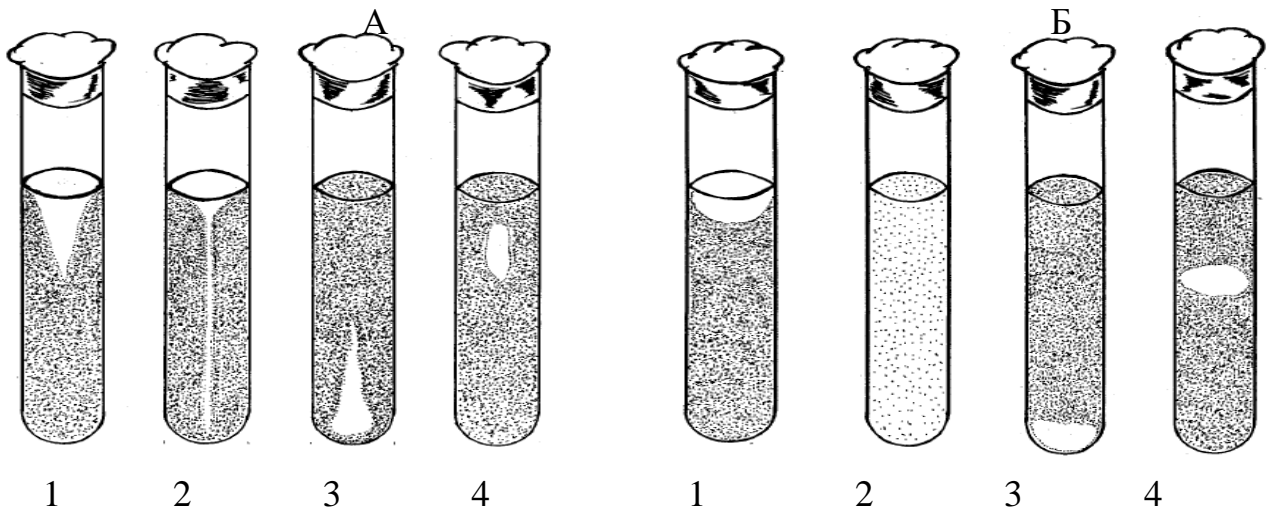


Рис. 15. Ріст мікроорганізмів при посіві уколом (А) та при посіві на розплавлене щільне середовище (Б):

1 – аероби; 2 – факультативні анаероби; 3 – облигатні анаероби; 4 – мікроаерофіли.

Коли будуть визначені всі морфологічні, культуральні й фізіологічні ознаки, то можна приступитися до визначення видової приналежності досліджуваної бактерії.

На основі досліджених ознак згідно наведених далі вихідних даних визначаємо рід та вид збудника.

Послідовність визначення роду та виду мікроорганізмів

Визначення роду:

- | | |
|--|---|
| 1. Коки | 3 |
| 2. Палички | 4 |
| 3. В рідкому середовищі ріст одиночними клітинами, двійчатками або | |

неправильними скопиченнями – мікрокок (*Micrococcus*)

В рідкому середовищі ріст пакетами, що нагадують тюки товарів – сарцини (*Sarcina*)

В рідкому середовищі ріст довгими ланцюжками – стрептокок (*Streptococcus*)

4. Безспоріві форми – бактерії (*Bacterium*)

Спороутворювальні форми – бацили (*Bacillus*)

Визначення виду:

Micrococcus

- | | |
|---|----|
| 1. На агарі і желатині білий, сірий або оранжевий ріст | 2 |
| На агарі і желатині ріст від рожевого до ясно-червоного | 11 |
| На агарі і желатині ріст синій (<i>Micrococcus cyanes conn</i>) | |
| 2. Желатина розріджується | 3 |
| Желатина не розріджується | 6 |
| 3. Молоко звертається | 4 |
| Молоко не звертається | 5 |
| 4. Ріст білий (<i>Micrococcus acidi lactis</i>) | |
| Ріст жовтий (<i>Micrococcus citreus</i>) | |
| Ріст оранжевий (<i>Micrococcus aureus</i>) | |
| 5. Ріст білий (<i>Micrococcus butyri</i>) | |
| Ріст жовтий (<i>Micrococcus chromotraus</i>) | |
| Ріст сіро-помаранчевий (<i>Micrococcus cremoides</i>) | |
| Ріст буро-жовтий (<i>Micrococcus badius</i>) | |
| 6. Молоко звертається | 7 |
| Молоко не звертається | 8 |
| 7. Ріст білий (<i>Micrococcus lactis acidi</i>) | |
| Ріст жовтий (<i>Micrococcus acidi lactis</i>) | |
| Ріст оранжевий (<i>Micrococcus umbilicatus</i>) | |
| 8. Ріст білий | 9 |
| Ріст іншого кольору | 10 |

9. Рухомі форми (*Micrococcus agilis albus*)

Нерухомі форми (*Micrococcus candidans*)

10. Ріст жовтий (*Micrococcus sulfurens*)

Ріст оранжевий (*Micrococcus aurantiacus*)

Ріст буро-жовтий (*Micrococcus versicolor*)

Ріст покритий прозорим нальотом (*Micrococcus concentricus*)

11. Рухомі форми (*Micrococcus agilis fili*)

Нерухомі форми (*Micrococcus roseus*)

Sarcina

1. На агарі і желатині білий, сірий, жовтий або оранжевий ріст 2

На агарі і желатині рожевий або червоний ріст (*Sarcina rosea*)

2. Ріст білий або сірий (*Sarcina alba*)

Ріст жовтий, желатина розріджується (*Sarcina cutea*)

Ріст оранжевий (*Sarcina aurantiaca*)

Ріст буро-жовтий (*Sarcina fulva*)

Streptococcus

1. Желатина розріджується (*Streptococcus gracilis*)

Желатина не розріджується 2

2. Молоко звертається (*Streptococcus pyogenes*)

Молоко не звертається (*Streptococcus kefir*)

Bacterium

1. На агарі і желатині білий до сірого, субстрат не забарвлюється 2

На агарі і желатині білий до сірого, субстрат забарвлюється в
зелений, синій або темно-бурий колір 7

На агарі і желатині жовтий до оранжевого 9

На агарі і желатині рожевий, червоний до буро-червоного 12

На агарі і желатині синій до фіолетового 13

2. Колонії з рівними, зазубреними або лопатевидними краями 3

Колонії з неправильними виростами або променями (*Bacterium vulgare*)

3. Нерухомі форми 4
 Рухомі форми 6
4. Молоко звертається 5
 Молоко не звертається (*Bacterium innocuum*)
5. Газоутворення на середовищі МПБ + глюкоза є (*Bacterium acidi lactis*)
 Газоутворення на середовищі МПБ + глюкоза немає (*Bacterium limbatum*)
6. Молоко звертається, газоутворення немає (*Bacterium coli*)
 Молоко не звертається (*Bacterium stutzeri*)
7. Желатина розріджується, субстрат зелений (*Bacterium fluorescens*)
 Желатина не розріджується 8
8. Субстрат забарвлюється в зелений, рідше – в бурий колір (*Bacterium puridum*)
 Субстрат забарвлюється в синій до чорного колір (*Bacterium syncianuum*)
9. Ріст яскраво-жовто-зелений, дуже маленькі рухомі палички, які повільно розріджують желатину (*Bacterium turcosum*)
 Ріст лимонно або золотисто-жовтий. Палички нерухомі, желатина не розріджується (*Bacterium luteum*)
 Ріст жовто-білий до буро-оранжевого 10
 Ріст лимонно-жовтий з червоним забарвленням субстрату (*Bacterium erythrogenes*)
 Ріст оранжевий до цегляно-червоного 11
10. Желатина розріджується, рухомі форми (*Bacterium crenoides*)
 Желатина не розріджується, нерухомі форми (*Bacterium ochraceum*)
11. Нерухомі форми (*Bacterium tuevum*)
 Рухомі форми (*Bacterium chrysogeora*)
12. Желатина не розріджується, нерухомі форми (*Bacterium*

prodigiosum)

Желатина розріджується, рухомі форми (*Bacterium latericum*)

13. Ріст фіолетовий (*Bacterium violaceum*)

Ріст синій (*Bacterium coeruleum*)

Bacillus

- | | |
|--|---|
| 1. Аеробні форми | 2 |
| Строго анаеробні форми | 8 |
| 2. Укол у желатині з боковим розгалудженням | 3 |
| Укол у желатині без розгалуджень | 4 |
| 3. Розгалудження тонкі, довгі, схожі на кореневі мички, малорухомі бацили (<i>Bacillus micoides</i>) | |
| Розгалудження дуже короткі, нерухомі бацили (<i>Bacillus ellenbachensis</i>) | |
| 4. Ріст на картоплі у вигляді білого випуклого нальоту (<i>Bacillus oxalaticus</i>) | |
| Ріст на картоплі у вигляді тонкої прозорої плівки (<i>Bacillus tumescens</i>) | |
| Ріст на картоплі сірий, плоский, борошністий (<i>Bacillus silvialis</i>) | |
| Ріст на картоплі жовтувато-бурий | 5 |
| Ріст на картоплі у вигляді зморшкуватих складок | 7 |
| 5. Повільнорухливі форми (<i>Bacillus megaterium</i>) | |
| Швидкорухливі форми | 6 |
| 6. На агарі і желатині сірий прозорий ріст, дуже великі спори з гранями (<i>Bacillus asterosporum</i>) | |
| На агарі і желатині жовтий ріст, маленькі палички з циліндричними спорами (<i>Bacillus paulus</i>) | |
| 7. Ріст біло-сірий (<i>Bacillus mezentericus vulgatus</i>) | |
| Ріст жовтий (<i>Bacillus mezentericus tuscus</i>) | |
| Ріст сіро-синій до буро-червоного (<i>Bacillus mezentericus ruber</i>) | |
| Ріст рожевий до рожево-бурого (<i>Bacillus mezentericus niger</i>) | |

8. Утворення масляної кислоти відсутнє, енергійний розклад білків, спороутворення плектридіальне (*Bacillus putrificus*)

Масляна кислота утворюється, білки не розкладаються, спороутворення клостридіальне

9

9. Рухомі форми (*Bacillus amilobacter mobilis*)

Нерухомі форми (*Bacillus amilobacter immobilis*)

Питання для самоконтролю:

1. Які ознаки належать до морфологічних?
2. Які ознаки належать до культуральних?
3. Які ознаки належать до фізіологічних?
4. На які групи поділяються мікроорганізми по відношенню до кисню?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Дослідження збудників молочнокислого бродіння. Постановка досліду на маслянокисле бродіння та нітрифікацію у ґрунті.

Матеріали і обладнання: бактеорологічні петлі; спиртівки; сірники; штативи; пробірки з кефіром, кислим молоком, сметаною, йогуртом, розсолем овочів; мікроскопи; предметні та накривні скельця; пробірки; стебла льону; сира картопля; подрібнений фільтрувальний папір; дистильована вода; шматочок крейди; середовища для розвитку целюлозолітичних мікроорганізмів; середовища для розвитку нітрифікувальних мікроорганізмів I та II фази; метиленовий синій.

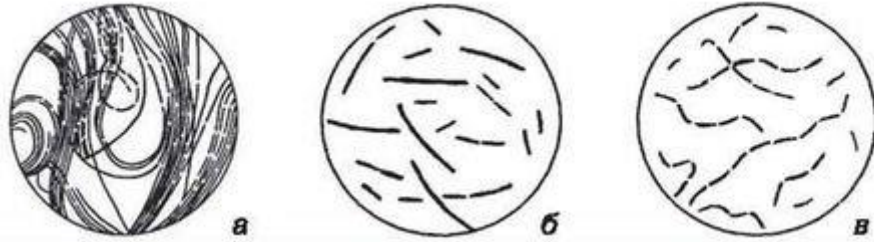
Вказівки до виконання роботи.

Молочнокислі бактерії – фізіологічна група хемоорганогетеротрофних, неспроутворювальних, нерухомих, факультативно анаеробних мікроорганізмів, збудників молочнокислого бродіння. Трапляються у молоці та кисломолочних продуктах, в соліннях, маринадах, у ґрунті, в філосфері та ризосфері рослин, в кишечнику хребетних (рис. 16).

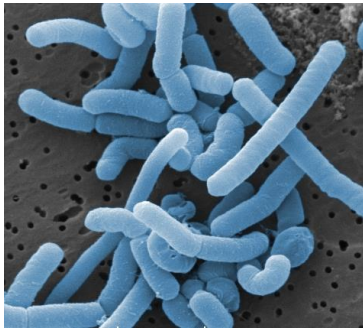
У результаті зброджування цукрів (глюкоза, фруктоза, маноза, сахароза, лактоза, мальтоза та ін.) утворюють молочну, оцтову кислоти, етанол, CO₂.

За морфологічними ознаками молочнокислі бактерії поділяють на кулясті (*Streptococcus*) та паличкоподібні (*Lactobacterium*, *Lactobacillus*).

Кулясті (округлі, сферичні, коки) молочнокислі бактерії використовуються переважно з метою виготовлення молочнокислих продуктів.



а – *Lactobacillus bulgaricus*; б – *Lactobacillus acidophilus*; в – *Lactobacterium bulgaricum*



Lactobacillus paracasei



Lactobacillus crispatus



Streptococcus lactis



Bifidobacterium bifidum



Lactobacterium plantarum

Рис. 16. Молочнокислі мікроорганізми під мікроскопом:

Паличкоподібні молочнокислі бактерії використовуються переважно при сквашуванні фруктів та овочів.

За характером бродіння їх поділяють на дві групи:

Гомоферментативні або типові бактерії – утворюють лише молочну кислоту, яка складає до 90% від усіх продуктів зброджування:



Збудники гомоферментативного бродіння (рис. 16):

Streptococcus lactis – молочнокислий стрептокок, клітини розташовані у вигляді диплококів та коротеньких ланцюжків (викликає згортання молока);

Lactobacterium bulgaricus – болгарська паличка, використовується для виготовлення простокваші;

Lactobacterium cucumeris – огіркова паличка, утворює ланцюжки, бере участь у квашенні огірків;

Lactobacterium plantarum – бере участь у квашенні овочів і силосуванні кормів;

Lactobacterium casei – відіграє роль при дозріванні сирів;

Lactobacterium acidophilus – використовується для виготовлення ацидофіліна.

Гетероферментативні або нетипові бактерії – під час бродіння з глюкози крім молочної кислоти утворюється оцтова кислота, вуглекислий газ, етиловий спирт.



До збудників гетероферментативного молочнокислого бродіння належать:

Lactobacterium brassicae – капуста паличка;

Betabacterium brevis, вони зустрічаються на рослинах та у хлібних заквасках.

Біфідобактерії – це бактерії роду *Bifidobacterium*, виглядають як прямі або розгалужені палички. Нерухомі, безспоріві, грампозитивні. Типовий представник – *Bifidobacterium bifidum*. Біфідобактерії зустрічаються в кишковому тракті людини та тварин, синтезують антибіотики, з чистих культур готують лікувальний молочнокислий біфідін.

Молочнокисле бродіння є основою виробництва кисломолочних продуктів, хлібопекарської промисловості (чорний хліб), сквашування овочів та фруктів, силосування кормів та для отримання молочної кислоти.

Дослідження молочнокислих бактерій.

1. На предметне скло нанести краплю кисломолочного продукту або розсолу, додати краплю дистильованої води та за допомогою бактеріальної петлі виготовити мазок.

2. Мазок висушити над полум'ям спиртівки та зафіксувати.

3. На фіксований таким чином мазок нанести кілька крапель метиленового синього на 3–5 хв.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати.

5. Знайти в полі зору ланцюжки коків або паличок. Зробити схематичний малюнок.

Постановка досліду на маслянокисле бродіння у ґрунті:

а) перетворення пектинових речовин – готуємо снопик із 5–6 стебел льону довжиною 2–3 см, зв'язуємо ниткою і розташовуємо у пробірці. Приливаємо в пробірку до ½ об'єму дистильованої води, доводимо до кипіння на спиртівці. Зливаємо воду, доливаємо свіжої і знову кип'ятимо. Після охолодження пробірки вносимо шматочок ґрунту для зараження середовища збудниками розкладу пектинових речовин.

б) перетворення крохмалю: пробірку на ¼ об'єму заповнюємо нарізаною кубиками сирого картоплею і доливаємо до ½ об'єму дистильованою водою, доводимо до кипіння на спиртівці. Після охолодження пробірки додаємо шматочок крейди для створення лужного середовища шматочок та сирого картоплі для зараження середовища збудниками розкладу крохмалю.

в) перетворення целюлози: пробірку на ¼ об'єму заповнюємо дрібно нарізаним фільтрувальним папером і доливаємо до ½ об'єму середовищем, що

слугує для розвитку целюлозолітичних мікроорганізмів, доводимо до кипіння на спиртівці. Після охолодження пробірки додаємо шматочок ґрунту для зараження середовища целюлозолітичними мікроорганізмами.

Постановка досліду на нітрифікацію у ґрунті.

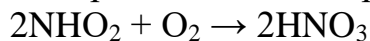
Нітрифікація – це мікробіологічний процес окислення аміаку і солей амонію, що накопичуються у ґрунті, гною та водоймах завдяки амоніфікації спочатку до азотистої, а потім до азотної кислот.

С.М. Виноградський виявив, що процес нітрифікації відбувається у дві фази, кожна з яких зумовлена специфічною групою аеробних бактерій:

1. Перша фаза нітрифікації – окислення аміаку до азотистої кислоти та її солей – нітритів. Процес викликає група грамнегативних бактерій: *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*



2. Друга фаза нітрифікації – доокислення азотистої кислоти до азотної і її солей нітратів. Здійснює група бактерій: *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*.



Нітрифікуючі бактерії належать до типових хемолітоавтотрофів і є облігатними аеробами.

Процес нітрифікації важливий для родючості ґрунту та живлення рослин, так як час нітрифікації утворюються солі азотної кислоти – нітрати, які є основним джерелом азоту для вищих рослин.

Постановка досліду: дві пробірки позначаємо цифрами 1 та 2 і заповнюємо кожен до ¼ об'єму середовищами, що слугують для розвитку нітрифікувальних мікроорганізмів відповідно I та II фаз нітрифікації, доводимо до кипіння на спиртівці. Після охолодження пробірок в кожен додаємо по грудочці ґрунту для зараження середовища нітрифікувальними мікроорганізмами.

Питання для самоконтролю:

1. Процес молочнокислого бродіння, основні види.
2. Найбільш поширені збудники молочнокислого бродіння.
3. Процес маслянокислого бродіння.
4. Процес нітрифікації.
5. Фази нітрифікації.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Дослідження збудників маслянокислого бродіння та нітрифікації у ґрунті.

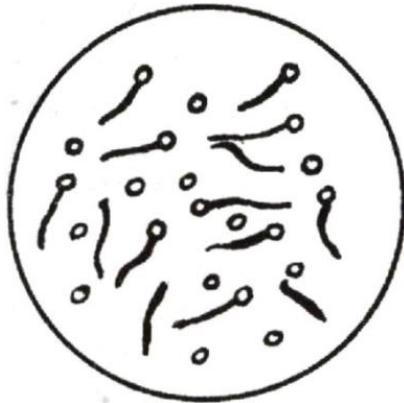
Матеріали і обладнання: бактеорологічні петлі; спиртівки; сірники; штативи; пробірки з середовищами, де закладався дослід на маслянокисле бродіння та нітрифікацію у ґрунті; мікроскопи; предметні та накривні скельця.

Вказівки до виконання роботи.

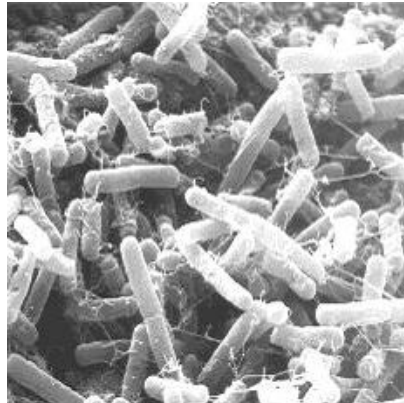
Дослідження збудників маслянокислого бродіння.

Маслянокислі бактерії (представники роду *Clostridium*) це obligатні анаероби, спороутворюючі, хемоорганотрофи, дуже чутливі до кислотності середовища (оптимальна рН = 7–7,3), грампозитивні палички, що здатні зброджувати вуглеводи та деякі органічні кислоти до масляної та оцтової кислот, H_2 і CO_2 . Клостридії – рухомі (перитрихи) анаеробні бактерії, що мешкають у ґрунті й утворюють спори за клостридіальним або плектридіальним типом.

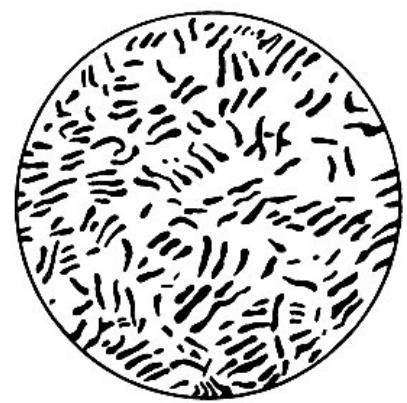
Типовими представниками маслянокислих бактерій є *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium omelianskii* (рис. 17).



Clostridium omelianskii



Clostridium butylicum



Clostridium pasteurianum

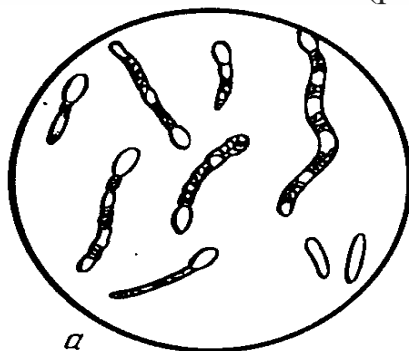
Рис. 17. Типові представники збудників маслянокислого бродіння

Дослідження збудників маслянокислого бродіння. Із пробірок, де закладався досвід на перетворення у ґрунті пектинових речовин, крохмалю та целюлози приготувати препарат живих клітин маслянокислих мікроорганізмів методом «роздавленої» краплі, розглянути під мікроскопом спочатку при малому, потім при великому збільшенні, схематично замалювати та підписати:

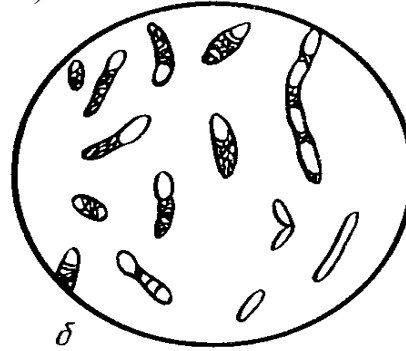
а) збудники розкладу пектинових речовин – наприклад, *Clostridium pectinovorum*, *Clostridium felsineum* (рис. 18);

б) збудники розкладу крохмалю

в) збудники розкладу клітковини (целюлози) – наприклад, *Cytophaga Cellvibrio*, *Clostridium omelianskii* (рис. 19).



а



б

Рис. 18. Збудники розкладу пектинових речовин:
а – *Clostridium pectinovorum*; б – *Clostridium felsineum*

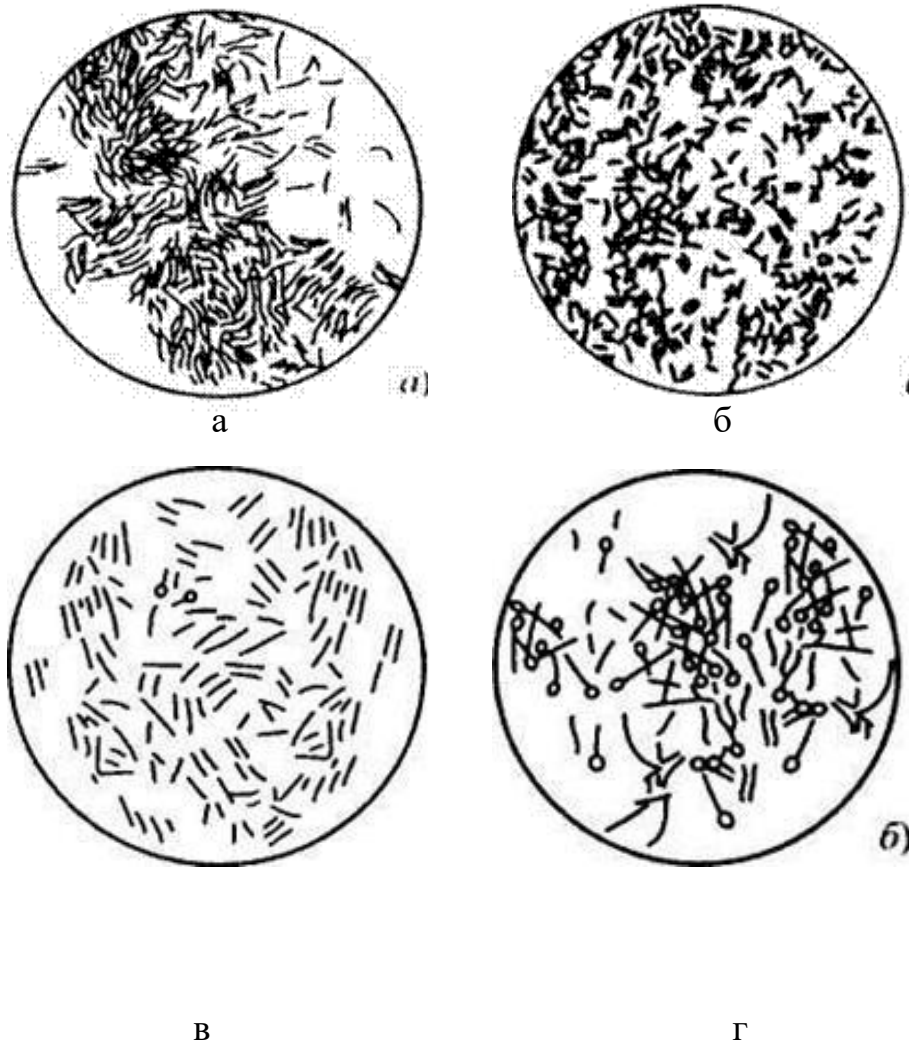


Рис. 19. Збудники розкладу клітковини:
 а – *Cytophaga*; б – *Cellvibrio*; в – *Clostridium omelianskii* (молоді клітини);
 г – *Clostridium omelianskii* (клітини зі спорами).

Дослідження збудників нітрифікації.

I фаза: збудників I фази нітрифікації виявляємо за накопиченням азотистої кислоти та нітритів. Для цього у заглиблення фарфорової палетки вносимо зразок середовища із пробірки, де було закладено дослід зі збудниками I фази нітрифікації та додаємо реактив Грісса, перемішуємо. Поява червоного відтінку свідчить про присутність у середовищі збудників I фази нітрифікації. Поява рожевого кольору при додаванні до середовища з пробірки I реактиву Несслера свідчить про присутність нітритів.

II фаза: збудників II фази нітрифікації виявляємо за накопиченням азотної кислоти та нітратів. Для цього у заглиблення фарфорової палетки вносимо зразок середовища із пробірки, де було закладено дослід зі збудниками II фази нітрифікації та додаємо реактив дифеніламін, який розчиняємо краплиною сірчаної кислоти, перемішуємо. Поява синього відтінку свідчить про присутність у середовищі збудників II фази нітрифікації. Поява рожевого

кольору при додаванні до середовища з пробірки 2 реактиву Несслера свідчить про присутність нітратів.

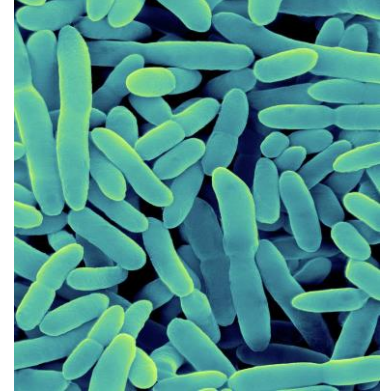
Із пробірок, де закладався дослід на нітрифікацію, приготувати препарат живих клітин мікроорганізмів методом роздавленої краплі, розглянути спочатку при малому, потім при великому збільшенні, схематично замалювати та підписати.



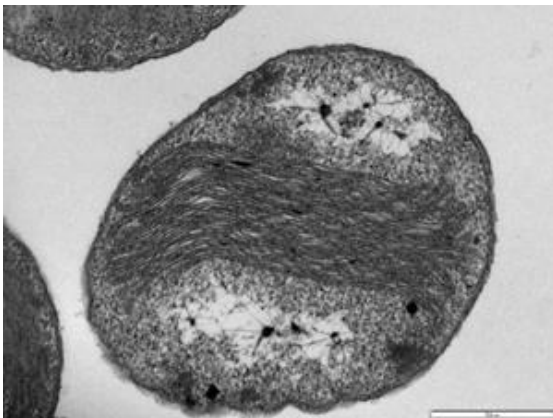
Nitrosospira sp. bacterium



Nitrobacter Sp Bacteria



Nitrobacter Sp. Nitrifying



Nitrosococcus oceanii



Nitrosomonas

Питання для самоконтролю:

1. До якої родини належать збудники маслянокислого бродіння?
2. Які найбільш поширені збудники маслянокислого бродіння?
3. I фаза нітрифікації, збудники та хімізм.
4. II фаза нітрифікації, збудники та хімізм.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Вивчення морфологічної будови мікроорганізмів – збудників хвороб рослин та псування різних за призначенням видів сировини (плоди, овочі, зерно) та готових продуктів (кlostридії, мезофільні і термофільні бацили, мікроскопічні гриби і дріжджі).

Матеріали і обладнання: мікроскопи; чашки Петрі; зразки рослинних матеріалів, уражених захворюваннями; бактеріологічні петлі; скальпелі; препарувальні голки; спиртівки; серветки; предметні і накривні скельця; флакони зі спиртом і водою; розчин метиленового синього і фуксину; атласи-визначники захворювань плодових, овочевих, ягідних і зернових культур.

Вказівки до виконання роботи.

Користуючись атласами та іншою допоміжною літературою, визначити вид захворювання у поданих зразках сировини.

Методом зіскобу виготовити препарати збудників захворювань і розглянути під мікроскопом.

Замалювати прояви захворювання на досліджуваному об'єкті та вигляд збудника (форма клітини – для бактеріозів; міцелій, органи спороношення і вигляд спор – для грибних захворювань). Підписати збудників латиницею.

Питання для самоконтролю::

1. Вплив погодних умов, строків збирання, механічних пошкоджень та ін. на псування сировини.
2. Характеристика мікроорганізмів, що викликають хвороби рослин.
3. Специфічні фітопатогенні мікроорганізми, що викликають хвороби рослин та псування сировини.
4. Способи і типи поширення фітопатогенних мікроорганізмів.
5. Значення збереження природної оболонки плодів, овочів, ягід, зерна у попередженні ураження їх хворобами.
6. Характеристика найбільш поширених хвороб плодів, овочів, ягід, зерна.
7. Основні заходи з попередження мікробіологічних захворювань плодів, овочів, ягід, зерна.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Закладання дослідів на вивчення санітарно-бактеріологічного стану обладнання, інвентаря, тари, рук обслуговуючого персоналу (МАФАНМ, БГКП).

Дослідження забрудненості зерна і борошна картопляною паличкою.

Матеріали і обладнання: стерильні ватні тампони; стерильний пептонно-сольовий розчин; колби на 100 см³; стерильні пробірки; чашки Петрі; стерильні пінцети; стерильні металеві трафарети з обмежувальними отворами; МПА; середовище Кеслера; банки об'ємом 0,5; 1,0; 3,0 дм³; пінцети; бактеріологічні петлі; пшеничний хліб з борошна вищого ґатунку; МПБ.

Вказівки до виконання роботи.

Мікробіологічний контроль санітарного стану устаткування та інвентарю.

Пробу для визначення санітарного стану устаткування, інвентарю беруть зволеним стерильним ватним або марлевым тампоном, яким протирають 100 см² поверхні. Тампони звожують у стерильному пептонно-сольовому розчині. Для обмеження площі на поверхню накладають стерильний металевий трафарет з отворами певного розміру. Після взяття змивів з поверхні тампон уміщують у посуд з 100 см³ стерильного пептонно-сольового розчину і енергійно струшують. Виконують розведення (1/1000; 1/10000 і т.д.). Вибір ступеня розведення залежить від передбачуваної кількості МАФАНМ у продукті. Розведення підбирають з таким розрахунком, щоб у засівах на чашках Петрі виростало від 15 до 300 колоній.

1 см³ відповідного розведення висівають на МПА для визначення кількості МАФАНМ. Засіви термостатують при температурі (30±1) С° протягом 72 годин. Дозволяється проводити завчасний облік результатів після 48 годин. В чашках підраховують колонії і виконують перерахунок на площу 1 см² з урахуванням розведення.

Для визначення БГКП тампони зі змивами безпосередньо занурюють в 5–7 см³ одного із середовищ збагачення (Кеслер, Кода). Засіви термостатують при температурі (36±1)°С протягом 24 годин. Із пробірок з ознаками росту (зміна кольору, газоутворення, помутніння) роблять висів на середовище Ендо. З колоній, характерних для БГКП (червоних з металевим блиском або без нього, рожевих і блідо-рожевих), готують препарати, фарбують за Грамом і мікроскопують. При виявленні в препаратах грамнегативних безспорових паличок проводять тест на газоутворення в напіврідкому середовищі з глюкозою. Враховують результат після інкубації при температурі (37±1)С° через 6–8 годин. При виявленні газоутворення на середовищі з глюкозою роблять висновок про те, що в змивах виявлені БГКП.

В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про санітарний стан обладнання та інвентаря.

Мікробіологічний контроль гігієнічного стану обслуговуючого персоналу.

При взятті змивів з рук протирають поверхні долоней рук, проводячи вологим тампоном не менш 5 разів по кожній долоні і пальцях, під нігтями. Стерильні тампони звожують у стерильному пептонно-сольовому розчині і після відбору змивів занурюють в пробірку з селективним середовищем для виявлення БГКП (як описано вище).

Змиви з санітарного одягу беруть, протираючи стерильними тампонами 4 площини по 25 см² (нижня частина кожного рукава і 2 площини з верхньої передньої частини санодрюгу). Після відбору змивів тампони занурюють в пробірку з селективним середовищем для виявлення БГКП (як описано вище).

В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про гігієнічний стан рук і одягу обслуговуючого персоналу.

Мікробіологічний контроль санітарного стану тари.

Взяття змивів з тари проводять після миття. У відібрану тару заливають пептонно-сольовий розчин. Для тари місткістю до 1 дм³ об'єм розчину – 10 см³, від 1 дм³ до 3 дм³ – 20 см³, більше 3 дм³ – 50 см³. Тару прикривають кришкою і, струшуючи, змивають внутрішню поверхню.

1 см³ змиву висівають на МПА для визначення МАФАНМ. Засіви терmostатують при температурі (30±1)С° протягом 72 годин. В чашках підраховують колонії і виконують перерахунок на відповідний об'єм тари.

В робочий зошит записують розрахунки та роблять висновок про санітарний стан тари.

Дослідження забрудненості зерна і борошна картопляною паличкою.

Спори *B. mesentericus* потрапляють у борошно під час розмелювання зерна. Вони витримують нагрівання до 120°С, а тому дуже часто залишаються життєздатними у м'якуші хліба, де температура випікання не перевищує 100°С. За підвищеної температури та вологості зберігання борошна, хлібобулочних виробів *Bacillus mesentericus* значно активізує свою діяльність.

Для визначення *Bacillus mesentericus* у стерильній воді готують 10% розчин із зерна, борошна чи хліба і засівають по 1 см³ розведення 1:100, 1:1000 у пробірки з 10 см³ мясопептонного бульйону. Через дві доби терmostатування за температури 37°С виконують пересів суспензії на шматочки пшеничного хліба з борошна вищого ґатунку, які попередньо стерилізують.

Для цього в стерильні чашки Петрі вміщують шматочки хліба, на які наносять по 10 см³ мясопептонного бульйону з досліджуваних пробірок. Чашки вміщують в ексікатор, на дно якого наливають небагато стерильної води. Чашки інкубують дві-три доби за температури 37°С. Далі їх оглядають, відзначаючи характерні ознаки для картопляної хвороби. Враховуючи розведення, розраховують кількість картопляної палички в зразках.

Ознаки, характерні для росту картопляної палички:

- утворення спор;
- позитивне забарвлення за Грамом;
- ріст на зрізі картоплі у вигляді складчастого нальоту;
- ріст на поверхні мясопептонного бульйону у вигляді зморщеної плівки;
- розрідження желатину;
- ферментація глюкози і сахарози до кислот без утворення газів;
- відсутність ферментації лактози.

Питання для самоконтролю::

1. Мікробіологічний контроль устаткування: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
2. Мікробіологічний контроль інвентаря: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
3. Мікробіологічний контроль тари: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.

4. Мікробіологічний контроль гігієнічного стану обслуговуючого персоналу: показники, що контролюються; відбір проб; методика висіву проб; допуски.
5. Поняття про дезінфекцію, показання до застосування. Класифікація дезінфікуючих речовин та особливості їх використання.
6. Які ознаки, характерні для росту картопляної палички?
7. Назвіть основні способи потрапляння картопляної палички у борошно
8. Які фактори зумовлюють активність розвитку картопляної палички?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

Підрахунки і дослідження мікроорганізмів, висіяних з обладнання, тари, інвентаря та рук обслуговуючого персоналу. Санітарно-бактеріологічна оцінка одержаних даних. Дослідження забрудненості зерна і борошна грибною мікробіотою.

Матеріали і обладнання: колби на 100 см³; дистильована вода; 80%-вий спиртовий розчин, фарбники; ефір; 20%-ва сірчана кислота; гліцерин; 7%-вий розчин двовуглекислого натрію; стерильні пробірки; препарувальні голки; центрифуга; аналітичні ваги; сушильна шафа; мікроскопи; предметні і покривні скельця; чашки Петрі; стерильні пінцети; паперові фільтри; МПА; бактеріологічні петлі; зерно; борошно;

Вказівки до виконання роботи.

Як відомо, деякі фітопатогенні мікроорганізми здатні нагромаджувати в зерні, борошні та інших продуктах шкідливі речовини, споживання яких може призводити до виникнення захворювань. Перш за все, це відноситься до ріжків, деяких грибів роду *Fusarium* та сажкових грибів. Специфічні токсини цих грибів зумовлюють фарбування хліба, змінюють його запах, а в окремих випадках роблять хліб отруйним. Тому з метою попередження негативних наслідків в зерні та борошні необхідно своєчасно виявляти шкідливі домішки грибного походження.

Виявлення ріжків у борошні за Е. І. Вайштейном. Відбирають дві наважки борошна масою 20 г: одну – досліджуваного матеріалу, а іншу – такого ж матеріалу, яка завідомо містить ріжки (контроль).

Наважку вміщують у порцелянову чашку і заливають 60–70 мл гарячого 80%-вого спирту. Чашку з сумішшю ставлять на киплячу водяну баню на 10 хвилин та періодично помішують. Рідину зливають через чисту марлю. Залишок на марлі двічі промивають 80%-вим спиртом, віджимають і висушують в сушильній шафі.

Висушений залишок подрібнюють скляною паличкою і змішують з 1,5 мл 25%-вої сірчаної кислоти.

Через 30 хвилин суміш переносять в колбу (або циліндр) з притертою пробкою, доливають 30 мл сірчаного ефіру збовтують упродовж однієї години

та фільтрують через паперовий фільтр у мірний циліндр з щільною пробкою. Залишок на фільтрі промивають чистим ефіром, об'єм якого доводять до 40 мл.

Далі готують насичений розчин двовуглекислого натрію, 10 мл якого доливають в циліндр. Вміст циліндра добре струшують, через декілька хвилин частини ріжків зафарбовуються в червоно-фіолетовий колір. Інтенсивність фарбування яких залежить від їх кількості: різка зміна кольору простежується за вмісту ріжків біля 1% і ледве помітна – за наявності 0,25%. Порівняння ведуть до контрольного зразка.

Виявлення ріжків у борошні за Гофманом. До 10 г борошна, вміщеного в циліндр з притертою пробкою, доливають 20 мл ефіру і 1 мл 20%-вої сірчаної кислоти. Суміш добре збовтують і 3–4 години відстоюють, періодично струшуючи. Далі її фільтрують через паперовий фільтр. Залишок на фільтрі промивають чистим ефіром до одержання 25 мл фільтрату, який переносять в циліндр, куди доливають 0,5 мл 7%-вого розчину двовуглекислого натрію і добре перемішують.

Содовий розчин екстрагує барвні речовини ріжків і зосереджується в нижній частині циліндра. Якщо содовий розчин набуває жовто-бурого кольору з легким фіолетовим відтінком, це вказує на вміст у борошні 0,5–0,1 % ріжків, а якщо розчин стає фіолетовим – вміст ріжків перевищує 0,2%.

Визначення вмісту сажки в зерні центрифугуванням. Для цього 50 г зерна очищують від землі та інших домішок. До зерна доливають 50 мл води і добре збовтують, потім одержану суспензію розливають в парне число пробірок і центрифугують. Спори осідають на дно пробірок, з яких зливають воду, а до осаду доливають невелику кількість дистильованої води і ще раз збовтують. Вміст всіх пробірок зливають в одну, зважену на аналітичних вагах пробірку, яку теж центрифугують. Після центрифугування з неї зливають воду та ставлять на висушування в сушильну шафу при 105°C упродовж трьох-чотирьох годин до одержання сталої маси. Вміст сажки у зерні визначають за різницею маси пробірки з спорами після висушування і маси чистої пробірки.

Визначення вмісту сажки в зерні мікроскопіюванням. При незначному забрудненні зерна сажкою застосовують метод прямого підрахунку спор під мікроскопом. Для цього наважку зерна промивають водою, температура якої складає близько 30°C. На 5 г зерна беруть 10 мл води. Під час промивання зерно добре збовтують з водою упродовж 15 хвилин. Далі воду зливають у центрифужну пробірку і центрифугують. Після центрифугування воду зливають, а до осаду спор додають 0,5 мл чистої води, в якій спори суспензують. Кількість спор підраховують за допомогою рахункової камери за збільшення мікроскопу в 200–300 разів. Кількість спор в 0,1 мл отриманої суспензії буде відповідати їх вмісту в 1 г зерна. Масу спор можна вирахувати математичним шляхом, зважаючи, що маса однієї спори сажки, висушеної при 100°C рівняється $22 \cdot 10^{-7}$ мг (1/450000 мг).

Визначення вмісту сажки у борошні. Наважку борошна 5–10 мг піддають мікроскопіюванню. Для цього борошно попередньо обробляють при нагріванні сумішшю з десяти частин хлоралгідрату, п'яти частин гліцерину і трьох частин 85%-вої соляної кислоти. Наважку переносять на предметне скло.

Сажкові спори рахують у 30–50 полях зору мікроскопу, після чого виконують перерахунок їх на взятую наважку і за формулою вираховують вміст сажки у відсотках:

$$x = \frac{M \cdot 1}{4500 \cdot H} \quad \%,$$

де: М – отримане число спор;

Н – маса наважки борошна в міліграмах.

Якщо спор у виготовленому препараті занадто багато, то наважку для аналізу розмішують у десятиразовому співвідношенні з рисовим крохмалем. При остаточному підрахунку одержаний результат потрібно збільшити у десять разів.

Відсотковий вміст сажкових спор у борошні можна визначити за узагальненими даними, одержаними для наважок масою 5 і 10 мг (табл. 12).

3. Відсотковий вміст спор сажки за різного обсіменіння ними борошна

Кількість спор у наважках, шт.		%
10 мг	5 мг	
2250	1125	0,05
1800	900	0,04
1350	675	0,03
900	450	0,02
450	225	0,01
225	112	0,005
112	56	0,0025
22	11	0,0005
4,4	2,2	0,0001
2,2	1,1	0,00005

Визначення ураження зерна фузаріозом. Видимою ознакою фузаріозу є кармінно-рожеве забарвлення оболонки і ендосперму зерна, яке можна виявити надломивши зернину. Таке зерно має меншу масу, ніж здорове, та вирізняється матово-сірою оболонкою. Фузаріозне зерно також може мати на поверхні рожево-помаранчеві чи жовтувато-помаранчеві горбинки, представлені конідіальним спороношенням гриба. Найчастіше вони розташовуються біля зародка зерна, але інколи (у вигляді тонкої полоси) виявлятися і в борозенці зародка.

Для розпізнавання конідій гриба *Fusarium*, горбинки зерна змочують водою і через 5–7 хвилин, коли вони розм'якнуть, за допомогою препарувальної голки переносять на предметне скельце в краплю води. За збільшення мікроскопу в 60–70 разів добре видно конідії гриба.

Зараженість зерна грибами роду *Fusarium* можна визначити і методом пророщування: насіння вміщують у чашки Петрі на зволожений стерильною водою фільтрувальний папір, що складений в три шари, на відстані 1,0–1,5 см одне від одного. Замість фільтрувального паперу можна використовувати стерильний кварцовий чи річковий пісок, які також треба звожити. Чашки Петрі залишають за температури 20°C у темряві і спостерігають щоденно (до 7 днів). Під час пророщування на зараженому насінні з'являється характерний для фузаріозу міцелій, який обволікає зерно, та має вигляд пухкої, спочатку павутинної шапочки сніжно-білого, ніжно-рожевого або яскраво-малинового кольору.

За зберігання зерна упродовж 2–4 років міцелій гриба втрачає здатність проростати, також паралельно знижується його токсичність.

Допустимий для харчового зерна максимум фузаріозного ураження не повинен перевищувати 3–5%.

Наявність гриба у борошні можна визначити і методом висіву на живильні середовища, але добрі результати одержують лише за використання свіжих зразків.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть основні джерела мікробіологічного обсіменіння сільськогосподарських культур?
2. Дайте характеристику фітопатогенної мікробіоти рослин та її впливу на якісні показники зерна та продуктів його переробки.
3. Охарактеризуйте найбільш розповсюджені хвороби рослин та зерна, їх шкодочинність для сільського господарства, промисловості, людини і тварин?
4. Назвіть методи визначення сажки в зерні та борошні.
5. Опишіть методику визначення забрудненості зерна та борошна продуктами життєдіяльності грибів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Притуляк Р. М. Мікробіологія сировини та продуктів її переробки. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами другого рівня вищої освіти (магістр) спеціальностей 091 «Біологія», 203 «Садівництво та виноградарство» 181 «Харчові технології». Умань, 2022. 18 с.
2. Заболотний О. І. Сільськогосподарська мікробіологія і вірусологія. Методичні рекомендації до виконання практичних занять студентами першого рівня вищої освіти (бакалавр) спеціальності 201 – «Агрономія». – Умань, 2020. – 84 с.
3. Карпенко В. П., Грицаєнко З. М., Притуляк Р. М. та ін. Мікробіологія галузі: зерно і продукти його переробки: навч. посіб. за ред. В. П. Карпенка. Умань : Видавничо-поліграфічний центр «Візаві», 2014. 132 с.
4. Карпенко В. П., Притуляк Р. М. Лабораторний практикум з мікробіології консервного виробництва. Навчально-методичний посібник до виконання лабораторно-практичних занять. Умань: Редакційно-видавничий відділ Уманського НУС, 2010. 55 с.
5. Грицаєнко З. М., Карпенко В. П., Притуляк Р. М. Мікробіологія консервної галузі. Умань: Редакційно-видавничий відділ Уманського НУС, 2010. – 96 с.
6. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології. К. : Либідь, 2001. – 143 с.
7. Груздь С. П. Практикум з мікробіології. Львів: Львів нац. ун-т. І. Франка, 2003. 78 с.
8. Рильський О.Ф., Костюченко Н.І. Методичні вказівки до лабораторних робіт з мікробіології для студентів денної форми навчання. – Запоріжжя: ЗНУ, 2007. – 47 с.