

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Київський національний університет будівництва і архітектури

БІОЛОГІЯ. МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня
вищої освіти за спеціальностями 101 «Екологія»,
183 «Технологія захисту навколишнього середовища»
та 076 «Підприємство та торгівля»

Київ 2025

УДК 579.2

Б63

Укладачі: А. Р. Перебинос, канд. техн. наук;
Т. І. Кривомаз, доктор техн. наук, професор.

Рецензент О. Г. Жукова, канд. техн. наук, доцент.

Відповідальний за випуск Т. М. Ткаченко, д-р техн. наук,
професор, завідувач кафедри.

*Затверджено на засіданні кафедри технологій захисту
навколишнього середовища та охорони праці, протокол № 11 від
4 березня 2025 року.*

В авторській редакції.

Біологія. Мікробіологія [Електронний ресурс]: методичні
Б63 вказівки до виконання лабораторних робіт / уклад. : А. Р. Перебинос,
Т. І. Кривомаз. – Київ : КНУБА, 2025. – 61 с.

Містять зміст, порядок оформлення і вказівки до виконання
лабораторних робіт.

Призначено для здобувачів першого (бакалаврського) рівня
вищої освіти за спеціальностями 101 «Екологія», 183 «Технологія
захисту навколишнього середовища» та 076 «Підприємство та
торгівля».

©КНУБА, 2025

ЗМІСТ

Загальні положення	4
Лабораторна робота № 1. Вступне заняття: правила роботи в біологічній лабораторії та підготовка обладнання.....	5
Лабораторна робота № 2. Підготовка лабораторного посуду для проведення лабораторних робіт. Методи стерилізації та їх класифікація	10
Лабораторна робота № 3. Приготування поживного середовища для досліджень проб повітря.....	18
Лабораторна робота № 4. Дослідження мікрофлори повітря.....	23
Лабораторна робота № 5. Загальні методи виділення в чисту культуру та правила культивування грибів.....	27
Лабораторна робота № 6. Вивчення культуральних і морфологічних ознак живих мікроорганізмів за допомогою мікроскопу в пробах повітря.....	34
Лабораторна робота № 7. Приготування поживного середовища для досліджень проб ґрунту.....	43
Лабораторна робота № 8. Дослідження мікрофлори ґрунту.....	44
Лабораторна робота № 9. Вивчення культуральних і морфологічних ознак живих мікроорганізмів за допомогою мікроскопу в пробах ґрунту.....	48
Лабораторна робота № 10. Приготування поживного середовища для досліджень проб води.....	49
Лабораторна робота № 11. Кількісний облік бактерій в пробах води. Визначення колі-титру і колі-індексу кишкової палички.....	50
Лабораторна робота № 12. Мікробіологічне дослідження твердих поверхонь методом змивів.....	53
Список літератури.....	56
Додаток.....	57

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Дисципліни «Біологія» і «Мікробіологія» входять до циклу природничо-наукової підготовки здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти технічних навчальних закладів. Важливість засвоєння програми цієї дисципліни майбутніми фахівцями пов'язана з тим, що життєдіяльність мікроорганізмів лежить в основі багатьох природних та антропогенних процесів. Теоретичний курс доповнюється лабораторним практикумом, який має навчити здобувачів основам експериментальної мікробіології: приготуванню поживних середовищ, відбору проб, культивуванню мікроорганізмів, виготовленню мікробіологічних препаратів, мікроскопуванню тощо.

Лабораторний практикум складається з 12 лабораторних робіт, кожна з яких містить відповідний теоретичний матеріал, експериментальну частину та контрольні запитання.

Матеріал для кожного заняття викладається в такій послідовності: коротко сформульовано мету лабораторного заняття, наведено перелік необхідного обладнання та матеріалів, викладено теоретичний матеріал по темі, визначено конкретне завдання і порядок його виконання, подані рекомендації з оформлення результатів досліджень. По кожній темі розроблено контрольні запитання, які допоможуть здобувачам добре підготуватися до захисту лабораторної роботи.

У додатку наведено відомості з приготування деяких поживних середовищ та барвників.

Зважаючи на складність деяких методів і тривалості вирощування мікроорганізмів, в окремих випадках частина лабораторного матеріалу готується заздалегідь співробітниками кафедри. Послідовність виконання та кількість лабораторних робіт є рекомендованою та може змінюватися викладачами в залежності від поточного навчального навантаження.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Тема. Вступне заняття: правила роботи в біологічній лабораторії та підготовка обладнання

Мета роботи: ознайомитися з роботою біологічної лабораторії та підготуватися до виконання лабораторного практикуму.

Обладнання для проведення заняття: мікроскоп біологічний, термостат, сушильна шафа, стерилізатор повітряний, автоклав, центрифуга, шафа витяжна лабораторна.

Матеріали для проведення заняття: чашки Петрі, колби різного розміру, пробірки різного розміру, мікробіологічна петля, мікробіологічна голка тощо.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Правила техніки безпеки при роботі в біологічній лабораторії:

1. Кожен студент в лабораторії працює на постійному місці, виконуючи завдання індивідуально, якщо інше не вказано в описі виконання лабораторної роботи.
2. На робочому місці не повинно бути сторонніх предметів. Особисті речі слід зберігати в спеціально відведеному місці.
3. Студент повинен працювати в халаті, шапочці або косинці.
4. Забороняється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
5. У лабораторії категорично забороняється прийом їжі та зберігання продуктів харчування.
6. Не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів).
7. Перед початком роботи обов'язково перевіряють наявність і справність приладів, посуду, пальників та ін. Про помічені несправності повідомляють викладачеві.
8. При роботі з електроприладами не відключати прилад мокрими руками. У разі несправності приладу (нагрівання, іскріння, замикання)

його необхідно негайно ж знеструмити і повідомити про те, що трапилося викладачеві.

9. Забороняється працювати з несправним обладнанням, йти з робочого місця при проведенні дослідження.

10. При розплавленні щільних поживних середовищ необхідно користуватися водяною банею, попередньо послабивши пробки в колбах. Кип'ятіння розчинів на електроплитці відбувається на азбестових прокладках в термостійких колбах.

11. При роботі з культурами мікроорганізмів необхідно дотримуватися всіх правил мікробіологічної техніки: на пробірках, колбах, чашках Петрі повинний бути зроблений напис, що містить дату посіву, назву дослідження, місце відбору проб (за необхідності), прізвище студента і номер групи.

12. Мікробну культуру з пробірки або чашки Петрі слід відбирати з дотриманням правил асептики, тобто дотримуватися заходів, спрямованих на запобігання проникненню мікроорганізмів з навколишнього середовища.

13. Всі маніпуляції при посіві слід проводити за склом у витяжній шафі. Не можна робити різкі рухи і ходити близько особи, яка працює з чистою культурою, так як рух повітря збільшує ймовірність випадкового її забруднення.

14. Не залишати відкритими чашки Петрі, пробірки, колби з культурами мікроскопічних грибів та бактерій.

15. Суворо дотримуватися правил поводження з хімічними реактивами та барвниками.

16. Якщо в момент пересіву ватяна пробка впаде на підлогу або на стіл, то не слід знову вставляти її в пробірку, її потрібно замінити на нову стерильну пробку.

17. Всі предмети, використані при роботі з живими культурами, повинні бути знезаражені. З цією метою їх обпалюють в полум'ї спиртівки або за допомогою електричної системи стерилізації (петлі, голки), або занурюють у дезінфікуючий розчин (предметне і покрівельне скло, піпетки, шпателі та ін.).

18. Всі засіяні пробірки, чашки поміщаються в термостат або здаються черговому, відпрацьований матеріал (пробірки, чашки Петрі) також поміщаються в певні ємності за вказівкою викладача для їх подальшого знезараження.

19. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторії.

20. У кінці заняття студент повинен привести в порядок робоче місце, ретельно вимити руки з триразовим намилюванням.

21. Кожен студент повинен вести зошит лабораторних робіт, що є документом, що дозволяє контролювати правильність отриманих результатів. Записи проводяться в певній послідовності і повинні містити наступне: номер, назва та мета роботи, дату постановки і закінчення досліду; короткі теоретичні відомості; умови проведення досліду, включаючи опис методів дослідження; отримані результати і висновки.

Робота в біологічній лабораторії вимагає суворого дотримання спеціальних правил, що обумовлено двома основними причинами. По-перше, в мікробіологічній практиці використовують, головним чином, чисті культури мікроорганізмів, тобто популяції мікроорганізмів одного, які є потомством однієї клітини. Оскільки в повітрі, на поверхні предметів, що оточують нас, на одязі, руках, волоссі завжди наявна велика кількість різноманітної мікрофлори, то для забезпечення стерильності досліджень і щоб уникнути забруднення культур робота повинна проводитися з дотриманням правил асептики. По-друге, при роботі з неідентифікованими мікроорганізмами, при їх виділенні з об'єктів навколишнього середовища та техногенних потоків, можуть бути виділені патогенні і умовно патогенні мікроорганізми. Крім того, клітини мікроорганізмів можуть бути алергенами для певних індивідумів.

Інструменти та посуд, що застосовуються в біологічній лабораторії

У лабораторії мікроорганізми вирощують на щільних і рідких поживних середовищах, які розливають в пробірки, колби і чашки Петрі (рис. 1.1). В пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на щільних середовищах. Рідким середовищем для аеробних культур заповнюють зазвичай 1/3 пробірки, для анаеробних - 2/3. При вирощуванні мікроорганізмів в колбах використовують тільки рідкі поживні середовища. Для культивування аеробних мікроорганізмів середовище наливають тонким шаром (наприклад, 30 мл в колби Ерленмейера на 100 мл), для вирощування анаеробних мікроорганізмів колбу заповнюють на 2/3. Пробірки та колби також використовують для зберігання поживних середовищ. Чашки Петрі застосовують для вирощування культур мікроорганізмів на щільних поживних середовищах. Вони мають висоту близько 1,5 см і діаметр близько 8-10 см (діаметр кришки дещо більше, ніж діаметр нижньої чашки).

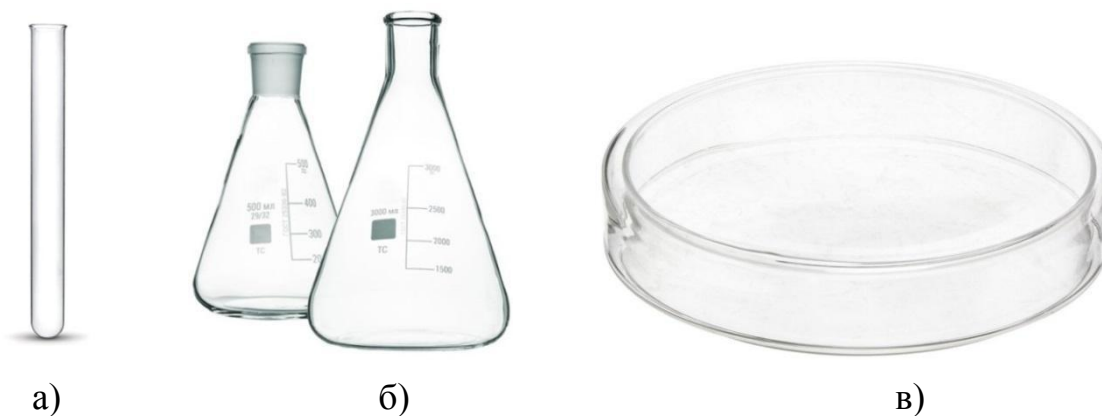


Рис. 1.1. Посуд для культивування мікроорганізмів:
а – пробірка; б – колба; в – чашка Петрі

Для посіву штрихом використовують бактеріологічні петлі (рис. 1.2). Їх виготовляють з платиного дроту, яку закріплюють в спеціальних металевих тримачах або впаюють в скляні палички. Товщина голок і петель не повинна перевищувати 0,5 мм, шпателя - 1,5 мм і більше. При посівах (і пересівах) культур мікроорганізмів з колоній, що виростили на щільних середовищах, застосовуються голки або шпателі. Шпателі також використовують для взяття клітин з колоній, які вросли в субстрат, і для розмазування рідких культур на поверхні щільного поживного середовища. Суспензії мікроорганізмів беруть петлею

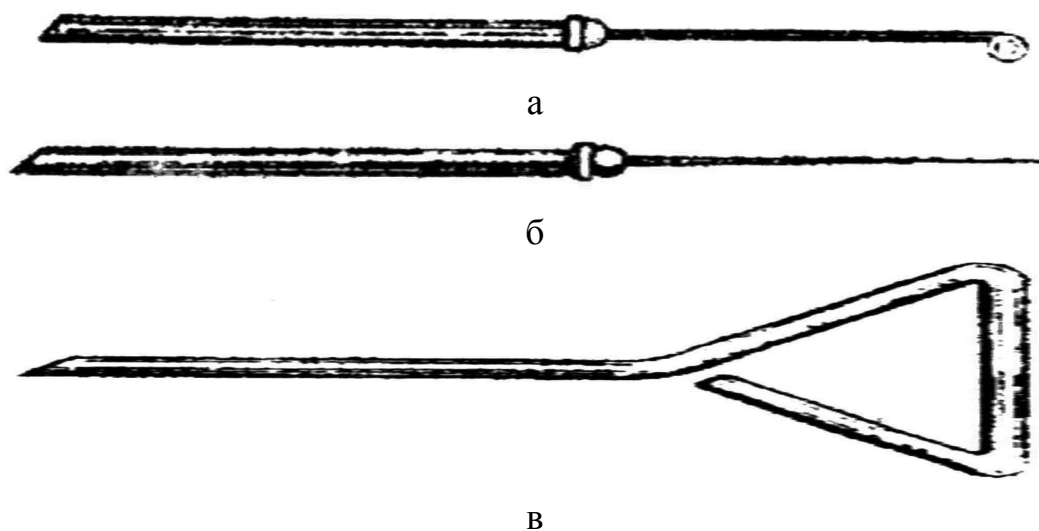


Рис. 1.2. Інструменти для посіву мікроорганізмів:
а – мікробіологічна петля; б – мікробіологічна голка; в – шпатель

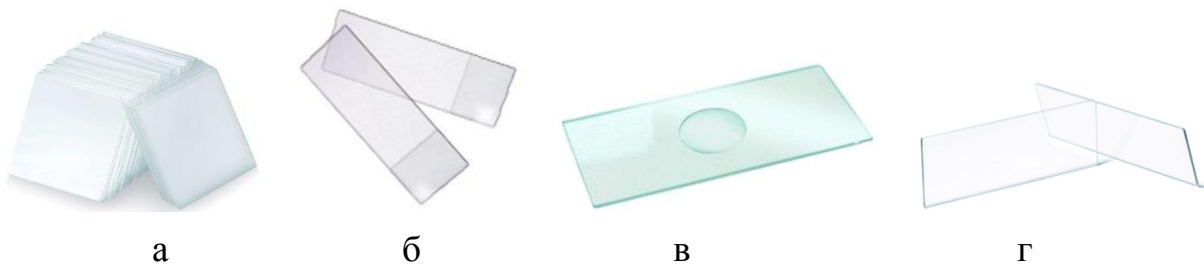


Рис. 1.3. Види скелець для приготування препаратів:
 а – покрівельне скло; б – предметне скло зі шліфовкою;
 в – предметне скло з лункою; г – звичайне предметне скло

При приготуванні препаратів мікроорганізмів предметні скельця (рис. 1.3) утримують у висячому положенні пінцетами або спеціальними утримувачами. Сушити препарати доцільно на верхньому ярусі сушильного металевого столика Коха. Промивати їх зручно на пристосування - перекладинах або на так званих препаратотримачах - паралельно розташованих скляних паличках, з'єднаних гумовими трубками (довжина паличок від 20 до 30 см, трубок від 15 до 20 см). Палички встановлюють над кристалізаторами або фарфоровими чашками.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Вивчити правила безпечної роботи в навчальній біологічній лабораторії.
2. Оглянути лабораторний посуд та інструменти, що будуть використовуватися під час виконання лабораторних робіт. Скласти список необхідного посуду та інструментів для виконання наступних лабораторних робіт.
3. Оглянути обладнання, що буде використовуватися під час виконання лабораторних робіт, та ознайомитися зі специфікою його використання.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні правила роботи і поведінки в навчальній лабораторії.
2. Що означає чиста культура мікроорганізмів?
3. Назвіть посуд для культивування мікроорганізмів.
4. Назвіть інструменти, що використовуються для посіву мікроорганізмів та специфіку їх використання.
5. Назвіть види скелець для приготування препаратів та специфіку їх використання.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Тема. *Підготовка лабораторного посуду для проведення лабораторних робіт. Методи стерилізації та їх класифікація*

Мета роботи: ознайомитися з методами стерилізації та здійснити стерилізації необхідного лабораторного посуду для виконання.

Обладнання для проведення заняття: сушильна шафа, стерилізатор сухоповітряний, автоклав.

Матеріали для проведення заняття: чашки Петрі, колби різного розміру, пробірки різного розміру, піпетки тощо.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Стерилізація – це процес знищення всіх живих мікроорганізмів і спор у середовищі або на поверхні об'єкту. Стерилізації піддаються поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини тощо. Залежно від того, за допомогою яких факторів вбивають мікроорганізми, всі способи стерилізації розділяють на *термічні* та *холодні* або *фізичні*, *механічні* та *хімічні*.

Термічна стерилізація заснована на знищенні мікроорганізмів за допомогою високих температур, що досить легко здійснити і широко використовується в практичній діяльності людини та найчастіше застосовується в мікробіологічній практиці. При цьому потрібно пам'ятати, що у вегетативних (неспорових) клітин денатурація білків і загибель починається вже при температурі 56-60 °С. Більш термостійкі спори гинуть в сухій атмосфері при температурі 160 °С протягом 1-2 год, а у вологому середовищі загибель спор відбувається при температурі 112-120 °С протягом 20-30 хв.

До методів термічної стерилізації відносять: 1) стерилізація сухим жаром; 2) стерилізація парою під тиском; 3) стерилізація текучою парою; 4) кип'ятіння; 5) дробна стерилізація; 6) пастеризація; 7) фламбірування.

Основним способом стерилізації скляного посуду є обробка **сухим гарячим повітрям** при температурі не вище 180 °С протягом 1-3 год (табл. 2.1). При цьому гинуть і вегетативні клітини, і спори

мікроорганізмів. Стерилізацію здійснюють в спеціальних сухоповітряних (сухожарові) стерилізаторах і сушильних шафах, що пристосовані для стерилізації та забезпечують автоматичне підтримання необхідної температури. Посуд перед стерилізацією повинен бути ретельно вимитий і загорнутий в папір для збереження стерильності після прогрівання. Після цього його не дуже щільно завантажують в стерилізатор, щоб забезпечити циркуляцію повітря і рівномірний надійний прогрів матеріалу. Після закінчення стерилізації шафу не відкривають до тих пір, поки температура не впаде до 80 °С, тому що при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу, а сильно нагріте скло тріснути.

Таблиця 2.1

Час, необхідний для стерилізації скляного посуду сухим жаром

Температура, °С	Час, хв
140	180
150	150
160	120
170	60

Стерилізація сухим жаром проводиться гарячим повітрям в печі Пастера або сушильній шафі. Піч Пастера (рис. 2.1) є шафою з подвійними стінками, покритою зовні азбестом для теплоізоляції. У середині шафи розташовані металеві полиці з отворами, на які поміщають матеріал, що стерилізується. Стерилізація проводиться при температурі 160-170 °С протягом 1,5-2 год. Стерилізують сухим жаром головним чином скляний посуд – чашки Петрі, піпетки, шпателі, пробірки, колби. Цей метод надійний – гинуть спорові і неспорові форми мікроорганізмів.

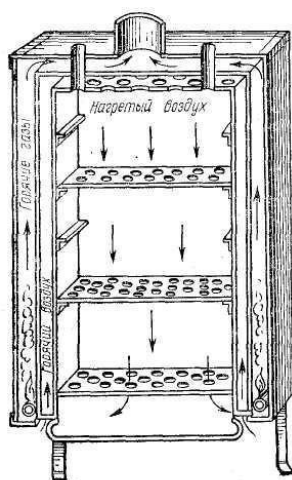


Рис. 2.1. Піч Пастера

Стерилізація парою під тиском проводиться насиченою водяною парою в автоклаві (рис. 2.2). Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металевий двостінний казан, здатний витримувати високий тиск.

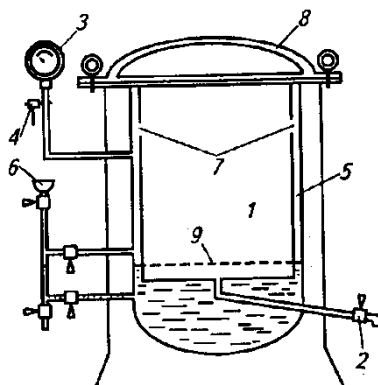


Рис. 2.2. Автоклав вертикального завантаження:

- 1 – камера стерилізації; 2 – кран для виходу повітря; 3 – манометр;
4 – запобіжний клапан; 5 – камера; 6 – воронка для заповнення автоклава водою;
7 – отвори для надходження пари в камеру стерилізації; 8 – кришка автоклава;
9 – підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються

Внутрішня частина казана – камера стерилізації, в яку поміщають матеріал, що стерилізується, оточена водо-паровою камерою, яка має кран для виходу повітря і пари. При стерилізації у водо-парову камеру наливають воду до необхідного рівня. Предмети у камері слід розміщувати не дуже щільно, оскільки пара повинна вільно минати між ними. Кришка автоклава герметично закривається.

Найпоширеніші режими стерилізації наступні:

- 15-45 хв при надлишковому тиску 0,5 атм (температура досягає 110-112 °С);
- 15-45 хв при надлишковому тиску 1,0 атм (температура досягає 121 °С);
- 10-30 хв при надлишковому тиску 1,5 атм (температура досягає 126 °С).

Після закінчення часу стерилізації нагрів припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пару. Стерилізують парою під тиском поживні середовища, скляний посуд, інструменти тощо. Автоклавування є швидким і надійним способом стерилізації, при якому гинуть всі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.

Стерилізація текучою парою проводиться гарячим вологим повітрям в апараті Коха чи водяній лабораторній бані (рис. 2.3). У нижню

частину металевого циліндру апарату Коха наливають воду, над нею розташовують полицю з отворами і матеріал, що стерилізується. Апарат щільно закривають конічною кришкою з отвором для виходу пари і нагрівають на вогні. Коли вода закипить, гаряча водяна пара з температурою $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ «потече» сильним струменем з отвору кришки. З цього моменту відмічають час початку стерилізації. Стерилізація текучою парою триває від 45 хв до 1,5 год залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується. В такий спосіб стерилізують поживні середовища, які не можна нагрівати вище $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, наприклад м'ясо-пептонний желатин (вище $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ він розріджується та не застигає). Цей спосіб стерилізації не достатньо надійний – повністю гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів. Для досягнення повної стерилізації середовища в апараті Коха застосовують дробну стерилізацію.

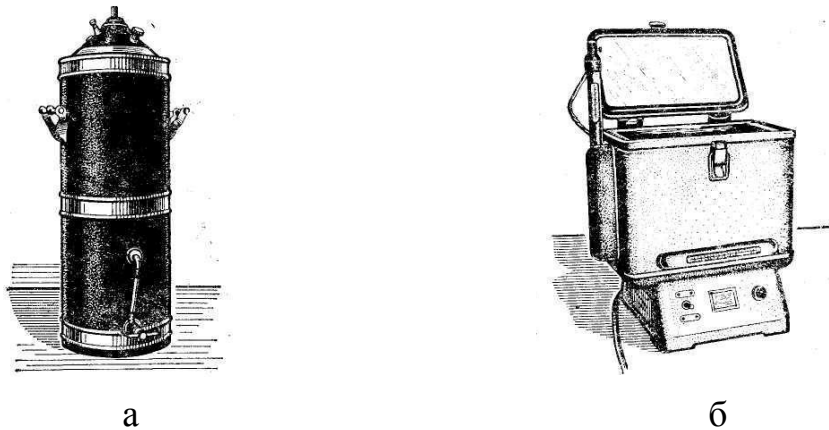


Рис. 2.3. Апарат Коха (а); водяна лабораторна баня (б)

Кип'ятіння є одним з найпростіших способів стерилізації. Проводиться в спеціальному стерилізаторі (рис. 2.4) – металевій прямокутній коробці з кришкою і сіткою на дні для розташування предметів, що стерилізуються. Наливають в нього воду та нагрівають до кипіння. Кип'ятіння триває від 15-30 хв до 2 год при температурі $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

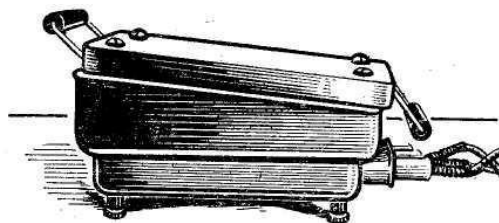


Рис. 2.4. Стерилізатор

Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети — шприци, голки, скляні трубки та ін. При цьому гинуть вегетативні форми

мікроорганізмів і частина спор. Кип'ятінням у дистилаті стерилізують мембранні фільтри. Режим стерилізації для мембранних фільтрів складає 30-60 хв з моменту енергійного закипання води. У мікробіологічній практиці таким засобом стерилізації користуються рідко у зв'язку з тим, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а скорочення часу кип'ятіння може не забезпечити стерильності.

Дробна стерилізація (тиндалізація) використовується для стерилізації поживних середовищ і розчинів, які псуються при використанні температур вище 100 °С. Матеріал стерилізується, в декілька прийомів. Дробним може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха. Метод розроблений Джоном Тиндалем. Матеріал стерилізують 10 хв при 100 °С. За цей час всі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Потім рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30 °С), і через декілька годин знову пропускають пару. Двох-трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор. Тиндалізацію зазвичай проводять 3 дні по 30 хв щодня, а в перервах залишають матеріал при кімнатній температурі. Це робиться для провокації зростання спор у вегетативні форми і їх знищення при подальших обробках, що підвищує надійність цих способів.

Пастеризація – прийом часткової стерилізації названий на честь французького вченого Луї Пастера. Спосіб полягає в тому, що рідину, налиту в стерильний посуд, прогрівають на водяній бані при температурі 60-90 °С протягом 10-30 хв. Застосовують пастеризацію для середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості при високих температурах. У харчовій промисловості пастеризують молоко, вершки, вино, пиво, соки тощо. При цьому повністю зберігаються вітаміни і смакові якості продуктів. Пастеризовані продукти не підлягають тривалому зберіганню, оскільки при цьому способі стерилізації гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори залишаються.

У лабораторних умовах пастеризацію проводять або на водяній бані, або в термостаті при наступних режимах: 30 хв при 60-70 °С або 10-15 хв при 80 °С.

Фламбірування (від нім. flamme – полум'я) – прожарювання в полум'ї дрібних металевих або скляних предметів. Найбільш швидкий і доступний метод стерилізації. Проте його використання обмежується тільки термостійкими матеріалами. В такий спосіб стерилізують бактеріологічні петлі, металеві пінцети, скляні шпателі, палички, скельця,

фарфорові ступки та інші інструменти. При прожарюванні згорають всі мікроорганізми (вегетативні та спорові форми). Це швидкий і надійний спосіб стерилізації. Після прожарювання охолоджені предмети не можна класти на стіл; їх слід тримати так, щоб вони не торкалися інших предметів.

Холодні способи стерилізації включають різноманітні прийоми знищення мікроорганізмів. Називають їх холодними умовно, щоб підкреслити, що вони не пов'язані з дією високих температур, а низькі негативні температури не вбивають, а лише затримують розвиток мікроорганізмів. До способів холодної стерилізації відносять хімічну стерилізацію або дезінфекцію, різні фізичні методи стерилізації (крім використання температурного фактору) та механічне звільнення від мікроорганізмів.

Хімічні методи припинення життєдіяльності мікроорганізмів засновані на використанні дезінфектантів і антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використанні антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з вибірковою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів при дезінфекції відбувається в основному в результаті гідролізу компонентів клітин, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів. Метод хімічної стерилізації застосовують при дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець тощо.

До антисептиків або дезінфікуючих засобів відносяться мило, деякі органічні барвники, солі важких металів, окисники (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти (60-70 % водні розчини), кислоти, антибіотики, газоподібні речовини (формальдегід, окис етилену, озон) та ін. Стійкість мікроорганізмів до їх дії може суттєво змінюватися залежно від таких факторів як концентрація активного компоненту, тривалість контакту, кислотність (рН), температура, вологість тощо.

Фізичні методи стерилізації: стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивним випромінюванням, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти та ін. Ці прийоми широко використовують в медицині. Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів, що є нестійкими проти дії теплоти. Ультрафіолетові (УФ) промені використовуються для стерилізації центрифужних пробірок, наконечників для піпеток, матеріалів з термолабільної пластмаси. Час опромінення визначається потужністю лампи, часом дії, ступенем і видовим складом мікроорганізмів забрудненого матеріалу. Вегетативні форми чутливіші до опромінення, ніж

спори, які в 3-10 разів більш стійкі. Від УФ-випромінювання мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або іншими захисними оболонками. Обмеженням при використанні даного методу стерилізації є низька проникаюча здатність УФ-променів і висока поглинаюча здатність води і скла.

Рентгенівське і гамма-опромінення (γ -опромінення) також ефективно для стерилізації пластмас, харчових продуктів, але вимагає суворого дотримання правил безпеки. Найбільш чутливі до γ -опромінення вегетативні клітини бактерій, потім йдуть цвілеві гриби, дріжджі, бактеріальні спори і віруси. Гамма-опромінення використовується для стерилізації лікарняного приладдя, антибіотиків, вітамінів, гормонів, стероїдів, пластмасового одноразового устаткування, шовного і перев'язувального матеріалу.

Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. Зважаючи на можливу несприятливу дію УФ-променів на організм людини бактерицидні лампи включають лише за відсутності людей в приміщенні.

Механічний метод стерилізації (стерилізація фільтруванням) застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, леткі речовини та ін.). Спосіб полягає в пропусканні рідин і газів через спеціальні дрібнопористі фільтри (бактерійні), діаметр пор яких не перевищує

0,45-0,2 мкм. Фільтри затримують мікроорганізми. Для пропускання розчину через фільтр потрібний вакуум або тиск. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частки затримуються в них в результаті адсорбції і механічного захоплення в матриці фільтру. Мембранні фільтри мають безперервну структуру і захоплення ними часток визначається розміром пір. Фільтри містять різні природні (каолін, азбест, целюлоза) або синтетичні (похідні целюлози) матеріали.

У мікробіологічній лабораторії та особливо на виробництві постійно здійснюють контроль ефективності стерилізації. Для цього визначають кількість клітин, які вижили після стерилізації, методом посіву в чашки за кількістю колоній, що утворюються. Використовують також і спеціальні біологічні індикатори (бактеріальні спори), які за визначених умов стерилізації гинуть з прогнозованою швидкістю.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Перед стерилізацією ретельно вимити, висушити та щільно загорнути лабораторний посуд в папір (для збереження стерильності після прогрівання) наступним чином:

- Чашки Петрі загортають разом по 2-4 штуки.
- Колби, пробірки закривають ватяними пробками, а зверху паперовими ковпачками.
- Кожну піпетку завертають окремо в довгі смужки паперу шириною 4-5 см. У широкі кінці піпеток, заздалегідь вставляють ватні тампони. Обмотку починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують біля кінця з тампоном. Папір повинен щільно охоплювати піпетку. Загорнуті піпетки для застереження паперу від забруднення і розривів завертають по декілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали.

2. Посуд, що підготовлений до стерилізації, не дуже щільно завантажити в сушильну шафу чи сухоповітряний стерилізатор, щоб забезпечити циркуляцію повітря та рівномірне прогрівання предметів, що стерилізуються.

3. Увімкнути обладнання та обрати режим стерилізації (табл. 2.1).

4. Якщо обладнання не забезпечене терморегулятором, необхідно весь час стежити за температурою, оскільки при її зниженні посуд не простерилізується, а при нагріві вище 180 °С папір і пробки починають обвуглюватися.

5. По закінченню стерилізації вимкнути обладнання та не відкривати до тих пір, поки температура не впаде до 80 °С, тому що при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу і тріснути сильно нагріте скло.

6. Простерилізований посуд зберігати в закритому та захищеному від пилу місці. Розгортати його потрібно безпосередньо перед використанням.

Контрольні запитання

1. Що таке процес стерилізації?
2. Які існують класифікації методів стерилізації?
3. Назвіть та охарактеризуйте термічні методи стерилізації.
4. Назвіть та охарактеризуйте холодні методи стерилізації.
5. Назвіть та охарактеризуйте фізичні методи стерилізації.
6. Назвіть та охарактеризуйте хімічні методи стерилізації.
7. Назвіть та охарактеризуйте механічні методи стерилізації.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Тема. *Приготування поживного середовища для досліджень проб повітря*

Мета роботи: ознайомитися з типами і призначенням поживних середовищ та підготувати поживне середовище для досліджень проб повітря.

Обладнання для проведення заняття: автоклав, дистилятор, електрична плита, ваги.

Матеріали для проведення заняття: каструля лабораторна, пенал з набором інструментів, скляна паличка, лійки, колби різного розміру, флакони, чашки Петрі, пробірки, марля, сухе поживне середовища агар Сабуро, дистильована вода.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Для отримання чистих культур грибів, підтримання їх життєздатності в цілях подальшого вивчення застосовують різні поживні середовища. *Поживне* або *живильне середовища* – це спеціальна речовина чи набір речовин, що використовується у лабораторній практиці для вирощування мікроорганізмів. Вибір того чи іншого типу поживного субстрату залежить від потреб мікроорганізму і цілей експерименту.

Класифікація поживних середовищ:

1. За походженням:

- а) природні (молоко, желатин, картопля і ін.);
- б) штучні – середовища, приготовані з спеціально підготовлених природних компонентів (пептону, амінопептиду, дріжджового екстракту і т.п.);
- в) синтетичні – середовища відомого складу, що приготовлені з хімічно чистих неорганічних і органічних сполук (солей, амінокислот, вуглеводів і т. д.).

2. За складом:

- а) прості – м'ясопептонний агар, м'ясопептонний бульйон, агар Хоттінгера та ін.;
- б) складні – це прості середовища з додаванням додаткового

живильного компонента (кров'яного, шоколадного агару): цукровий бульйон, жовчний бульйон, сироватковий агар, жовчно-сольовий агар, середовище Кітта-Тароцці, середовище Вільсона-Блера і ін.

3. За консистенцією:

- а) тверді або щільні (містять 3-5% агар-агар);
- б) напіврідкі (0,15-0,7% агар-агар);
- в) рідкі (не містять агар-агар).

4. За призначенням:

а) загального призначення – для культивування більшості бактерій (м'ясопептонний агар, м'ясопептонний бульйон, кров'яний агар);

б) спеціального призначення:

– *елективні* – середовища, на яких ростуть бактерії тільки одного виду (роду), а рід інших пригнічується (лужний бульйон, 1% -ва пептонна вода, жовчно-сольовий агар, казеїново-вугільний агар та ін.);

– *диференційно-діагностичні* – середовища, на яких зростання одних видів мікроорганізмів відрізняється від зростання інших видів з тих чи інших властивостей, частіше біохімічним (середовища Ендо, Левіна, Гіса, Плоскірева),

– *середовища збагачення* – середовища, в яких відбувається розмноження і накопичення мікроорганізмів будь-якого роду або виду, збагачення ними досліджуваного матеріалу (селенітовий бульйон).

Щільні середовища готують, додаючи до розчинів солей і відварів агар (2-2,5 %) або желатин (10-15 %), а, в разі необхідності, зволожують поверхню твердих предметів (наприклад, тирсу та ін.) розчинами поживних речовин. Щільні середовища використовують для:

- виділення грибів з природних субстратів;
- визначення репродуктивної здатності і особливостей спорування;
- диференціації грибів за характером росту на щільних середовищах;
- вивчення впливу факторів середовища і різних речовин на зростання грибів.

Рідкі поживні середовища застосовують для якісного і кількісного вивчення потреб грибів в поживних речовинах в процесах росту і синтезу метаболітів. У таких середовищах визначають вплив кислотності (рН) середовища, мікроелементів, стимуляторів, інгібіторів та інших речовин на біосинтетичну активність гриба. Для підкислення середовища використовують соляну, сірчану, лимонну, молочну, фосфорну кислоти, для

лугування – NaOH або KOH. Для посилення росту грибів і підвищення їх біосинтетичної активності в поживні середовища вводять мікроелементи. Залізо, цинк, марганець тощо застосовують в розчиненому вигляді. Як фактори росту використовують тіамін, біотин, рідше інозин, піридоксин та ін. Готують вихідні розчини цих сполук в 20 % розчині спирту, стерилізують кип'ятінням на водяній бані і зберігають в холодильнику. Вихідні розчини тіаміну і піридоксину повинні містити 100 мкг/мл; біотину – 5 мкг/мл.

Серед рідких середовищ найбільш поширеним і вживаним є середовище Чапека (табл. 3.1) з рН 7,0. Можна замінити сахарозу глюкозою, $\text{NaNO}_3 - \text{NH}_4\text{Cl}$, доводити рН до 6,6 і нижче та використовувати водопровідну воду. Компоненти середовища послідовно розчиняють в воді, вносять агар-агар і розплавляють його. Потім додають сахарозу, встановлюють рН 7,0. Середовище розливають в посуд і стерилізують 30 хв при температурі 117 °С або 20 хв при 121 °С.

Таблиця 3.1

Склад поживних середовищ для отримання грибів

Назва поживного середовища	Склад компонентів на 1 л води, г	Група культивованих грибів
Агаризоване середовище «голодний агар»	Агар (15-20)	Більшість видів (для отримання спороношення)
Картопляно-сахарозний агар	1000 мл картопляного екстракту (1800 г картоплі на 4500 мл води), сахароза (40), агар (40)	<i>Fusarium</i>
Картопляний агар	Картопля (200), агар (20)	<i>Fusarium, Phytophthora</i>
Вівсяний агар	Овес (100) або вівсяні пластівці (150), агар (20)	<i>Clasterosporium, Fusarium</i>
Синтетичний агар Чапека	Сульфат магнію (0,5), безводний фосфат калію (1,0), хлорид калію (0,5), сульфат заліза (0,01), нітрат натрію (2,0), декстроза (30), агар (20), вода дистильована	Ґрунтові патогени і руйнівники деревини, більшість видів грибів

Правила приготування та стерилізації поживних середовищ

При приготуванні поживних середовищ необхідно враховувати наступне:

1) гриби зазвичай ростуть краще на середовищі, що багате вуглеводами, але вирощування їх на таких середовищах тривалий час може уповільнити процес спороутворення (редукувати споруляцію);

2) для більшості грибів кислотність середовища повинно знаходитися в межах рН 6,0-6,5;

3) вуглеводи і білки в кислих і лужних розчинах руйнуються при нагріванні, тому вони повинні бути помірно стерилізовані або додані окремо;

4) агар розчиняють у половинній нормі води протягом 1-2 год, а поживні речовини – у воді, що залишилася, після чого компоненти змішують;

5) агаризоване середовище не твердне, якщо рН зміщена в кислу або в лужну сторону;

7) краще використовувати водопровідну воду, ніж дистильовану, оскільки перша містить корисні мікроелементи, але для грибів роду *Phytophthora* краще використовувати дистильовану воду;

8) для середовищ, до складу яких входить рослинний матеріал, з нього попередньо роблять витяжку при низьких (картопляний агар) або високих (картопляно-декстрозний агар) температурах.

Для культивування бактерій використовують поживні середовища, до яких пред'являється ряд вимог:

1. Поживність: містити всі необхідні поживні речовини для культивування певного виду бактерій.

2. Ізотонічність: містити набір солей для підтримки осмотичного тиску, певну концентрацію хлориду натрію.

3. Оптимальний рН (кислотність) середовища: кислотність середовища забезпечує функціонування ферментів бактерій; для більшості бактерій становить 7,2-7,6.

4. Оптимальний електронний потенціал, який свідчить про вміст у середовищі розчиненого кисню: він повинен бути високим для аеробів і низьким для анаеробів.

5. Прозорість: щоб було видно зростання бактерій, особливо для рідких середовищ.

6. Стерильність, тобто забезпечити відсутність інших мікроорганізмів за допомогою стерилізації поживних середовищ.

Способи стерилізації поживних стерилізацій наступні:

- 1) стерилізація насиченою парою під тиском;
- 2) стерилізація середовищ фільтруванням через дрібнопористі фільтри. Застосовуються бактеріологічні фільтри Зейтца, мембранні фільтри. Фільтруюча здатність їх визначається розмірами пор і ступенем пористості. Метод необхідний в тих випадках, коли середовища не витримують нагрівання (наприклад, середовища, що містять білки);
- 3) хімічна стерилізація: середовище витримують 7 год з 0,1 % перекисом водню при температурі 45 °С;
- 4) стерилізація за допомогою антибіотиків. Цим методом користуються в тих випадках, коли прагнуть звільнитися від одних груп мікроорганізмів при збереженні інших і для зменшення обсіменіння матеріалу;
- 5) стерилізація струмом високої частоти, ультразвуком, ГЧ-променями.

Режим термічної стерилізації залежить від складу середовища, який вказаний в його рецепті. Приклади схем режиму стерилізації поживних середовищ наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Режими термічної стерилізації поживних середовищ

Середовище	Режим стерилізації			
	Апарат	Температура, °С (тиск, атм.)	Час, хв	Періодичність
Прості	Автоклав	120 (1)	20	-
Складні: з вуглеводами, молоком, желатином	Апарат Коха	100 °С (текучий пар)	30-60	3 дні підряд (дробна стерилізація)
Білкові (сироваткові або ячні) з ущільненням	Апарат Коха	80-85	60	3 дні підряд
		95	60	-
Білкові рідкі	Водяна баня або інактиватор	58	60	3-4 дня підряд

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготувати поживне середовище агар Сабуро за наступним алгоритмом:
 - внести 62 г препарату в 1000 мл очищеної води та розмішати;
 - кип'ятити до повного розплавлення агару протягом 2-3 хвилин;
 - профільтрувати через ватно-марлевий фільтр та розлити у стерильний посуд.
2. Стерилізувати приготоване середовище в автоклаві за температури 121 ± 1 °C протягом 15 хвилин.
3. Середовище охолодити до температури $47,5 \pm 2,5$ °C та розлити по 25 ± 5 мл в стерильні чашки Петрі. Після застигання, дотримуючись правил асептики, підсушити за температури 33 ± 2 °C протягом 40 ± 5 хвилин.
4. Ознайомитися з типами живильних середовищ. Скласти таблицю класифікації поживних середовищ.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення терміну «поживне середовище» та визначити сфери їх застосування.
2. Дайте класифікацію поживних середовищ та їх особливості.
3. Назвіть методи та режими стерилізації поживних середовищ.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема. Дослідження мікрофлори повітря

Мета роботи: навчитися проводити дослідження для характеристики мікрофлори повітря в приміщеннях.

Обладнання для проведення заняття: аспіратор, термостат.

Матеріали для проведення заняття: чашки Петрі з готовим поживним середовищем, пенал з набором інструментів.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями про мікрофлору повітряного середовища та вивчити вплив факторів навколишнього середовища на мікроорганізми.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Мікроорганізми широко поширені в природі й існують у всіх природних середовищах. Виявлення і кількісний облік мікроорганізмів в об'єктах навколишнього середовища необхідні при санітарно-гігієнічних і екологічних дослідженнях для моделювання природних систем і розробки основ управління природними та антропогенними процесами.

Мікрофлора повітря

Склад мікрофлори повітря різноманітний і значно змінюється в залежності від умов. Мікроорганізми в повітрі можуть перебувати тільки тимчасово, так як в ньому відсутнє необхідне живильне середовище. Забруднення повітря мікроорганізмами відбувається з ґрунту, від тварин, людей і рослин. Потрапивши в повітря, вони швидко відмирають або знову осідають на поверхню землі і різних предметів. Мікроорганізми, що знаходяться в повітрі, в основному належать до нешкідливих видів. Серед них зустрічаються різні спори бактерій, грибів, дріжджів, різні мікрококи та ін. Повітря верхніх шарів атмосфери, а також гірське і морське повітря містить дуже мало мікроорганізмів. У населених пунктах їх значно більше, особливо в літню пору.

Кількість мікроорганізмів у житлових приміщеннях залежить від їх санітарно-гігієнічного стану. Повітря вважається чистим при вмісті в 1 м^3 не більше 1500 бактерій і 16 стрептококів. Найбільш забруднюється повітря в приміщеннях при скупченні людей і поганій роботі вентиляції. Повітря може служити фактором передачі гострих респіраторних вірусних інфекційних (ГРВІ) захворювань, грипу, туберкульозу, дифтерії, стафілокової інфекції та ін. Патогенні мікроорганізми потрапляють в повітря при кашлі, чханні тощо хворих людей або бактеріоносцями.

У повітрі цехів підприємств харчової промисловості патогенні мікроорганізми повинні бути відсутні, загальна кількість мікробів в 1 м^3 повинна перевищувати 100-500 бактерій. Мікробна забрудненість повітря значно знижується при хорошій роботі вентиляції, наявності бактерицидних фільтрів для повітря, що подається, регулярного вологого прибирання приміщень. У холодильних і кондитерських цехах рекомендується використання бактерицидних ламп.

У пильних приміщеннях кількість мікробів підвищується до десятків тисяч в 1 м^3 повітря. У нежитлових приміщеннях, підвалах і льохах в повітрі міститься менше мікробів, ніж у відкритих місцях. У 1 г кімнатного або вуличного пилу міститься 1 млн мікробів і серед них часто зустрічаються патогенні. Значний вміст мікробів у повітрі свідчить про

низький санітарний стан приміщення. При наявності до 500 мікробних клітин в 1 м³ повітря житлових або виробничих приміщень повітря вважають чистим. При дослідженні бактеріальної забрудненості повітря враховується загальна кількість мікроорганізмів, що містяться в певному обсязі повітря, і якісний склад мікрофлори повітря.

Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря проводиться двома шляхами: *седиментаційним* і *аспіраційним*.

Седиментаційний метод (по Коху) – осідання мікробів під дією сили тяжіння – є простим способом вивчення мікрофлори повітря. Він полягає в тому, що чашки Петрі з середовищем залишають відкритими на певний час. Залежно від потенційного мікробного забруднення повітря рекомендована експозиція чашок: 5-10 хв при великій кількості бактерій, 20-40 хв – при малій. Чашки закривають, інкубують 24 год при 37 °С і ще добу при кімнатній температурі. Кількість колоній, що вирости відповідає ступеню забрудненості повітря: за приблизними підрахунками на площу 100 см² в протягом 5 хв осідає стільки мікробів, скільки їх міститься в 10 л повітря.

Аспіраційний метод може бути здійснений за допомогою апарату Кротова, який дає можливість досліджувати певний обсяг повітря. Апарат змонтований в портативному ящику і складається з вузла для відбору проб повітря, макроманометру і електромотора. Досліджуване повітря просочується через клиноподібну щілину прозорого диска з плексигласу, встановленого на центробіжному вентиляторі. Засмоктане повітря розподіляється по поверхні живильного середовища чашки Петрі. Чашка з середовищем повинна обертатися зі швидкістю 60 обертів за хвилину, що гарантує рівномірний розподіл мікроорганізмів на поверхні живильного середовища. Швидкість просочування при відборі проб повинна бути 25 л за хвилину з експозицією 4-5 хвилин для визначення загальної кількості мікробів (тобто не менше 100 л повітря) і з експозицією 10-15 хв для виявлення коків (не менше 250-300 л повітря).

При визначенні загальної бактеріальної забрудненості повітря посів роблять на дві чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром. Вирощують 48 год (24 год в термостаті і 24 год при кімнатній температурі). Потім підраховують кількість колоній, що вирости, і отримані дані перераховують на 1 м³ досліджуваного повітря.

Санітарно-показовими мікроорганізмами забруднення повітря закритих приміщень є стафілококи, гемолітичні стрептококи. Чим більше кількість стрептококів виявляють в повітряному середовищі, тим найімовірніше можливість зараження людини повітряно-крапельними

інфекціями.

Визначення кількості клітин висівом на щільні поживні середовища (чашковий метод Коха)

В основі методу лежить принцип Коха, згідно з яким кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє на підставі числа колоній, що вирости після посіву на щільне поживне середовище певного обсягу досліджуваної суспензії, оцінити про вихідному вмісті в ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто висловлюють не в числі клітин, а в умовних одиницях – так званих ***колонієутворюючих одиницях (КУО)***. Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи: приготування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі і підрахунок колоній, що вирости.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Чашки Петрі з готовим простерилізованим поживним середовищем агар Сабуро підписати наступним чином: прізвище та ім'я студента, група, дата дослідження, назва дослідження та місце посіву (аудиторія та місце розташування відповідної чашки Петрі).

2. Провести посів мікроорганізмів в чашку Петрі на живильне середовище седиментаційним методом. Для цього кришку чашки Петрі відкрити, не перевертаючи догори, та залишити на рівній горизонтальній поверхні як показано на рис. 4.1. Тривалість експозиції становить 20 хв.



Рис. 4.1. Положення чашки Петрі під час відбору проб повітря седиментаційним методом

3. Після посіву чашки Петрі поставити на вирощування у термостат за температури 37 °С.

4. На наступному занятті підрахувати загальну кількість колоній мікроорганізмів, що вирости на живильному середовищі в чашці Петрі.

5. Провести перерахунок кількості колоній в 1 м³ повітря.

6. Зробити попередній висновок про санітарний стан приміщення.

Контрольні запитання

1. Від чого залежить санітарно-епідеміологічний стан приміщення?

2. Назвіть методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря.

3. Опишіть в чому полягає седиментаційний метод дослідження проб повітря.

4. Опишіть в чому полягає аспіраційний метод дослідження проб повітря.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Тема. *Загальні методи виділення в чисту культуру та правила культивування грибів*

Мета роботи: ознайомитися з загальними правилами і методами культивування грибів, підготувати об'єкти до виділення грибів в чисту культуру.

Обладнання для проведення заняття: лабораторний бокс або шафа витяжна лабораторна, сушильна шафа, термостат, мікроскоп.

Матеріали для проведення заняття: пенал з набором інструментів, чашки Петрі, паперові фільтри, вата, спиртівка, дезінфікуючий розчин (3 % розчин перекис водню, 2 % розчин марганцевокислого калію або 70 % розчин етилового спирту).

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.

2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.

3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.

4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Залежно від цілей і методів дослідження культивування мікроскопічних грибів включає ряд етапів:

– підготовка зразків природних субстратів (грунту, уражених органів рослин або рослинних залишків, зерна тощо), з яких передбачається зробити посів на звичайні (агар Чапека) і елективні

(вибірчі) середовища, що забезпечують переважне розвиток одного виду або групи споріднених видів середовища; визначення наявності грибів.

– виділення і отримання чистих культур грибів на щільних поживних середовищах.

– пересівання чистих культур на диференційно-діагностичні середовища для подальшого визначення їх видової приналежності.

Культивування мікроскопічних грибів з метою накопичення біомаси або певних продуктів метаболізму передбачає:

1) наявність чистої культури;

2) підготовку стандартного посівного матеріалу;

3) визначення умов, необхідних для росту грибів і прояви їх біосинтетичної активності.

Метод чистих культур. Гриби виділяють в чисту культуру і спостерігають за ними *in vitro*. Наявність чистих культур дає можливість

– визначити характер росту і спорутворення у грибів, особливості морфогенезу, виявити плодові тіла і види спороношення, встановити відношення грибів до факторів середовища (температура, вологість, джерела світла, кислотність середовища, радіація, компоненти субстрату);

– визначити біосинтетичну активність продуктів метаболізму (ферментів, регуляторів росту, вітамінів) грибів;

– виявити ставлення грибів до фунгіцидів, лікарських препаратів; провести порівняльну характеристику ізолятів видів грибів;

– провести популяційні дослідження;

– з'ясувати взаємини грибів один з одним, охарактеризувати ступінь паразитизму, спорідненість між грибами та ін.

Виділення фітопатогенних грибів. Перш ніж отримати чисту культуру досліджуваного виду гриба, необхідно мати спори або міцелій, вільні від зараження сапротрофною мікробіотою. Одним з найбільш простих методів отримання міцелію або органів спороношення є стимулювання росту грибів і спороношення в умовах підвищеної вологості - застосування вологих камер. Для їх виготовлення зазвичай використовують чашки Петрі. Перед закладанням об'єкта у вологу камеру його промивають в проточній воді або в декількох водах. Вибір концентрації дезінфектанту і часу експозиції залежить від цілей дослідження і характеру досліджуваного матеріалу. Стерилізують об'єкт, використовуючи 3 % розчин перекис водню, 2 % розчин марганцевокислого калію або 70 % розчин етилового спирту. Об'єкт

витримують в розчині протягом 1-5 хв і багаторазово промивають стерильною водою. Для грубих частин рослин використовують випал в полум'ї.

Необхідний для проведення мікологічного експерименту посуд миють з миючими засобами, загортають у папір і стерилізують в сушильній шафі протягом 2 год при температурі 180-200 °С. Інструмент стерилізують спиртом і прожарюють у вогні.

У стерильні чашки Петрі кладуть 2-3 фільтра, зволожені стерильною або проточною водою (рідше рідким живильним середовищем). Після поверхневої дезінфекції досліджуваній матеріал поміщають в чашку Петрі і ставлять в термостат при відповідній температурі (зазвичай 20-25 °С). Фрагменти досліджуваних уражених об'єктів розкладають в чашках Петрі так, щоб вони не стикалися один з одним.

Виділення фітопатогенних мікроміцетів проводять з різних уражених органів рослин:

- виділення з коренів: свіжовикопані коріння багаторазово промивають проточною, потім стерильною водою, віджимають в декількох шарах стерильною фільтрувального паперу, відрізками довжиною 1-3 см або цілком (у проростків) укладають на круги стерильною фільтрувального паперу в чашках Петрі і поміщають в термостат при температурі 26 °С. Товсті корені розрізають уздовж або нарізають невеликі поперечні відрізки. Спостереження за ростом грибів та їх виділення проводять через 24-48 год і в наступні дні зростання;

- виділення з бульб, цибулин, коренеплодів, плодів: для виділення патогенних грибів необхідні попереднє відмивання досліджуваного матеріалу від частинок ґрунту і поверхнева стерилізація. Зрізають стерильно невеликий шматочок на кордоні ураженої і здорової тканини і поміщають його у вологу камеру або на щільне середовище;

- виділення зі стеблин і листя: гриби можна виділити не тільки зі свіжого матеріалу, але і з гербарних зразків. Необхідно негайно зафіксувати гербарний матеріал висушуванням, а також оберегти від зараження сторонньою мікобіотою. Листя, стеблини або їх частини поміщають в стерильний пакет з фільтрувального паперу і висушують в ньому. Після висушування листя пакет поміщають в другій пакет, також стерильний, але з більш щільного паперу. У такому вигляді зберігають до дослідження. Перед виділенням гриба матеріал поміщають у вологу камеру. При ураженні листя або пелюсток хімічної обробки не проводять, а промивають кілька разів водою;

- виділення з зерна хлібних злаків і насіння: насіння дезінфікують, якщо припускають наявність внутрішнього зараження. Якщо визначають зовнішню заспоренність, то дезінфекцію не проводять. Зерна або насіння після поверхневої дезінфекції укладають на фільтрувальну папір через

0,5-1 см; з однієї досліджуваної партії зерна беруть 100-1000 зерен.

Методи посіву

Важливим етапом бактеріологічного дослідження є посів. В залежності від мети дослідження, характеру посівного матеріалу і середовища використовують різні методи посіву. Всі вони включають обов'язкову мету: захистити посів від сторонніх мікроорганізмів. Тому працювати слід швидко, але без різких рухів, що підсилюють коливання повітря. Під час посіву не можна розмовляти. Посіви краще робити в боксі.

Увага! Не забувайте виконувати правила особистої безпеки при роботі з забрудненим чи заразним матеріалом.

Посів з пробірки в пробірку. Пробірку з посівним матеріалом і пробірку з середовищем тримають злегка похило в лівій руці між великим і вказівним пальцями так, щоб краю пробірок були на одному рівні, а їх дно знаходилися поверх кисті. Зазвичай пробірку з посівним матеріалом тримають ближче до себе. У правій руці, як писальне перо, тримають бактеріальну петлю, і стерилізують її, тримаючи вертикально в полум'я пальника. мізинцем і краєм долоні правої руки виймають обидві пробірки одночасно. Витягають пробірки НЕ ривком, а плавно - легкими гвинтовими рухами. Вийнявши пробки, краю пробірок обпалюють у полум'ї пальника. Знезаражену петлю вводять через полум'я пальника в пробірку з посівним матеріалом, охолоджують і, набравши трохи матеріалу, обережно переносять в пробірку з середовищем.

При посіві в рідке середовище посівний матеріал розтирають на стінці пробірки над рідиною і змивають середовищем. При посіві на рідкі середовища тампон занурюють в середовище і 3-5 с споліскують в ньому. При посіві на щільне середовище матеріал втирають в поверхню, обертаючи тампон, після чого тампон знезаражують (поміщають в пробірку, в якій він був доставлений в лабораторію, і автоклавують).

Увага! Слідкуйте, щоб середовище не вилилося і не змочило пробку.

При посіві на скошений агар матеріал зазвичай розтирають на поверхні середовища зигзагоподібними рухами від низу до верху, починаючи від кордону конденсату.

При посіві на щільні середовища, розлиті в пробірки стовпчиком, петлею з посівним матеріалом проколюють стовпчик, виробляючи так

званий посів «уколом». Після посіву петлю витягають з пробірки, край пробірок обпалюють, провівши пробірки через полум'я пальника, і закривають пробірки, після цього знезаражують петлю в полум'ї.

Посів рідкого матеріалу можна робити стерильними піпетками (пастерівськими і градуйованими). Після посіву піпетки занурюють в дезінфікуючу рідину.

Посіви у флакони, матраци і бутлі здійснюють приблизно так, як в пробірки, тільки спочатку набирають матеріал (петлею або в піпетку), а потім відкривають посудину з середовищем.

Посуд з посіяною культурою підписують і ставлять в термостат.

Посів на пробірки з чашки Петрі. Вивчивши характер росту культури на чашці, з боку дна відзначають восковим олівцем потрібну для посіву ділянку. Чашку з посівним матеріалом ставлять перед собою кришкою вгору. Лівою рукою відкривають кришку і вводять під неї обпалену петлю. Остудивши петлю, набирають посівний матеріал з зазначеної ділянки. Виймають петлю, закривають чашку і в ліву руку беруть пробірку з середовищем. Посів роблять так само, як з пробірки в пробірку. Після посіву чашку повертають догори дном.

Посів на агар в чашки Петрі. Посів шпателем. Шпатель – це скляна або металева трубочка, кінець якої загнаний у вигляді трикутника. Шпатель можна зробити з пастерівської піпетки, зігнувши під кутом її тонкий кінець, попередньо розігрітий в полум'я пальника.

Лівою рукою злегка відкривають кришку, тримаючи її великим і вказівним пальцем. Петлею, піпеткою або скляною паличкою наносять на поверхню середовища посівний матеріал, після чого ретельно втирають його круговими рухами шпателя до тих пір, поки шпатель не перестане вільно ковзати по поверхні середовища, лівою рукою при цьому притримують кришку і одночасно обертають чашку. Після закінчення посіву шпатель виймають з чашки і закривають кришку. Скляний шпатель поміщають у дезінфікуючий розчин, а металевий знезаражують у полум'ї пальника.

Посів петлею. Невелика кількість посівного матеріалу (іноді його попередньо емульгують в стерильному фізіологічному розчині або бульйоні) втирають петлею в поверхню середовища на краю чашки, кілька разів проводячи петлею з боку в бік. Потім у те місце, де закінчилися штрихи, агар проколюють петлею, знімаючи надлишок посівного матеріалу. Посівний матеріал, що залишився на петлі, зигзагоподібними рухами розподіляють по всій поверхні середовища. Після закінчення посіву закривають чашку і пропалюють петлю.

Посів петлею на сектори. Чашку з боку дна розкреслюють на сектори. Посів роблять звивистими рухами від краю чашки до центру. Необхідно стежити, щоб штрихи не заходили на сусідній сектор.

Посів в товщу агару. Культуру, вирощену на рідкому середовищі, або емульгований матеріал вносять у посудину з розплавленим і охолодженим до 45 °С агаром, перемішують і виливають у стерильну чашку Петрі. Можливо внести посівний матеріал в порожню чашку і залити 15-20 мл остудженого до 45 °С агару. Для перемішування вмісту чашки її злегка похитують і обертають. Чашки залишають на столі до застигання середовища. Засіяні чашки підписують з боку дна і поміщають в термостат дном вгору.

Підрахунок колоній, що вирости

Колонії мікроорганізмів в залежності від швидкості росту підраховують через 1,5-2 діб інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожен прорахований колонію відзначають точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі і підсумовують результати. Результати враховують на тих чашках Петрі, на яких виростає від 30-50 до 100-150 колоній. Якщо число виростих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин в вихідному матеріалі не використовують. Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = \frac{a}{V} \cdot 10n,$$

де M – кількість клітин в 1 мл; a – середнє число колоній в чашці Петрі;
V – обсяг суспензії, взятий для посіву, мл;
n – коефіцієнт розведення.

Необхідно пам'ятати, що статистична обробка результатів можлива тільки при мінімальній похибці.

Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

Чистою культурою називають скупчення мікроорганізмів одного виду на щільному або в рідкому поживному середовищі. Існує ряд методів виділення чистої культури в залежності від властивостей досліджуваного матеріалу і мети дослідження. Зазвичай чисті культури отримують з ізольованих колоній - відокремлених скупчень організмів на щільному середовищі. Вважають, що найчастіше колонія розвивається з однієї клітини, тобто є чистою культурою цього мікроорганізму. Етапи виділення чистої культури наступні:

1-й день – отримання ізольованих колоній. Краплю досліджуваного

матеріалу петлею, піпеткою або скляною паличкою наносять на поверхню агару в чашці Петрі. Шпателем втирають матеріал в поверхню середовища; не пропалюючи і не перевертаючи шпателя, проводять посів на 2-й, а потім на 3-й чашці. При такому посіві на 1-шу чашку доводиться багато матеріалу і відповідно багато мікробів, на 2-гу менше і на 3-ю ще менше.

Можливо одержати ізольовані колонії при посіві петлею. Для цього досліджуваний матеріал емульгують в бульйоні або фізіологічному розчині натрію хлориду.

2-й день – вивчають зростання мікробів на чашках. У 1-й чашці зазвичай буває суцільний ріст - виділити ізольовану колонію не вдається. На поверхні агару в 2-й і 3-й чашці виростають ізольовані колонії. Їх вивчають неозброєним оком, за допомогою лупи, при малому збільшенні мікроскопа і іноді в стереоскопічному мікроскопі. Потрібну колонію відзначають з боку дна чашки і пересівають на скошений агар. Посіви ставлять в термостат. Увага! Пересівати можна тільки ізольовані колонії.

3-й день – вивчають характер росту на скошеному агарі. Роблять мазок, забарвлюють його і, переконавшись в тому, що культура чиста, приступають до її вивчення. На цьому виділення чистої культури закінчується. Виділена з певного джерела і вивчена культура, називається штамом.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Освоїти основні способи посіву для біологічного дослідження.
 - здійснити посів на пробірки з чашок Петрі;
 - здійснити посів на агар в чашки Петрі за допомогою шпателя;
 - здійснити посів на агар в чашки Петрі за допомогою мікробіологічної петлі;
 - здійснити посів товщу поживного середовища;
2. Після посіву чашки Петрі поставити на вирощування у термостат за температури 37 °С.
3. Підрахувати кількість колоній, що виростили у кожній чашці Петрі, за формулою, наданій у теоретичній частині.

Контрольні запитання

1. Що таке «чиста культура» мікроорганізмів?
2. Охарактеризуйте метод посіву з пробірки в пробірку.
3. Охарактеризуйте метод посіву з чашки Петрі в пробірку.
4. Описати методи посіву на агар в чашку Петрі.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Тема. *Вивчення культуральних і морфологічних ознак живих мікроорганізмів за допомогою мікроскопу в пробах повітря*

Мета роботи: освоїти техніку мікроскопування та навчитися описувати морфологічні структури грибів і вимірювати об'єкти при мікроскопуванні.

Обладнання для проведення заняття: лабораторний бокс або шафа витяжна лабораторна, мікроскоп або біокуляр.

Матеріали для проведення заняття: чашки Петрі з чистими культурами грибів на середовищах, спиртівка, мікробіологічна петля, мікробіологічна голка, предметні та покривельні скельця, фільтрувальний папір, скляна паличка, піпетка, колба з водою, барвники (метиленовий синій або нейтральний червоний), імерсійне масло, дезінфікуючий розчин (3 % розчин перекис водню, 2 % розчин марганцевокислого калію або 70 % розчин етилового спирту).

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями щодо проведення мікроскопування.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Будова мікроскопу. Мікроскопування. Вивчення невидимих неозброєним оком клітин мікроорганізмів, розміри яких не перевищують десятків і сотень мікрометрів, можливо тільки за допомогою мікроскопів. Ці прилади дозволяють отримувати в сотні раз (світлові мікроскопи) і в десятки – сотні тисяч разів (електронні мікроскопи) збільшене зображення досліджуваних об'єктів. За допомогою мікроскопа вивчають морфологію клітин мікроорганізмів, їх зростання і розвиток, проводять первинну ідентифікацію досліджуваних організмів, ведуть спостереження за характером розвитку мікробних ценозів (співтовариств) в різних субстратах.

Мікроскоп складається з двох частин: механічної (підсобної) і оптичної (головної) (рис. 6.1). До механічної частини мікроскопа відносять штатив, предметний столик і тубус. Штатив має основу і тубусотримач у формі дуги. До нього примикає система для регуляції положення тубуса,

яка приводиться в рух обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів.

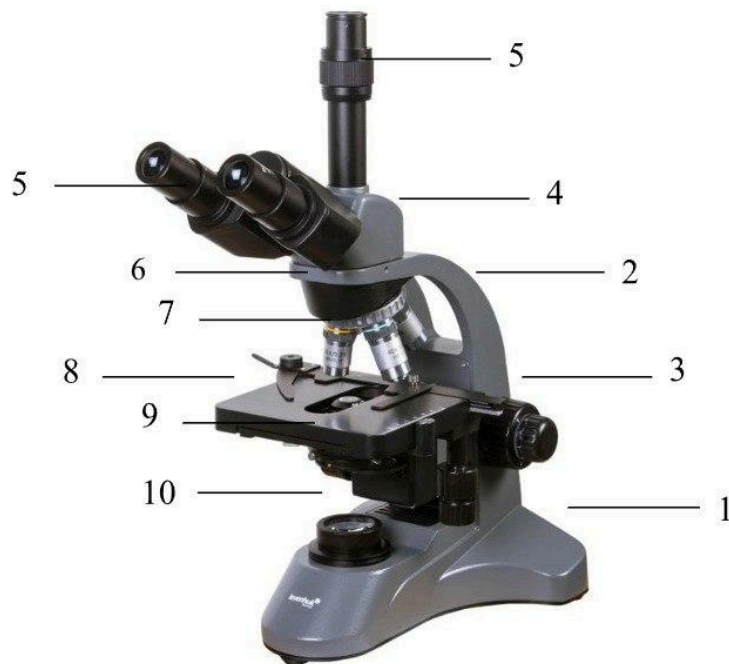


Рис. 6.1. Будова тринокулярного мікроскопу: 1 – основа; 2 – опорна стійка; 3 – ручка регулювання фокусу (макрогвинт, мікрогвинт); 4 – окулярна насадка; 5 – окуляри; 6 – револьверна головка; 7 – об’єктиви; 8 – предметний столик; 9 – конденсатор; 10 – освітлювальна система

Макрометричний гвинт (макрогвинт) служить для попередньої орієнтовної установки зображення даного об’єкту.

Мікрометричний гвинт (мікрогвинт) використовують для подальшої чіткої установки на фокус. При повному повороті мікрогвинта труба пересувається на 0,1 мм. При обертанні гвинтів за годинниковою стрілкою труба опускається у напрямку до препарату, при обертанні проти годинникової стрілки – піднімається від препарату.

Предметний столик служить для розміщення препарату з об’єктом дослідження. Предметний столик переміщується за допомогою гвинтів в двох взаємно перпендикулярних напрямках. В центрі столика знаходиться круглий отвір для освітлення препарату знизу. До столику вмонтовано два затиски (клеми) – пружинячі металеві пластинки, призначені для закріплення препарату.

Тубус (труба) – оправа, в яку поміщені елементи оптичної системи мікроскопа. До нижньої частини тубуса прикріплюється револьвер (об’єктив тримач) з гніздами для об’єктивів.

Оптична частина мікроскопа складається з основного оптичного вузла (об’єктив і окуляр) і допоміжної освітлювальної системи. Всі частини

оптичної системи строго центровані відносно один одного. Освітлювальна система знаходиться під предметним столиком.

Конденсор (від лат. *condenso* – згущую), що складається з 2-3 короткофокусних лінз, збирає промені, що йдуть від освітлювального пристрою, і направляє їх на об'єкт. Конденсор необхідний перш за все при роботі з імерсійною системою. Лінзи конденсора вмонтовані в металеву оправу, сполучену із зубчастим механізмом, що дозволяє переміщати конденсор вгору і вниз спеціальним гвинтом. Для регулювання інтенсивності освітлення в конденсорі є ірисова (пелюсткова) діафрагма, що складається із сталевих серповидних пластинок. Забарвлені препарати краще розглядати при майже повністю відкритій діафрагмі, незабарвлені – при зменшеному отворі діафрагми.

Об'єктив – найбільш важлива частина мікроскопа. Це багатолінзова короткофокусна система, від якості якої залежить в основному зображення об'єкту. Зовнішня лінза, повернута плоскою стороною до препарату, називається фронтальною. Саме вона забезпечує збільшення. Решта лінз в системі об'єктиву виконує переважно функції корекції оптичних недоліків, що виникають при дослідженні об'єктів.

Об'єктиви бувають сухі та імерсійні. При роботі з сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктиву і об'єктом дослідження знаходиться повітря. Оптичний розрахунок імерсійних об'єктивів передбачає їх роботу при зануренні фронтальної лінзи об'єктиву в рідку однорідну середовище. При роботі з сухим об'єктивом внаслідок різниці між показниками заломлення скла (1,52) і повітря (1,0) частка світлових променів відхиляється і не потрапляє в око спостерігача.

При роботі з імерсійним об'єктивом необхідно помістити між покривним скельцем і лінзами імерсійне масло. Показник заломлення цього масла близький до показника заломлення скла. Промені в оптично однорідному гомогенному середовищі не змінюють свого напрямку.

Об'єктиви розрізняють по їх збільшенню. Величина збільшення об'єктивів позначена на їх оправі (4x, 10x, 40x, 100x).

Оптичні характеристики об'єктивів:

- ступінь збільшення вказана на корпусі об'єктиву; для імерсійної мікроскопії використовується об'єктив з 100-кратним збільшенням;
- фокусна відстань має розміри від 1,3 до 60 мм; чим більше збільшення лінзи, тим більше її кривизна і менше фокусна відстань;

- числова апертура – це множення показника заломлення середовища (повітря – 1,000; олія – 1,515) на синус кута, якій утворюється крайовими променями, які входять в об'єктив через фронтальну лінзу.; числова апертура вказана на корпусі об'єктиву;

- роздільна здатність – це здатність відображати найдрібніші деталі досліджуваного матеріалу.

Окуляр служить безпосереднім продовженням «лінз» (кришталіків) очей людини. Окуляр складається з двох лінз – очної (верхньої) і польової, або збірної (нижньої) – в металевій оправі. Призначення польової лінзи – збирати промені, що йдуть від об'єктиву, так, щоб вони проходили через маленький отвір очної лінзи. Призначення окуляра – пряме уявне збільшення дійсного зворотного і збільшеного зображення, яке дає об'єктив. Збільшення окуляра вигравійовано на його оправі. Робоче збільшення окуляра коливається в межах від 4x до 15x.

Основні правила роботи з мікроскопом:

- місце для мікроскопа вибирають подалі від прямого сонячного світла;

- робота на столі з темною поверхнею менше стомлює очі;

- краще дивитися в окуляр лівим оком, не закриваючи правого;

- в разі роботи з біноклярною насадкою спочатку регулюють відстань між окуляром відповідно до відстані між очима спостерігача так, щоб поля зору обох окуляра злилися в одне;

- лінзи мають бути завжди чистими. Не можна торкатися пальцями оптичних поверхонь;

- переносити мікроскоп необхідно двома руками: однією тримати штатив, іншою – основу мікроскопа; слід оберегти мікроскоп від поштовхів, зіткнення з сильнодіючими речовинами (кислотами, лугами);

- не рекомендується виймати окуляр з труби, щоб не забруднювати пилом трубу і об'єктиви.

- мікроскоп слід зберігати в чохлі.

Порядок роботи з мікроскопом:

- 1) помістити об'єкт на предметний столик мікроскопа;

- 2) встановити об'єктив на найменше доступне збільшення (4x або 10x);

- 3) підняти конденсор вгору до упору;

- 4) встановити диск регулювання накалу лампи в крайнє положення обертанням від спостерігача;

- 5) включити освітлювач, відрегулювати яскравість горіння лампи;

- 6) сфокусувати мікроскоп обертанням макро- і мікрогвинта на різке зображення об'єкту, що знаходиться на предметному столику;
- 7) вийняти окуляр із тубуса мікроскопа, спостерігаючи в окулярний тубус, розкрити діафрагму конденсора за розміром зіниці об'єктиву;
- 8) встановити окуляр в тубус мікроскопа, спостерігати поле зору об'єкту
- 9) для досягнення найкращої якості зображення рекомендується прикривати діафрагму конденсора на 1/3 вихідної зіниці об'єктиву;
- 10) потім можна переходити до роботи з сильнішими об'єктивами, у тому числі і з імерсійним.

При роботі з імерсійним об'єктивом необхідно:

- 1) підняти конденсор;
- 2) краплю імерсійної рідини нанести на препарат, не розмазуючи її по склу; занурювати в імерсійну рідину можна тільки імерсійні об'єктиви (не сухі!);
- 3) дивлячись збоку, опустити об'єктив до поверхні масляної краплі. Далі, дивлячись в окуляр, обережно опустити об'єктив за допомогою макрогвинта, стежачи за появою зображення. Коли зображення об'єкту з'явиться, переходять до використання мікрогвинта. Якщо зображення не різке – щось зроблене неправильно: забруднена фронтальна лінза об'єктиву, заважають бульбашки повітря в маслі, випадково закрита діафрагма. Причину неякісного зображення треба усунути.
- 4) після закінчення роботи піднімають тубус, знімають препарат і обережно протирають фронтальну лінзу об'єктиву бавовняною серветкою або ватою, змоченою ефіром або етиловим спиртом.

Методи приготування препаратів мікроорганізмів

Техніка відбору культури для приготування препарату. Пробірку з культурою тримають в лівій руці майже в горизонтальному положенні поблизу пальника (рис. 6.2.а.). Перед відбором культури правою рукою виймають ватяну пробку з пробірки, затискаючи її між мізинцем і долонею (рис. 6.2.б.), а край пробірки обпалюють на полум'ї пальники (рис. 6.2.в.). Бактеріологічну голку (петлю) тримають в правій руці великим, вказівним і середнім пальцями. Обпаленою в полум'ї бактеріологічною голкою (петлею) з пробірки беруть невелику кількість мікробної маси (рис. 6.2.г.). Якщо культуру беруть з рідкого середовища, не слід сильно нахилити пробірку, щоб не змочити її краї і пробку. Після відбору культури отвір

пробірки і пробку обпалюють в полум'ї (рис. 6.2.д.) і закривають пробірку (рис. 6.2.е.).

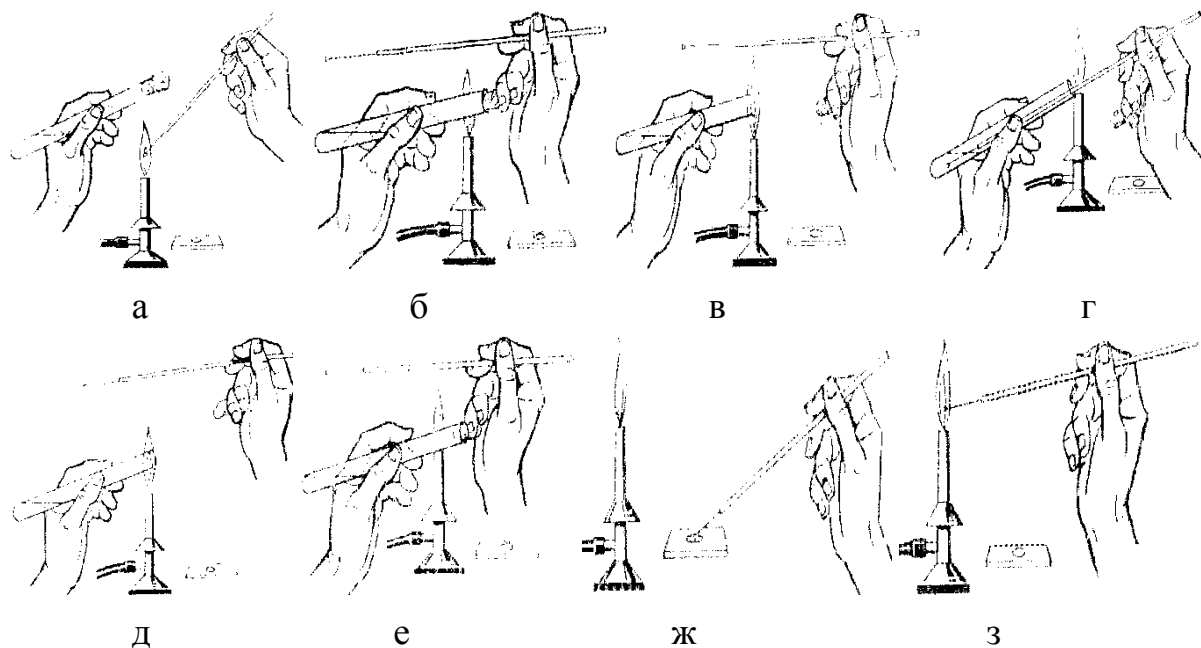


Рис. 6.2. Техніка відбору культури для приготування препарату

Дослідження живих клітин мікроорганізмів методом «роздавленої краплі». Метод застосовують для виявлення рухливості клітин мікроорганізмів, спостереження за розмноженням, утворенням і проростанням спор, встановлення реакції мікроорганізмів на хімічні сполуки і фізичні фактори, вивчення розмірів клітин, характеру їх розташування, визначення запасних речовин в клітині.

Алгоритм приготування тимчасового препарату наступний:

1. На чисте знежирене предметне скло наносять краплю води.
2. Прожареною бактеріологічною петлею з пробірки чи чашки Петрі з культурою беруть невелику кількість мікробної маси і вносять до краплі води.
3. Прожарюють бактеріологічну петлю в полум'ї.
4. Накривають краплю покривним скельцем так, щоб під ним не утворювалися бульбашки повітря.
5. Скляною паличкою притискають покривне скельце до предметного і видаляють надлишок води фільтрувальним папером.

Препарати мікроскопують при злегка затемненому полі зору; конденсор трохи опускають, надходження світла регулюють освітлювачем. Спочатку користуються малим збільшенням – об'єктив 4x або 10x, після того, як виявляють край краплі, встановлюють об'єктив 40x або імерсійний

(100x). При цьому методі забарвлення об'єкту проводять «прижиттєвими» барвниками – вітальне забарвлення. Прижиттєвими барвниками можуть служити метиленовий синій, нейтральний червоний в концентраціях від 0,001 до 0,0001%.

Фіксовані препарати мікроорганізмів. У мікробіології часто готують фіксовані препарати. Їх розглядають під мікроскопом в забарвленому вигляді. Під фіксацією мається на увазі така обробка живого об'єкту, яка дає можливість швидко перервати перебіг життєвих процесів в об'єкті, зберігши його тонку структуру. В результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще фарбуються. Фіксація необхідна і в разі роботи з патогенними мікроорганізмами (в цілях безпеки). Приготування фіксованих препаратів включає наступні етапи:

1. *Приготування мазка.* На чисте знежирене предметне скло наносять краплю води. Прожареною бактеріологічною голкою з пробірки з культурою беруть невелику кількість мікробної маси і вносять до краплі води. Краплю ретельно розмазують петлею по склу на площі 2-4 см². У випадку, якщо суспензія густа, її спочатку розводять водою. Для цього прожареною петлею беруть трохи суспензії і переносять в краплю води на інше предметне скло. Суспензію нормальної густини розмазують тонким шаром по склу.

2. *Висушування мазка.* Мазок сушать на повітрі при кімнатній температурі, правильно приготований тонкий мазок сохне достатньо швидко. Якщо висушування мазка сповільнено, то препарат можна злегка нагрівати в струмені теплого повітря, тримаючи його високо над полум'ям пальника. Сильне нагрівання препарату при сушці не рекомендується, оскільки при цьому можлива коагуляція білків, що спотворює структуру і форму клітин.

3. *Фіксація мазка.* Фіксацію мазка проводять над полум'ям пальника при дослідженні форми клітин або за допомогою хімічних сполук для вивчення внутрішньої структури клітин. У першому випадку препарат 3-4 рази повільно проводять нижньою стороною над полум'ям пальника. Один з поширених прийомів фіксації за допомогою хімічних сполук – обробка препарату 96 % спиртом або сумішшю рівних об'ємів етилового спирту і ефіру (рідина Нікіфорова).

4. *Забарвлення препарату.* При забарвленні мазка препарат поміщають на препаратотримач. На мазок наносять декілька крапель барвника. Залежно від виду барвника і мети дослідження тривалість забарвлення варіює від 1 до 5 хвилин, в окремих випадках займаючи до 30

хвилин і більше. Після закінчення забарвлення препарат промивають водою, фільтрувальним папером видаляють воду, підсушують на повітрі і мікроскопують.

Загальна інформація про мікроскопічні гриби

Гриби – це еукаріоти, що належать до царства *Mycota* (*Fungi*). Вони відрізняються від прокаріотичних мікроорганізмів більш складною будовою і більш досконалим способом розмноження. Класифікацію грибів здійснюють за типом міцелію та способом розмноження: нижчі (*Chytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Hyphochytridiomycetes*) і вищі (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*), досконалі (*Chytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*) та недосконалі (*Deuteromycetes*). Більшість патогенних грибів належить до дейтероміцетів, деякі – до аскоміцетів або зигоміцетів. Гриби розмножуються безстатевим і статевим шляхами. Ті, що розмножуються безстатевим шляхом – вегетативно (брунькуванням, поділом грибниці, спорами), називають недосконалими. Гриби, що розмножуються шляхом статевого процесу – злиття чоловічих та жіночих гамет, внаслідок чого утворюються гаплоїдні клітини – спори, називаються досконалими.

Клітини грибів вкриті оболонкою, мають цитоплазматичну мембрану, чітко диференційоване одне або кілька ядер з ядерцями, комплекс Гольджі, мітохондрії, лізосоми, різноманітні включення.

Культивують гриби на поживних середовищах Сауро, Чапека, сусло-агарі. Більшість з них аероби.

За морфологією відрізняють гриби ниткоподібні (плісняві) і дріжджі, дріжджоподібні гриби роду *Candida*. Клітини пліснявих грибів називають гіфами, вони переплітаються, галузяться, утворюючи тіло гриба – міцелій. Він буває одноклітинний (несептований) – нижчих грибів, і багатоклітинний (септований) – у вищих. Септи – це перегородки в гіфах. Розрізняють субстратний (вегетативний) міцелій і повітряний (репродуктивний), який може бути пігментованим.

Дріжджі і дріжджоподібні гриби роду *Candida* – це одноклітинні мікроорганізми овальної форми. Вони не утворюють міцелій, але *Candida* внаслідок брунькування можуть створювати ланцюжки з подовжених клітин, що називають псевдоміцелієм.

Зигоміцети. Нижчі гриби, мають добре розвинений гіллястий одноклітинний міцелій. Розмножуються як статевим шляхом, так і безстатевим, тобто за допомогою спор. Представник класу – мукор (*Mucor mucedo*) (рис. 6.3, а) розвивається у вигляді білого або сірого нальоту на

продуктах рослинного походження і гної травоядних тварин. Міцелій мукових грибів пронизує субстрат і частково стелиться по його поверхні.

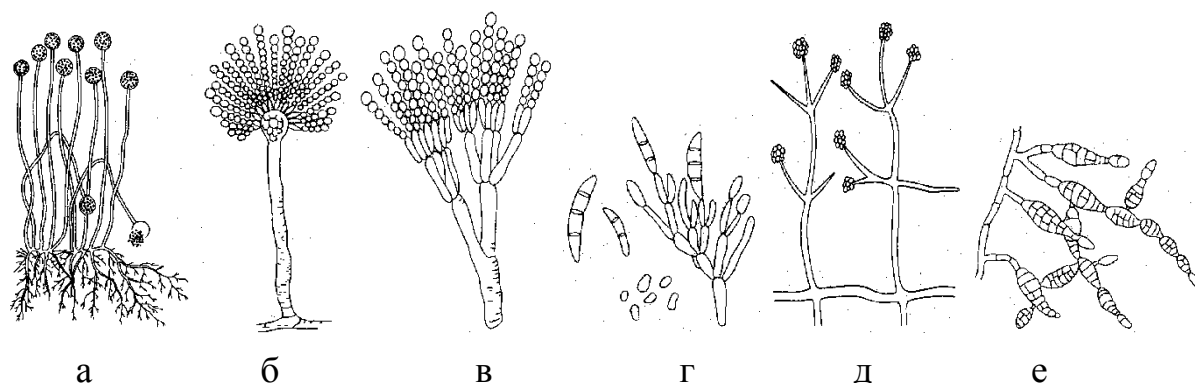


Рис. 6.3. Гриби мікроскопічні:
а – *Mucor*, б – *Aspergillus*; в – *Penicillium*; г – *Fusarium*,
д – *Trichoderma*; е – *Alternaria*

Аскоміцети або сумчасті гриби. Вищі гриби з багатоклітинним або членистим міцелієм, які утворюють спори в сумках, – асках. Вони включають представників еуаскоміцетів (дійсних аскоміцетів), у яких сумки із спорами формуються в результаті статевого процесу на поверхні або у середовищі плодових тіл, що утворюються сплетенням гіф міцелія (можливе безстатеве розмноження екзогенними виникаючими спорами – конідіями), і геміаскоміцетів, у яких плодові тіла відсутні. До геміаскоміцетів відносять більшість дріжджів, що розглядаються як окрема група грибів. Еуаскоміцети включають два найважливіші роди ґрунтових, грибів – *Penicillium* (рис. 6.3, в) і *Aspergillus* (рис. 6.3, б), яких нерідко називають також пліснявими грибами. До групи пліснявих відносять і деяких представників зигоміцетів і недосконалих грибів. Пеніцили і аспергіли мають добре розвинений багатоклітинний міцелій. Розмножуються переважно конідіальним спороутворенням. Спостерігаються у вигляді нальоту блакитного, зеленого, сизого, рідше інших кольорів на продуктах рослинного походження (варенні, томатній пасті, лимонах і апельсинах), виробках зі шкіри, шпалерах. Поширені у верхніх горизонтах ґрунту.

Дейтероміцети або недосконалі гриби. Мають багатоклітинний міцелій, але у них немає статевого процесу і досконалої стадії спороутворення. Розмножуються безстатевим шляхом за допомогою конідій або вегетативно ділянками гіфів. У природі широко поширені представники родів *Fusarium* (рис. 6.3, г), *Trichoderma* (рис. 6.3, д), *Alternaria* (рис. 6.3, е), яких формально відносять до дейтероміцетів.

Зустрічаються вони на рослинних залишках, плодах, насінні і в ґрунті. Серед грибів роду *Fusarium* є сапротрофи, що живуть в ґрунті і на рослинних залишках, і паразити, що викликають захворювання багатьох видів рослин (в'янення, гнилизни коріння, стебел, плодів, хвороби насіння, різні пігментації органів рослин).

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготувати тимчасовий препарат для мікроскопування методом «роздавлена крапля» запропонованих культур мікроорганізмів.
2. Провести мікроскопування готового препарату з об'єктивом 10x та 40x.
3. Знайти в отриманих препаратах гіфи, конідії та спори мікроміцетів.
4. Описати морфологічні структури і культуральні властивості досліджуваних мікроміцетів.

Контрольні запитання

1. Опишіть будову світлового мікроскопу.
2. Опишіть алгоритм мікроскопування.
3. Опишіть алгоритм приготування препарату «роздавлена крапля» культури мікроорганізмів.
4. Опишіть алгоритм приготування фіксованого препарату мікроорганізмів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Тема. *Приготування поживного середовища для досліджень проб ґрунту*

Мета роботи: підготувати поживне середовище для досліджень проб ґрунту.

Обладнання для проведення заняття: автоклав, дистилятор, електрична плита, ваги.

Матеріали для проведення заняття: каструля лабораторна, пенал з набором інструментів, скляна паличка, лійки, колби різного розміру, флакони, чашки Петрі, пробірки, марля, сухе поживне середовища Ендо, сухе поживне середовища агар Сабуро, дистильована вода.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Повторити теоретичні відомості, наведені в роботі № 3.

3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.

4. Відповісти на контрольні запитання.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготувати поживне середовище Ендо за наступним алгоритмом:

- внести 33 г препарату в 1000 мл очищеної води та розмішати;
- кип'ятити до повного розплавлення агару протягом 2-3 хвилин;
- профільтрувати через ватно-марлевий фільтр і знову довести до кипіння.

2. Стерилізувати приготоване середовище в автоклаві за температури 121 ± 1 °C протягом 15 хвилин.

3. Середовище охолодити до температури $47,5 \pm 2,5$ °C та розлити по 25 ± 5 мл в стерильні чашки Петрі. Після застигання, дотримуючись правил асептики, підсушити за температури 37 ± 1 °C протягом 50 ± 10 хвилин.

4. Приготуйте середовище агар Сабуро за алгоритмом, що описаний у практичній роботі № 3.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення терміну «поживне середовище» та визначити сфери їх застосування.

2. Дайте класифікацію поживних середовищ та їх особливості.

3. Назвіть методи та режими стерилізації поживних середовищ.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Тема. Дослідження мікрофлори ґрунту

Мета роботи: освоїти метод посіву проби ґрунту на поживні середовища.

Обладнання для проведення заняття: термостат, ваги.

Матеріали для проведення заняття: ступка, піпетки на 10 мл і 1 мл, стерильні пробірки, колба місткістю 250 мл, колба зі стерильною дистильованою водою, чашки Петрі з середовищем Ендо та агар Сабуро.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.

2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.

3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході

виконання лабораторної роботи.

4. Відповіді на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Ґрунт – природне середовище мікроорганізмів, які беруть участь в круговороті речовин в природі. Мікроорганізми з ґрунту потрапляють в повітря і воду. В 1 г ґрунту знаходиться кілька мільярдів найрізноманітніших мікроорганізмів: гнильні аеробні та анаеробні бактерії, азотфіксуючі, нітрифікуючі й інші бактерії, актиноміцети, гриби, найпростіші. Особливо довго в ґрунті знаходяться спори бактерій і грибів. Найбільша кількість мікроорганізмів міститься на глибині 5-10 см. Ґрунтові мікроорганізми здійснюють процес мінералізації органічних відходів з утворенням гумусу, що забезпечує родючість ґрунту.

Хвороботворні мікроорганізми потрапляють в ґрунт з виділеннями хворих людей і тварин, з відходами, з трупами щурів та інших тварин. Збудники кишкових інфекцій можуть перебувати в ґрунті від декількох днів до місяця, іноді довше. Спори сибірки, ботулізму, правця та газової гангрені можуть зберігатися в ґрунті десятки років. Забруднення продуктів хвороботворними мікробами з ґрунту становить велику небезпеку захворюваннями людей.

Санітарно-показові мікроорганізми

Санітарно-показові мікроорганізми є постійними мешканцями поверхонь і порожнин людського або тваринного організму. Виявлення їх в об'єктах зовнішнього середовища свідчить про забруднення виділеннями людини або тварини. Чим рясніше таке забруднення, тим більше можливість попадання в об'єкт патогенних мікроорганізмів. Санітарно-показовими мікроорганізмами можуть бути тільки ті, що постійно і у великих кількостях містяться у виділеннях людини або тварини, вони повинні зберігати життєздатність у зовнішньому середовищі протягом строків, близьких до термінів виживання патогенних мікроорганізмів, що виділяються тими ж шляхами, але не розмножуватися інтенсивно у зовнішньому середовищі. Вони повинні також легко виявлятися сучасними і досить простими методами дослідження. Основними санітарно-показовими мікроорганізмами щодо кишкових інфекцій, що вказують на фекальне забруднення середовища, вважають бактерії групи кишкових паличок (БГКП). В якості додаткових показників при оцінці деяких об'єктів визначають наявність фекальних стрептококів (ентерококів) і клостридій.

До БГКП відносяться не тільки ешерихії, а й представники родів

цитробактерій, ентеробактері й. Для них характерні такі ознаки: короткі, грамнегативні, палички, що не утворюють спори, на середовищі Ендо вони ростуть в вигляді темно-червоних колоній з металевим блиском або без нього, або у вигляді рожевих колоній з темним центром, зброджують лактозу і глюкозу при 37°C протягом 24 годин з утворенням кислоти і газу. Всі БГКП потрапляють у зовнішнє середовище тільки з кишечника людини і тварин. Найбільше санітарно-показові значення в цій групі має *Escherichia coli*, присутність якої, наприклад, у питній воді, розглядається як ознака нещодавнього господарсько-побутового забруднення.

Присутність ентерококів вважають додатковим показником фекального забруднення води та інших об'єктів. Однак їх виділення вимагає більш складних у приготуванні середовищ і ростуть вони повільніше. Ентерококи є нормальними мешканцями кишечника, але виділяються в зовнішнє середовище в менших кількостях, ніж кишкові палички.

До санітарно-показових клостридій відносять групу грампозитивних, спороутворюючих анаеробних паличок, редукуючих сульфід на сульфід-неоміцінполіміксіновому середовищі (СПН) при інкубації в умовах 45 °С протягом 12-24 годин. Ця група в основному представлена *Clostridium perfringens*. Визначення санітарно-показових клостридій рекомендують проводити в ґрунті і воді, використовуюваної на підприємствах харчової промисловості, а також при виборі нових джерел водопостачання.

Виділення грибів з ґрунту

1. *Метод «контактного скла»* (метод Россі-Холодного) – метод виділення мікроорганізмів безпосередньо з місця їх розташування в ґрунті. Стерильні предметні скельця притискають до ґрунту. Через кілька днів скло струшують для звільнення від великих грудочок ґрунту і поміщають на поверхню агарового середовища з антибіотиком стороною, що стикалася з ґрунтом. Отримані гриби переглядають при малому збільшенні мікроскопа і після певного періоду інкубації колонії пересіюють на свіже середовище.

2. *Метод розведення ґрунтової суспензії*. Найчастіше для цих цілей застосовують розведення 1:10 (10 г ґрунту на 100 мл води), 1:100, 1:1000. Суспензії з великим розведенням висівають на агар.

Після появи спороношення або ознак розвитку міцелію його пересівають на щільне живильне середовище безпосередньо в пробірку на скошений агар або попередньо на агаризоване середовище, розливу в

чашки Петрі. Для звільнення від бактерій, посіви досліджуваних грибів та первинне виділення культур проводять на середовищах з рН 4,0 з додаванням в середовище для посіву антибіотика з широким спектром антибактеріальної дії (наприклад, канаміцин і ін.) в концентрації 1-2 г/л живильного середовища.

Облігатних паразитів вирощують на живих рослинах або спеціальних середовищах. Для подальшої роботи дуже важливо провести розчистку культури, яку можливо здійснити наступними способами:

1) *штрихова розводка*: невелика кількість спороношення гриба знімають петлею і наносять штрихом на поверхню агару в чашки Петрі. По мірі продовження штриха спори все більше розділяються до тих пір, поки в результаті не вдаються індивідуальні колонії;

2) *розведення в стерильній воді*: готують розведення шляхом введення спор в пробірку зі стерильною водою (10 мл), потім стерильною піпеткою переносять певну кількість суспензії (наприклад, 1 мл) в пробірку з 9 мл стерильної води. Свіжа стерильна піпетка використовується, щоб змішати рідину і перенести 1 мл її в чергову пробірку, що містить 9 мл стерильної води. Розведення продовжують в міру потреби. З останнього розведення 1 мл суспензії спор додають до розплавленого агару, охолодженого до 45 °С;

3) *розведення в поживному середовищі*: використовують п'ять пробірок з відповідним середовищем, розплавленим та охолодженим до 45 °С. Потім в одну з пробірок вноситься невелика кількість спор; пробірку обертають між долонями і вміст виливають в чашку Петрі. Спустошену пробірку заповнюють середовищем з іншої пробірки, обертають між долонями і виливають у другу чашку. Процедуру повторюють з рештою трьома пробірками.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготуйте суспензію ґрунту. Для цього відважте 10 г ґрунту і перенесіть навішення в стерильну ступку, додайте 2-3 мл стерильної води і розтріть до пастоподібного стану.

2. Отриману пробу ґрунту (10 г) перенесіть в стерильну колбу, що містить 90 мл стерильної води, розмішайте протягом 5 хвилин і дайте відстоятися 30 хвилин. Це перше розведення досліджуваної проби ґрунту.

3. Приготуйте ряд наступних 10-кратних розведень цієї проби в пробірках в залежності від передбачуваної чисельності мікроорганізмів в пробі. Для приготування кожного наступного розведення використовуйте нову піпетку.

4. Отримані розведення в об'ємі 1 мл посійте: а) на середовище Ендо для визначення загального числа бактерій; б) на середовище агар Сабуро для обліку і виділення актиноміцетів.

5. Рівномірно розподіліть краплю інокуляту на поверхні агару, похитуючи чашку, і залиште на 30 хвилин для адсорбції при кімнатній температурі.

6. Засіяні чашки Петрі через 30 хвилин переверніть догори дном і помістіть в термостат при температурі 28-37 °С для вирощування мезофільної мікрофлори. Кількість бактерій на середовищі Ендо порахуйте через 1-5 діб.

7. Підрахуйте кількість колоній в такий спосіб: дно чашки Петрі маркером розділіть на рівні сектори, враховані колонії відзначайте точками на склі. Підрахуйте середнє число колоній на чашці і далі перерахуйте кількість мікроорганізмів на 1 г повітряно-сухого ґрунту.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте мікрофлору ґрунту та наведіть санітарно-показові мікроорганізми.

2. Охарактеризуйте бактерії групи кишкових паличок.

3. Опишіть алгоритм відбору проб з ґрунтового середовища для мікробіологічного дослідження.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Тема. *Вивчення культуральних і морфологічних ознак живих мікроорганізмів за допомогою мікроскопу в пробах ґрунту*

Мета роботи: освоїти техніку мікроскопування та навчитися описувати морфологічні структури грибів і вимірювати об'єкти при мікроскопуванні.

Обладнання для проведення заняття: лабораторний бокс або шафа витяжна лабораторна, мікроскоп або біокуляр.

Матеріали для проведення заняття: чашки Петрі з чистими культурами грибів на середовищах, спиртівка, мікробіологічна петля, мікробіологічна голка, предметні та покривельні скельця, фільтрувальний папір, скляна паличка, піпетка, колба з водою, барвники (метиленовий синій або нейтральний червоний), імерсійне масло, дезінфікуючий розчин (3 % розчин перекис водню, 2 % розчин марганцевокислого калію або 70 % розчин етилового спирту).

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями, наведеними у практичній роботі № 6.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготувати тимчасовий препарат для мікроскопування методом «роздавлена крапля» запропонованих культур мікроорганізмів.
2. Провести мікроскопування готового препарату з об'єктивом 10x та 40x.
3. Знайти в отриманих препаратах гіфи, конідії та спори мікроміцетів.
4. Описати морфологічні структури і культуральні властивості досліджуваних мікроміцетів.

Контрольні запитання

1. Опишіть будову світлового мікроскопу.
2. Опишіть алгоритм мікроскопування.
3. Опишіть алгоритм приготування препарату «роздавлена крапля» культури мікроорганізмів.
4. Опишіть алгоритм приготування фіксованого препарату мікроорганізмів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

Тема. *Приготування поживного середовища для досліджень проб води*

Мета роботи: підготувати поживне середовище для досліджень проб води.

Обладнання для проведення заняття: автоклав, дистильатор, електрична плита, ваги.

Матеріали для проведення заняття: каструля лабораторна, пенал з набором інструментів, скляна паличка, лійки, колби різного розміру, флакони, чашки Петрі, пробірки, марля, сухе поживне середовища Ендо, дистильована вода.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та

матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.

2. Повторити теоретичні відомості, що представлені в практичній роботі № 3.

3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.

4. Відповісти на контрольні запитання.

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Приготувати поживне середовище Ендо за наступним алгоритмом:

- внести 33 г препарату в 1000 мл очищеної води та розмішати;
- кип'ятити до повного розплавлення агару протягом 2-3 хвилин;
- профільтрувати через ватно-марлевий фільтр і знову довести до кипіння.

2. Стерилізувати приготоване середовище в автоклаві за температури 121 ± 1 °C протягом 15 хвилин.

3. Середовище охолодити до температури $47,5 \pm 2,5$ °C та розлити по 25 ± 5 мл в стерильні чашки Петрі. Після застигання, дотримуючись правил асептики, підсушити за температури 37 ± 1 °C протягом 50 ± 10 хв.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення терміну «поживне середовище» та визначити сфери їх застосування.

2. Дайте класифікацію поживних середовищ та їх особливості.

3. Назвіть методи та режими стерилізації поживних середовищ.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

Тема. *Кількісний облік бактерій в пробах води; визначення колі-титру і колі-індексу кишкової палички*

Мета роботи: освоїти методи відбору проб води, їх посіву та визначення бактеріальної забрудненості води.

Обладнання для проведення заняття: термостат.

Матеріали для проведення заняття: стерильні чашки Петрі з середовищем Ендо, досліджувані проби води, промивалка з водою, мембранні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм, піпетки на 10 мл і 1 мл, стерильні пробірки, колба місткістю 250 мл, колба зі стерильною дистильованою водою.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та

матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.

2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

У воді кількість мікроорганізмів значно вище, ніж в повітрі, так як багато хто з них здатні жити і розвиватися в воді. В 1 мл (см³) води поверхневих джерел може знаходитися до мільйона мікробів. В артезіанській воді мікробів дуже мало.

Поверхневі води річок, озер, водосховищ забруднюються стічними водами населених пунктів, промислових підприємств і тваринницьких ферм. Мікробне забруднення води зростає також після рясних дощів і весняної повені. Проточні водойми (річки, канали) мають здатність до самоочищення, кількість мікробів нижче місця забруднення річки може істотно не змінюватися, а через деякий час чистота води в річці відновлюється.

Вода служить фактором передачі кишкових інфекцій (дизентерії, холери, черевного тифу та ін.), збудники яких потрапляють в неї зі стічними водами. Багато патогенних мікроорганізми (холерний вібріон, збудник туберкульозу та ін.) можуть зберігатися у воді до декількох місяців. На підприємствах харчування повинна використовуватися вода лише питного якості, що пройшла очищення і знешкодження.

Тинкторіальний метод виявлення мікроорганізмів

Метод Грама розробив Крістіан Грам у 1884 р. Серед складних методів фарбування (тинкторіальні властивості – особливості забарвлення мікроорганізмів) він є найбільш поширеним. Він має важливе диференційно-діагностичне значення, оскільки допомагає визначити таксономічне положення тих чи інших бактерій. Грампозитивні бактерії забарвлюються за методом Грама в темно-фіолетовий колір (здатні утворювати міцну сполуку з генціанвіолетом та йодом). Грамнегативні бактерії забарвлюються за методом Грама в червоний колір (сполука з генціанвіолетом та йодом вимивається спиртом, тому вони забарвлюються фуксином в червоний колір).

Методика фарбування за Грамом.

1. На фіксований мазок наносять розчин генціанвіолету на 1-2 хвилини, після чого розчин зливають, не змиваючи його водою.
2. Наносять на мазок розчин Люголя на 1-2 хвилини.

3. Знебарвлюють мазок 96% спиртом протягом 15-20 секунд.
4. Промивають водою.
5. Наносять на мазок розчин фуксину на 1-2 хвилини.
6. Промивають водою, висушують фільтрувальним папірцем.

Хід роботи:

1. Відберіть проби води в стерильні флакони або колби в обсязі 50 або 100 мл безпосередньо перед початком заняття: а) пробу водопровідної води; б) пробу з відкритого водойми (струмок, ключ, ставок). До початку заняття (посіву) проби можна зберігати не більше 3 годин при температурі не вище 4 °С.

2. Приготуйте ряд наступних 10-кратних розведень відібраних проб в пробірках, в залежності від передбачуваної чисельності мікроорганізмів в пробі. Для приготування кожного наступного разу ведення використовуйте нову піпетку.

3. Отримані розведення в об'ємі 1 мл посійте на середовище Ендо для врахування БГКП (бактерії групи кишкової палички або ентеробактерії).

4. У чашки Петрі з середовищем Ендо внесіть по 1 мл останнього і передостаннього розведень, рівномірно розподіліть краплю інокулята на поверхні агару, похитуючи чашку, і залиште на 30 хвилин для адсорбції при кімнатній температурі.

5. Засіяні чашки Петрі через 30 хвилин переверніть догори дном і помістіть в термостат при температурі 28-37 °С для вирощування мезофільної мікрофлори. Кількість бактерій враховуйте через 1-2 доби.

6. Водопровідну воду досліджуйте також методом мембранних фільтрів.

7. Профільтруйте пробу водопровідної води в обсязі 100 мл. Стерильним пінцетом фільтр акуратно перенесіть в чашку Петрі з середовищем Ендо та помістіть в термостат з температурою 37 °С.

8. Враховуйте кількість колоній в такий спосіб: дно чашки Петрі маркером розділіть на рівні сектори, враховані колонії відзначайте точками на склі. Для визначення титру підрахуйте середнє число колоній на чашці і помножьте на розведення.

9. Для підтвердження належності до БГКП з колоній, що вирости на середовищі Ендо, приготуйте фіксовані мазки, пофарбуйте їх по Граму, промікроскопуйте. Грамнегативні бактерії протестуйте по біохімічними властивостями з системою індикаторної паперової (СІБ) для ідентифікації ентеробактерій.

10. Підрахуйте кількість колоній кишкової палички в 1 мл води.

11. Результати запишіть в табл. 11.1.

Таблиця 11.1

Кількісний облік бактерій в пробах води

№ проби	Загальна кількість бактерій в 1 мл води	Колі-титр

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте санітарно-мікробіологічне дослідження водних об'єктів.
2. Що таке тинкторіальні властивості мікроорганізмів?
3. Охарактеризуйте методику фарбування за Грамом.
4. Опишіть алгоритм відбору проб з водного середовища для мікробіологічного дослідження.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

Тема. Мікробіологічне дослідження твердих поверхонь методом змивів

Мета роботи: освоїти техніку мікробіологічного дослідження твердих поверхонь методом змивів.

Обладнання для проведення заняття: термостат.

Матеріали для проведення заняття: стерильні чашки Петрі, середовище м'ясо-пептонний агар, рамка для взяття змивів, стерильні аплікатори, гумка з тримачем для відбору проб, стерильні піпетки на 10 мл і 1 мл, стерильні пробірки, колба місткістю 250 мл, колба зі стерильною дистильованою водою, досліджувані тверді поверхні на вибір студента.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Ознайомитися з метою заняття, а також списком обладнання та матеріалами, необхідними для виконання лабораторної роботи.
2. Ознайомитися з теоретичними відомостями.
3. Виконати завдання, послідовність яких описана в ході виконання лабораторної роботи.
4. Відповісти на контрольні запитання.

Теоретичні відомості

Бактеріологічний аналіз поверхонь обладнання, виробничого інвентарю, посуду, одягу, рушників, а також рук персоналу є обов'язковим розділом комплексних санітарних досліджень у харчовій промисловості, на підприємствах громадського харчування, торгівлі тощо. Основним методом відбору проб для даних досліджень твердих поверхонь є *метод змивів*. Про мікробну забрудненість предметів судять по загальній кількості

мікроорганізмів на одиниці поверхні (зазвичай на 1 см²), а також по наявності кишкових паличок, як показників фекального забруднення. В окремих виробничих приміщеннях досліджують наявність умовно-патогенних бактерій (стафілококів, сальмонел тощо).

Важливою умовою санітарно-бактеріологічного контролю є правильний вибір часу забору проб (так, змиви з рук, санітарного одягу і рушників беруть до початку роботи, в перервах і після неї, а в цехах обробки сирової продукції – тільки до роботи).

У досліджуваних змивах не повинно бути кишкових паличок, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, їх присутність свідчить про грубе порушення санітарних правил і вимагає проведення термінових профілактичних заходів.

Для оцінки санітарного стану поверхні обладнання та інвентарю користуються шкалою наведеною в таблиці 12.1.

Таблиця 12.1

Шкала оцінки санітарного стану твердих поверхонь

Оцінка чистоти	Кількість мікроорганізмів на 1 см ² поверхні (КУО)
Добре	0-100
Задовільно	101-1000
Незадовільно	Більше 1000

Хід виконання завдань лабораторної роботи

1. Стерильним пінцетом беруть з чашки Петрі стерильний аплікатор, змочений у 10 см³ стерильної води (фізіологічному розчині) і обмежують їм певну поверхню столу, наприклад, 25 см². Змивають цю поверхню.

2. Повторити дії п. 1 ще у трьох місцях столу, щоб загальна площа змитої поверхні склала 100 см².

3. Занурити аплікатор у пробірку з водою і струшувати вручну упродовж 3 хв.

4. В умовах стерильності відібрати стерильною піпеткою 1 мл суспензії та внести на дно стерильної попередньо підписаної чашки Петрі.

5. Залити в чашку Петрі розплавлений і охолоджений до температури 48...50 °С м'ясо-пептонний агар, перемішати середовище і

суспензію круговими обертами.

6. Після застигання агару перевернути чашку догори дном і поставити у термостат для культивування мікроорганізмів при температурі 37°C на 24-48 год.

7. Підрахувати кількість колоній, які виростили в чашці Петрі.

8. Вирахувати мікробне число за формулою:

$$M = \frac{n \cdot 10}{S},$$

де M – мікробне число; n – кількість колоній на чашці; 10 – вихідне розведення змиву; S – площа змиву, см².

Контрольні запитання

1. Для чого і в який час проводять змиви з твердих поверхонь?
2. Як проводять змиви з поверхні столу, посуду тощо?
3. Які мікробіологічні показники визначають при санітарно-бактеріологічному контролі?

Список літератури

1. Бондар І.В. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія / І.В. Бондар, В.М. Гуляев. – Дніпродзержинськ : ДДТУ, 2004. – 280 с.
2. ДСП 9.9.5.-080-02. Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю / ДСП (Державні Санітарні Правила. – [Чинний від 2002.01.28]. – К.: Державна санітарно-епідеміологічна служба України, 2002.
3. ДСТУ 2636-94. Загальна мікробіологія. Терміни та визначення / Державний стандарт України. – [Чинний від 1995.07.01]. – К.: Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, 1994.
4. ДСТУ 2881-94. Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення / Державний стандарт України. – [Чинний від 1996.01.01]. – К.: Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, 1994.
5. ДСТУ 3803-98. Біотехнологія.. Терміни та визначення / Державний стандарт України. – [Чинний від 2000.01.01]. – К.: Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, 1998.
6. Екологія грибів / Г. Л. Антоняк, З. І. Калинець-Мамчур, І. О. Дудка та ін. – Львів : ЛНУ ім. Івана Франка, 2013. – 628 с.
7. Леонтьєв Д.В., Акулов О.Ю. Загальна мікологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів. – Харків: Основа, 2007. – 225 с.
8. Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами»: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 24.01.2008 № 26. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text> (дата звернення: 20.02.2025). – Назва з екрана.
9. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi: 9th ed. / P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David, J. A. Stalpers. – Egham: CABI Bioscience; Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2001. – 624 p.
10. Sick building syndrome: are we doing enough? / A. Ghaffarianhoseini, Al Waer, H. Omrany et al. // Architectural Science Review. – 2018. – № 61(3). – P. 99–121.

Приготування деяких барвників та поживних середовищ

1. Барвники

Фуксин основний спиртовий розчин - насичений

Фуксин основний кристалічний - 10 г

Етиловий спирт, 96 % - 100 мл

Фуксин розчиняють в 100 мл 96 % -ного етанолу. Розчин може зберігатися довгий час в пляшці з темного скла з притертою пробкою.

Фуксин основний карболовий - фуксин Ціля

Фуксин основний кристалічний - 1 г

Карболова кислота (фенол) - 5 г

Етиловий спирт, 96 ° - 10 мл

Дистильована вода - 100 мл

При приготуванні розчину попередньо зважують певну кількість (1 г) фуксину основного кристалічного, вносять в порцелянову ступку і розтирають з певною кількістю (5 г) карболової кислоти, додаючи спирт невеликими порціями і дистильовану воду до повного розчинення кристалів, після чого доливають воду, що залишилася. Приготований барвник ставлять в термостат при 37 °С на дві доби. Потім фільтрують через складчастий паперовий фільтр. Фуксин основний карболовий стійкий і може зберігатися довго. Зберігати слід в пляшці з темного скла з притертою пробкою.

Фуксин основний карболовий можна приготувати іншим способом:

Спочатку готують два розчини. 1-й розчин: фуксин основний кристалічний - 1 г, етиловий спирт, 96 ° - 10 мл розтирають у фарфоровій ступці до повного розчинення кристалів фуксину. 2-й розчин: карболова кислота - 5 г, дистильована вода - 95 мл. Воду підігрівають до 50 °С для кращого розчинення карболової кислоти. Другий розчин вливають в перший, добре збовтують і фільтрують через складчастий паперовий фільтр.

Фуксин основний, водний (фуксин Пфейффера)

Карболовий фуксин Ціля - 10 мл

Дистильована вода - 90 мл

Водний фуксин нестійкий, його краще готувати безпосередньо перед вживанням. Розчин водного фуксину може зберігатися не більше 10 днів.

Карболовий генціановий фіолетовий

Генціановий фіолетовий (кристали) - 1 г

Етиловий спирт, 96 % - 10 мл

Карболова кислота - 5 г

Дистильована вода - 100 мл.

Техніка приготування карболового генціановий фіолетового така ж, як карболового фуксину Ціля. При приготуванні карболового генціановий фіолетового можна також готувати заздалегідь два розчину.

1-й розчин

Генціановий фіолетовий - 1 г

Етиловий спирт, 96 % - 10 мл

2-й розчин

Карболова кислота - 5 г

Дистильована вода - 95 мл

Послідовність і спосіб приготування першого і другого розчинів такі ж, як і при приготуванні карболового фуксину Циля.

2. Універсальні поживні середовища

М'ясопептонний бульйон. Готують м'ясну воду: 1 кг яловичого м'яса, звільненого від кісток, жиру, сухожиль, пропускають через м'ясорубку, заливають 2 л водопровідної води. Фарш наполягають у воді 12-24 години на холоді. За цей час з м'яса екстрагуються водорозчинні білки, амінокислоти, вітаміни, вуглеводи, мінеральні та інші речовини. Настій фільтрують через подвійний шар марлі, м'ясо добре віджимають і фільтрат кип'ятять 30 хв для згортання білків. Знявши жир, охолоджену рідину пропускають через ватно-марлевий фільтр і доливають водою до початкового об'єму. М'ясну воду розливають по колбам або пляшках і стерилізують в автоклаві при 0,1 МПа протягом 20 хв.

Для приготування мясопептонного бульйону до м'ясної води додають 1 % пептону і 0,5 % хімічно чистого хлориду натрію, кип'ятять 10 хв, фільтрують через складчастий паперовий фільтр, встановлюють рН 7,2-7,4 10 % розчином двовуглекислої соди і знову кип'ятять 10 хвилин. М'ясопептонний бульйон повинен мати солом'яний колір і бути абсолютно прозорим. Його розливають в пробірки, колби, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують при тиску 0,1 МПа 20-30 хв.

Поживний бульйон можна приготувати із заміників м'яса (м'ясного екстракту, рибного гідролізату) за способом, вказаним на етикетці.

М'ясопептонний агар готується з мясопептонного бульйону з додаванням 2-3 % подрібненого або порошкоподібного агар-агар. Розчин нагрівають до кипіння і кип'ятять до повного розчинення агару. Потім розчин охолоджують до 50 °С і освітлюють збитим курячим білком (1 білок на 1 л середовища), змішаним з 30 мл води, знову доводять до кипіння і кип'ятять 20 хв. Білок згортається, осідає і освітлює середовище. Гарячий агар фільтрують через ватно-марлевий шар, доводять до рН 7,2-7,4, розливають по пробірках або колбах і стерилізують 20 хв при тиску 0,1 МПа.

Пептонна вода. Розчиняють 30 г пептону в 1 л дистильованої води і стерилізують 20 хвилин при тиску 0,1 МПа. Пептонну воду можна також приготувати таким чином: до 1 л дистильованої води додають при нагріванні 10 г пептону, 5 г хлориду натрію і 0,1 г нітрату калію. Фільтрують через паперовий фільтр і встановлюють рН 7,6-7,8. Розливають по пробірках і стерилізують текучою парою дрібно по 30 хв протягом 3 діб.

Солодове сусло. 250-300 г ячмінного сухого солоду грубого помелу заливають 1 л водопровідної води, нагрівають до 48-50 °С і, безперервно

помішуючи, щоб уникнути утворення грудочок, підтримують температуру протягом 30 хв. Потім температуру підвищують до 55-58 °С, через 30 хв до 63 °С і на цьому рівні витримують суміш до повного оцукрювання крохмалю. Готове середовище віджимають через полотняний фільтр, потім фільтрують через складчастий паперовий фільтр. У фільтраті визначають концентрацію сухих речовин (СР) при 20 °С, яка зазвичай становить 18-20 %. До потрібної концентрації фільтрат розводять водою. Для вирощування дріжджів солодове сусло повинно мати концентрацію 6-8% СР, для молочнокислих бактерій – 8-12% СР, для міцеліальних грибів 3-4%, рН середовища 5,6-6,0. При більш низькому значенні рН сусло підлужують 10 % розчином двовуглекислої соди або гідроксиду натрію. Далі сусло розливають в колби або пробірки, закривають їх ватно-марлевими пробками і стерилізують при тиску 0,05 МПа 30 хв.

Сусло-агар. При приготуванні сусло-агару до солодового сусла додають 2% агару. Для мікроорганізмів, що утворюють кислоти додають також трохи крейди. Середовище стерилізують 30 хвилин при тиску 0,05 МПа або дрібно текучим паром. Середовище використовується для виділення, вирощування і зберігання дріжджів, міцеліальних грибів, молочнокислих і оцтовокислих бактерій.

3. Спеціальні (елективні) поживні середовища

Середовища для виявлення стафілококів

Молочно-сольовий агар: в 100 см³ поживного агару розчиняють при кип'ятінні 6,5 г хлориду натрію, стерилізують при 0,1 МПа протягом 20 хвилин. До розплавленого і охолодженого до 45 °С агару додають 10 см³ на 100 см³ знежиреного стерилізованого молока, ретельно перемішують і розливають тонким шаром в чашки Петрі. Враховують колонії із зоною просвітлення.

Жовточно-сольовий агар: до 150 см³ розплавленого і охолодженого до 45 °С 6 % сольового агару стерильно додають 50 см³ жовткового розчину (1 жовток курячого яйця розчиняють в 150-200 см³ фізіологічного розчину). Швидко перемішують і розливають у чашки Петрі.

Середовища для культивування дріжджів і мікроскопічних грибів

Середовище Сабуро. Основою цього середовища є дріжджова вода. Для приготування дріжджової води 70-100 г свіжих пресованих дріжджів (7-10 г сухих дріжджів) кип'ятять протягом 20-30 хв в 1 л дистильованої води і відстоюють в високому циліндрі на холоді 12 годин. Відстоюну рідину декантують, додають ще 1 л води, кип'ятять 30 хв, фільтрують, доводять рН до необхідного значення. Приготовану середу стерилізують дрібно по 20 хвилин 2-3 доби. До 100 мл стерильної дріжджовий води додають 1 % пептону, 2 % агару, після розчинення агару вносять 4% глюкози або мальтози, фільтрують, розливають в пробірки і стерилізують при 0,05 МПа протягом 20 хвилин. Середовище можна готувати і на звичайній 1 % пептонній воді.

Картопляно-глюкозний агар. Очищений і нарізаний скибочками картопля масою 200 г заливають 1 л дистильованої води і кип'ятять протягом 1 години. Відвар фільтрують, до фільтрату додають воду до початкового об'єму, 2 % глюкози і 2-3 % агар-агару. Середовище розливають в пробірки або колби і стерилізують при 0,1 МПа протягом 10 хв. При вживанні встановлюють рН 3,5 за допомогою 10 % стерильного розчину безводної лимонної кислоти.

Синтетичне середовище Чапека для грибів. Склад середовища (в г/л): сахароза або глюкоза 30, дигідрофосфат калію 1,0, нітрат натрію 2,0, сульфат магнію 0,5, хлорид калію 0,05, сульфат заліза 0,1, агар 20. Наважку агару витравлюють і додають до зазначених інгредієнтів, попередньо розчиненим у 1 л дистильованої води, прогрівають текучим паром, встановлюють рН 4,0-5,5 10 % розчином лимонної кислоти або гідроксиду натрію. Фільтрують, розливають в пробірки і стерилізують дрібно текучим паром 3 діб по 30 хв.

Середовища для виявлення та ідентифікації бактерій групи кишкової палички

Середовище Кеслера: до 1 л водопровідної води додають 10 г пептону і 50 мл свіжої бичачої жовчі. Суміш кип'ятять на водяній бані 30 хв, помішуючи, після чого фільтрують через вату, додають 2,5 г глюкози і доводять обсяг до 1 л. Встановлюють реакцію середовища (рН 7,4-7,6) і додають 2 мл 1 % водного розчину кристалічного фіолетового. Середовище розливають в пробірки або колби з поплавками в кількостях, передбачених для контролю окремих продуктів. Стерилізують при 0,05 МПа протягом 20 хв. Колір середовища повинен бути темно-фіолетовим.

Лактозо-пептонне (глюкозо-пептонне) середовище. 10 г пептону, 5 г натрію хлористого, 5 г лактози (глюкози) розчиняють при нагріванні в 1 л дистильованої води. Після розчинення інгредієнтів встановлюють рН 7,4-7,6. Середовище розливають по пробірках і стерилізують при 0,05 МПа 10-15 хв.

Середовище Ендо (фуксин-сульфітний агар): в 5 мл стерильної води розчиняють 1 г лактози, підігрівають на водяній бані при 100 °С протягом 5 хв, дотримуючись стерильність, додають до 100 мл розплавленого 2% -ного мясопептонного агару з рН 7, 6-7,8. В окрему стерильну пробірку вносять 0,5 мл приготованого напередодні і профільтрованого 10%-ного розчину основного фуксину, до якого додають свіжо приготований 10% -ний розчин сульфіту натрію до отримання блідо-рожевого забарвлення. Отриману суміш вносять у розплавлений лактозний агар, ретельно перемішують, уникають спінювання, і розливають в стерильні чашки Петрі. Середовище Ендо повинно бути приготовано свіжим.

Навчально-методичне видання

БІОЛОГІЯ. МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки

до виконання лабораторних робіт
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня
вищої освіти за спеціальностями 101 «Екологія»,
183 «Технологія захисту навколишнього середовища»
та 076 «Підприємство та торгівля»

Укладачі: **Перебинос** Альона Ростиславівна,
Кривомаз Тетяна Іванівна

Комп'ютерне верстання *А. П. Селівестрової*

Ум. друк. арк. 3,49. Обл.-вид. арк. 3,75
Електронний документ. Вид № 43/V-25.

Виконавець і виготовлювач

Київський національний університет будівництва і архітектури
Проспект Повітряних Сил, 31, Київ, Україна, 03680

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єктів
видавничої справи ДК № 808 від 13.02.2002 р