МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІГІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ННІ Менеджменту, харчових технологій і торгівлі

МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів усіх форм навчання за освітньо-професійною програмою 076 «Підприємництво, торгівля та біржова діяльність»

ЗАТВЕРДЖЕНО
на засіданні кафедри підприємництва і торгівлі
протокол № 2 від 27.09.2019р.

Чернігів ЧНТУ 2019

Мікробіологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів усіх форм навчання за освітньо-професійною програмою 076 «Підприємництво, торгівля та біржова діяльність» / Укладачі: Т.М. Денисенко – Чернігів: ЧНТУ, 2019. – 62 с.

Укладачі: Денисенко Тетяна Миколаївна, кандидат технічних наук, доцент

Відповідальний за видання: Іванова Н.В., завідувач кафедри, доктор економічних наук, професор

Рецензент: Хребтань Олена Борисівна, завідувач кафедри харчових технологій, кандидат технічних наук, доцент

ЗМІСТ

Вступ 4

Лабораторна робота № 1

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії..... 5

Лабораторна робота № 2

Стерилізація живильних середовищ, посуду, інструментів і приладів 13

Лабораторна робота № 3

Принципи складання живильних середовищ для культивування мікроорганізмів і техніка мікробіологічного посіву 23

Лабораторна робота № 4

Будова і принцип роботи оптичного мікроскопа. Правила мікроскопування..... 34

Лабораторна робота № 5

Методи культивування мікроорганізмів. Вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів 40

Лабораторна робота № 6

Морфологія плісеневих грибів..... 49

Лабораторна робота № 7

Методи кількісного визначення мікрофлори 53

Лабораторна робота № 8

Метод культивування мікроорганізмів (чашковий). Санітарно-бактеріологічний контроль об’єктів зовнішнього середовища..... 56

Рекомендована література ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

ВСТУП

Лабораторні роботи з курсу „Мікробіологія” є складовою частиною навчального комплексу дисципліни.

Метою лабораторних робіт є закріплення теоретичних знань, набутих студентами на лекціях і у процесі самостійної підготовки, а також набуття практичних навичок щодо роботи з мікроскопом, технікою мікроскопування, підготовкою препаратів, засвоєння методик кількісного і якісного обліку мікроорганізмів в об’єктах зовнішнього середовища.

Тематика лабораторних робіт дозволяє проводити заняття відповідно до профілю вибіркового блоку циклу загальної підготовки та кількості навчальних годин, передбачених освітньо-професійною програмою 076 «Підприємництво, торгівля та біржова діяльність».

Опис кожної лабораторної роботи вміщує тему, мету, теоретичне пояснення з теми (інколи у вигляді схем, що дозволяють студентам краще опанувати матеріал), методичні вказівки до виконання, конкретні завдання для студентів.

Підготовленість студентів до кожного заняття із загальнотеоретичних питань контролюється викладачем шляхом усного або письмового опитування.

Кожна лабораторна робота розрахована на 4 години.

Звіт з кожної лабораторної роботи має бути оформлений на аркушах формату А4 (або в загальному зошиті) і містити наступні відомості:

- Назву та мету лабораторної роботи
- Найменування запропонованих завдань
- Методики рекомендованих досліджень
- Таблиці
- Необхідні формули та розрахунки
- Рисунки
- Висновки

На лабораторних роботах доцільно використовувати наочні приладдя (таблиці, плакати, слайди тощо), демонструвати мікробіологічне обладнання.

Деякі лабораторні завдання можуть бути покладені в основу наукових досліджень студентів при виконанні курсових та дипломних робіт.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Тема: правила роботи в мікробіологічній лабораторії

Мета роботи: вивчення загальних правил роботи в мікробіологічній лабораторії та ознайомлення з матеріалами і устаткуванням мікробіологічної лабораторії

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікробіологічна лабораторія. Приміщення лабораторії

Залежно від призначення мікробіологічна лабораторія (учбова, виробнича, науково-дослідна) складається з декількох приміщень: кімнати для проведення мікроскопічних робіт, біохімічної лабораторії, кімнат стерилізації, мийної і термостатної. Всі приміщення повинні бути сухими, світлими, добре вентильованими, мати підведення газу, гарячої і холодної води і пристрій для її відведення.

Приміщення для основної мікробіологічної роботи повинне бути повернуто вікнами на північ або північний захід, оскільки для мікроскопування потрібне рівне розсіяне світло. Пряме сонячне проміння стомлює зір, заважає мікроскопуванню, завдає шкоди оптичним приладам і мікроорганізмам. Природна освітленість робочого приміщення повинна відповідати світловому коефіцієнту 1:5. Стіни кімнати зафарбовують масляною фарбою світлих тонів. Підлогу покривають лінолеумом або плитами, що легко миються, із шлакосіталу. Столи для мікроскопування розташовують так, щоб світло падало, спереду або збоку, краще з лівого боку. Висота столів повинна бути не більше 0,7 м. Поверхню столів покривають пластиком або лінолеумом, що полегшує їх миття і дезинфекцію. Столи забезпечують зручними для роботи гвинтовими табуретами.

В приміщенні мікробіологічної лабораторії двічі в день проводять вологе прибирання. Підлогу, стіни і меблі періодично обробляють пилососом і протирають дезинфікуючими розчинами: 2–3 % розчином соди (двовуглекислого натрію), 3–5 % розчином фенолу або лізолу (препарат фенолу з додаванням зеленого мила), 0,5–3 % розчином хлораміну, 0,3–0,4 % розчинами четвертинних аммонійних сполук. Два-три рази на місяць, особливо після роботи з міцеліальними грибами, для знищення мікроорганізмів в повітрі і на різних поверхнях приміщення лабораторії піддають спеціальній обробці – опромінюванню переносними бактерицидними лампами (БУФ-15 або БУФ-30) тривалістю від 30 хвилин до декількох годин.

Деякі роботи з мікроорганізмами, що вимагають абсолютної стерильності (пересівання чистих культур, виділення і ін.), проводять в спеціальному ізольованому приміщенні – боксі площею 3–5 м^2. Бокс розділяють на дві частини: робоче приміщення і предбоксник, що виключає різку циркуляцію повітря і занесення мікроорганізмів ззовні. В боксі встановлюють стіл, стільці, газові пальники, підвішують або укріплюють на

кронштейні, що висувається, бактерицидні лампи. Приміщення боксу періодично миють і дезинфікують, а після прибирання і перед роботою протягом 30–60 хвилин опромінюють бактерицидними лампами, що розміщені на висоті 2 м від підлоги.

Біохімічна лабораторія обладнана хімічними столами, витяжними шафами, необхідними приладами (фотоелектроколориметрами, спектрофотометром, pH-метрами, технічними і аналітичними терезами, холодильниками, вакуумом-насос і т. д.), шафами з посудом і хімічними реактивами.

В препараторскій встановлюють робочі столи, шафи з інструментами, стерильним посудом і реактивами, центрифуги і інші вібруючі апарати, холодильники для зберігання препаратів і чистих культур, термостати. В кімнаті стерилізації розміщають автоклави для стерилізації живильних середовищ і посуду, окремий автоклав для термічної обробки використаного лабораторного посуду (колби, пробірки, піпетки, що містять живі мікроорганізми), кип'ятильники Коха, сушильні шафи, стерилізатори інструментів.

Мийну обладнують зручними раковинами (або ваннами) з підведенням гарячої і холодної води, стелажами для сушіння посуду, газовими або електричними плитами і посудом для варіння живильних середовищ, терезами, дистиляторами води.

В термостатній кімнаті, температура в якій повинна бути в межах 30-45°С, розміщують стелажі для засіваючих колб і пробірок, на спеціальних фундаментах встановлюють ротаційні гойдалки. Розроблені конструкції гойдалок, підвішених до металевих рам.

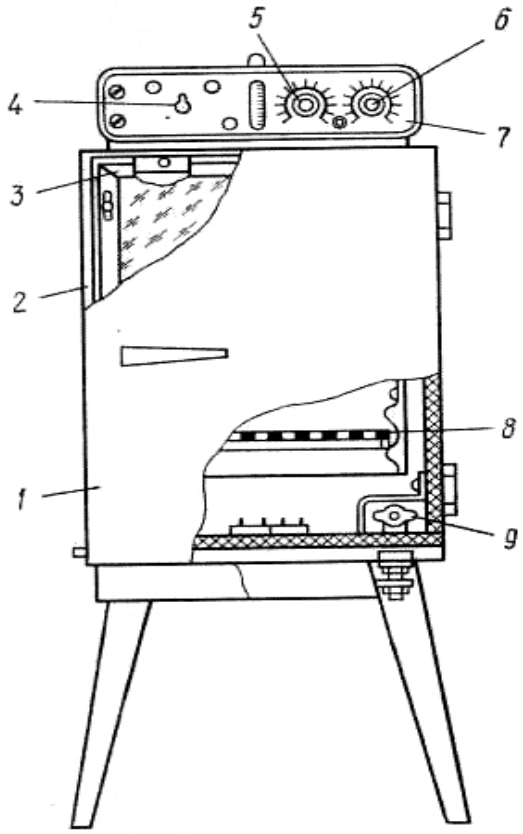
В учбовій лабораторії за кожним студентом закріплюють постійне робоче місце і прилади. На лабораторному столі встановлюють освітлювач для мікроскопа, спиртовий або газовий пальник, набір барвників, бактеріологічні петлі і голки, штатив для пробірок, градуйовані і пастерівські піпетки, скляні шпателі, предметні скельця – звичайні і з поглибленням, покривні скельця, скляний місток і ванну для зафарбовування препаратів, промивалку з водою, дезинфікуючу рідину, банку з ватою, фланелеву (марлеву) серветку, олівець по склу, іммерсійну олію, пісочний годинник, фільтрувальний папір, нарізаний за розміром предметного скла, сірники. Мікроскоп розміщують на столі, покривають скляним ковпаком або поліетиленовим чохлом або зберігають в підвісному ящику під кришкою столу. Робоче місце повинно бути в найстрогішій чистоті. Поверхню столу протирають ватяними тампонами, змоченими лізолом, хлораміном, 70 % (за об'ємом) етанолом або ізопропанолом. Спирти можуть бути використані і для дезинфекції рук.

Апарати, прилади, посуд, матеріали, інвентар

Апарати і прилади. Термостати повітряні (рисунок 1.1), водяні призначені для вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах при постійній заданій температурі. В лабораторії встановлюють декілька термостатів з різною температурою, сприятливою для розвитку окремих груп мікроорганізмів: мезофілів – 28-30°С, термофілів – 43-55°С, патогенних видів – 37°С.

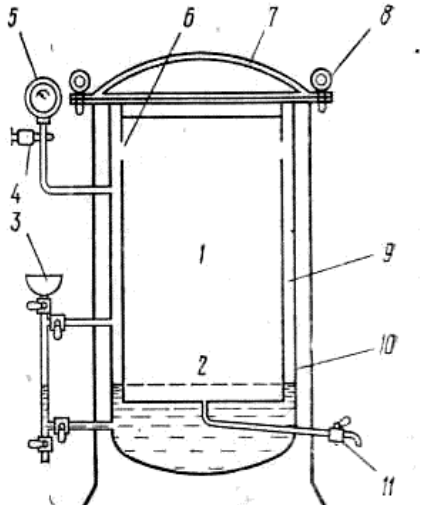
Термостати бувають різної форми, розмірів і конструкцій: від невеликої шафки до політермостату з декількома відділеннями або окремої термостатної кімнати.

Автоклави слугують для стерилізації посуду, живильних середовищ і інших матеріалів насиченою парою під тиском вище атмосферного. Автоклави бувають різних конструкцій (вертикальні, горизонтальні), але принципова схема їх будови однакова (рисунок 1.2).



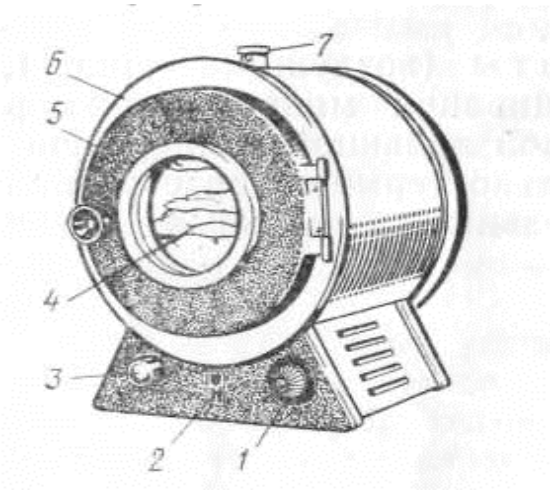
1 – двері зовнішні; 2 – корпус; 3 – двері внутрішні; 4 – тумблер для включення термостата в мережу; 5 – потенціометр для точної установки температури; 6 – потенціометр для грубої установки температури; 7 – блок управління; 8 – полиці; 9 – елемент нагрівальний

Рисунок 1.1 – Повітряний електричний термостат



1 – камера стерилізації; 2 – підставка для розміщення матеріалів, що стерелізуються; 3 – лійка для заповнення автоклава водою;4 – клапан запобіжний; 5 – манометр; 6 – отвір для надходження пари в камеру стерилізації; 7 – кришка; 8 – затиски гвинтові;
9 – камера водопарова; 10 – казан; 11 – кран для спуску води
Рисунок 1.2 – Схема будови автоклава

Сушильна шафа (рисунок 1.3) з терморегулятором призначена для сушки і стерилізації лабораторного посуду, для висушування різних матеріалів до постійної маси. Сушильну шафу виготовляють з термостійких матеріалів (металу і азбесту) і розраховують на діапазон температур в робочій камері від 40 до 200^{0}С. Тривалість розігрівання до граничної температури близько 1,5 год. Всередині шафа обладнана полицями з дірчастих листів металу, на яких розміщують посуд або висушуваний матеріал.



1 – рукоятка терморегулятора з шкалою; 2 – вимикач приладу; 3 – лампа сигнальна; 4 – підставка; 5 – дверцята; 5 – корпус; 7 – отвір для термометра і вентиляційний ковпачок
Рисунок 1.3 – Сушильна шафа:

Холодильник використовують для зберігання при температурі близько +4°С музейних і робочих культур мікроорганізмів, живильних середовищ, деяких реактивів і розчинів.

Центрифуга призначена для розділення рідких і твердих фаз суспензій. Центрифуга забезпечена двома роторами, які поперемінно, насаджуються на вал електродвигуна: ротором-хрестовиною з чотирма стаканами і ротором кутового типу з гніздами для скляних або поліетиленових пробірок. Швидкість обертання роторів від 3000 до 6000 об/хв.

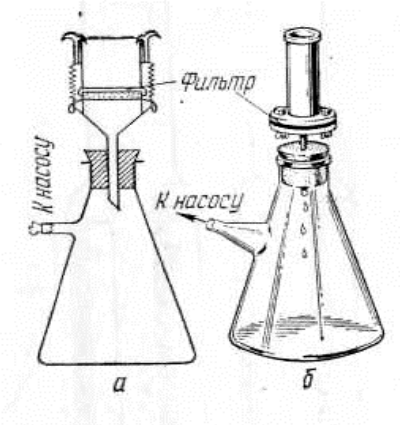
Лабораторний pH-метр призначений для вимірювання активності іонів водню (pH) і окислювально-відновного потенціалу (Eh).

Рефрактометр використовують для визначення вмісту сухих речовин, цукрів, спиртів, амінокислот, вітамінів, екстрактних речовин. Шкала показує показник заломлення розчину і вміст сухих речовин в %.

Фотоелектроколориметр застосовують для вимірювання оптичної густини і коефіцієнтів пропускання забарвлених і колоїдних розчинів. Прилад забезпечують набором світлофільтрів в області спектру 315–630 нм. Колориметр-нефелометр дозволяє оцінювати за мірою каламутності розчинів концентрацію клітин мікроорганізмів.

Спектрофотометр використовують для вимірювання оптичної густини і коефіцієнтів пропускання рідких і твердих речовин. Можна вивчати спектри поглинання у видимій (400–760 нм) області спектру.

Фільтри Зейтца є дисками завтовшки 3–5 мм і діаметром 33–140 мм, виготовлені з суміші азбесту і целюлози. Із збільшенням вмісту целюлози пористість фільтру зростає. Випускаються фільтри марки Ф2 і СФ (стерилізуючі). Фільтри вставляються у лійку (рисунок 1.4), як правило, з нікельованого металу. Лійка складається з двох частин: верхньої циліндрової і нижньої конусоподібної, між якими на металевій сітці укладають азбестовий фільтр. Потім лійку загвинчують або туго затискають спеціальними гвинтами, а вузький тубус вставляють в гумову пробку колби

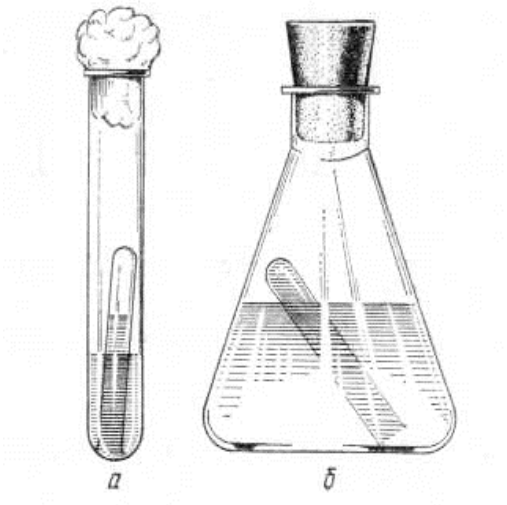


Бунзена.

а – зі скляним утримувачем; *б* – з металевим утримувачем

Рисунок 1.4 – Фільтри Зейтца

Посуд. Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд. Чашки Петрі (діаметр 10 см, висота 1,5 см) застосовують для виділення чистих культур, кількісного обліку мікроорганізмів, аналізу мікрофлори на щільних живильних середовищах і інших досліджень; колби Виноградського, плоскі бутлі-матраци, качалочні колби для вирощування мікроорганізмів аеробів, пробірки і колби з поплавцями (рисунок 1.5) – для вивчення процесів бродіння.

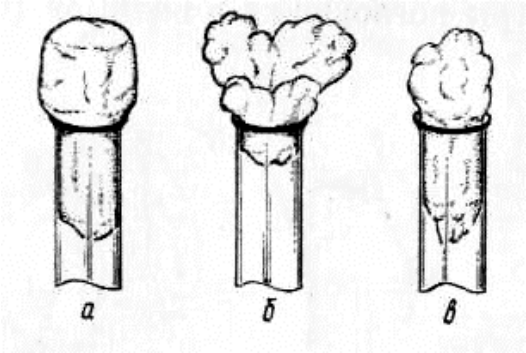


а – пробірка; б – колба з поплавцями

Рисунок 1.5 – Скляний посуд для вивчення процесів бродіння

Окрім спеціального мікробіологічного посуду широко використовують звичайний хімічний посуд: колби плоскодонні конічні Ерленмейера, круглодонні, мірні (на 25, 50, 100, 200 мл); піпетки градуйовані (на 1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора (на 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 мл), пастерівські піпетки з відтягнутим капіляром, пробірки біологічні (без ранта) 18×2,0; 18×1,5; 15×1,5 см; бюретки, крапельниці, лійки, мензурки, циліндри, бюкси, склянки.

Приготування ватяних пробок. Колби і пробірки, що використовуються для приготування і стерилізації живильних середовищ і вирощування культур мікроорганізмів, закривають ватяними пробками (рисунок 1.6). Пробки виготовляють вручну або за допомогою спеціальної машини.



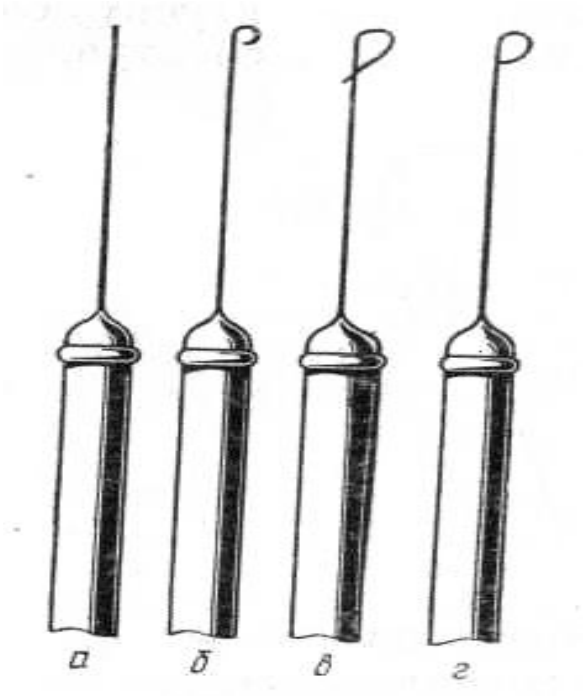
а – правильно; б і в – неправильно

Рисунок 1.6 – Приготування ватяних пробок:

Правильно виготовлена пробка повинна мати довжину 3–4 см, помірно туго входити в пробірку, бути щільною і не міняти своєї форми при багатократному застосуванні. Ватяна пробка краще зберігається, якщо її обгорнути шматочком марлі, кінці якої у верхній частині щільно зав'язати ниткою.

Інвентар. В мікробіологічній практиці застосовують петлі, голки, пінцети, ножиці, свердла для пробок, металеві циліндри для піпеток, дротяні або металеві з отворами корзини для стерилізації пробірок, пластмасові або металеві штативи для пробірок і ін.

Петлі і голки виготовляють з платинового, нікелевого або хромонікелевого дроту завдовжки 8 см, діаметром 0,4–0,5 мм і упаюють в скляні або металеві утримувачі. Вільний кінець дроту акуратно загинають у вигляді петлі з щільно притиснутим кінцем (рисунок 1.7), інакше рідина в кільці не утримуватиметься.



а – голка для посівів; б , в – петлі виконані неправильно;
г – петля виконана правильно
Рисунок 1.7 – Петлі і голки

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії

В мікробіологічній лабораторії суворо дотримуються правил і підтримують певний режим. Працюють в білих халатах, шапочках або косинках. На робочому місці не повинно бути зайвих предметів. Все обладнання розташовують на певних місцях. Пробірки і колби з культурами мікроорганізмів повинні мати чіткі написи чорнилом по склу, ємності з реактивами і розчинами – етикетки. При роботі із спиртівками остерігаються запалювання пари спирту. Не можна запалювати спиртівку від іншої спиртівки, що горить. Гасять полум'я спиртівки тільки спеціальними

ковпачками. При запалюванні ватяних пробок на них не дмухають, оскільки це підсилює горіння. Для попередження доступу повітря пробки, що горять, вводять в пробірки, колби або накривають зверху рушником.

До і після роботи ретельно миють дезинфікують поверхню столу, на якому проводиться дослідження мікроорганізмів. Мікробна маса не повинна забруднювати руки стіл і навколишні предмети. Петлі, голки, пінцети після кожного зіткнення з мікроорганізмами пропалюють в полум'ї спиртівки або газового пальника і ставлять в спеціальний штатив. Мікробну суспензію, що пролилася, знешкоджують, використовуючи дезинфікуючі засоби.

Після закінчення роботи забруднений мікроорганізмами посуд негайно стерилізують кип'ятінням або автоклавуванням, щоб знищити живі клітини і лише після цього можна мити. Поверхню твердих середовищ з мікробами заливають дезинфікуючим розчином. Через добу середовища можна викидати і мити посуд. Використані піпетки кладують в 3% розчин хлораміну, після чого миють і стерилізують. Предметні і покривні скельця, після роботи кладуть в дезинфікуючий розчин, потім ретельно миють в проточній воді. Посуд миють тільки в гумових рукавичках. Неакуратне поводження з мікроорганізмами може привести до утворення в повітрі мікробного аерозолю. При роботі з бактерицидними лампами користуються темними або простими захисними окулярами. Не можна дивитися на світло лампи незахищеними очима, оскільки це може привести до втрати зору.

Суворого дотримання правил безпеки вимагає поводження з апаратами, що працюють під тиском, напругою або при високій температурі.

В лабораторії не дозволяється палити, пити, багато ходити, вносити в неї сторонні предмети. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторного приміщення.

Слід суворо дотримуватися особистої гігієни – ретельно дезінфікувати і мити руки з милом після закінчення роботи і перед їжею.

В спеціальному журналі студенти і співробітники роблять запис про проведення інструктажу і ознайомлення з режимом роботи в лабораторії.

ПРАВИЛА ДЛЯ СТУДЕНТІВ ПРИ РОБОТІ В МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Кожний студент має в лабораторії постійне місце роботи та закріплений за ним мікроскоп і працює індивідуально.
2. На лабораторному столі не повинно бути зайвих предметів (у тому числі портфелів, сумок, головних уборів тощо).
3. Студенти повинні працювати в чистих халатах, волосся у студенток має бути підібраним і не спадати на плечі.
4. У лабораторії заборонено вживання їжі, куріння, зайве ходіння.
5. Під час роботи з культурами мікроорганізмів необхідно виконувати всі правила мікробіологічної техніки. Запалювати спиртівки виключно сірниками. На пробірках, чашках Петрі треба відмічати прізвище студента, номер групи, дату, розведення тощо.
6. Усі предмети, які використовувалися під час роботи з живими культурами мають бути знезаражені над полум'ям спиртівки (петлі, голки)

або занурені в дезінфікуючий розчин (предметні скельця, піпетки, шпателі тощо).

7. Наприкінці заняття студент повинен привести до порядку робоче місце, вимити руки.

Кожний студент веде журнал лабораторних робіт, який є документом, що дозволяє контролювати правильність отриманих даних.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання **1** ***Вивчити приміщення і устаткування мікробіологічної лабораторії***

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть основні приміщення мікробіологічної лабораторії і розташоване в ньому устаткування. Результати оформити у вигляді таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Характеристика приміщень і устаткування в ньому

№ п/п	Назва приміщення	Види устаткування

Завдання 2 *Вивчити правила роботи в мікробіологічній лабораторії*

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Результати оформити в довільній формі

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Тема: стерилізація живильних середовищ, посуду, інструментів і приладів

Мета роботи: ознайомитися з основними методами стерилізації живильних середовищ, посуду, інструментів і приладів

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Способи стерилізації живильних середовищ, посуду, інструментів, приладів

Стерилізація є одним з найважливіших і необхідних прийомів у мікробіологічній практиці. Слово “стерилізація” у перекладі з латинського означає знепліднення. У мікробіології під стерилізацією розуміють знищення живих мікроорганізмів. Мікробіологи стерилізують середовища, посуд, інструменти й інші необхідні предмети з метою не допустити розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах.

Існують наступні способи стерилізації.

Термічна стерилізація: прожарювання в полум'ї, стерилізація гарячим повітрям, стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування), дробова стерилізація (тиндалізація).

Холодна стерилізація: фільтруванням, ультрафіолетовими променями.

Хімічна стерилізація: з використанням різних дезінфікуючих засобів.

Біологічна стерилізація: використання антибіотиків.

Можливість і доцільність застосування того або іншого способу визначаються особливостями матеріалу, що підлягає стерилізації, його фізичними властивостями й хімічним складом, метою дослідження.

Стерилізація живильних середовищ

Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування)

Це найбільш надійний і найчастіше застосовуваний спосіб стерилізації живильних середовищ. Він заснований на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску вище атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні його тиску (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1 – Температура насиченої пари при різних тисках

Тиск, атм		Температура, °С
нормальне	додаткове	
1,0	–	100
1,0	0,5	112
1,0	1,0	121
1,0	1,5	128
1,0	2,0	134

Спільна дія високої температури й пари забезпечує особливу ефективність даного способу. При цьому гинуть і вегетативні клітини, і спори мікроорганізмів. Стерилізацію в автоклаві проводять при різних режимах. Коли говорять про режим стерилізації в одиницях тиску, мають на увазі саме додатковий тиск: стерилізація при 0,5; 1,0; 2,0 атм. У закордонній літературі режим автоклавування часто характеризується температурою й часом.

Будова автоклава. Умови підвищеного тиску пари створюють у спеціальних товстостінних апаратах, що герметично закриваються, – автоклавах. Автоклави бувають різної конструкції, але принципова схема будови – однакова. Це металевий двостінний котел, здатний витримувати високий тиск. Внутрішня частина котла є стерилізаційною камерою. У неї кладуть матеріал для стерилізації. Стерилізаційна камера обладнана краном для виходу повітря, манометром для визначення тиску пари й запобіжним клапаном для виходу пари при підвищенні тиску понад необхідний і для запобігання розриву автоклава. Простір між стінками, називається „сорочкою" або водопаровою камерою, заповнюється через лійку водою (краще дистильованою, щоб не утворювався накип) до певного рівня, що відзначений на спеціальній водомірній трубці автоклава. Вище цього рівня воду наливати не слід, тому що при бурхливому кипінні вода може

потрапити в трубку, що веде до манометра, і спотворити його показання. У верхній частині внутрішньої стінки „сорочки" є отвори, через які пара надходить у стерилізаційну камеру. Паровий котел зверху покритий кожухом, виготовленим з листового заліза. Кожух охороняє котел від механічних ушкоджень, а працюючих біля автоклава – від опіків. Для створення герметичності автоклав щільно закривається масивною кришкою з гумовою прокладкою.

Оскільки автоклав є апаратом, що працює при високих тисках і температурах, неправильне поводження з ним може бути причиною нещасних випадків. Установка автоклава й робота з ним здійснюється при строгому й точному виконанні правил, зазначених у прикладеній до апарата інструкції. До роботи допускаються тільки підготовлені особи. Періодичний контроль за роботою автоклава здійснює котлонадзор.

Підготовка середовищ до стерилізації. Середовища, призначені для стерилізації в автоклаві, наливають не вище половини висоти посудини. Посудини із середовищами закривають ватяними пробками, які охороняють середовище від зараження мікрофлорою, що перебуває в навколишнім повітрі. Пробки повинні бути досить щільними, з рівномірним розподілом волокон вати, тому що через них відбувається газообмін культури з навколишнім середовищем. Однак, треба пам'ятати, що занадто щільні пробки затруднюють постачання культур повітрям.

Для готування пробки плоский шматок вати, узятий уздовж волокна, скручують валиком. Щоб додати пробці міцність, її прокочують між долонями або між долонею й чистим склом, що лежить на столі. Довжина пробки для зазвичайї пробірки повинна бути близько 4 см. Пробка повинна входити в пробірку на 1,5 – 2,0 см. Для збереження форми пробку виймають із горлечка, злегка обертаючи. Зручно обгортати пробку чистою марлевою серветкою. Не можна обгортати пробки посудин, які будуть стерилізуватися в автоклаві, целофаном або іншими матеріалами, що не пропускають пари, тому що пара повинна обов'язково проникати через пробку в посудину, інакше середовища не нагріються до потрібної температури й не простерилізуються.

Автоклавування. Стерилізація в автоклаві здійснюється в такий спосіб. У водопаровую камеру наливають воду. У стерилізаційну камеру на спеціальну решітку поміщають матеріал для стерилізації. Предмети варто розміщати не занадто щільно, тому що пара повинна вільно проходити між ними, інакше вони не нагріються до потрібної температури й можуть залишитися нестерильними. Завантаживши стерилізаційну камеру, установлюють і загвинчують кришку автоклава. Потім відкривають кран, що з'єднує камеру із зовнішнім повітрям, і починають нагрівати автоклав. Нагрівання автоклава здійснюється електрикою або газом. На кран надягають гумову трубку, яку опускають у відро з водою. Відзначають час, коли з автоклава через кран почне виходити пара. Пара витісняє повітря, що перебуває в автоклаві. Необхідно, щоб з автоклава було вилучене все повітря, тому що згубна дія насиченої перегрітої пари на бактерії значно сильніше,

ніж її суміші з повітрям. Це пов'язане з тим, що при тому самому тиску температура чистої пари вище температури суміші пари й повітря. У перші хвилини разом з парою у воду виходять більші кульки повітря з м'яким звуком, що булькає. Потім струмінь пари сильнішає, але поки в автоклаві ще є повітря, суміш повітря й пари, проходячи через воду, видає сильний тріск. Чиста пара виходить із рівномірним шиплячим звуком. Зазвичай, пару випускають протягом 15–20 хв., але не більше, інакше в автоклаві залишиться мало води, і він може зіпсуватися. Потім кран закривають і за манометром стежать за підвищенням тиску пари. На манометрі позначається той додатковий тиск, що створюється в автоклаві понад нормальний, тобто понад одну атмосферу. Коли стрілка манометра дійде до покажчика необхідного розподілу, і, отже, температура пари досягне відповідного значення, регулюючи нагрівання, підтримують тиск на цьому рівні необхідний час. Є автоклави й з автоматичним регулюванням режиму. Коли мине час стерилізації, нагрівання автоклава припиняють. Тиск в автоклаві падає. Необхідно дочекатися, щоб стрілка манометра впала до 0, тобто тиск пари в автоклаві зрівнявся з атмосферним. Лише після цього відкривають кран, що виводить пар. Передчасне відкривання крана неприпустимо, тому що перегріті середовища при різкому зниженні тиску відразу ж бурхливо закипають, змочують і навіть іноді виштовхують ватяні пробки. Це порушить згодом стерильність матеріалу. Коли пара вийде, відкривають кришку автоклава й виймають стерильний матеріал. Після стерилізації середовища для перевірки стерильності витримують 2–3 доби в термостаті при 30°С. Якщо в середовищах виявляється ріст мікроорганізмів, їх готують заново.

Температура й тривалість автоклавування визначаються складом живильного середовища. Такі, що легко руйнуються субстрати – як молоко чи желатинові середовища, а також субстрати, що містять цукри, вітаміни (сусло пивне, соки, дріжджовий автолізат й ін.) завичай стерилізують при 0,5 атм. протягом 20–30 хв. М'ясо-пептонні середовища стерилізують при 1,0 атм. 20–30 хв. Однак є субстрати, у яких можуть бути спори, що відрізняються особливою термостабільністю. При зазначених режимах автоклавування такі субстрати можуть залишитися нестерильними. Особливо важко простерилізувати ґрунт. Його зазвичай стерилізують один раз при 1 атм. 2 години, або 2 дні підряд, по годині при тому ж тиску, а іноді – при 2 атм. 2 години.

Вибираючи режим стерилізації, необхідно враховувати значення pH середовища. При ***кислій*** реакції середовища багато речовин, що входять у його склад, можуть піддатися гідролізу. Чим нижче значення pH середовища, чим вище температура й триваліше час стерилізації, тим сильніше відбувається гідроліз. У результаті після стерилізації перестають застигати середовища з желатином й навіть із агаром. Якщо середовище ***лужне***, то при стерилізації випадають в осад солі заліза, карамелізуються й стають непридатними для використання бактеріями цукри. Щоб уникнути цих явищ, розчини деяких речовин стерилізують окремо при значенні pH, що забезпечує їх цілісність, і додають їх у середовища після стерилізації. Це

окремий випадок, так названої роздільної стерилізації. Таким прийомом користуються досить часто, тому що багато компонентів середовища не можна стерилізувати при однаковому режимі тиску, температури, pH і т.д. Розчини компонентів середовища, простерилізовані різними способами, перед посівом стерильно поєднують у потрібну співвідношенні.

Дробова стерилізація (тиндалізація)

Дробова стерилізація застосовується для стерилізації середовищ, що псуються під дією температур, вище 100°С. Цей прийом був уведений англійським ученим Тиндалем. Принцип тиндалізації полягає в тому, що проводять нагрівання середовища або його компонентів при нормальному тиску кілька разів й у період між прогріваннями дають прорости життєздатним спорам. Передбачається, що виникаючі зі спор клітини гинуть при наступному прогріванні, не встигнувши утворити нові спори. Прогрівання можна здійснювати в парах киплячої води або, як говорять, текучою парою. Обробку ***текучою парою*** проводять 3 рази по 30–40 хв в автоклаві з незагвинченою кришкою або в кип'ятильнику Коха. Час прогрівання відзначається з моменту енергійного виділення пари.

Кип'ятильник Коха являє собою металевий циліндр, покритий теплоізолюючим шаром, найчастіше – азбестом. Усередині циліндра перебуває сітчасте відро або підставка на ніжках, куди поміщають стерилизований матеріал, прикривши його клейонкою для захисту від конденсаційної води. На дно циліндра наливають воду так, щоб рівень її не доходив до дна підставки. Кип'ятильник закривають кришкою, у якій є отвір для виходу пари, і нагрівають за допомогою газового пальника або електрики.

В проміжки між прогріваннями середовища поміщають на добу в термостат, відрегульований на 30°С, для пророщення спор. Практичне значення тиндалізації в цей час досить обмежено, тому що між прогріваннями деякі спори можуть, не прорости, а частина вегетативних клітин, що з'явилися, може знову утворити спори й у такому виді протистояти дії високої температури. Крім того, цей метод вимагає великої витрати часу.

Середовища, що не витримують нагрівання при 100°С, прогрівають більш обережно при 60 – 80^0С, 4 – 5 днів підряд. Однократний прогрів матеріалу при температурах нижче 100°С відомий за назвою ***пастеризації.***

Пастеризація запропонована Пастером. Вона призначена для знищення в основному безспорових мікроорганізмів. Пастеризація в переважній більшості випадків не забезпечує стерильності субстрату. Пастеризацію проводять при 60 – 75°С від 15 до 30 хв., при 80^0С – 10 – 15 хв. Іноді нагрівають матеріал до 90°С і відразу ж охолоджують. При таких способах обробки гине більшість безспорових форм. Режим пастеризації визначається стійкістю матеріалу до термічної обробки, передбачуваною зараженістю його мікроорганізмами й метою роботи. Пастеризацію в лабораторії проводять в ультратермостаті або на водяній бані. Ультратермостат являє собою резервуар, заповнений водою, температура якої регулюється автоматично за

допомогою спеціального пристрою (нагрівальний елемент, циркуляційний насос, контактний і контрольний термометри, блок керування, мотор й ін.), закріпленого на верхній панелі приладу. Посудину із матеріалом закривають ватяною пробкою. За температурою стежать по термометрі, розміщеному в аналогічній посудині з водою. Кількість води в цій посудині повинна бути рівна кількості матеріалу взятого для пастеризації. У мікробіологічній практиці пастеризацію середовищ або посівного матеріалу часто використовують для виділення чистих культур спороутворюючих мікроорганізмів і для виявлення здатності мікроорганізмів до утворення спор. Пастеризація широко застосовується в харчовій промисловості для обробки продуктів, що втрачають смакові й живильні якості при кип'ятінні: молока, ягідних і фруктових соків, вин, пива й ін.

Стерилізація фільтруванням

Стерилізація фільтруванням застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання, зокрема, для середовищ, що містять білки, для сироваток, деяких антибіотиків, вітамінів, летких речовин, наприклад, деяких вуглеводнів. Цей прийом досить широко використовується для стерилізації культуральної рідини, коли необхідно звільнити її від клітин мікроорганізмів, але зберегти всі продукти обміну, що містяться в ній, в незміненому вигляді. Спосіб полягає у фільтруванні рідин через спеціальні *фільтри*, що мають дрібнопористі перегородки й тому затримують клітини мікроорганізмів. Причому тут має місце не тільки механічна затримка, але й адсорбція мікроорганізмів на стінках (поверхнях), що обмежує пори, внаслідок того, що більшість мікроорганізмів у водних суспензіях несе на своїй поверхні негативний заряд, а фільтри виготовляються з позитивно заряджених матеріалів. Якщо виготовити фільтр із електронегативного матеріалу, наприклад, з обпаленого гіпсу або алебастру, то багато мікроорганізмів будуть легко проходити через нього. Пори фільтрів повинні бути досить дрібними не тільки тому, щоб забезпечити механічну затримку клітин, але й для того, щоб мікроорганізми виявилися в сфері дії електричного заряду стінок. Діаметр пор визначає область застосування фільтрів. Фільтри з відносно великими порами застосовують для очищення (фільтрування) води від планктонних організмів, а також для відділення більших мікроорганізмів від дрібних. Чим дрібніші пори фільтра, тим більш придатний він для стерилізації. Придатність фільтрів для стерилізації випробовують шляхом пробної фільтрації через них суспензії якого-небудь дрібного мікроорганізму, наприклад, Seeratia marcescens; Pseudomonas pyocyaneum. Для перевірки на стерильність фільтрат у великій кількості висівають на живильне середовище. Якщо протягом п'яти днів тест-організм не виросте, фільтри можуть бути використані для стерилізації. Як правило, бактеріальні фільтри пропускають віруси й бактеріофаги.

Бактеріальні фільтри виготовляються з різних матеріалів. Вони мають різну форму й різний діаметр пор, зазначений на упакуванні фільтра або в

прикладеному паспорті. Нерідко фільтри випускаються під певними номерами й марками. Кожен номер або марка відповідають певному розміру пор. У цей час для стерилізації найбільш широко використовуються два типи фільтрів: мембранні фільтри й фільтри Зейтца.

Мембранні фільтри готовлять із колодію, ацетату, целюлози інших матеріалів. Вони являють собою диски, що нагадують паперові, товщиною близько 0,1 мм. Діаметр мембранних фільтрів може бути різний. Вітчизняна промисловість випускає мембранні фільтри діаметром 35 мм. Залежно від розмірів пор вони позначаються № 1, №2, №3, №4 й №5 (таблиця 2.2). Для стерилізації найбільш придатний фільтр № 1. Крім перерахованих, випускається ще, так званий, "попередній фільтр". Він призначений тільки для фільтрації.

Таблиця 2.2 – Характеристика мембранних фільтрів

Номер фільтра	Середній діаметр пор, мк
1	0,35
2	0,5
3	0,7
4	0,9
5	1,2

Фільтри Зейтця – це щільні диски, виготовлені із суміші азбесту із целюлозою. Зі збільшенням вмісту целюлози пористість фільтра зростає. Верхня поверхня дисків флокулірована. Вітчизняні азбестові фільтри позначаються марками **$Ф_2$** і **СФ**. Фільтри, що стерилізують – марки СФ. Пом'яті азбестові пластинки, а також пластинки з надламами й тріщинами для роботи непридатні.

Крім того, для стерилізації застосовуються фільтри, виготовлені з каоліну з домішкою кварцового піску („свічки" Шамберлана), з інфузорної землі („свічки" Беркефельда) і з інших матеріалів. Свічки Шамберлана розрізняються за розмірами пор і ступенем пористості. Фільтри з позначенням L найбільш пористі. Вони пропускають усі бактерії. Свічки L_{1bis} й L_2 затримують клітини тільки великих бактерій. Свічки L_3 затримують спори правця й паличку дифтерії. Потім у порядку зменшення розмірів пор свічки позначаються від L_5 до L_{13}. Свічки, призначені, головним чином, для фільтрації води, позначаються F й B, причому, за своєю пористостю свічки F відповідають L_5, а свічки B – L_7. Форма свіч Шамберлана може бути різної. Свічки Беркефельда мають позначення W, N й V, що відповідає діаметрам пор 3-4, 5-7 й 8-12 мк.

Мембранні й азбестові фільтри розраховані на одноразове використання. Свічки після використання спочатку промивають дистильованою водою, просмоктуючи її в напрямку, зворотному фільтруванню. Потім фільтри заливають на ніч концентрованою сірчаною кислотою, що містить в невеликій кількості нітрат натрію й хлорнокислий калій. Наступного дня їх багаторазово промивають дистильованою водою, а

потім кип’ятять у воді для видалення розчиненого повітря. Свічки не слід мити сумішшю двухромовокислого калію із сірчаною кислотою, тому що хромат адсорбується на фільтрі, що може привести до ушкодження фільтра й зіпсувати фільтрат. Не можна обробляти фільтри концентрованими розчинами лугів, тому що це може збільшити розміри пор. Для очищення свічок від сторонніх часток органічного походження їх можна прожарювати в муфельній печі. Варто враховувати, що склад рідин, що пройшли через бактеріальні фільтри, може мінятися внаслідок адсорбції па фільтрах ряду речовин, таких, наприклад, як деякі жирні кислоти, білки, поліцукри й ін. У результаті середовища можуть виявитися непридатними для культивування даних мікроорганізмів. Можливість і ступінь адсорбції речовин на фільтрі визначається хімічною природою фільтра, розмірами його пор, часом фільтрування.

Стерилізація скляного посуду

Основним способом стерилізації скляного посуду є стерилізація гарячим повітрям. Вона здійснюється в сушильних шафах при температурі 165–170°С протягом двох годин. При цьому гинуть і вегетативні клітини, і спори мікроорганізмів. Сушильні шафи роблять із термостійких матеріалів – з металу й азбесту. Усередині шафи є одна-дві полички, а зверху отвір, у якому за допомогою пробки закріплюють термометр. Біля стінки шафи поблизу поверхні, що гріє, температура завжди значно вище, ніж усередині, тому ртутна кулька термометра повинна перебувати усередині шафи на відстані 6-8 см. від верхньої стінки. Нагорі є також отвір для вентиляції, що при стерилізації закривають. У шафі з електричним нагріванням є регулятори, що забезпечують підтримку необхідної температури.

Підготовка посуду до стерилізації. Посуд перед стерилізацією повинен бути ретельно вимитий й загорнений в папір для збереження стерильності після прогрівання. Посуд розгортають безпосередньо перед уживанням.

У кінці піпеток, які беруться в рот, вставляють ватяні тампони. Піпетки загортають у довгі смужки паперу, шириною 4–5 см.. Обмотку починають із кінця, що опускають у середовище. Поступовим рухом паперу по спіралі закінчують обмотку до того кінця, що береться в рот. Загорнені піпетки для запобігання паперу від забруднення й розривів перед стерилізацією загортають по декілька штук разом або поміщають їх у спеціальні металеві або картонні пенали. Кожну чашку Петрі краще загортати окремо; можна загортати й разом по 2–3 штуки. Шпателі також стерилізують загорненими в папір; кожен шпатель загортають окремо. Колби, пробірки й трубки Буррі закривають ватяними пробками. На пробки можна надягти паперові ковпачки, що охороняють горличко від пилу.

Посуд, підготовлений для стерилізації, завантажують у сушильну шафу не занадто щільно, щоб забезпечити деяку циркуляцію повітря й рівномірний, надійний прогрів матеріалу, що стерилізується. Сушильна шафа при стерилізації повинна бути закрита. Якщо шафа не оснащена терморегулятором, необхідно увесь час стежити за температурою, тому що

при зниженні її не здійсниться стерилізація, а при нагріванні вище 175°С папір і пробки починають руйнуватися. По закінченні стерилізації шафу не відкривають доти, поки температура в ньому не впаде до 100–70°С, тому що при різкому охолодженні іноді порушується стерильність матеріалу, а сильно нагріте скло може тріснути. Посуд можна стерилізувати й в автоклаві.

Стерилізація інструментів і приладів

Дрібні металеві інструменти (петлі, голки, пінцети, ножиці) стерилізують прожарюванням у полум'ї безпосередньо перед використанням. На полум'ї короткочасно обпалюють горличка колб, пробірок, пляшок, а також ватяні пробки при пересіваннях культур і розливі середовищ. У полум'ї гинуть і клітини, і спори мікроорганізмів.

Прилади для культивування мікроорганізмів, а також деталі до цих приладів, гумові пробки й шланги стерилізують автоклавуванням. Предмети, що підлягають стерилізації в автоклаві, загортають у папір.

Деякі предмети (металеві інструменти, мембранні фільтри) іноді стерилізують тривалим кип'ятінням у дистильованій воді. Однак цим способом з метою стерилізації в мікробіологічній практиці користуються рідко у зв'язку з тим, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а зменшення часу кип'ятіння може не забезпечити стерилізацію, тому що спори деяких мікроорганізмів зберігають життєздатність навіть після кип'ятіння протягом декількох годин.

Предмети, виготовлені з термолабільних пластмас, наприклад, центрифужні пробірки, стерилізують ультрафіолетовими променями. Час опромінення встановлюють експериментально. Він залежить від потужності використовуваної бактерицидної лампи й відстані між лампою й об'єктом. Після опромінення, предмети до використання, варто зберігати в стерильному посуді. Стерилізацію предметів з термолабільних пластмас можна робити й окисом етилену.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Вивчення основних способів стерилізації живильних середовищ

Використовуючи відомості теоретичної частини вивчити способи стерилізації живильних середовищ. Результати вивчення оформити у вигляді таблиці 2.3.

Завдання 2 Вивчення основних методів стерилізації посуду й інструментів

Використовуючи відомості теоретичної частини вивчити методи стерилізації посуду й інструментів, підготувати до стерилізації й простерилізувати у сушильній шафі скляний посуд.

Результати оформити у вигляді таблиці 2.4

Таблиця 2.3 – Способи стерилізації живильних середовищ

Стерилізований матеріал	Метод стерилізації	Режим стерилізації	Примітка
Живильні середовища з ґрунтовою витяжкою; картопляні середовища			
Рідкі й агаризовані середовища, які не містять цукрів й інших речовин, що розкладаються при 120°С			
Рідкі й агаризовані середовища із цукрами й іншими сполуками, що не витримують нагрівання при 120°С			
Середовища або компоненти середовищ, що не витримують нагрівання вище 100°С			
Середовища або компоненти середовищ, що не витримують нагрівання, наприклад, білки, деякі вітаміни й ін.			

Таблиця 2.4 – Методи стерилізації лабораторних матеріалів

Матеріал, що стерилізується	Метод стерилізації	Режим стерилізації	Примітка
Чашки Петрі, піпетки, колби, шпателі			
Петлі, голки, пінцети, ножиці			
Колби, пробірки, хімічні склянки, флакони, скляні центрифужні пробірки, трубки Буррі			
Тримачі бактеріальних фільтрів, гумові пробки й шланги, фільтри Зейтця, Свічки Шамберлана й Беркефельда			
Мембранні фільтри			
Центрифужні пробірки виготовлені з термолабільних пластмас			

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Тема: принципи складання живильних середовищ для культивування мікроорганізмів і техніка мікробіологічного посіву

Мета роботи: засвоєння принципів складання живильних середовищ і вивчення умов культивування мікроорганізмів

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Принципи складання середовищ для культивування мікроорганізмів

Для нагромадження, виділення, культивування й збереження мікроорганізмів користуються живильними середовищами, які не тільки містять необхідні живильні речовини, але і є середовищем перебування мікроорганізмів. Тому при складанні середовищ ураховують як потреби мікроорганізмів у речовинах, необхідних для їхнього життя, так і фізико-хімічні умови, у яких мікроорганізми можуть здійснювати обмін між клітиною й середовищем. Обмін речовин мікроорганізмів включає два основних процеси – одержання енергії (енергетичний обмін) і біосинтез речовин клітини (конструктивний обмін). Конструктивний й енергетичний процеси не відірвані один від одного, а являють собою різні сторони єдиного обміну речовин. Вони протікають у клітині у вигляді сполучених хімічних реакцій; часто для конструктивних й енергетичних цілей використовується одна й таж речовина.

Елементарний склад живої клітини. У найбільшій кількості в клітинах утримуються вуглець, азот, водень і кисень. Їх називають елементами-органогенами. У значній кількості в клітині виявляються також фосфор і сірка й, нарешті, у невеликій кількості Fe, Mg, Mn, Cu, C1, K і ін., які називають мікроелементами. Всі ці елементи зв’язані в клітині в різні сполуки. 75 – 85% речовин мікробної клітини становить вода, 15 – 25% – “суха речовина”. 2 – 14% сухих речовин припадають на золу, а інша (більша) частина представлена органічними сполуками.

Щоб здійснювати біосинтез, рости й розмножуватися, клітина повинна одержувати ззовні в необхідних кількостях всі елементи, що втримуються в ній, і повинна бути забезпечена джерел енергії. Відповідно до того, які саме елементи доставляються клітині, речовини живильного середовища називають джерелами вуглецю, азоту, фосфору, сірки й т.д. Сполуки, у вигляді яких необхідні для конструктивних цілей елементи повинні бути внесені в середовища, визначаються синтетичними здатностями мікроорганізмів. Форма джерела енергії – способом її одержання.

Синтетичні можливості мікроорганізмів і способи одержання ними енергії відрізняються надзвичайю різноманітністю. Отже, і дуже різні їхні потреби в джерелах харчування. Це необхідно враховувати при складанні середовищ, чітко представляючи, що універсальних середовищ, однаково придатних для росту всіх без винятку мікроорганізмів, не існує. Таким чином, склад живильних середовищ визначається, насамперед особливостями,

різноманітністю обміну речовин мікроорганізмів. Тому що ця різноманітність у переважній більшості випадків проявляється відношенням мікроорганізмів до джерел вуглецю й азоту, тому саме вони й визначають специфічність середовищ. Так званий "мінеральний фон" середовищ для багатьох мікроорганізмів може бути дуже близьким за складом.

Середовища для того самого мікроорганізму можуть бути різними залежно від завдань дослідження. Наприклад, середовища, що підходять для тривалої підтримки культур мікроорганізмів, можуть сильно відрізнятися від середовищ, призначених для одержання тих або інших продуктів обміну, коли потрібно стимулювати окремі сторони життєдіяльності мікроорганізмів.

За складом живильні середовища поділяються на дві групи: натуральні середовища (невизначеного складу) і синтетичні середовища.

Натуральними називають середовища, які складаються із продуктів тваринного або рослинного походження, що мають складний невизначений хімічний склад. Основою таких середовищ є різні частини зелених рослин, тваринні тканини, солод, дріжджі, фрукти, овочі, гній, ґрунт, вода морів, озер і мінеральних джерел. Більшість із них використовується у вигляді екстрактів або настоїв. На натуральних середовищах добре розвиваються багато мікроорганізмів, тому що в таких середовищах є, як правило, усі компоненти, необхідні для росту й розвитку. Однак середовища з невизначеним складом мало придатні для вивчення фізіології обміну речовин мікроорганізмів, оскільки вони не дозволяють урахувати споживання ряду компонентів середовища, а з іншого боку, з'ясувати, які речовини утворяться по ходу розвитку мікроорганізмів. Це пов'язано з тим, що склад натуральних середовищ дуже різноманітний; крім того, він не є постійним, тому що істотно коливається залежно від сировини й способу готування середовищ. Це помітно впливає на ріст мікроорганізмів. Натуральні середовища невизначеного складу використовуються головним чином для підтримки культур мікроорганізмів, нагромадження їхньої біомаси й для діагностичних цілей.

До числа середовищ невизначеного складу відносять і *напівсинтетичні* середовища. У їхній склад поряд із сполуками відомої хімічної природи входять речовини невизначеного складу. Такі середовища знаходять особливо широке застосування в промисловій мікробіології для одержання амінокислот, вітамінів, антибіотиків й інших важливих продуктів життєдіяльності мікроорганізмів. Як приклад таких середовищ можна назвати наступні:

- м'ясо – пептонне середовище, до складу якої одночасно з м'ясним екстрактом і пептоном, що має складний, невизначений хімічний склад, входять кухонна сіль, фосфорнокислий калій, іноді глюкоза або сахароза;
- картопляні середовища із глюкозою й пептоном.

У названих середовищах компоненти невизначеного складу є основою середовища.

Але до *напівсинтетичних* середовищ відносяться й такі, головними складовими частинами яких є відомі сполуки (вуглеводи, солі амонію або

нітрати, фосфати й т.п.), а компонент невизначеного складу (кукурудзяний екстракт, дріжджовий автолізат, гідролізат казеїну) утримується у відносно низьких концентраціях.

Синтетичні середовища – це такі середовища, до складу яких входять тільки певні, хімічно чисті сполуки, узяті в точно зазначених концентраціях. Синтетичні середовища варто готувати на дистильованій воді. Для розробки синтетичних середовищ, що забезпечують нормальний ріст досліджуваного мікроорганізму або максимальний біосинтез якого-небудь продукту його життєдіяльності, необхідне знання особливостей обміну речовин даного організму й потреб його в джерелах харчування. У нинішній час у розпорядженні мікробіологів є достатня кількість синтетичних середовищ, що не уступають за своїми якостями складним середовищам невідомого складу. Синтетичні середовища можуть мати великий набір компонентів, але можуть бути й досить простими по складу. Синтетичні середовища найбільш зручні для дослідження обміну речовин мікроорганізмів. Знаючи точний склад і кількість вхідних у середовище компонентів, можна вивчити їхнє споживання й перетворення у відповідні продукти обміну.

За призначенням розрізняють *елективні* й *диференційно-діагностичні* середовища.

Елективні середовища були уведені в мікробіологічну практику С. Н. Виноградским і М. Бейєрінком. Ці середовища забезпечують переважний розвиток одного виду або групи родинних мікроорганізмів і менш придатні або зовсім непридатні для розвитку інших. Такі середовища застосовуються головним чином для виділення мікроорганізмів з місць їхнього природного перебування, для одержання накопичувальних культур. Поняття “елективні середовища” входить у більш широке поняття “елективні умови”.

Диференційно-діагностичні середовища – це такі середовища, які дозволяють по можливості швидко відрізнити (диференціювати) одні види мікроорганізмів від інших. Їхній склад підбирається з таким розрахунком, щоб він дозволив чітко виявити найбільш характерні властивості даного виду. Нерідко це досягається введенням у середовища спеціальних барвників-індикаторів, які зафарбовують, наприклад, колонії мікроорганізмів, що виявляють, у певний колір. Диференційно-діагностичними середовищами користуються в медичній мікробіології, а також для ідентифікації й систематики мікроорганізмів.

За фізичним станом середовища розділяються на *рідкі, щільні* й *сипучі*. Для з’ясування фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів, а також для нагромадження їхньої біомаси або продуктів обміну найбільш зручно застосовувати рідкі середовища. Щільні середовища використовують для виділення чистих культур (одержання ізольованих колоній), у діагностичних цілях: опис колоній, установлення характеру росту на скошеному м’ясо-пептонну агарі й ін., для зберігання культур, для кількісного обліку мікроорганізмів, визначення їхніх антагоністичних властивостей й у ряді інших випадків. Для ущільнення середовищ застосовують агар-агар, желатин

й кремнекислий гель. У промисловій мікробіології іноді застосовують сипучі середовища. До таких середовищ відноситься, наприклад, розварене пшоно, висівки, просочені живильним розчином, і т.д.

Посуд, призначений для готування середовищ і культивування мікроорганізмів, не повинен містити сторонніх речовин. Найкраще користуватися скляним посудом. Новий скляний посуд миють і занурюють на ніч в 1 – 2%-ний розчин соляної кислоти, потім ретельно прополіскують і висушують. Для спеціальних цілей (робота з мікроелементами, вітамінами, строго синтетичними середовищами й ін.) іноді потрібно особливо ретельне очищення посуду. У тих випадках, коли готують середовища не суворо визначеного складу, можна користуватися емальованим або алюмінієвим посудом.

Не слід готувати взапас більшість середовищ, тому що вони висихають, концентруються й стають непридатними. Зберігають середовища в прохолодному, захищеному від світла й не занадто вологому приміщенні. При підвищеній вологості повітря ватяні пробки просочуються вологою й через них проростає міцелій плісеней. До кожної посудини із середовищем обов'язково прикріплюють лист паперу з позначенням складу (назви) середовища й часу її готування.

Методи посіву й пересіву мікроорганізмів

Для виділення мікроорганізмів з виробничих і природних субстратів, підтримки в активному стані чистих культур, готування робочих культур з метою передачі у виробництво й т.п. у лабораторній практиці часто користуються методами посіву й пересівання. Посівом (або інокуляцією) називається внесення частини досліджуваного матеріалу в стерильне живильне середовище, пересіванням – перенос частини вирощеної на живильному середовищі культури мікроорганізму на інше, свіже стерильне середовище. При посіві й пересіві необхідно дотримуватись наступних прийомів (рисунок 3.1):

1. У ліву руку беруть дві пробірки – одну зі стерильним середовищем, іншу – з культурою й тримають у похилому положенні. У правій руці велтким і вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю й стерилізують у полум'ї пальника.

2. Виймають ватяні пробки з обох пробірок, притискають їх до долоні мізинцем і підмізинним пальцями правої руки й обпалюють краю пробірок. Стежать за тим, щоб пробки не торкалися сторонніх предметів.

3. Петлю вводять у пробірку з мікробною культурою, що пересівається. Обережно, не торкаючись стінок, відбирають краплю рідкої культури. Якщо роблять пересівання з косого шару агару, то для охолодження петлі спочатку варто доторкнутися до поверхні агару, де немає культури, після чого беруть невелику кількість мікробної маси зі скошеного щільного середовища.

4. Уводять петлю з матеріалом у пробірку зі стерильним рідким середовищем, намагаючись не зачіпати стінок пробірки. При посіві на скошене живильне середовище петлю із клітинами мікроорганізмів

опускають майже до дна, де концентрується невелика кількість конденсаційної води. Злегка торкаючись петлею поверхні щільного середовища, але не розпушуючи його, проводять від дна нагору штрих.

5. Петлю виймають, обпалюють краї пробірок і внутрішні кінці пробок, після чого пробірки закривають.

6. Петлю знову прожарюють у полум'ї пальника.

7. На пробірці роблять напис: назва культури й дата посіву. Надписують чорнилом або олівцем по склу або наклеюють етикетку. Засіяні пробірки поміщають у термостат для вирощування при постійній температурі.

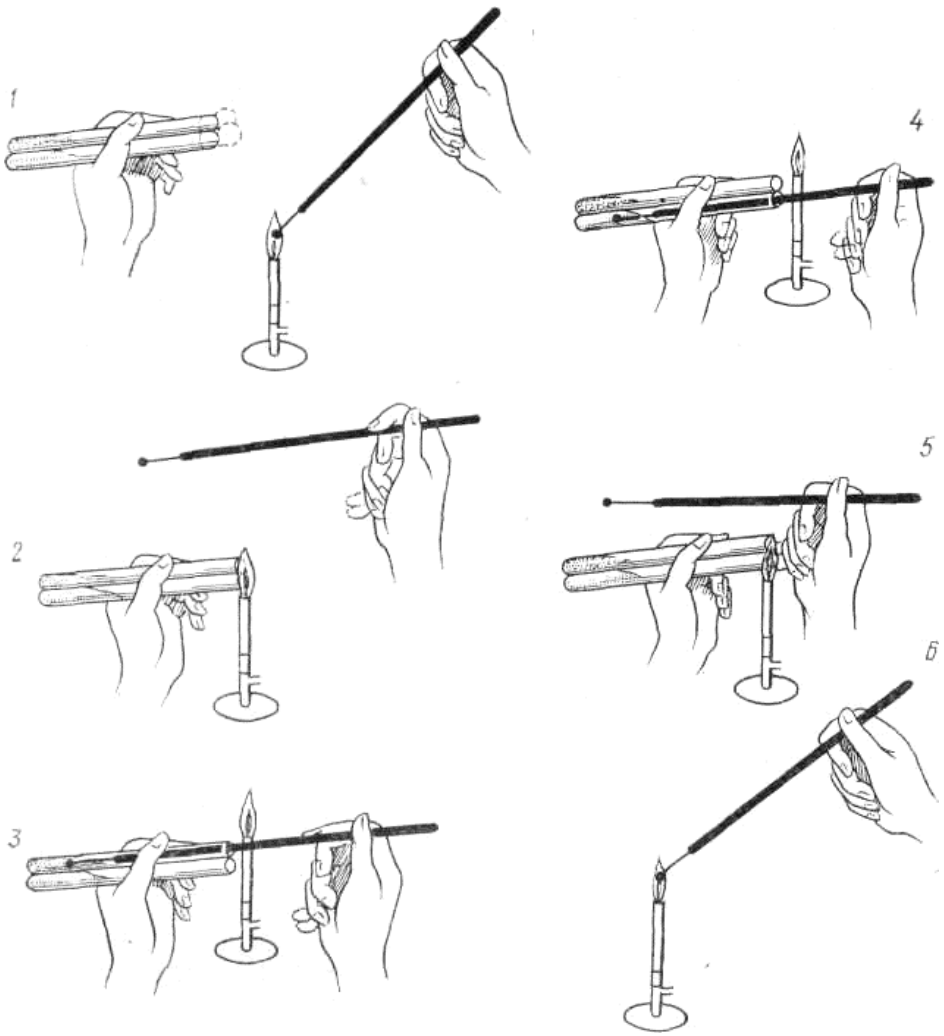


Рисунок 3.1 – Пересівання культури мікроорганізмів

Описані операції проводять біля полум'я пальника (але не в полум'ї), по можливості швидко, щоб не забруднити культури сторонніми мікроорганізмами. Не можна робити різких рухів, ходити, кашляти й т.п. біля працюючих із чистою культурою, тому що рух повітря збільшує небезпеку випадкового зараження культури й середовища. Тому посіви й пересівання мікроорганізмів краще проводити в боксі.

Посів у рідке середовище

Посів у рідке середовище можна робити петлею або піпеткою (пастерівскою або градуйованою). Обидві пробірки тримають у злегка похилому положенні, щоб не замочити ватяні пробки. Петлю з мікробним матеріалом опускають безпосередньо в стерильне середовище й обполіскують. При внесенні клітин, узятих петлею із щільного середовища, матеріал ретельно розтирають по стінці пробірки у верхнього краю рідкого середовища, увесь час змиваючи його середовищем.

Посів на щільні середовища

Посіви петлею на скошеному агарі роблять: зигзагоподібним штрихом, вільно сковзаючи петлею по поверхні щільного середовища від одного краю пробірки до іншого; прямою рисою, для чого проводять петлею пряму лінію знизу нагору посередині поверхні живильного середовища; суцільним посівом, розтираючи матеріал обережними круговими рухами по всій поверхні середовища.

Посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб: щільне живильне середовище в пробірках або колбах розплавляють на киплячій водяній бані, охолоджують до 48–50°С і, дотримуючись правил стерильності, розливають рівним шаром товщиною 3-5 мм у стерильні чашки (рисунок 3.2). Застигле середовище можна злегка підсушити в термостаті. Посів роблять скляним шпателем Дригальского (рисунок 3.3) або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних штрихів (рисунок 3.4).

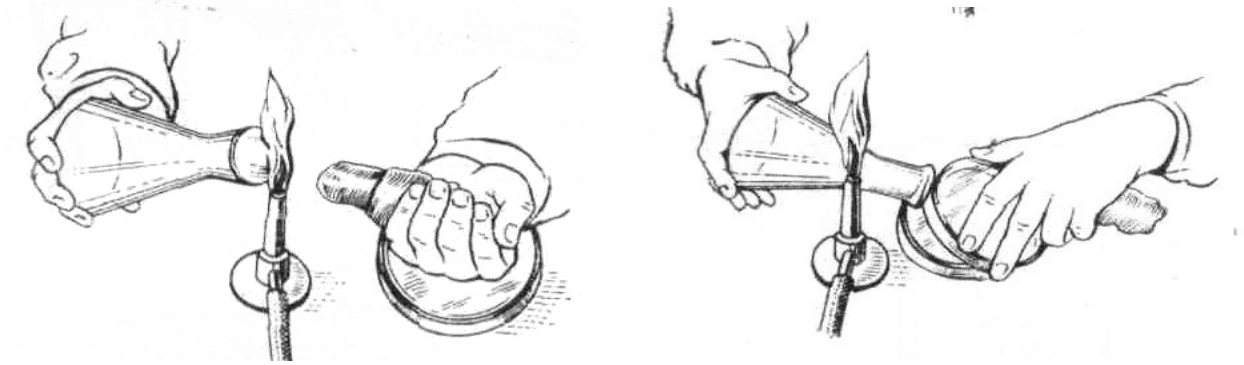
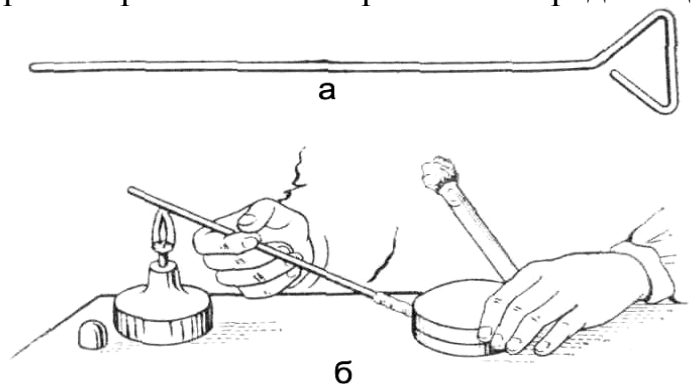
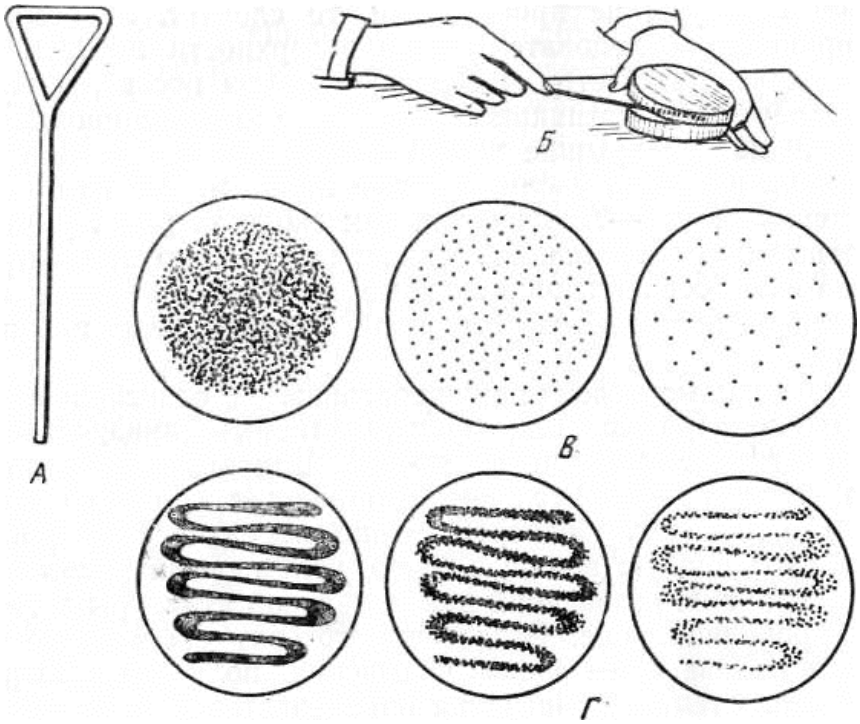


Рисунок 3.2 – Правила розливання стерильного середовища в чашки Петрі



а – шпатель; б – посів

Рисунок 3.3 – Посів на агар у чашки Петрі шпателем Дригальского



А – шпатель Дригальского; *Б* – розсів;
В – ріст мікроорганізмів після розсіву шпателем;
Г – ріст мікроорганізмів після розсіву петлею

Рисунок 3.4 – Розсів культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища

Посів уколом (метод посіву, що виснажує).

У стовпчик м’ясопептонного агару або м’ясопептонного желатину посів роблять уколом (рисунок 3.5).

Засіяні й надписані пробірки, колби або чашки Петрі поміщають у термостат для вирощування

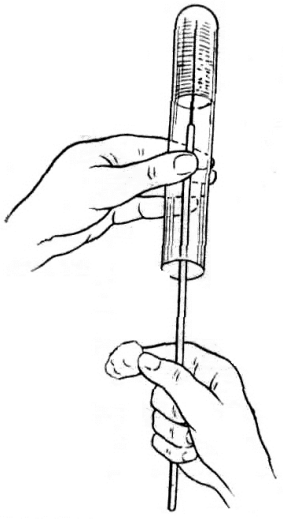


Рисунок 3.5 – Посів уколом

Потреби мікроорганізмів у джерелах харчування у зв'язку з особливостями їхнього обміну

Залежно від здатності мікроорганізмів використовувати для біосинтезу речовин клітини вуглекислоту як єдине джерело вуглецю розрізняють гетеротрофний й автотрофний способи живлення.

Гетеротрофні мікроорганізми

Гетеротрофи – це мікроорганізми, які не можуть використовувати вуглекислоту як єдине джерело вуглецю й мають потребу в готових органічних речовинах. Гетеротрофи сильно розрізняються як за потребою у джерелах харчування для побудови речовин клітини (конструктивний обмін), так і за способами одержання енергії (енергетичний обмін).

Конструктивний обмін гетеротрофів. Багато гетеротрофних мікроорганізмів для синтезу речовин клітини можуть задовольнятися одним або двома безазотистими органічними сполуками: цукрами, спиртами, органічними кислотами й ін. Найменш вимогливі з них, що володіють високими синтетичними здатностями, обходяться одновуглецевими сполуками, такими як, наприклад, мурашина кислота.

Для побудови азотовмісних речовин клітини такі мікроорганізми використовують азот мінеральних солей і не мають потреби в готових амінокислотах. Їх можна культивувати на синтетичних середовищах, складених з порівняно невеликого числа речовин відомого складу. Найбільш універсальним джерелом азоту для таких мікроорганізмів є амонійні солі. Однак амонійні солі сильних кислот мають той недолік, що в міру використання іона амонію в середовищі накопичується відповідна кислота, і середовище підкислюється. Це фізіологічно кислі солі. Розвиток мікроорганізмів, що не виносить підкислення, при цьому гнітиться, тому таким мікроорганізмам краще давати амонійні солі органічних кислот, які не так сильно підкисляють середовище. Дуже зручно вносити в середовища солі, у яких мікроорганізмом використовуються обидва компоненти. У цьому випадку підкислення може не відбуватися. Прикладом такої солі служить янтарнокислий амоній. Вільний аміак уводять у середовища як джерело азоту рідше, тому що він створює сильно лужні умови. Ряд мікроорганізмів можуть використовувати азот гетероциклічних сполук, попередньо розкладаючи ці сполуки з виділенням азоту в основному у вигляді аміаку. Багато мікроорганізмів використовують азот нітратів. Нітрати – фізіологічно лужні солі. Нітрити для багатьох бактерій токсичні й у середовища включаються рідко. Існують мікроорганізми, здатні будувати азотовмісні речовини клітини, використовуючи молекулярний азот. Це – *азотфіксатори*. У середовища для культивування вільно живучих азотфіксаторів не вносять сполуки азоту. Постачання цих мікроорганізмів газоподібним азотом здійснюється завдяки зіткненню середовища з повітрям або культивуванню в атмосфері азоту.

Більшість гетеротрофів мають потребу в одному або декількох готових вітамінах, і насамперед у вітамінах групи В. З іншого боку, є мікроорганізми, які можуть самі синтезувати всі необхідні їм вітаміни з речовин середовища.

Крім вуглецю, азоту й вітамінів, мікроорганізмам для побудови речовин клітини потрібні фосфор, сірка й ряд інших елементів. У натуральних середовищах ці елементи майже завжди присутні в необхідних кількостях. У синтетичні середовища їх уводять в основному у формі мінеральних солей. Фосфор вносять у вигляді калієвих або натрієвих солей фосфорної кислоти. Джерелом сірки найчастіше є сульфати, завичай $MgSO_4$. Ця сіль слугує одночасно й джерелом магнію. Однак деякі мікроорганізми не можуть відновлювати SO_4 і мають потребу в готовій сульфгідрильній групі. Джерелом натрію й хлору є NaC1, кальцію – $CaCO_3$ або $CaC1_2$. Залізо додають окисне або закисне у вигляді хлоридів або сульфатів. Для того щоб залізо в лужних умовах не випадало в осад з утворенням нерозчинного $Fe(OH)_3$, у середовище нерідко вносять лимонну кислоту, що утворить із залізом розчинний комплекс. Замість цитрату можна користуватися трилоном Б (ЕДТА – етилендиамінтетраацетат) – 0,001–1 *г/л,* або гексаметафосфатом – 4 *г/л.* Комплекси, утворені цими сполукими з катіонами, служать резервом, з якого в результаті дисоціації в розчин надходять вільні катіони, що використовуються мікроорганізмами.

Мікроелементи вносять у вигляді солей: $CuSO_4$, $MnSO_4$, і т.д. Середовища часто готують на водопровідній воді. Якщо досліджуваний мікроорганізм не відрізняється підвищеними вимогами до мікроелементів, останні в середовище спеціально не додаються, тому що завжди містяться в незначних кількостях у водопровідній воді й можуть надходити в середовище зі скла посуду. Для приготування строго синтетичних середовищ використовують дистильовану воду. У цьому випадку потрібне внесення мікроелементів. Зазвичай готують розчин**,** що містить суміш необхідних мікроелементів, концентрації яких у багато разів перевищують необхідні. Розчин стерилізують й у необхідній кількості стерильно вносять у середовище перед посівом. Коли з'ясовують потреби мікроорганізмів у мікроелементах, використовують бідистилят і ретельно очищені від домішок цих мікроелементів компоненти середовища й посуд.

Більш вимогливим *гетеротрофам-сапрофітам* потрібні в готовому вигляді всі або тільки деякі з 20 амінокислот, всі або багато вітамінів групи В, фрагменти нуклеїнових кислот, вуглеводи й т.д. Такі мікроорганізми культивують на середовищах складного складу: гідролізатах м'яса або казеїну, гідролізатах дріжджів, рослинних екстрактах. Синтетичні середовища, пропоновані, наприклад, для деяких молочнокислих бактерій, містять близько 40 компонентів. Найбільш високими вимогами до джерел харчування володіють багато патогенних мікроорганізмів. Синтетичні здатності цих мікроорганізмів розвинені дуже слабко, тому їх культивують на середовищах, що містять білки або продукти їхнього неглибокого розпаду, нуклеотиди, вітаміни. Синтетичні середовища, складені для деяких паразитичних форм, дуже складні. Вони включають кілька десятків компонентів. Варто враховувати, що органічні азотовмісні речовини часто використовуються мікроорганізмами не тільки як джерело азоту, але і як джерело вуглецю.

Енергетичний обмін гетеротрофів. Розходження в способах одержання енергії гетеротрофами важливо враховувати при складанні середовищ, щоб мати можливість не тільки доставити клітині відповідний енергетичний матеріал, але й створити умови для його використання. Багато мікроорганізмів (цвілеві гриби, дріжджі, аеробні бактерії) одержують енергію при окислюванні органічних речовин киснем повітря. Окислювання може йти до кінця, тобто до CO_2 і H_2O, або бути неповним, що досить поширено серед мікроорганізмів. В останньому випадку утворяться недоокислені продукти. Мікроорганізми, що здійснюють окислювання речовин киснем повітря, культивуються в аеробних умовах. Є мікроорганізми, що окисляють органічні речовини з одночасним відновленням мінеральних сполук: нітратів до вільного азоту (денітрифікація), сульфатів до сірководню (десульфатація), вуглекислоти до метану. Мікроорганізми, що здійснюють ці процеси, культивуються без доступу повітря. У середовищі повинно міститися не тільки окислювальна, але й відновлювана речовина.

Ряд мікроорганізмів використовують енергію бродіння. Бродіння протікає без участі кисню повітря і являє собою процес сполученого окислювання – відновлення, при якому одні атоми вуглецю речовини, що служить енергетичним, окисляються за рахунок відновлення інших атомів вуглецю тієї ж речовини. Мікроорганізми, що здійснюють бродіння, культивуються без доступу повітря.

Мікроорганізми можуть окиснювати будь-які наявні в природі речовини. Найбільш універсальним енергетичним матеріалом є цукри, амінокислоти, органічні кислоти, спирти. Є мікроорганізми, які можуть окиснювати такі стійкі сполуки, як парафіни, віск, нафта. Причому, серед гетеротрофів є *поліфаги*, що використовують широке коло речовин, і є спеціалізовані форми, що пристосувалися до окиснювання невеликого числа сполук.

Більшість гетеротрофів одержують енергію й створюють вуглецеву основу речовин клітини з того самого сполуки. Однак є мікроорганізми, які для конструктивних й енергетичних процесів мають потребу в різних вуглецевовмісних сполуках. Наприклад, гомоферментативні молочнокислі бактерії одержують енергію при зброджуванні цукрів, але майже не використовують їх для побудови вуглецевих ланцюжків речовин клітини. Для конструктивних цілей вони потребують готових амінокислот, пуринових й піримідинових основ, вітамінів.

Автотрофні мікроорганізми

Автотрофи – це мікроорганізми, які здатні використовувати вуглекислоту як єдине джерело вуглецю й не мають потреби в готових органічних речовинах.

Конструктивний обмін автотрофів. Автотрофні мікроорганізми мають найбільш високі синтетичні здатності. Для побудови речовин клітини вони можуть використовувати як єдине джерело вуглецю вуглекислоту. Азот й інші необхідні елементи автотрофи одержують із мінеральних солей. У середовища для автотрофів не потрібно включати органічні речовини. Для

них готують мінеральні середовища. Щоб забезпечити мікроорганізми вуглекислотою, її продувають через середовище або вводять у середовище карбонати або бікарбонати. Іноді цілком достатньо контакту середовища з повітрям, звідки мікроорганізми черпають CO_2.

Енергетичний обмін автотрофів. Автотрофні мікроорганізми розрізняються за способом одержання енергії. Деякі автотрофи (пурпурні й зелені сіркобактерії) мають пігментну систему – хлорофіли особливого типу, і можуть використовувати енергію світла. Вони здійснюють, як і зелені рослини, фотосинтез. Їх культивують при денному або штучному (у люміностатах) освітленні. Інші автотрофні мікроорганізми використовують енергію окиснювання мінеральних речовин: сполук сірки (безбарвні сіркобактерії), азоту (нітрифікатори), заліза (залізобактерії). Ці мікроорганізми здійснюють хемосинтез і називаються хемолітоавтотрофами.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 *Вивчити типи живильних середовищ*

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть основні типи живильних середовищ. Результати оформити у вигляді таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Характеристика типів живильних середовищ

Тип середовища	Вид	Застосування
За складом		
За призначенням		
За фізичним станом		

Завдання 2 *Вивчити основні способи посіву мікроорганізмів*

Використовуючи дані теоретичної частини, розглянете способи посіву мікроорганізмів, дайте їхній короткий опис і схематичне зображення. Результати оформити в довільній формі.

Завдання 3 *Вивчити потреби мікроорганізмів у джерелах харчування у зв'язку з особливостями їхнього обміну*

Вивчити особливості енергетичного обміну мікроорганізмів. Результати оформити у вигляді схеми.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема: Будова і принцип роботи оптичного мікроскопа. Правила мікроскопування

Мета роботи: Вивчення будови оптичного мікроскопа, методів підготовки препаратів до мікроскопування

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Будова оптичного мікроскопа

Біологічний мікроскоп (рисунок 4.1) складається з механічної, оптичної й освітлювальної частин.

Механічна частина:

- штатив, що складається з основи (9) і тубусотримача (13);
- тубус (2), розташований у верхній частині тубусотримача;
- револьвер (3) – спеціальний пристрій, що складається із двох пластин: нерухомої й рухливої, на якій у гніздах закріплюються об'єктиви;
- предметний столик (5) із затискувачами для закріплення препарату може мати круглу, квадратну або прямокутну форму. У центрі столика є отвір для проходження світла. По обидва боки столика знаходяться гвинти, за допомогою яких можна пересувати столик й, відповідно, препарат на ньому у взаємоперпендикулярних напрямках, що дозволяє знайти краще місце або змінити поле зору;
- макрометричний гвинт (12) розташований на тубусотримачі з обох боків й служить для швидкого пересування тубуса, а також для грубого фокусування, тобто знаходження зображення;
- мікрометричний гвинт (11) розташований на основі штатива з обох боків й служить для точного фокусування, тобто встановлення чіткості зображення. У деяких моделях мікроскопа мікрогвинт розташований на штативі нижче макрогвинта;
- гвинт конденсора (10) розташований під предметним столиком і забезпечує розташування конденсора на необхідній висоті.

Оптична частина мікроскопа:

- окуляр (1) – це дві лінзи в оправі, які знаходяться у верхній частині тубуса. Збільшення окуляра відзначається на оправі (найчастіше може бути 7^x, 10^x, 15^x).
- об'єктив (4) – система лінз в оправі. Розрізняють сухі об'єктиви (коли між фронтальною лінзою й препаратом розташоване повітря), які дають мале (в 8, 9, 10 разів) і середнє (в 20, 40 разів) збільшення й іммерсійні (між фронтальною лінзою й препаратом розташована іммерсійна олія), які дають велике збільшення (в 90 разів). Загальне збільшення мікроскопа рівняється добутку збільшення окуляра на збільшення об'єктива. Наприклад, 15 х 8 = 120 разів, 15 х 40 = 600 разів, 15х90= 1350 разів.

Освітлювальна частина мікроскопа:

- джерело світла – лампочка, що вмонтована в оправу з колекторною лінзою, розташована в основі штативу (7). У деяких моделях мікроскопів може бути двостороннє дзеркало (з однієї сторони воно плоске, а з іншого – вигнуте). Дзеркало легко обертається й з його допомогою промені направляються від джерела світла до конденсора;
- конденсор (6) – система лінз, що розташовані під предметним столиком і збирають паралельні промені, які йдуть від освітлювача або дзеркала. Конденсор оснащений ірисовою діафрагмою (8), за допомогою якої можна регулювати інтенсивність освітлення препарату. Гвинт конденсора (10) дозволяє розташовувати його на необхідній висоті.

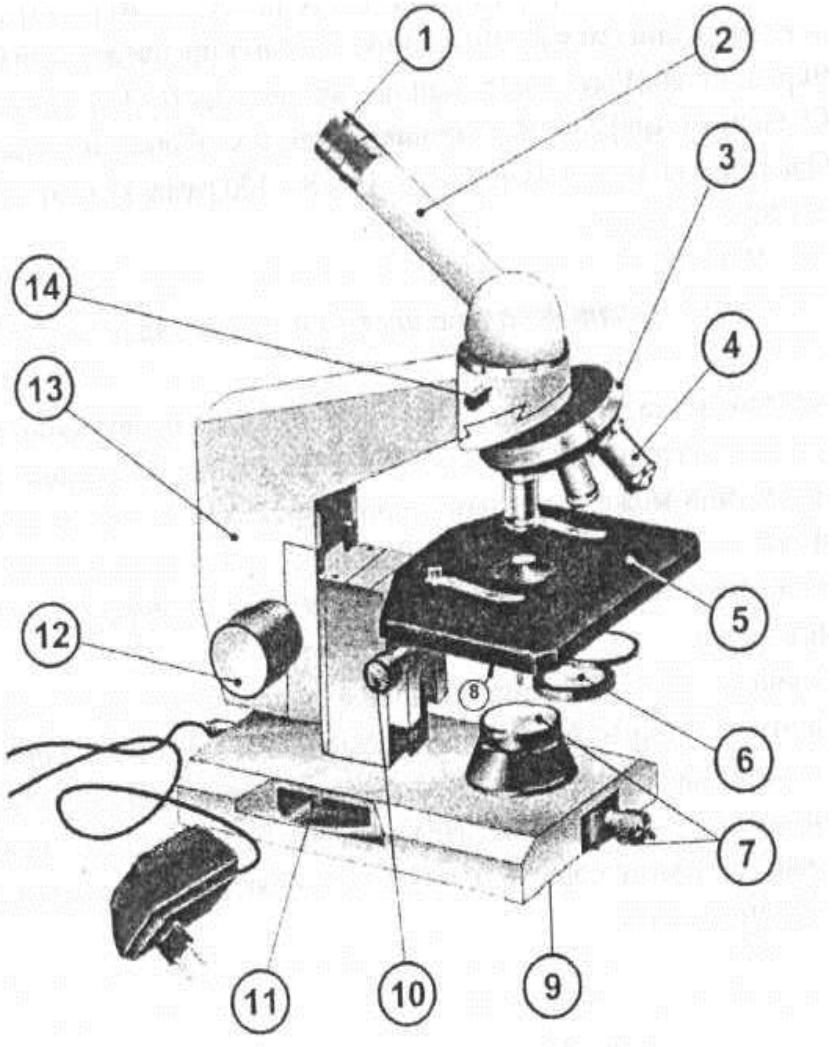


Рисунок 4.1 – Будова оптичного мікроскопа

Правила мікроскопування

1. Мікроскоп ставлять на робоче місце.
2. Установлюють світло:

2.1. Мікроскоп включають в електричну мережу.

2.2. Конденсор піднімають нагору до кінця.

2.3. Відкривають діафрагму.

3. Закріплюють підготовлений препарат на предметному столику клемами.

4. Установлюють необхідний для роботи об’єктив на оптичну вісь із окуляром (шляхом обігу рухливої частини револьверного пристрою за годинною стрілкою до звуку клацання фіксатора).

5. Під контролем ока (дивлячись збоку на об’єктив) за допомогою макрогвинта, опускають тубус на певну відстань між фронтальною лінзою об’єктива й препаратом (для об. 9^x – на 1,0 см., для об. 40^x – на 0,1 см., для об. 90^x – занурюють у краплю іммерсійної олії, попередньо нанесеної на препарат).

6. Дивляться в окуляр, повільно піднімають тубус макрогвинтом і знаходять зображення (грубе фокусування).

7. За допомогою мікрогвинта встановлюють чіткість зображення (точне фокусування). Обертання мікрогвинта не повинні бути більше 90° в той чи інший бік.

Після закінчення роботи з мікроскопом виключають шнур з електромережі, піднімають тубус до крайнього верхнього положення, протирають імерсійний об’єктив марлевою серветкою, змоченою в спирті, і мікроскоп накривають.

Відпрацьовані предметні скельця складають у спеціальні ванночки з дезінфікуючим розчином.

Приготування препаратів живих клітин

Спостерігати мікроорганізми в живому стані можна на препаратах: „**роздавлена крапля”,** „**висяча крапля”,** „**відбиток”.**

Препарат “роздавлена крапля”

На предметне скло наносять маленьку краплю водопровідної води (використовувати дистильовану воду не можна, тому що відсутність у ній солей може привести до небажаних змін клітин мікроорганізмів) і переносять у неї невелику кількість культури досліджуваних мікроорганізмів, розмішують і покривають покривним склом. Якщо досліджувані мікроорганізми ростуть на щільному живильному середовищі, тоді мікробну масу переносять у приготовлену краплю води за допомогою бактеріологічної петлі. Якщо ж досліджується культура, вирощена в рідкому середовищі, то на предметне скло суспензію клітин наносять за допомогою стерильної піпетки. У цьому випадку краплю води на предметне скло можна не наносити. Крапля з досліджуваним матеріалом повинна бути настільки мала, щоб після притискання її покривним склом не було надлишку рідини, що виступає з-під покривного скла. Якщо є надлишок рідини, то його варто видалити фільтрувальним папером. Приготовлений у такий спосіб препарат поміщають на предметний столик мікроскопа й розглядають його із сухою системою.

Препарат „роздавлена крапля” дозволяє встановити форму клітин досліджуваних мікроорганізмів, їхні розміри, розташування, спосіб спороутворення, а також наявність або відсутність рухливості.

Препарат „висяча крапля”

Препарат „висяча крапля” використовують для виявлення рухливості в мікроорганізмів. Крім того, у препараті „*висяча крапля*” можна спостерігати за розмноженням мікроорганізмів, утворенням і проростанням спор, відношенням клітин до хімічних подразників. Для готування препарату невелику краплю суспензії мікроорганізмів наносять на покривне скло, перевертають його краплею вниз і поміщають на спеціальне предметне скло з заглибленням (лункою) у центрі. Крапля повинна вільно висіти, не торкаючись країв і дна лунки. Краї лунки попередньо змазують вазеліном. Крапля виявляється герметично укладеною у вологій камері, що допускає багатоденне спостереження за об’єктом. Для тривалих спостережень доцільно користуватися стерильним склом, а суспензію бактерій готовити не у воді, а в рідкому живильному середовищі.

Препарат „відбиток”

Метод відбитків полягає в наступному. З агаризованного середовища в чашці Петрі, на якій досліджувані мікроорганізми ростуть суцільним газоном або у вигляді окремих колоній, вирізують скальпелем невеликий кубик (блок) і переносять його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була звернена нагору. Потім до газону або до колонії прикладають чисте покривне скло, злегка надавлюють на нього петлею або пінцетом, і негайно ж знімають, намагаючись не зрушити убік. Отриманий препарат поміщають відбитком униз у краплю води (можна в краплю метиленового синього) на предметне скло й розглядають під мікроскопом із сухою системою. Такий відбиток можна одержати й на предметному склі, якщо торкнутися поверхні колонії предметним склом. Відбитки можна фіксувати й зафарбовувати будь-яким способом. Ці препарати зручні для вивчення природного розташування клітин у колонії мікроорганізмів, і особливо для дослідження форми спор й спороносіїв в актиноміцетів і грибів.

Приготування препаратів фіксованих клітин

Для виявлення деяких морфологічних особливостей і кількісного обліку мікроорганізмів, перевірки чистоти культури й для ряду інших цілей готовлять фіксовані пофарбовані препарати, які можуть зберігатися тривалий час. Готування фіксованих пофарбованих препаратів включає наступні етапи: готування мазка, висушування, фіксацію й фарбування.

Готування мазка. На знежирене предметне скло наносять маленьку краплю водопровідної води й переносять у неї петлею невелику кількість досліджуваного матеріалу, як для препарату “роздавлена крапля”. суспензію, що вийшла, рівномірно розмазують петлею або краєм покривного скла на площі 1–2 см. можливо більш тонким шаром. Мазок повинен бути настільки тонкий, щоб висихав майже негайно ж після готування.

Висушування мазка. Найкраще сушити препарат при кімнатній температурі на повітрі. Добре приготовлений тонкий мазок висихає дуже швидко. Якщо висушування мазка уповільнено, то препарат можна злегка нагріти в струмені теплого повітря високо над полум'ям пальника, тримаючи скло мазком нагору. Цю операцію варто проводити вкрай обережно, не перегріваючи мазка, інакше клітини мікроорганізмів деформуються.

Фіксація. Фіксація препарату переслідує кілька цілей: убити мікроорганізми, тобто зробити безпечним подальшу роботу з ними; забезпечити краще прилипання клітин до скла; зробити мазок більш сприйнятливим до фарбування (мертві клітини зафарбовуються краще, ніж живі). Найпоширенішим способом фіксації є термічна обробка. Для цього препарат тричі проводять через найбільш гарячу частину полум'я пальника, тримаючи предметне скло мазком нагору. Не слід перегрівати мазок, тому що при цьому можуть відбутися грубі зміни клітинних структур, а іноді й зовнішнього вигляду клітин, наприклад, їх зморщування. Для дослідження точної будови клітини використовують фіксацію різними хімічними речовинами. У цьому випадку фіксуючу рідину або наливають на мазок, або препарат на певний час занурюють у склянку з фіксатором. Найчастіше користуються етиловим спиртом (час фіксації 15–20 хв.), метиловим спиртом (час фіксації 3–5 хв.), сумішшю рівних обсягів етилового спирту й ефіру (препарат занурюють на 15–20 хв. у суміш або заливають нею мазок і дають суміші випаруватися). Існує цілий ряд інших фіксаторів. По закінченні фіксації препарат відмивають від фіксатора, обережно обливаючи його водопровідною водою, і зафарбовують.

Фарбування. Для простого фарбування клітин мікроорганізмів найчастіше користуються аніліновими барвниками: фуксином, генціанвіолетом, метиленовим синім. Фіксований препарат поміщають на паралельні скляні рейки, що лежать на стінках кювети, і обливають із піпетки розчином обраного барвника. Варто звертати увагу на те, щоб кінець піпетки не торкався мазка. Зазвичай буває досить покрити мазок декількома краплями барвника. Час фарбування зазначеними барвниками коливається від 1 до 3 хв. Необхідно стежити, щоб під час фарбування розчин барвника на мазку не підсихав, і якщо буде потреба доливати нові порції. По закінченні фарбування препарат промивають струменем води доти, поки стікаюча вода стане безбарвної. Потім препарат висушують на повітрі або обережно промокають його фільтрувальним папером і розглядають із іммерсією. Для одержання більш чистих препаратів фарбу можна наливати на мазок, покритий фільтрувальним папером.

Метод фарбування препаратів у модифікації Синєва дозволяє використовувати замість розчинів барвників фільтрувальний папір, заздалегідь просочений барвником. У цьому випадку фарбування роблять у такий спосіб. На фіксований мазок наносять краплі дистильованої води, накладають смужку сухого фільтрувального паперу, просоченого барвником, і притискають його пінцетом до поверхні скла. Після закінчення часу фарбування фільтрувальний папір знімають і препарат промивають водою. У

правильно пофарбованому й добре промитому препараті поле зору залишається зовсім світлим і чистим, а пофарбованими виявляються тільки клітини мікроорганізму.

Описаний метод відноситься до позитивних способів фарбування, коли зафарбовуються клітини мікроорганізмів. Крім цього існує і негативне контрастування, коли барвник заповнює простір, що оточує клітини, у результаті чого мікроорганізми, у які барвник не проникає, виглядають як світлі частки на рівномірно зафарбованому тлі.

Для негативного фарбування найчастіше користуються рідкою тушшю. Фарбування негативними барвниками можна вести двома шляхами: або розчин барвника наносять на сухий фіксований мазок, дають йому висохнути й сухий препарат розглядають із імерсією, або краплю досліджуваної суспензії бактерій змішують із барвником безпосередньо на предметному склі, покривають її покривним склом і вивчають із сухою системою. В останньому випадку негативне фарбування можна комбінувати із прижиттєвим фарбуванням клітин. Для цього краплю досліджуваної суспензії мікроорганізмів поміщають спочатку в краплю розведеного розчину фуксину, а потім змішують із краплею туші й закривають покривним склом.

Препарати, робота з якими закінчена (предметні й покривні скельця), перш, ніж вимити, поміщають у посудину з дезінфікуючим розчином.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 *Вивчення будови оптичного мікроскопа*

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть основні складові частини мікроскопа. Результати оформити у вигляді таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Характеристика складових частин мікроскопа

Основні частини	Склад	Застосування
механічна		
оптична		
освітлювальна		

Завдання 2 *Вивчити методики приготування препаратів живих клітин*

Вивчивши методики приготування препаратів живих клітин, приготувати препарати „роздавлена крапля” й „висяча крапля”. Розглянути препарати під мікроскопом. Відзначити форму й сполуки клітин мікроорганізмів, а також характер їхнього руху. Результати оформити у вигляді таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Характеристика виду мікроорганізмів під мікроскопом

Вид мікроорганізмів	Форма клітини	Характер руху

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Тема: Методи культивування мікроорганізмів. Вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів

Мета роботи: Вивчення методів культивування мікроорганізмів й особливостей, які використовуються для їхньої ідентифікації

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вивчення деяких особливостей мікроорганізмів

З'ясування систематичного положення мікроорганізмів, отриманих у чистій культурі, часто є необхідною умовою для проведення з ним подальшої роботи. Однак визначення видової приналежності в багатьох мікроорганізмів являє собою досить важке дослідницьке завдання, виконання якого вимагає певних навичок роботи. Воно включає вивчення цілого ряду особливостей мікроорганізмів: морфології клітин, характеру росту культури на різних середовищах, здатності використовувати ті або інші сполуки, відношення до температури, кислотності середовища, кисню. Крім того, для визначення виду в мікроорганізмів часто необхідно знати продукти обміну речовин, серологічні властивості, нуклеотидний склад клітин і ряд інших ознак. Це пов'язано із тривалими спостереженнями, постановкою спеціальних дослідів і проведенням складних біохімічних аналізів. Тому визначення мікроорганізмів до виду ми не розглядаємо. Нижче наведені тільки деякі особливості росту мікроорганізмів на щільному й рідкому живильному середовищах, основні способи вивчення морфології клітин, фарбування за Грамом й виявлення кислотостійкості. Цього, як правило, досить для встановлення приналежності виділеного мікроорганізму до певного порядку, іноді родини й рідше роду.

Ріст мікроорганізмів на щільних живильних середовищах

Найбільш істотною особливістю росту мікроорганізмів на щільному живильному середовищі являється характер колонії. Розрізняють ***поверхневі, глибинні й донні*** колонії залежно від того, де вони розвивалися – на поверхні щільного живильного середовища, в товщі її або на дні посудини. Зазвичай, вивчають й описують тільки колонії, що виросли на поверхні середовища, тому що саме ці колонії відрізняються більшою розмаїтістю. Глибинні колонії, навпроти, досить одноманітні. Найчастіше вони мають вигляд більш-менш сплющених чечевичок, що приймають у проекції форму овалів із загостреними кінцями. Лише в деяких мікроорганізмів глибинні колонії нагадують пучки вати з нитковидними виростами в живильне середовище. Утворення глибинних колоній часто супроводжується розривом агаризованого середовища внаслідок виділення мікроорганізмами, що розвиваються, вуглекислоти або інших газів. Донні колонії найрізноманітніших мікроорганізмів ростуть у вигляді тонких прозорих

плівок, що стеляться по дну. При **описі колонії необхідно** вказувати вік культури, склад середовища й температуру культивування.

Опис поверхневих колоній проводять за наступною схемою.

Форма колонії – округла, неправильної форми, ризоїдна й т.д. (рисунок 5.1)

а б в г д

а – округла, б – неправильна, в – амебоподібна,
г – ризоїдна, д – міцеліальна
Рисунок 5.1 – Форма колоній

Поверхня колонії – гладка, шорсткувата, борозенчаста, складчаста, зморшкувата, з концентричними колами або радіально покреслена.

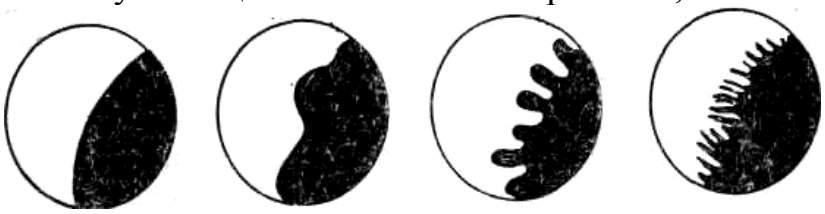
Профіль колонії – плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний і т.д. (рисунок 5.2)

а б в г

а – плоский, 6 – опуклий, в – кратероподібний, г – конусоподібний
Рисунок 5.2 – Профіль колоній

Розмір (діаметр) колонії вимірюють за допомогою звичайної лінійки або окулярного мікрометра при малому збільшенні мікроскопа й указують її величину в міліметрах. Чашки при цьому поміщають на столик мікроскопа кришками вниз. Крапковими називають колонії менші 1 мм у діаметрі, але видимі неозброєним оком. Дрібні колонії мають 1–2 мм, середні – 2-4 мм і великі – більше 4 мм у діаметрі.

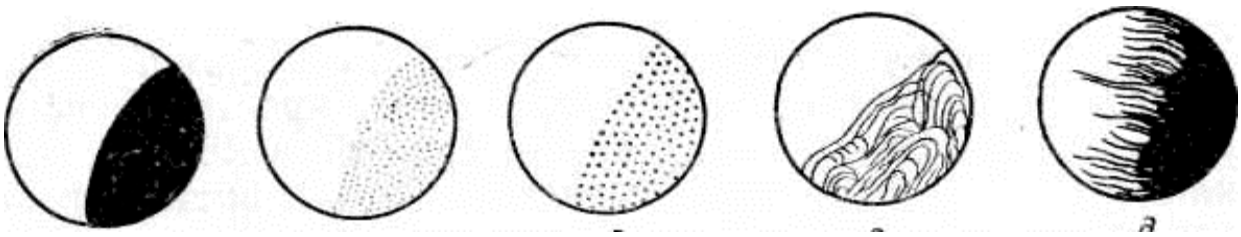
Край колонії – рівний, хвилястий, зубчастий, торочкуватий і т.д. (рисунок 5.3) визначають при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи. Чашку поміщають на столик мікроскопа, як зазначено вище.



а б в г

а – рівний, *б* — хвилястий, *в* — лопатевий, *г* – торочкуватий
Рисунок 5.3 – Край колоній

Структуру *колонії* – однорідна, дрібно- або крупнозерниста, струйчата й т.д. (рисунок 5.4) визначають при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи.



а б в г д

а – однорідна, б – дрібнозерниста,
в – крупнозерниста, г – струйчата, д – волокниста

Рисунок 5.4 – Структура колоній:

Блиск і прозорість – колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора.

Колір колонії – безбарвна (грязно-білі колонії відносять до безбарвного); пігментована – біла, жовта, золотава, жовтогаряча, бузкова, червона, чорна.

Консистенцію колонії визначають, доторкаючись до її поверхні петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути щільної, м'якої або вростаючою в агар, слизуватої (прилипає до петлі), тягучої, волокнистої (знімається цілком), (легко ламається при дотику петлею) консистенції.

Крім того, відзначають здатність колонії емульгуватися – одні колонії утворять у фізіологічному розчині гомогенну суспензію, в інших суспензія зерниста або у вигляді обривків плівок.

Ріст мікроорганізмів у рідких живильних середовищах

Характер росту мікроорганізмів у рідких живильних середовищах відрізняється більшою однаковістю, ніж вид колоній на щільних середовищах. Мікроорганізми при рості в рідких середовищах можуть викликати помутніння середовища, утворення плівок або осаду. Зазвичай вказують ступінь помутніння середовища – слабкий, помірний або сильний. Мутність середовища може бути постійної або тимчасовою, однорідною, пластівчастою, із шовковистою хвилястістю й т.д. Якщо утвориться плівка, то відзначають її характер – тонка, щільна або пухка; гладка, зморшкувата або складчаста. При утворенні осаду слід зазначити його кількість (убогий, рясний і т.д.) і консистенцію (щільний, пухкий, слизуватий). Відмічають вік культури, склад середовища, умови культивування. У ряді випадків ріст мікроорганізмів супроводжується появою запаху, зміною кольору середовища, газовиділенням. Щоб установити здатність мікроорганізмів до газоутворення, у пробірку кладуть так званий „поплавець" – маленьку, запаяну з одного кінця трубку. Поплавець поміщають у пробірку запаяним кінцем нагору перед стерилізацією середовища, і стежать, щоб він повністю був заповнений середовищем. Якщо ріст мікроорганізмів супроводжується

газовиділенням, то гази, що утворяться, накопичуються в поплавці у вигляді пухирця.

Морфологічна характеристика мікроорганізмів

Морфологічна характеристика мікроорганізмів включає форму клітин, їхнє сполучення й розміри, рухливість, здатність до утворення спор і капсул, а також наявність у клітинах деяких включень. Вивчення морфологічних особливостей проводять, використовуючи методи мікроскопії й різні способи фарбування клітин. При описі морфології клітин варто вказувати вік культури, склад середовища й умови культивування.

Форма, розміри й сполуки клітин. *Форму й сполуки* клітин визначають при мікроскопуванні молодої (найчастіше добової) культури мікроорганізмів, вирощеної в рідкому середовищі. Для цього готовлять препарати живих або фіксованих пофарбованих клітин і мікроскопіюють: перші з використанням фазово-контрастного пристрою, а другі – з використанням імерсійної системи.

Визначення розмірів клітин проводять під мікроскопом за допомогою окулярної лінійки (мікрометра) або окулярного гвинтового мікрометра, використовуючи найчастіше 24-годинні культури мікроорганізмів. Розміри клітин особливо зручно визначати, користуючись фазово-контрастним пристроєм. Якщо клітини рухливі, препарат злегка підігрівають або до краплі досліджуваної суспензії додають краплю 0,1%-ного водяного розчину агар-агару. Фіксувати й зафарбовувати клітини небажано, тому що це веде до деякої зміни їхніх існуючих розмірів. Розміри клітин виражають у мікронах.

Рухливість. Найбільш виразний рух бактерій видно в препараті „висяча крапля”. Рухливі клітини жваво пересуваються в полі зору мікроскопа в різних напрямках. Рухливість мікроорганізмів необхідно відрізняти від їхнього пасивного переміщення в результаті броунівського руху. Броунівський рух – це безладні коливання клітин у досить вузьких межах. Воно особливо помітно в суспензіях з великою густиною клітин. Якщо характер руху досліджуваних організмів нагадує броунівський рух, то для того щоб переконається у власній рухливості клітин, до краплі досліджуваної суспензії додають краплю 5%-ного водяного розчину фенолу або 0,1 н розчину сулеми. Активний рух негайно припиняється, тоді як броунівський – зберігається. Необхідно мати на увазі, що з віком навіть дуже рухливі форми гублять рухливість, тому здатність до руху досліджують у клітині молодій, найчастіше добової культури. Якщо в таких клітин рухливість не виявлена, варто переглянути клітини дванадцяти, шести або навіть двогодинних культур. У препараті „висяча крапля” рухливість установлюють тільки для форм, що мають джгутики або здатних пересуватися завдяки скороченню тіла.

Розташування джгутиків й їхнє число мають діагностичне значення. При мікроскопуванні у світлому полі спостерігати джгутики в живих клітин не вдається, тому що їхня товщина не перевищує 0,04 мк, що лежить за межами здатності мікроскопа. У теперішній час для дослідження джгутиків

усе ширше починають застосовувати електронну мікроскопію. При фарбуванні джгутики можна побачити й у світлопольному мікроскопі.

Фарбування джгутиків (по Пєшкову). Фарбування джгутиків у клітин невідомих мікроорганізмів краще проводити паралельно з фарбуванням культури, тип джгутування якої відомий. Підготовка матеріалу й готування препарату. Джгутики легко відпадають від клітин у момент готування мазка. Тому необхідно звертати увагу на чистоту скла й спосіб нанесення на нього суспензії клітин. Скло варто промивати в хромовій суміші, а потім у воді. Перед самим готуванням мазка рекомендується сильно нагріти в полум'ї ту сторону скла, на яку буде нанесений мазок. Наносити мазок треба на охолоджене скло. Культуру, призначену для виявлення джгутиків, треба попередньо протягом декількох днів щодня пересівати на свіжий субстрат: у цих умовах рухливість клітин підсилюється. Культуру беруть із рідкої або зі скошеного агаризованого середовища, до якого перед посівом додали 2–3 мл стерильної води. В останньому випадку культуру відбирають із ділянки, ближче всього розташованої до води. Матеріал розводять у пробірках зі стерильною водою або розбавляють у краплях води, нанесених на чисте покривне скло. Коли досягнуть такого розведення, при якому клітини розташовані більш-менш ізольовано одна від одної (контроль під мікроскопом), наносять петлю суспензії на предметне скло. Мазок на склі розмазують можливо більш тонким шаром, щоб прискорити висихання препарату. При тривалому висиханні бактерії часто гублять джгутики.

Фарбування джгутиків. Висушений препарат обережно фіксують полум'ям. Мазок заливають розчином для протравлення на 15 хв., без нагрівання. Необхідно стежити за тим, щоб весь препарат протягом усього часу протравляння перебував під рідиною. Після закінчення часу протравлювання препарат ретельно промивають водою (над ванночкою або кристаллізатором). Протравлений препарат поміщають мазком униз у годинникове скло з барвником (фуксин Циля: вода – 1:1) на 5 хв. Пофарбований препарат промивають водою, висушують на повітрі й досліджують під мікроскопом з іммерсійною системою.

Рухливість міксобактерій, що пересуваються тільки по щільному субстраті, виявити в препараті „висяча крапля" не вдається. Рух таких бактерій виявляють на агарових плівках. Для готування агарової плівки на нагріте в полум'ї пальника покривне скло наносять із піпетки гаряче розплавлене агаризоване живильне середовище. Покривне скло тримають при цьому похило, так щоб крапля середовища з нього стікала. Стерильним скальпелем зрізують більш товсту ділянку застиглого середовища. У результаті в центрі покривного скла виявляється тонка плівка застиглого живильного агаризованого середовища, на поверхню якого петлею наносять суспензію досліджуваних клітин. Готують препарат „висяча крапля". Якщо клітини рухливі, то вони, зазвичай, повзуть по поверхні агару, роблячи згинальні або качальні рухи.

Виявлення спор у бактерій. Виявлення здатності культури до спороутворення краще проводити в старих культурах. Для визначення способу спороутворення й розташування спори в клітині варто проводити спостереження в динаміці розвитку культури. Спори в бактерій можна виявити при мікроскопуванні препарату „роздавлена крапля" у світлому полі. Спори переломлюють світло сильніше, ніж інша частина клітини, і видимі в клітині як більш темні включення округлої або овальної форми. Однак значно краще для виявлення спор використовувати фазово-контрастний пристрій. У цьому випадку спори мають вигляд дуже світлих (блискучих) включень на тлі майже чорних клітин. Спори можна виявити, застосовуючи особливі методи фарбування. Оболонка спори багатошарова й важкопроникliва, тому при простому фарбуванню клітин спори не зафарбовуються й мають у клітині вид безбарвних включень; вільні спори, тобто спори, що знаходяться поза кліткою, нагадують маленькі кільця. Всі наявні способи фарбування спор засновані на тому, що спочатку сильним барвником із прогріванням фарбують одночасно клітину й спору. Потім протоплазму клітини знебарвлюють, залишаючи спори зафарбованими. Після цього протоплазму фарбують додатково в інший, найчастіше, контрастний колір. Найпоширеніші способи Ожешки й Пєшкова.

Спосіб Ожешки. На знежиреному предметному склі готовлять тонкий мазок бактерій, висушують його на повітрі, не фіксуючи, заливають 0,5%-ним розчином соляної кислоти й підігрівають протягом 2 хв., тримаючи високо над полум'ям пальника до появи парів. Кислоту зливають, препарат промивають водою, мазок закривають фільтрувальним папером і заливають карболовим фуксином Циля. Зафарбовують протягом 5 хв. при нагріванні над полум'ям пальника до появи парів. По мірі випаровування барвника його періодично додають, не даючи препарату підсохнути. Препарат знову промивають водою й обробляють протягом 2 хв. 1%-ним розчином сірчаної кислоти для знебарвлення. Час знебарвлення залежить від особливостей клітин може трохи коливатися. Тому для різних мікроорганізмів бажано визначати час знебарвлення дослідним шляхом. Препарат ще раз промивають водою й дофарбовують розчином метиленового синього 1:40 протягом 10–15 хв. Барвник зливають, препарат промивають водою, висушують і потім мікроскопіюють із іммерсійною системою. При правильному фарбуванні бактеріальні клітини повинні бути синіми, а спори червоними.

Спосіб Пєшкова. На знежиреному предметному склі готовлять тонкий мазок бактерій, висушують його на повітрі й фіксують над полум'ям пальника. На фіксований мазок наливають розчин метиленового синього (по Льоффлеру) і доводять його до кипіння, тримаючи препарат над полум'ям пальника. Кип'ятять протягом 15–20 сек. За мірою випаровування розчину метиленового синього додають нові порції барвника. Препарат ретельно промивають водою, після чого клітини дофарбовують 0,5%-ним водяним розчином нейтрального червоного протягом 30 сек. Барвник зливають, препарат знову промивають дистильованою водою, висушують і дивляться з

іммерсійною системою. При правильному дотриманні всіх стадій обробки й фарбування препарату бактеріальні клітини набувають червоного кольору, а спори синього.

У випадку виявлення в мікроорганізму здатності до утворення спор необхідно відзначати тип спороутворення (бацилярний, клостридіальний або плектридиальний), розташування спори в клітині (центральне, ексцентральне або полярне), форму вільних спор (кругла, еліпсовидна або довгаста) і їхні розміри.

Виявлення капсул. Багато мікроорганізмів, особливо при рості на середовищах, багатих вуглеводами, утворять капсули. Ці структури часто мають консистенцію гелю й погано видні при мікроскопуванні живих клітин. Хімічний склад капсул у різних бактерій неоднаковий. Тому їх не можна виявити яким-небудь одним методом фарбування. Крім того, при фарбуванні капсули легко деформуються. Про наявність капсул можна судити по характерному розташуванню клітин у препараті, тому що в цьому випадку одиночні клітини не стикаються одна з одною. Найчастіше для виявлення капсул застосовують ***спосіб „негативного"*** фарбування (негативного контрастування) за допомогою рідкої туші. При цьому на загальному темному тлі препарату добре видно безбарвні капсули, що оточують клітини мікроорганізмів. Капсули стають видимими завдяки простору, що вони займають, а не в силу їхніх хімічних особливостей.

Виявлення деяких включень у клітинах мікроорганізмів. Метахроматичні гранули (волютин). У клітинах багатьох мікроорганізмів можна виявити метахфоматичні гранули, основним компонентом яких є поліфосфати. У бактерій й актиноміцетів ці гранули локалізовані в цитоплазмі, у дріжджів і грибів – у вакуолях. Як правило, волютину більше в молодих клітинах. Волютин виявляють фарбуванням за *способом Омелянского*. Фарбування засноване на поганій розчинності метахроматичних гранул у розчинах кислот. На знежиреному предметному склі готовлять тонкий мазок бактерій, висушують його на повітрі й фіксують над полум'ям пальника. На фіксований мазок наливають карболовий фуксин Циля й зафарбовують клітини протягом 0,5 хв. без нагрівання. Фарбу зливають, препарат промивають водою й заливають 1%-ним розчином сірчаної кислоти на 20–30 сек. для знебарвлення. Кислоту зливають, препарат промивають водою й додатково зафарбовують метиленовим синім (1:40) протягом 20–30 сек. Препарат ще раз промивають водою, висушують і мікроскопіюють із іммерсійною системою. При правильному фарбуванні зерна волютину мають червоний колір й добре видимі на тлі синьої цитоплазми.

Для виявлення волютину в дріжджах застосовують наступний спосіб. Фіксований над полум'ям пальника мазок зафарбовують метиленовим синім (по Льоффлеру) протягом 3 хв. Фарбу зливають, препарат промивають водою й, не висушуючи, наносять на мазок невелику краплю 1%-ного розчину

сірчаної кислоти; мазок покривають покривним склом і мікроскопіюють. Волютин має вигляд крапель синьо-фіолетових кольорів на слабо-блакитному тлі цитоплазми.

Гранули вуглеводної природи. Деяким мікроорганізмам властиве нагромадження запасних речовин вуглеводної природи, що виявляють у клітині найчастіше у вигляді гранул. Ці речовини виявляють мікрохімічно при обробці клітин розчином Люголя. Для цього до краплі суспензії клітин досліджуваного мікроорганізму на предметному склі додають краплю розчину Люголя. Препарат покривають покривним склом і мікроскопіюють. Гранули крахмалоподібних речовин зафарбовуються в синій, а гранули глікогеноподібних поліцукрів – у червонясто-коричневі кольори.

Фарбування за Грамом й виявлення кислотостійкості

Цей метод є однією з диференційних ознак при вивченні видової приналежності бактерій. При цьому методі використовується дві фарби: генціан-віолет і фуксин. Встановлено, що залежно від хімічного складу (вміст ліпідів, полісахаридів, муреїну, тейхоєвих кислот тощо) та ультраструктури оболонок і мембрани частина бактерій (коки, бацили, мікобактерії, клостридіальні бактерії) офарбовуються грампозитивно (гр$^+$) – синьо-фіолетове забарвлення, інші (спірили, сальмонели, вібріони, псевдомонади, азотбактер, кишкова паличка) – грамнегативно (гр.$^-$) – рожево-червоне забарвлення. Залежно від зазначених факторів у першому випадку спирт не розчиняє сполуку генціан-віолету з розчином Люголя і додатково нанесений фуксин дає фіолетове забарвлення. У другому випадку спирт розчиняє сполуку генціан-віолету з розчином Люголя і препарат фарбується лише фуксином.

Методика фарбування препаратів за Грамом

На фіксований мазок наносять:

1. Генціан-віолет ..... на 2 хв.
   1а. Злити залишок фарби
2. Розчин Люголя..... на 2 хв.
   2а. Злити залишок розчину
3. Етиловий спирт ..... на 30 сек.
4. Промивання водою
5. Фуксин ..... на 1 хв.
6. Промивання водою

Пофарбований препарат необхідно промокнути з обох боків фільтрувальним папірцем, нанести невелику краплю імерсійної (кедрової) олії та мікроскопувати з об. 90^x. При правильному фарбуванні грампозитивні бактерії мають синьо-фіолетові кольори, грамнегативні – червоні кольори фуксину.

Виявлення кислотостійкості. Кислостійкість є властивістю, характерною для мікобактерій і деяких актиноміцетів. Ця властивість виражається в здатності клітин мікроорганізмів, фіксованих і пофарбованих

при підігріванні карболовим фуксином, міцно втримувати фарбування при обробці підкисленим спиртом або розчином мінеральних кислот. Кислотостійкість бактерій зв'язують із особливостями хімічного складу їхньої оболонки. Найбільше поширення, одержав спосіб виявлення кислотостійкості за Циль-Нильсеном. На знежиреному предметному склі готовлять мазок досліджуваної культури, висушують її на повітрі й фіксують над полум'ям пальника. На фіксований мазок поміщають шматочок фільтрувального паперу й наливають поверх нього карболовий фуксин Циля. Мазок з барвником два-три рази підігрівають до появи парів, тримаючи високо над полум'ям пальника. З появою парів препарат відставляють в убік для охолодження. Препарату дають охолонути, знімають фільтрувальний папір, зливають барвник і промивають препарат водою. Для знебарвлення препарат обробляють розчином 5%-ної сірчаної кислоти, занурюючи предметне скло 2–3 рази в склянку з кислотою, не затримуючи його в кислоті. Препарат знову ретельно промивають водою й дофарбовують метиленовим синім (по Льоффлеру) 3–5 хв. Фарбу зливають, препарат ще раз промивають водою, підсушують і досліджують із іммерсійною системою. При правильному фарбуванні кислотостійкі бактерії набувають рубіново-червоного кольору, а всі інші – синього.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Вивчення методик та способів зафарбовування клітин мікроорганізмів

Користуючись даними теоретичної частини вивчити і законспектувати методики приготування фарбованих препаратів, виявлення джгутиків, спор, кислотостійкості клітин. Результати оформити у довільній формі.

Завдання 2 Вивчення культуральних особливостей мікроорганізмів

Описати культуральні особливості колоній, які виросли на чашках Петрі. Результати оформити у вигляді таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Характеристика властивостей колонії

Культуральні властивості колонії	Характеристика

Провести мікроскопію описаних колоній, попередньо пофарбованих, замалювати у звіт їхні морфологічні особливості.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Тема: Морфологія плісеневих грибів

Мета роботи: на основі вивчення культуральних ознак і морфологічної будови визначити родову приналежність представлених на заняття зразків плісеневих грибів методом мікроскопування.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Будова плісеневих грибів

Плісеневі гриби (цвілі) – за своїм розвитком стоять вище не тільки бактерій, але й дріжджів Серед них зустрічаються **одноклітинні** та **багатоклітинні** організми (рисунок 6.1). **Тіло грибів (міцелій, грибниця)** утворено сплетеними тонкими **нитками-гіфами.**

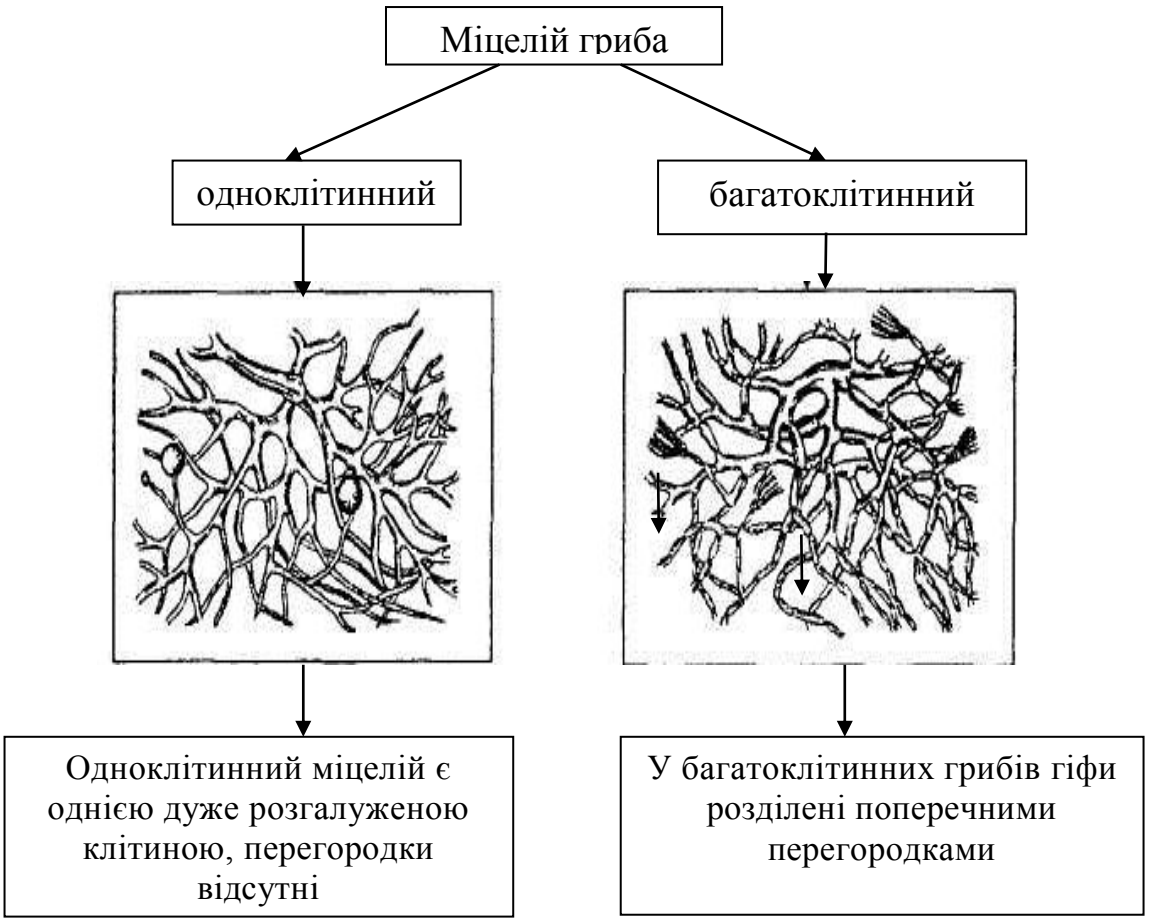
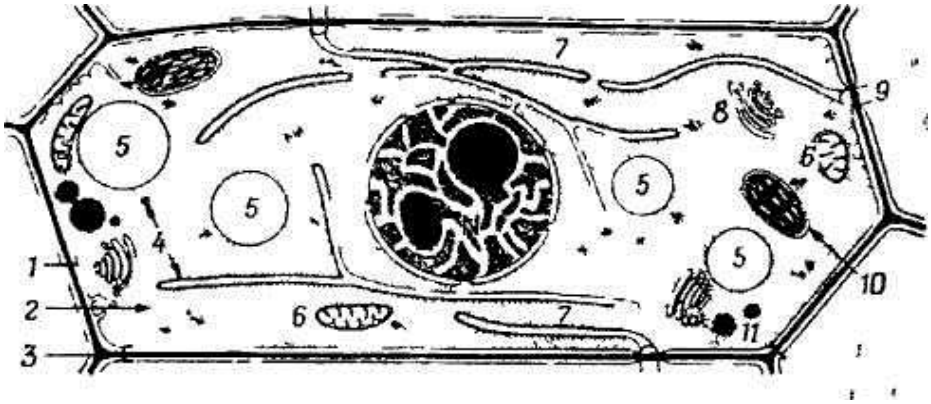


Рисунок 6.1 – Будова тіла гриба

Клітини плісеневих грибів, подібно до дріжджових, мають відокремлене ядро (інколи їх може бути декілька) (рисунок 6.2).



1 – цитоплазматична мембрана, 2 – цитоплазма, 3 – клітинна стінка, 4 – рибосоми, 5 - вакуоль, 6 – мітохондрія, 7 – ендоплазматична сітка, 8 – диктіосоми, 9 – пори з плазмодесмами, 10 – хлоропласт, 11 – жирові краплі

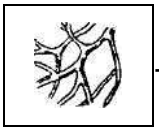
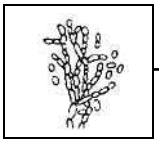
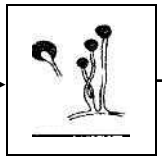
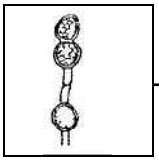
Рисунок 6.2 – Комбіноване схематичне зображення поперечного розрізу еукаріотичної (рослинної) клітини по Зітте (у центрі розташоване ядро)

Шляхи розмноження плісеневих грибів

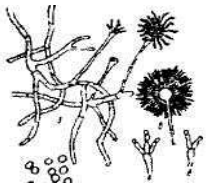
Вегетативний: шматочком міцелію, оїдіуми, спорангіями, конідіями, хламідоспорами, склероціями.

Статевий: зиготою, аскоспорами, базидієспорами

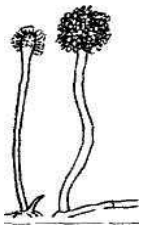
Вегетативне розмноження грибів

шматочком міцелію		Шматочок міцелію, потрапляючи на поживне середовище, розростається
оїдіями		Це окремі клітини міцелію, які відщеплюються від кінця гіф і стають початком нового міцелію
спорангіями		На спорангієносцях утворюються спорангії, всередині яких з'являється безліч спор (ендоспори) Рухомі спори називаються зооспорами
конідіями		Спори (конідії) утворюються ззовні (екзоспори) на конідієносцях відщепленням від стеригм (спеціальні довгасті клітини)
хламідоспорами		Це ущільнені, вкриті товстою оболонкою окремі частини гіф
склероціями		Це тверді, завичай темні утворення з щільно переплетених гіф, вони бувають різних форм і розмірів

Органи нестатевого розмноження, особливо, конідієносці з конідіями, виглядають у різних плісеневих грибів по-різному. На рисунку 5.3 наводяться приклади їх схематичного зображення.

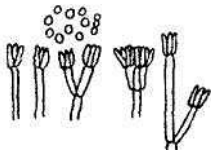


Aspergillus glaucus

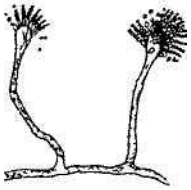


Aspergillus niger

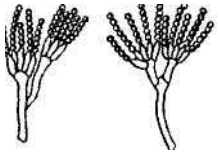
Aspergillus flavus



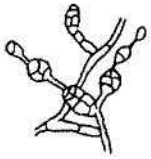
Penicillium vitale



Aspergillus fumigatum



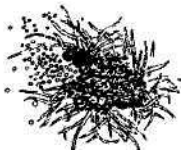
Penicillium notatum



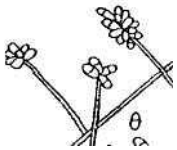
Alternaria

Botrytis

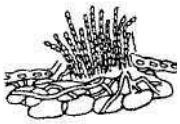
Fusarium



Phoma betae



Trichotecium



Monilia fructigena

Рисунок 6.3 – Органи не статевого розмноження плісеневих грибів

Статевий спосіб розмноження плісеневих грибів

Процесу передує злиття двох клітин, після чого утворюються зигота (рисунок 6.4), аскоспори (рисунок 6.5), базидієспори (рисунок 6.6).

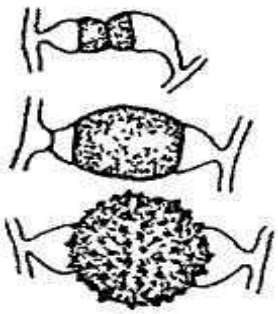


Рисунок 6.4 – Зигота

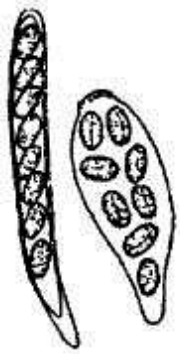


Рисунок 6.5 – Аскоспори

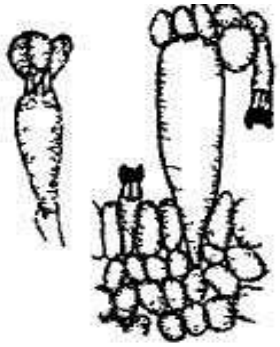


Рисунок 6.6 – Базидієспори

Культуральними ознаками плісеневих грибів є особливості росту на субстраті (харчовому продукті, поживному середовищі, приготовленому для вирощування грибів, або інших об'єктах) Під час розвитку гриба частина гіф укорінюється всередину субстрату, але основна маса міцелію знаходиться на поверхні, оскільки аеробні мікроорганізми потребують кисню. Повітряний міцелій не має забарвлення і може бути у вигляді різних нальотів (пухнастих, шкіряних, павутиноподібних, ватоподібних та ін.). У деяких грибів у період спороношення спостерігається яскраве забарвлення спорангіїв та конідій.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Вивчити культуральні ознаки зразків плісеневих грибів

Користуючись даними теоретичної частини охарактеризуйте особливості еукаріотичної клітини та опишіть способи розмноження плісеневих грибів.

Завдання 2 Вивчити будову міцелію плісеневих грибів

Приготувати препарат „роздавлена крапля" (у суміші спирту і гліцерину) за допомогою препарувальних голок трьох видів плісеневих грибів. Мікроскопувати з об 9^x і 40^x. Можливо мікроскопувати плісеневі гриби безпосередньо в чашках Петрі з об 9^x, знайшовши ділянку, яка добре просвічується світлом. Замалювати препарати плісеневих грибів, зазначивши будову міцелію й органи нестатевого розмноження.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Тема: Методи кількісного визначення мікрофлори

Мета роботи: Ознайомитись з основними методами кількісного обліку мікрофлори. За допомогою лічильної камери Горяєва методом пряного підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом підрахувати кількість дріжджових клітин в 1 г сухих дріжджів

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Методи кількісного обліку мікрофлори

Розрізняють три групи методів щодо кількісного обліку мікрофлори (рисунок 7.1).

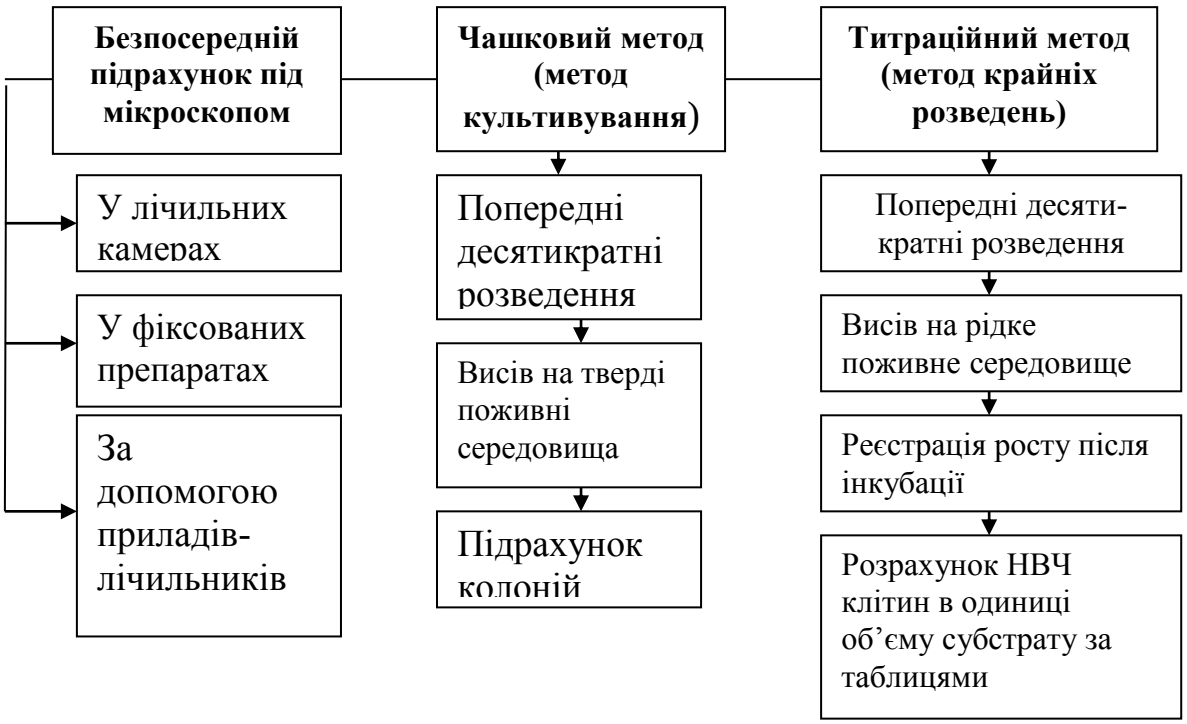


Рисунок 7.1 – Методи кількісного обліку мікрофлори

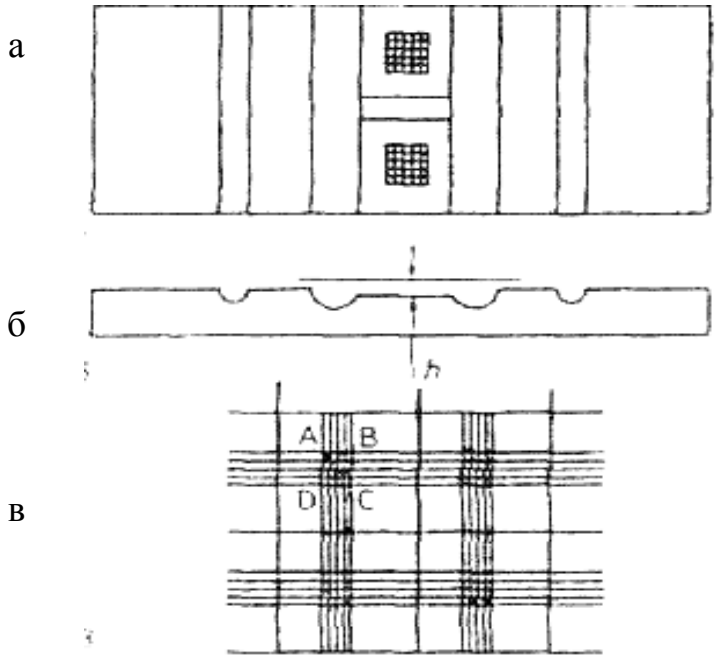
Метод прямого підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом у камерах Горяєва

Лічильні камери застосовують для підрахунку достатньо великих об'єктів – дріжджів, одноклітинних водоростей, спор грибів та деяких відносно великих бактерій. Принцип роботи всіх відомих камер однаковий (Горяєва, Фукс-Розенталя, Тома-Цейса та ін.)

Лічильна камера – це товсте предметне скло, середня частина якого розділена поперечною борозною. На кожній половинці середньої частини скла нанесена сітка для підрахунку мікроорганізмів. Площа сітки розділена на великі та малі квадрати. Існують камери, на предметному склі якої знаходиться не дві, а чотири сітки.

У камері Горяєва, яка найбільш часто використовується для підрахунку мікроорганізмів (рисунок 7.2), площа малого квадрата (ABCD), заштрихованого на рисунку, дорівнює 1/400 мм^2, площа великого квадрата (ABCD) – 1/25 мм^2 (0,04 мм^2) і складається з 16 малих квадратів. Частина скла, на яку нанесена сітка, знаходиться нижче рівня бокових сторін на 0,1 мм (глибина камери зазначається на склі).

Для підрахунку мікробних клітин суспензію, яка містить мікроорганізми, вносять у заглиблення камери і накривають покривним скельцем. Таким чином, є можливість підрахувати мікроорганізми у відомому об'ємі, який визначається глибиною камери (h) і площею квадрата (s). За формулою можна вирахувати кількість мікробів у вихідному матеріалі.



а – вид зверху; б – вид збоку; в – поділ камери на квадрати;
h – глибина камери

Рисунок 7.2 – Лічильна камера Горяєва

Переваги методу:

1. Швидкість.
2. Відсутність методичних труднощів.
3. Цінний у виробничих умовах (наприклад, для контролю накопичення дріжджових клітин), при санітарній оцінці зовнішнього середовища.

Недоліки методу:

1. Підраховуються як живі, так і неживі клітини.
2. При дослідженні субстрату з невеликою кількістю мікробних клітин можливі помилки.

Методика прямого підрахунку дріжджових клітин під мікроскопом у камерах Горяєва

1. Приготувати дріжджову суспензію 0,1% концентрації (0,1 г розвести в 100 мл стерильної води).
2. Невелику краплю дріжджової суспензії нанести скляною паличкою на поверхню лічильної камери (на сітку).
3. Накрити покривним скельцем, притерти великими пальцями до бокових стінок камери, щоб розрахункове значення об'єму камери відповідало об'єму суспензії.
4. Камеру розташувати на предметному столику мікроскопа, встановити об'єктив 8х (10х) і знайти зображення.
5. За допомогою гвинтиків предметного столика знайти будь-який кутовий квадрат сітки. Почати підрахунок клітин дріжджів у 10 великих квадратах, просуваючись по діагоналі. Підрахунок клітин вести всередині квадрата плюс ті, що знаходяться на верхній і правій сторонах.
6. Розрахувати середнє арифметичне значення кількості клітин в квадраті.
7. Кількість клітин в 1 мл суспензії вирахувати за формулою:

$$M=\frac{a*1000}{h*s},$$

де М - кількість клітин в 1 мл суспензії;

a - середнє значення кількості клітин в квадраті;

h - глибина камери в мм;

s - площа великого квадрата сітки в мм^2;

1000мм^3=1мл.

8. Кількість дріжджових клітин в 1 г сухих (або пресованих) дріжджів розрахувати за формулою:

$$X=\frac{M*100}{0{,}1},$$

де Х - кількість дріжджових клітин в 1 г сухих (або пресованих) дріжджів;

М - кількість клітин в 1 мл суспензії;

100 мл — об'єм мірної колби;

0,1 г - наважка сухих (пресованих) дріжджів.

По закінченні роботи лічильну камеру промити водою і протерти серветкою.

Приклад розрахунку. В десяти квадратах відповідно було підраховано клітин дріжджів: 31, 28, 44, 27, 30, 32, 35, 40, 29, 34. Середнє арифметичне значення – 330:10=33. Вираховуємо за формулою:

М=(33х1000):(0,1х0,04)=33000:0,004=8250000=8,25х10^6

клітин в 1 мл суспензії. Х= 8,25х10^{6}х100:0,1=8,25х10^9 клітин в 1 г сухих (пресованих) дріжджів.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Ознайомитись з методами кількісного обліку мікрофлори

Користуючись даними теоретичної частини законспектувати методи кількісного обліку мікрофлори.

Завдання 2 Вивчити метод прямого підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом у камерах Горяєва

Підрахувати кількість клітин в 1 мл 0,1% дріжджової суспензії методом прямого підрахунку в камері Горяєва. Розрахувати кількість клітин в 1 г сухих (пресованих) дріжджів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Тема: Метод культивування мікроорганізмів (чашковий). Санітарно-бактеріологічний контроль об'єктів зовнішнього середовища

Мета роботи: на підставі опанування чашкового методу обліку мікрофлори визначити мікробне число повітря дослідних приміщень та санітарний стан інвентарю, посуду і рук.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Метод культивування мікроорганізмів (чашковий, метод підрахунку колоній, метод висіву на тверді поживні середовища)

Визначення кількості мікроорганізмів методом культивування проводиться за такими етапами:

1. Підготовка матеріалу для дослідження.
2. Методика приготування десятикратних розведень матеріалу.
3. Висів у чашки Петрі й культивування посівів.
4. Облік вирощених колоній і розрахунок кількості мікроорганізмів

(в 1 г або в 1 $см^3$ продукту, на 1 $см^2$ поверхні, на руках, посуді тощо).

Підготовка матеріалу для дослідження

Характер підготовки матеріалу для мікробіологічного дослідження залежить від його природи, консистенції та інших властивостей.

• Тверді продукти не розчинні у воді (хліб, сир, печиво та ін.) За чинним стандартом відбирають середню пробу для аналізу. З середньої проби на стерильний папір або скло відбирають наважку. Розмір наважки визначається гаданим ступенем забрудненості продукту. Наважку переносять у стерильну ступку заливають 1–2 см стерильної води і ретельно перемішують стерильним макогончиком. Отриману масу переносять у стерильну колбу з визначеним об'ємом стерильної води. Залежно від розміру наважки і кількістю води отримують вихідну суспензію або розведення.

Наприклад, наважку ковбаси у 10 г перенесли у колбу і долили стерильною водою до позначки 100 см^3. Таким чином отримали розведення 1:10. Якби цю ж наважку у 10 г перенесли у пробірку і долили води до об'єму 10 см^3, то отримали б вихідну суспензію або так зване пряме розведення.

• Тверді продукти розчинні у воді (сіль, цукор тощо). Із середньої проби беруть наважку і розчиняють у визначеній кількості стерильної води, щоб отримати розведення 1:10 або 1:100.

• Рідкі продукти (сік, молоко, вода тощо). Такий матеріал є готовою вихідною суспензією.

Методика приготування десятикратних розведень матеріалів

Часто буває неможливим підрахувати колонії на чашці Петрі при прямому висіві об'єкта. Щоб зменшити кількість мікроорганізмів при висіві, вихідну суспензію розводять стерильною водою.

1.До пробірок наливають по 10 см^3 води і стерилізують в автоклаві (після стерилізації у кожній пробірці залишається 9 см^3 води).

2.Стерильною піпеткою беруть 1 см^3 підготовленої вихідної суспензії та вносять до пробірки з 9 см^3 стерильної води. Таким чином отримують перше розведення суспензії 1:10.

3.Далі новою стерильною піпеткою беруть із першого розведення 1 см і вносять таким же чином в наступну пробірку з 9 см^3 стерильної води, тобто готують друге розведення 1:100.

Аналогічним чином готують третє, четверте і наступні розведення (номер розведення співпадає з кількістю нулів у знаменнику).

Схема десятикратних розведень і висіву дослідного матеріалу наведена на рисунку 8.1.

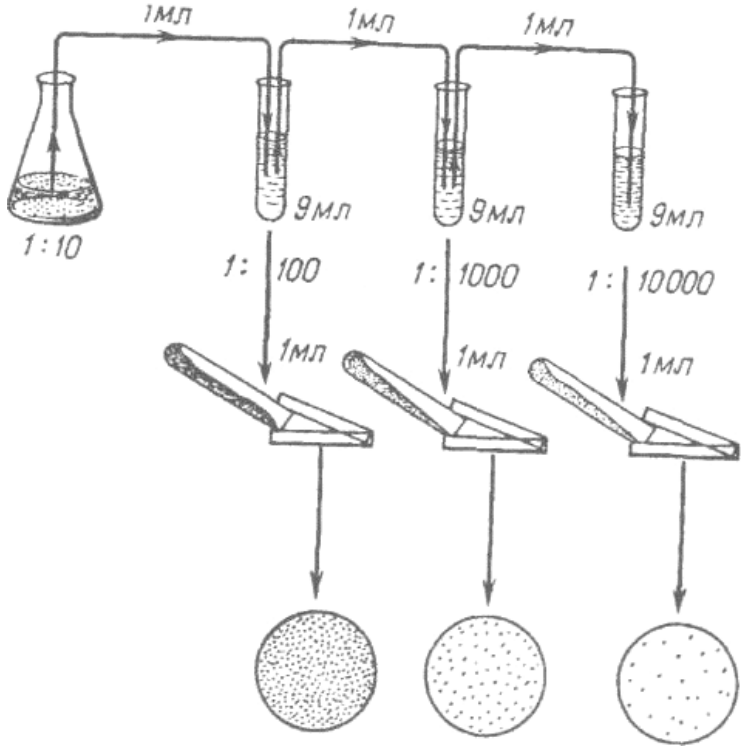


Рисунок 8.1 – Схема розведення і висіву дослідного матеріалу при визначенні мікробного числа чашковим методом

Висів у чашки Петрі й культивування посівів

1. Підписують чашки Петрі (обов'язково зазначають розведення та інші необхідні дані) і висівають в них стерильною піпеткою по 1 $см^3$ відповідного розведення матеріалу, починаючи з найбільшого, тобто з того, де є найменша кількість мікроорганізмів

2. Посіви заливають стерильним розплавленим і охолодженим до температури 48...50°С поживним середовищем та перемішують круговими рухами, не відриваючи чашку від столу.

3. Після застигання агару чашки перевертають догори дном і ставлять у термостат для культивування мікроорганізмів. Для вирощування МАФАМ використовують МПА (температура 37°С, час – 24-48 год.), для дріжджів і плісеневих грибів використовують сусло-агар (температура 25...27°С, час – 5–7 діб).

Облік вирощених колоній і розрахунок кількості мікроорганізмів

Найкращими для підрахунку вважаються чашки, на яких виросло від 15 до 300 колоній (ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных азробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов). В інших джерелах наводяться інші числа: від 50 до 100 [Леріна, Педенеко, 1980] і від 50 до 150 [Градова и др., 2001]. Зазвичай висівають по дві паралельні чашки кожного розведення. Кількість підрахованих колоній помножають на відповідне розведення, беруть середнє арифметичне двох паралельних чашок, потім загальне середнє арифметичне всіх підрахованих чашок і, таким чином, отримують остаточний результат, тобто вміст мікроорганізмів в 1 $см^3$ вихідної суспензії. Знаючи об'єм суспензії та масу наважки, взятої для її приготування, вираховують кількість мікроорганізмів в 1 г або в 1 $см^3$ продукту.

Приклад. На двох паралельних чашках при розведенні 1:10 виросла велика кількість колоній, які неможливо підрахувати. На чашках із розведенням 1:100 виросло відповідно 270 і 230 колоній, при розведенні 1:1000 – 15 і 20, при розведенні 1:10 000 – 2 і 5 колоній. У цьому випадку відбираємо для підрахунку чашки з розведеннями 1:100 і 1:1000. Підраховану кількість колоній множимо на розведення і беремо середнє арифметичне: [(270х100)+(230х100)]:2=25000 і [(15х1000)+(20х1000)]:2=17500.

Чашки з розведенням 1:10000 не враховуємо, тому що на них виросло менше 15 колоній.

Визначаємо кількість мікроорганізмів як середнє арифметичне усіх чашок, які були взяті для підрахування: (25000+17500):2=21250=$2{,}13х10^4$.

Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря закритих приміщень

Повітря є несприятливим середовищем для життєдіяльності мікроорганізмів. Однак, як правило, у повітрі закритих приміщень знаходять ґрунтові сапрофіти, а також мікроорганізми, які виділяються слизовими оболонками дихальних шляхів людини, тобто повітря є транзитним середовищем. Мікрофлора може бути представлена патогенними та умовно-

патогенними мікроорганізми, які довгий час зберігають інфекційну активність у повітрі. Санітарно-бактеріологічний стан повітря закритих приміщень визначається:

1. Загальною кількістю мікробів, які знаходяться в 1 $м^3$ повітря (мікробне число).

2. Кількістю санітарно-показових мікробів (гемолітичних стрептококів і патогенних стафілококів) в 1 $м^3$ повітря.

За орієнтирними критеріями повітря жилих приміщень вважають чистим при вмісті в 1 $м^3$ його до 1500 бактерій і 16 стрептококів, забрудненим – при 2500 бактерій і 38 стрептококів

Для мікробіологічного дослідження повітря застосовують методи, в основу яких покладено осадження (седиментація) й аспірація. За допомогою седиментаційних методів можна отримати загальну уяву про мікрофлору повітря. Аспіраційні методи дають можливість визначити не тільки якісний склад, але й кількісний вміст бактерій у певному об'ємі повітря.

Метод осадження (седиментації)

1-й день – початок дослідження

1.Чашку із застиглим м'ясо-пептонним агаром переносять у досліджуване приміщення і розміщують на розгорнутому папері, в якому вона стерилізувалась.

2.Не перевертаючи чашки, здвигають кришку на край таким чином, щоб вся поверхня чашки з МПА була повністю відкрита, і витримують 5 хв.

3.Чашку закривають кришкою і ставлять у термостат при температурі 37°С на 24–48 год. для культивування мікроорганізмів.

2-й день – завершення дослідження

1. Вивчають культуральні ознаки (особливості росту на поживних середовищах) різних колоній (ізольоване скупчення клітин одного виду, що виросло з однієї клітини), які виросли на чашці Петрі й описують їх у звіті.

2. Мікроскопують описані колонії, приготувавши фіксовані фарбовані за Грамом препарати, замальовують і визначають морфологічні ознаки.

Метод осадження може бути використаний для кількісного підрахунку мікрофлори повітря закритих приміщень (але ніяк не атмосферного повітря, де має місце коливання швидкості руху повітря) лише в тих випадках, коли відсутнє джерело електроенергії, внаслідок чого неможливо застосування аспіраційного методу.

Для підрахування мікробного числа повітря закритих приміщень користуються формулою В.Л. Омелянського, згідно з якою на поверхню 100 $см^2$ осідає за 5 хв стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 10 л ($дм^3$) повітря.

$$X = \frac{a*100*1000*5}{b*10*t},$$

де X — кількість мікробів в 1 м^3 повітря;
a – кількість колоній, що виросли на чашці Петрі;
b – площа чашки Петрі (3,14 х 52 = 78,5 см^2);
t – час експозиції в досліді, хв;
5 – час експозиції за Омелянським, хв.;
10 – об'єм повітря, з якого відбувається осадження за 5 хв., за Омелянським, л;
100 – площа, на яку відбувається осадження мікробів за Омелянським, см^2;
1000 – перерахунок на 1 м^3 повітря.
Після скорочення формула виглядає наступним чином, якщо експозиція чашки під час досліду дорівнювала 5 хв.

$$X = \frac{a*100*100}{b}$$

Аспіраційний метод

Аспіраційні методи основані на уловлюванні бактерій рідиною. Серед приладів для дослідження повітря приміщень найпоширенішим є прилад Кротова. Механізм уловлювання мікрофлори засновується на ударно-прибивній дії струменя повітря, який проходить крізь клиноподібну щілину і з великою швидкістю стукається об вологу поверхню поживного середовища.

Основними елементами апарату Кротова (рисунок 7.2) є збудник аспірації (електромотор з відцентровим вентилятором), прибор для визначення об'єму протягнутого повітря (мікроманометр) та диск, який обертається, і на який встановлюється відкрита чашка Петрі з твердим поживним середовищем. Корпус прибору герметично закривається кришкою, центральна частина якої є прозорий диск із плексигласу з клиноподібною щілиною (ширина 0,1 мм біля центру).

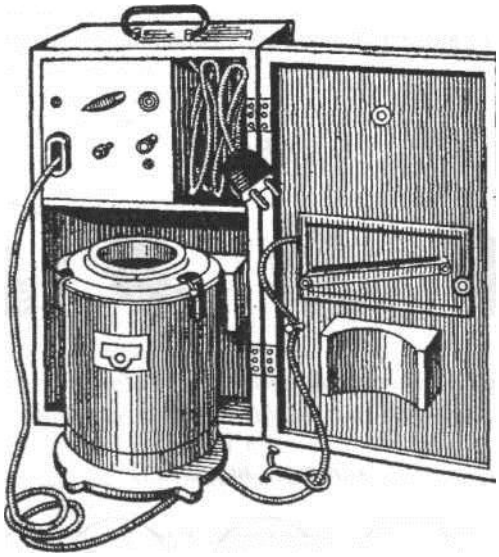


Рисунок 8.2– Апарат Кротова

Під час відбору проби повітря відкрита чашка Петрі обертається разом з диском апарату, завдяки чому досягається рівномірне засівання поверхні агару мікрофлорою повітря. Апарат дозволяє пропускати від 20 до 40 л ($дм^3$) повітря за хвилину. Загальний об'єм пропущеного через апарат повітря для аналізу різний і залежить від виду приміщення. Проби повітря необхідно відбирати на рівні людини, яка сидить або стоїть.

Методика досліду мікрофлори повітря аспіраційним методом на апараті Кротова

1-й день – початок дослідження

1.Підписати дві чашки Петрі.

2.Відкрити кришку апарату і закріпити на диску відкриту чашку Петрі із застиглим МПА.

3.Закрити кришку прибору, включити апарат в електромережу, встановити швидкість просочування повітря 25 л/хв і відмітити початковий час аспірації.

4.Провести забір 100 л повітря (час роботи апарата – 4 хв.).

5.Аналогічно провести дослід з паралельною чашкою.

6.Інкубацію посівів провести в термостаті при температурі 37°С упродовж 24–48 год.

2-й день – завершення дослідження

1. Підрахувати кількість колоній на кожній з двох чашок Петрі.
2. Вирахувати середнє арифметичне кількості колоній на двох паралельних чашках.
3. Визначити мікробне число (Х) повітря даного приміщення за формулою:

$$X = a * 10$$

де а – середнє арифметичне кількості колоній в 100 л повітря, 10 – коефіцієнт перерахунку на 1 $м^3$ (1 $м^3$=1000 л).

Мікробіологічні дослідження методом змиву

Забруднені поверхні різних предметів можуть бути джерелом зараження харчових продуктів збудниками мікробного псування, а також мікрофлорою, патогенною для людини. Тому поверхні предметів, які використовуються у виробничих процесах, при зберіганні й реалізації харчових продуктів і кулінарних виробів підлягають санітарно-бактеріологічному контролю.

Недотримання правил особистої гігієни на підприємствах харчової промисловості, торгівлі та ресторанного бізнесу може призвести до повторного забруднення харчових продуктів при їх обробці, реалізації тощо як сапрофітною, так і патогенною мікрофлорою. Санітарно-бактеріологічним контролем дотримання особистої гігієни персоналом є дослідження чистоти рук методом змиву.

Про мікробну забрудненість предметів (обладнання, виробничого інвентарю, посуду, одягу тощо) судять за загальною кількістю мікроорганізмів на одиницю поверхні (зазвичай – на 1 $см^2$), а також за наявністю кишкових паличок як показника фекального забруднення.

За сучасними рекомендаціями санітарний стан поверхонь вважається відмінним, якщо загальна кількість мікроорганізмів на 1 $см^2$ від 0 до 100, добрим - при кількості мікробів від 100 до 1000, задовільним - більше 1000, незадовільним - більше 10 000. У досліджених змивах не має бути кишкових паличок, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів. їх присутність свідчить про грубе порушення санітарних правил і потребує проведення термінових профілактичних заходів.

Методика проведення мікробіологічних досліджень методом змиву

1-й день – початок дослідження

Для визначення загального мікробного забруднення провести змив з поверхні столу (халата, обладнання тощо):

1. Простерилізувати (обмокнути у спирт і запалити) рамку-шаблон (трафарет), який обмежує певну площу (наприклад, 25 $см^2$).
2. Обмежити поверхню столу стерильним трафаретом і стерильним тампоном, змоченим у 10 $см^3$ стерильної води (фізіологічного розчину) в пробірці змити цю поверхню.
3. Повторити дії п. 2 ще у трьох місцях столу, щоб загальна площа змитої поверхні склала 100 $см^2$.
4. Занурити тампон у пробірку з водою і струшувати вручну упродовж 3 хв.
5. В умовах стерильності відібрати стерильною піпеткою 1 мл суспензії та внести на дно стерильної попередньо підписаної чашки Петрі.

6 Залити в чашку Петрі розплавлений і охолоджений до температури 48...50°С МПА, перемішати середовище і суспензію круговими обертами, не відриваючи від столу.

7. Після застигання агару перевернути чашку догори дном і поставити у термостат для культивування мікроорганізмів при температурі 37°С на 24–48 год.

2-й день – завершення дослідження

Визначити мікробне число дослідженої поверхні (кількість мікроорганізмів на 1 $см^2$ площі).

1. Підрахувати кількість колоній, які виросли на чашках з МПА.
2. Вирахувати мікробне число за формулою:

$$M = \frac{n*10}{s},$$

де:

М – мікробне число;

n – кількість колоній на чашці:

10 – вихідне розведення змиву;

S – площа змиву, $см^2$.

3. Описати культуральні ознаки колонії.

4. Провести мікроскопування описаних колоній бактерій, визначити їх форму, спороутворюючу здатність і фарбування за Грамом.

Для оцінки санітарного стану поверхн1 обладнання та інвентарю користуються наступною шкалою:

Кількість мікроорганізмів на 1 $см^2$ поверхні (МАФАМ, КУО)	Оцінка чистоти
Від 0 до 100	Добре
101-1000	Задовільно
Понад 1000	Незадовільно

З метою дотримання чистоти інвентарю та посуду здійснюють змиви з усієї поверхні, яка торкається продукту. Методика проведення дослідження аналогічна змиву з поверхні, але кількість МАФАМ визначають на одній тарілці, на одному стакані, на виделці тощо, тобто підраховану кількість колоній на чашці помножають на 10 (на вихідне розведення змиву).

Змиви з рук проводять за аналогічною методикою, протираючи стерильним тампоном спочатку тильні сторони кисті обох рук, потім долоні, місця між пальцями та нігтеві ложа. Окрім загальної кількості мікроорганізмів (МАФАМ) у змивах з рук визначають наявність (колі-титр) або відсутність бактерій групи кишкової палички методом крайніх розведень.

Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 $см^3$ змиву (при відсутності бактерій групи кишкової палички).

Кількість мікроорганізмів на 1 $см^2$ змиву з рук (МАФАМ, КУО)	Оцінка чистоти
1000	Відмінно
1000–5000	Добре
5000–10000	Задовільно
Понад 10000	Незадовільно

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1 Ознайомитись з методами санітарно-біологічного контролю об’єктів зовнішнього середовища

Користуючись даними теоретичної частини законспектувати методи санітарно-біологічного контролю об’єктів зовнішнього середовища.

Завдання 2 Провести змиви з поверхні столу, рук, посуду (тарілки, стакана, ложки тощо).

Провести розрахунки кількості МАФАМ у змивах. Визначити санітарний стан поверхні досліджених об’єктів. Описати культуральні ознаки колоній, які виросли на чашках Петрі. Провести мікроскопію описаних колоній, замалювати в звіт, встановивши їх морфологічні ознаки і фарбування за Грамом.

Рекомендована література

1. Рудавська Г.Б., Ларіна І.В., Демкевич Л.І. Мікробіологія. – К.: КНТЕУ, 2001. – 324 с.
2. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471с.
3. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа. – 1992. – 431 с.
4. Леонов Н.Р.Микробиология. – 2е изд. перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1989. – 351с.
5. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2002. – 352 с.
6. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. К.: Либідь, 2001. – 312 с.
7. Воробьёва Л.И. Промышленная микробиология. Учебн. пособие. М.: МГУ, 1989. – 294 с.
8. Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.Я. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 312с.
9. Мудрецова-Висс К.А., Чистяков Ф.М. Микробиология. Учебник для товароведч. и технол. фак. торг. ВУЗов. М.: Экономика, 1971. – 263 с.
10. Нейман Б.Я. Индустрия микробов. М.: Знание, 1983. – 208 с.
11. Основы микробиологии, физиологии питания и санитарии для общепита. – Ростов-на-Дону, „Феникс”, 2000. – 384 с.
12. Промышленная микробиология. Под. ред. Н.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989.– 688 с.
13. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясопродуктов /3-е изд. исп. - М.: Колос, 2000. – 240 с.
14. Утевский Н.Л. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1975. – 471 с.
15. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
16. Великая Е.И., Суходол В.Ф. Лабораторный практикум по курсу общей технологии бродильных производств (общие методы контроля). – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 312 с.
17. Ларина И.В., Педенко А.И. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. -М.: Экономика, 1980. – 150 с.
18. Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям: Учебное пособие для студентов фармацевтических ВУЗов и фармацевтических факультетов медицинских институтов / И.Л. Дикий, И.И. Сидорчук, И.Ю. Халтуняк и др. - К.: “Профессионал”, 2004. – 594 с.
19. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под. ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1983. – 221 с.
20. Слисаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 207 с.
21. Garpenter P.L. Microbiology, 2-nd editon. Philadelpfia and London, 1967. – 825 p.
22. . https://library.udpu.edu.ua/library_files/6399_01.pdf