

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА  
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ, БІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БОТАНІКИ ТА ЕКОЛОГІЇ

*Л. О. Мікуліч, М. І. Рогожук*

## **МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ВІРУСОЛОГІЯ**

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт  
для здобувачів вищої освіти ОС «Бакалавр»  
денної та заочної форм навчання  
спеціальності 091 Біологія та біохімія ОП «Біологія»

Вінниця  
2024

УДК 579:578](076.5)

М 597

*Затверджено на засіданні кафедри ботаніки та екології  
факультету хімії, біології і біотехнологій ДонНУ імені Василя Стуса  
(протокол № 8 від 8 лютого 2024 р.)*

**Укладачі:**

*Мікуліч Л. О.*, старший викладач кафедри ботаніки та екології;

*Рогожук М. І.*, асистент кафедри ботаніки та екології.

**Рецензенти:**

*Єрмішев О. В.*, кандидат хімічних наук, доцент, доцент кафедри біофізики і фізіології;

*Приседський Ю. Г.*, доктор біологічних наук, доцент, професор понад два роки, доцент кафедри ботаніки та екології.

**М 597** Мікробіологія та вірусологія: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти ОС «Бакалавр» денної та заочної форм навчання спеціальності 091 Біологія та біохімія ОП «Біологія» / укл. Л. О. Мікуліч, М. І. Рогожук. Вінниця: ДонНУ імені Василя Стуса, 2024. 44 с.

У методичних вказівках представлено теоретичний матеріал за основними розділами навчальної дисципліни, завдання для виконання лабораторних робіт, питання для самостійної роботи. В кожній лабораторній роботі наведені інструкції щодо її виконання, за допомогою яких здобувачі освіти можуть організувати свою роботу під час лабораторних занять.

Методичні вказівки рекомендовано для здобувачів вищої освіти ОС «Бакалавр» денної та заочної форми навчання спеціальності 091 Біологія та біохімія.

**УДК 579:578](076.5)**

© Мікуліч Л. О., 2024

© Рогожук М. І., 2024

© ДонНУ імені Василя Стуса, 2024

## ЗМІСТ

<b>Загальні положення</b> .....	4
<b>Лабораторна робота 1.</b> Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Лабораторний посуд у мікробіологічній практиці .....	6
<b>Лабораторна робота 2.</b> Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини. Форми бактерій .....	11
<b>Лабораторна робота 3.</b> Техніка приготування мазків й методи фарбування мікроорганізмів.....	14
<b>Лабораторна робота 4.</b> Методи стерилізації поживних середовищ та мікробіологічного посуду .....	17
<b>Лабораторна робота 5.</b> Приготування поживних середовищ для мікроорганізмів та культивування грибів .....	19
<b>Лабораторна робота 6.</b> Санітарно-бактеріологічні дослідження мікрофлори повітря закритих приміщень .....	21
<b>Лабораторна робота 7.</b> Виділення чистих культур та клітинні включення.....	23
<b>Лабораторна робота 8.</b> Морфологія пліснявих грибів та актиноміцетів .....	25
<b>Лабораторна робота 9.</b> Кількісний аналіз бактерій у воді .....	29
<b>Лабораторна робота 10.</b> Спиртове бродіння .....	30
<b>Лабораторна робота 11.</b> Молочнокисле бродіння .....	31
<b>Лабораторна робота 12.</b> Отримання накопичувальної культури збудників маслянокислого бродіння .....	34
<b>Лабораторна робота 13.</b> Накопичувальна культура нітрифікуючих бактерій.....	35
<b>Лабораторна робота 14.</b> Аеробне розкладання клітковини.....	37
<b>Лабораторна робота 15.</b> Мікрофлора тіла людини.....	38
<b>Лабораторна робота 16.</b> Виявлення чутливості бактерій до антибіотиків .....	41
<b>Список використаних джерел</b> .....	43

## ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Мета вивчення навчальної дисципліни «Мікробіологія та вірусологія» полягає у наданні здобувачам теоретичних знань про мікроорганізми, предмет мікробіології та навички роботи з ними, ознайомленні майбутніх фахівців з умовами та факторами, що впливають на ріст і біосинтез цих організмів, перспективи їх використання в біотехнології та мікробіології, біомоніторингу екологічного стану довкілля.

За результатами вивчення дисципліни треба очікувати такі компетентності:

### ***Компетентності здобувачів вищої освіти:***

- здатність до пошуку, оброблення та аналізу інформації з різних джерел;
- здатність демонструвати базові теоретичні знання в галузі біологічних наук та на межі предметних галузей;
- здатність досліджувати різні рівні організації живого, біологічні явища і процеси;
- здатність здійснювати збір, реєстрацію і аналіз даних за допомогою відповідних методів і технологічних засобів у польових і лабораторних умовах;
- здатність до критичного осмислення новітніх розробок у галузі біології і професійній діяльності;
- здатність до аналізу механізмів збереження, реалізації та передачі генетичної інформації в організмі;
- здатність аналізувати результати взаємодії біологічних систем різних рівнів організації, їхньої ролі у біосфері та можливості використання у різних галузях господарства, біотехнологіях, медицині та охороні навколишнього середовища.

### **Програмні результати навчання:**

- планувати, виконувати, аналізувати дані і презентувати результати експериментальних досліджень в галузі біології;
- демонструвати навички оцінювання непередбачуваних біологічних проблем і обдуманого вибору шляхів їх вирішення;
- знати та розуміти основні терміни, концепції, теорії і закони в галузі біологічних наук і на межі предметних галузей;
- дотримуватися положень біологічної етики, правил біологічної безпеки і біологічного захисту у процесі навчання та професійній діяльності;
- знати основи систематики, методи виявлення та ідентифікації неклітинних форм життя, прокаріот і еукаріот та застосовувати їх для вирішення конкретних біологічних завдань;
- розуміти структурну організацію біологічних систем на молекулярному рівні;

– демонструвати знання будови, процесів життєдіяльності та функцій живих організмів, розуміти механізми регуляції фізіологічних функцій для підтримання гомеостазу біологічних систем;

– знати механізми збереження, реалізації та передачі генетичної інформації та їхнє значення в еволюційних процесах;

– аналізувати взаємодії живих організмів різних рівнів філогенетичної спорідненості між собою, особливості впливу різних чинників на живі організми та оцінювати їхню роль у біосферних процесах трансформації речовин і енергії;

– аналізувати форми взаємовідносин між мікро- та макроорганізмами з визначенням основних напрямів цих процесів;

– аргументувати вибір методів, алгоритмів планування та проведення польових, лабораторних, клініко-лабораторних досліджень, у т. ч. математичних методів та програмного забезпечення для проведення досліджень, обробки та представлення результатів.

Методичні вказівки з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія» допоможуть здобувачам освіти засвоїти правила роботи в мікробіологічній лабораторії, методи фарбування клітин мікроорганізмів, стерилізації поживних середовищ та мікробіологічного посуду, приготування різних типів поживних середовищ, розпізнавати окремі групи й види мікроорганізмів. Також здобувачі освіти ознайомляться з будовою бактерій, морфологією пліснявих грибів, методикою санітарно-бактеріологічного дослідження мікрофлори повітря, особливостями процесів спиртового та молочнокислого бродіння.

## *Лабораторна робота 1 (2 години)*

### **Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Лабораторний посуд у мікробіологічній практиці**

**Мета роботи:** ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії, вивчити лабораторний посуд, який використовується у мікробіологічній практиці.

**Матеріали та обладнання:** мікроскоп, предметні скельця, покривні скельця, бактеріологічні петлі, чашки Петрі, піпетки, колба Кауфмана, бюретки, циліндри, воронки, термостат, автоклав.

Мікробіологічні дослідження здійснюються у спеціально обладнаних приміщеннях – мікробіологічних лабораторіях. Більшість мікробіологічних аналізів проводиться в стерильних умовах для виключення забруднення зовнішнього середовища й персоналу мікробами з дослідного матеріалу.

До основного обладнання лабораторії належать мікроскопи, термостати для культивування мікроорганізмів, прибори для стерилізації, холодильники та ін. За кожним студентом закріплюється постійне робоче місце.

### **Правила роботи студентів у лабораторії**

1. Здобувач освіти повинен мати в лабораторії постійне місце роботи.
2. Забороняється входити в лабораторію у верхньому одязі, головному уборі, працювати дозволяється тільки в халаті.
3. Забороняється на робоче місце класти сторонні речі.
4. Під час роботи треба якомога менше ходити, відкривати та закривати двері, щоб не допускати забруднення дослідного матеріалу мікрофлорою.
5. Категорично забороняється в лабораторії палити, їсти, торкатися брудними руками обличчя, класти будь-що на підлогу.
6. Пінцети, шпатель, предметне та покривне скло після роботи занурювати у посуд із дезінфікуючим розчином, голки із залишками культури знешкоджувати в полум'ї спиртівки.
7. На пробірках та чашках Петрі з культурами позначати прізвище, номер групи, дату посіву.
8. Після роботи на робочому місці навести порядок та обов'язково вимити руки з милом.

### **Правила надання невідкладної медичної допомоги в лабораторії**

1. У разі поранення склом видалити його залишки з рани, обробити рану йодом і забинтувати.

2. У разі термічного опіку першого й другого ступеня рану промити холодною водою, а потім 2 %-вим розчином питної соди або 5 %-вим розчином перманганату калію. В якості примочки можна використовувати 96 %-вий етиловий спирт або абсолютний спирт, який дезинфікує та знеболює.

3. У разі опіку кислотою уражене місце промити холодною водою, а потім покласти примочку з 2%-вого содового розчину.

4. У разі опіку лугами уражене місце промити холодною водою, а потім покласти примочку зі слабого розчину оцтової кислоти.

5. У разі отруєння газом постраждалого вивести на свіже повітря і терміново викликати швидку.

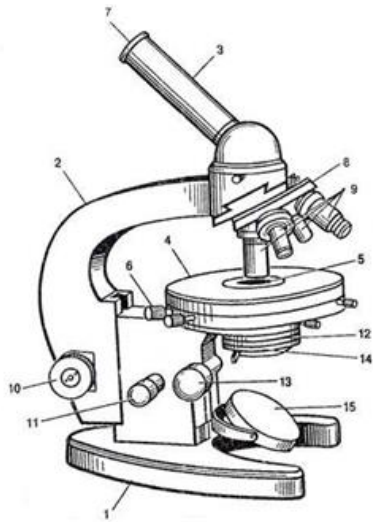
### **Мікроскоп і техніка роботи з ним**

У мікробіологічній практиці використовують мікроскопи МБІ–1, МБР–1, МБР–1А, М–9 та ін. Мікроскоп – складний оптичний прилад, призначений для вивчення об'єктів, розміри яких вимірюються у мікронах ( $1 \text{ мкм} = 1 \times 10^{-3} \text{ мм}$ ). Звичайний світловий мікроскоп збільшує об'єкт у кілька разів. У лабораторній практиці найчастіше використовують імерсійні мікроскопи, які дають змогу досліджувати мікроорганізми розміром не більше 0,2–0,3 мкм.

У мікроскопі розрізняють механічну (штатив з підковоподібною підставкою, предметний стілець, тубус із «револьвером» і системою гвинтів його руху та налаштування) і оптичну частини (освітлювач, об'єктив, окуляр).

Об'єктив – найважливіша частина мікроскопу. На ньому знаходяться цифрові позначки: 8, 10, 20, 40, 68, 80, 90, 100, 120, які відповідають ступеню збільшення. Загальне збільшення мікроскопа дорівнює множенню збільшення об'єктива й окуляра (наприклад,  $90 \times 15 = 1\,350$ ). Існують об'єктиви сухі: 8x, 10x, 40x та ін. (лінза знаходиться на деякій відстані від препарату) та вологі (імерсійні) – об'єктиви більших збільшень (80x, 90x та ін.), під час роботи з якими використовують імерсійну олію (олійна імерсія), воду (водна імерсія). Усунення світорозсіювання досягається способом використання імерсійної рідини, в якій показник заломлення ( $n$  води = 1,3;  $n$  гліцерину = 1,47;  $n$  кедрової олії = 1,57 та ін.) наближається до показника заломлення скла ( $n = 1,52$ ). Окуляр складається з двох лінз, розміщених одна над одною в оправі циліндричної форми.

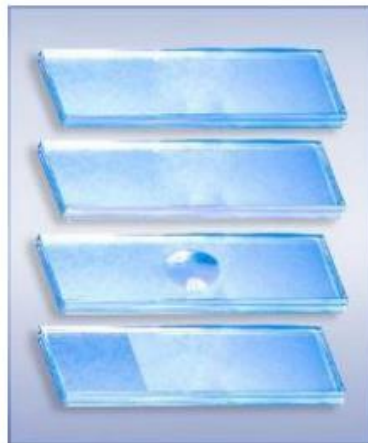
Під час роботи з імерсійним об'єктивом краплину заломлюючої рідини (олія, вода, гліцерин і под.) наносять на дослідний препарат і занурюють у неї об'єктив. Імерсійна олія й об'єктив створюють необхідний ступінь освітлення поля зору. Після закінчення роботи тубус піднімають, знімають із предметного скла препарат і обережно видаляють олію з фронтальної лінзи, користуючись сухою бавовняною серветкою (не треба протирати лінзу ксилолом, бо він розчиняє канадський бальзам, що скріплює лінзи об'єктива).



*Рис. 1. Будова мікроскопу: 1 – основа; 2 – тубусотримач; 3 – тубус; 4 – предметний столик; 5 – отвір предметного столика; 6 – гвинти, що переміщують предметний столик; 7 – окуляр; 8 – револьвер; 9 – об’єктиви; 10 – макрогвинт; 11 – мікрогвинт; 12 – конденсор; 13 – гвинт конденсора; 14 – діафрагма; 15 – дзеркало*

### **Мікробіологічний посуд**

**Предметні скельця** використовують для приготування мікробіологічних препаратів. Вони повинні мати розміри 26×76 мм. Товщина скла 1 мм. Існують модифікації предметних скелець: скло предметне з заточеним краєм для розтяжки мазків; скло предметне з лункою для мікроскопії препаратів «висяча крапля»; скло предметне зі смугою для запису.



*Рис. 2. Предметні скельця різного призначення*

**Покривні скельця** призначені для захисту об’єктива мікроскопа, а в разі отримання препарату «висяча крапля» на нього наноситься досліджувана культура мікроорганізмів. Товщина скла 0,2 мм. Розміри покривних скелець 18×18, 24×24, 24×48 мм. Вивчати під мікроскопом препарати, що не захищені покривним скельцем, категорично забороняється!

**Бактеріологічна петля** складається з петлетримача і, власне, петлі, виготовленої з ніхромової нитки різного діаметру.

**Чашка Петрі** зазвичай виготовляється з прозорого скла або пластмаси (прозорий полістирол) і може мати найрізноманітніші розміри. Найбільш часто використовуються чашки діаметром 50–100 мм і висотою приблизно 15 мм. Чашки використовуються в мікробіології для культивування колоній мікроорганізмів. Скляні чашки – багаторазові, але вимагають стерилізації перед повторним посівом. Чашки з пластичних матеріалів постачають стерильними, в герметичній упаковці.

**Шпатель Дригальського** призначений для засівання матеріалу на щільні поживні середовища. Випускаються шпателі L- і T-форми. Гладка поверхня робочої частини шпателя дає змогу уникати пошкодження живильного середовища.

**Колба Виноградського** – укорочена конічна колба з широким дном. Призначена для вирощування аеробних мікроорганізмів.

**Колба Кауфмана** – з довгим горлом, призначена для вирощування анаеробних мікроорганізмів.

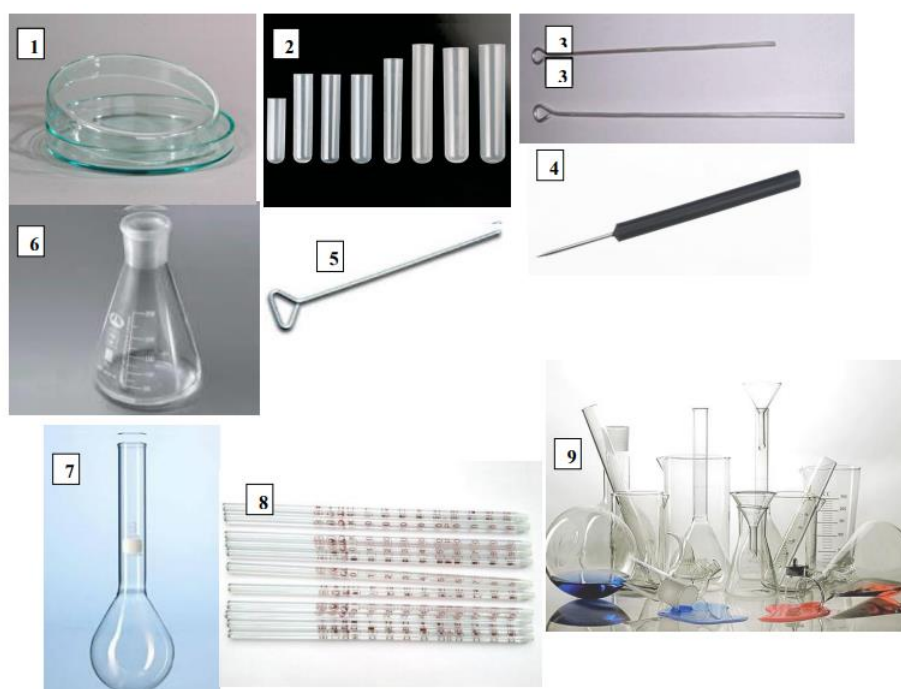


Рис. 3. Мікробіологічний посуд: 1 – чашка Петрі; 2 – пробірка; 3 – петля бактеріологічна; 4 – голки мікробіологічні; 5 – шпатель Дригальського; 6 – колба Виноградського; 7 – колба Кауфмана; 8 – піпетки; 9 – бюретки, циліндри, хімічні склянки, воронки

**Піпетки** – ємністю 1, 5, 10 мл, градуйовані піпетки на 1 мл та більше, пастерівські піпетки. Також використовуються бюретки, циліндри, хімічні склянки, воронки.

**Термостат** – прилад для підтримки постійної температури в обмеженому обсязі. У мікробіологічній практиці використовують для створення оптимальної

температури під час вирощування культур мікроорганізмів, для інкубації посівів. Термостат складається з ізолюваної камери, яка дає змогу утримувати сталість температури у всьому просторі камери.



*Рис. 4. Термостат*

**Автоклави** бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металевий двостінний котел, здатний витримувати високий тиск. Внутрішня частина котла – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується.



*Рис. 5. Схема автоклава: 1 – стерилізаційна камера; 2 – кран для виходу повітря; 3 – манометр; 4 – запобіжний клапан; 5 – водопарова камера; 6 – воронка для заповнення автоклава водою; 7 – отвори для надходження пари в стерилізаційну камеру; 8 – кришка автоклава; 9 – підставка для розміщення матеріалів, що стерилізуються*

Зазвичай у лабораторній практиці стерилізація під тиском проводиться за 1,5 атм і температури 112 °С або за 2 атм і температури 120 °С протягом 20–30 хв.

## Питання для самоконтролю

1. Яких правил необхідно дотримуватись під час роботи в мікробіологічній лабораторії?
2. З яких частин складається мікроскоп?
3. Як користуватися мікро- та макрогвинтами?
4. Що таке сухі та імерсійні об'єктиви?
5. Як визначається загальне збільшення мікроскопа?
6. З якою метою і як використовують кедрову олію під час роботи з імерсійним об'єктивом?
7. Який посуд використовують у мікробіологічній практиці?
8. Яку функцію виконують термостат, автоклав?

## Лабораторна робота 2 (2 години)

### Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини. Форми бактерій

**Мета роботи:** ознайомитися з морфологією мікроорганізмів та структурою бактеріальної клітини, вивчити основні форми бактерій.

**Матеріали та обладнання:** мікроскопи, предметні й покривні скельця, бавовняні серветки, металеві петлі, предметні скельця із заглибленням, спиртівка, фільтрувальний папір, настої сіна, гороху, борошна, імерсійна олія або гліцерин, дезінфікуючий розчин, вазелін.

## Перебіг роботи

### *Робота 2.1. Вивчення морфологічних особливостей будови бактеріальної клітини*

**Бактерії** – це група мікроорганізмів, розміри яких коливаються в межах 0,5–10 мкм. Клітини більшості бактерій мають сферичну, циліндричну чи звивисту форму. До того ж існують галузисті і нитчасті бактерії; бактерії, які утворюють простеки (вирости); бактерії у вигляді півкола, незамкненого кільця (тороїди), правильної шестикутної зірки, трикутної та прямокутної форми. Форма клітини прокаріотів визначається жорсткою (ригідною) клітинною стінкою. Але у деяких бактерій клітинна стінка еластична (спірохети, міксобактерії, флексибактерії) чи зовсім відсутня (мікоплазми і L-форми).

Бактерії розподіляються за формою клітин:

– **кулясті**, або **коки** (поодинокі – *мікрококи*, парні – *диплококи*, в ланцюжках – *стрептококи*, по чотири – *тетракоки*, у вигляді пакунків по 8–16 клітин – *сарцини*, у скупченнях у вигляді грона винограду – *стафілококи*);

– *паличкоподібні*, або *циліндричні* – бактерії (по дві – *диплобактерії*, у вигляді ланцюжків – *стрептобактерії*, спороутворюючі – *бацили*);  
*звивисті* – *вібріони* (слабко зігнуті), *спірили* (один або кілька завитків), *спірохети* (численні завитки).

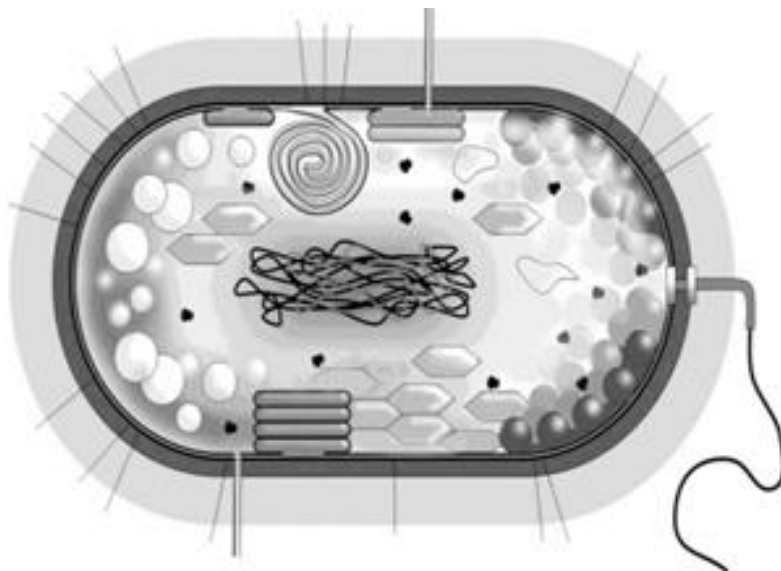


Рис. 6. Схематичне зображення ультраструктури бактерій

























Форма бактерій	Грамнегативні	Грампозитивні
Кулясті (коки)	 Нейсерії  Вейлонели  Хламідії  Мікоплазми	 Мікрококи  Диплококи  Стрептококи  Тетракоки  Сарцини  Стафілококи
Паличкоподібні	 Ентеробактерії  Іерсинії  Рикетсії  Фузобактерії	 Бацили  Клостридії  Лістерії  Кориньобактерії  Мікобактерії  Актиноміцети
Звивисті	 Вібріони  Кампілобактерії  Спірохети  Спірили	

Рис. 7. Форми бактерій

Замалювати схематично будову бактеріальної клітини та форми бактерій.  
Зробити відповідні підписи.

### **Робота 2.2. Підготовка препарату «роздавлена крапля»**

1. На чисте предметне скло нанести краплю дистильованої води.
2. Металеву петлю пропалити в полум'ї спиртівки, охолодити в повітрі та занурити в дослідний настій. Внести петлю з невеликою кількістю мікроорганізмів у краплю води. Обережно перемішати, рівномірно розмазати мазок бактерій по склу і накрити покривним склом.

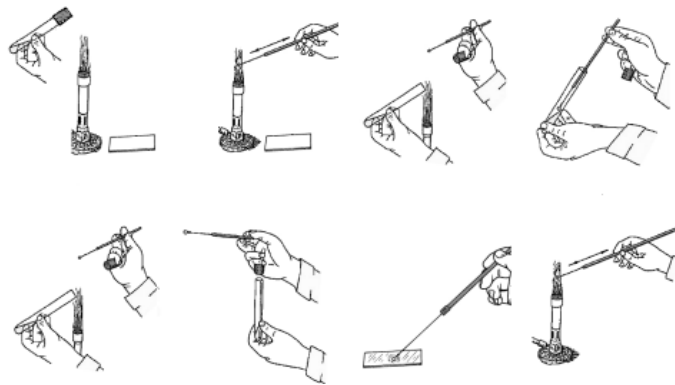


Рис. 8. Схема відбору біомаси мікроорганізмів для виготовлення препарату

3. Розглянути препарат під мікроскопом. Для більш детального вивчення структури об'єкта необхідно використовувати імерсійне середовище. Для цього на поверхню покривного скла нанести краплю імерсійного масла і занурити в нього об'єктив 90x. У кінці роботи обов'язково протерти об'єктив бавовняною серветкою.

4. Намалювати форми мікроорганізмів дослідних настоїв.

### **Робота 2.3. Приготування препарату «висяча крапля»**

1. Краї покривного скла обережно змазати вазеліном.



Рис. 9. Схема виготовлення препарату «висяча крапля»

2. Невелику краплю суспензії мікробних клітин нанести на покривне скло й обережно накласти на нього предметне скло з лункою так, щоб крапля вільно містилася в центрі заглиблення.
3. Препарат перевернути й роздивитися за збільшення 15×40 або 15×90.
4. Вивчити рух мікроорганізмів.

### **Питання для самоконтролю**

1. Яка форма клітин у бактерій?
2. Як групуються клітини у бактерій?
3. Чим відрізняється препарат «роздавлена крапля» від препарату «висяча крапля»?

### **Лабораторна робота 3 (2 години)**

#### **Техніка приготування мазків і методи фарбування мікроорганізмів**

**Мета роботи:** ознайомитися з технікою приготування мазків, методами фарбування мікроорганізмів та виконати фарбування мікроорганізмів на практиці.

**Матеріали та обладнання:** мікроскопи, бактеріологічні петлі, предметні та покривні скельця, пінцети, кристалізатор, мікробіологічні «містки», крапельниця з водою, фільтрувальний папір, бавовняні серветки, пісочний годинник, спиртівка, імерсійна олія, настої сіна, гороху, борошна, свіжа культура дріжджів.

**Реактиви:** генціанвіолет, розчин Люголя, лужний розчин метиленового синього, насичений спиртовий розчин метиленового синього, водний розчин основного фуксину, 0,5 %-вий водний розчин нейтрального червоного, розчин I (0,5 %-вий спиртовий розчин кристалічного фіолетового або діамантового зеленого), розчин II (0,5 % спиртовий розчин йодиду калію, 0,5 %-вий спиртовий розчин основного фуксин, 5 %-вий спиртовий розчин йоду).

Фарбування мікроорганізмів – складний фізико-хімічний процес, у механізмі якого відіграють роль явища електроадсорбції, капілярності, хімічної спорідненості між барвником та об'єктом. Фарбування в живому стані треба проводити під час диференціації живих та мертвих клітин (мертві клітини зазвичай фарбуються швидше та яскравіше завдяки підвищенню проникності клітинної оболонки).

Для більш детального вивчення мікроорганізмів використовують фіксацію препаратів і фарбування. У роботі використовують анілінові барвники (основні, нейтральні, кислі). Найбільш розповсюджені основні барвники: метиленовий синій, основний фуксин, генціанвіолет та ін.

## Перебіг роботи

### ***Робота 3.1. Прижиттєве фарбування клітин мікроорганізмів***

1. До краплі суспензії дріжджів на предметне скло додати краплю слабого розчину (1 : 1 000) барвника (метиленового синього або фуксину), перемішати, покрити покривним склом.
2. Роздивитися препарат під мікроскопом за збільшення 15×40.
3. Замалювати забарвлені клітини культур дріжджів.
4. Відпрацьовані препарати живих мікроорганізмів покласти в посудину з дезинфікуючим розчином для знезараження.

### ***Робота 3.2. Простий метод фарбування***

1. На чисте предметне скло нанести краплю дистильованої води. Металеву петлю пропалити в полум'ї спиртівки, охолодити в повітрі та занурити у дослідний настій. Внести петлю з невеликою кількістю мікроорганізмів у краплю води. Обережно перемішати, рівномірно розмазати мазок бактерій по склу і накрити покривним склом.
2. Мазок висушити в повітрі або над полум'ям спиртівки, потім охолоджений мазок зафіксувати в полум'ї спиртівки: пронести скло 3–4 рази через полум'я. Під час цього мікроби гинуть, клітини мікроорганізмів прикріплюються до скла, фарбування клітин поліпшується.
3. Препарат покласти на мікробіологічний місток над кристалізатором.
4. На зафіксований мазок нанести барвник, який має вкрити весь мазок. Фуксин витримати на мазку 1–2 хвилини, метиленовий синій – 3–4 хвилини.
5. Змити залишки барвника, а препарат промити слабким струмом води.
6. Висушити мазок у повітрі або обережно промокнути фільтрувальним папером.
7. На висушений препарат нанести краплю імерсійної олії або гліцерину та розглянути під мікроскопом.
8. Замалювати забарвлені клітини мікроорганізмів.

### ***Робота 3.3. Складний метод фарбування (за Грамом)***

Сутність методу полягає в послідовному фарбуванні двома або кількома барвниками. За методом Грама одні бактерії міцно фарбуються генціанвіолетом у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні, Гр<sup>+</sup>), тому що за наявності цього барвника й сполук йоду утворюється міцний комплекс фарб із протоплазмою клітини, який не розчиняється спиртом. Клітини інших мікроорганізмів цією особливістю не відрізняються, і тому отримали назву грамнегативні (Гр<sup>-</sup>). Ця методика застосовується в основному для диференціації видів або виявлення окремих клітинних структур.

1. Приготувати препарат і зафіксувати його (див. попередній розділ).
2. Зафіксований мазок покрити фільтрувальним папером і нанести на нього невелику кількість генціанвіолетового барвника.
3. Через 2 хвилини фільтрувальний папір зняти пінцетом, дистильованою водою змити фарбу і на препарат нанести розчин Люголя на 1–2 хвилини.
4. Мазок занурити у розчин 96 %-вого спирту на 0,5 хвилини.
5. Змити мазок водою. Для додаткового фарбування нанести на препарат водний розчин фуксину і залишити на 1 хвилину.
6. Промити препарат водою, промокнути фільтрувальним папером і розглянути під мікроскопом за збільшення 15×90. Грампозитивні бактерії фарбуються у синій колір, а грамнегативні – у рожевий.
7. Замалювати грампозитивні та грамнегативні бактерії.

#### ***Робота 3.4. Метод фарбування за Грамом у модифікації Г. П. Каліни***

1. Нанести краплю бактеріальної суспензії на предметне скло й одну краплю розчину I (0,5 %-вий спиртовий розчин кристалічного фіолетового або діамантового зеленого). Рівномірно розподілити суміш по склу площею приблизно 1 см<sup>2</sup>.
2. Мазок висушити за кімнатної температури.
3. Мазок зафіксувати (дивись розділ «Простий метод фарбування»).
4. На мазок нанести розчин II (0,5%-вий спиртовий розчин основного фуксину, 5%-вий спиртовий розчин йоду) на 1–2 хвилини.
5. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопувати з об'єктивом 90х.
6. Грампозитивні бактерії стануть чорно-фіолетового кольору або зеленого, а грамнегативні – світло-червоні. Якщо відношення культури до фарбування за Грамом визначається вперше, то треба на одному предметному склі зробити 2 мазки: один – дослідної культури, другий – контрольний – суміші грампозитивних (жовтої сарцини й золотистого стафілокока) та грамнегативних (кишкової палички або звичайного протей) бактерій.
7. Замалювати грамнегативні та грампозитивні бактерії.

#### ***Робота 3.5. Метод забарвлення кислотостійких бактерій за Цілем–Нільсеном***

1. Зафіксований над полум'ям спиртівки мазок забарвлювати протягом 3–5 хвилин фуксином з підігріванням до появи парів.
2. Дати препарату охолонути, промити водою.
3. Мазок знебарвити протягом 3–5 секунд за допомогою 5 %-го розчину сірчаної кислоти.
4. Препарат промити холодною водою.

5. Забарвити метиловим синім протягом 3–5 хвилин.
6. Промити водою, підсушити і мікроскопувати.

Під час фарбування препаратів за методом Ціля–Нільсена кислотостійкі бактерії забарвлюються фуксином у рубіново-червоний колір і не знебарвлюються кислотою. Некислотостійкі бактерії, а також елементи тканини і лейкоцит під дією кислоти стають безбарвними і набувають кольору додаткового барвника (синього).

### ***Питання для самоконтролю***

1. Як підготувати мазок для фарбування?
2. Які існують методи фарбування бактерій?
3. Як виявити наявність спор у клітині?
4. Яке значення мають бактеріальні спори і якими властивостями вони володіють?
5. З якою метою фіксують мазки?
6. Чому одні бактерії фарбуються за Грамом, а інші – ні?
7. У чому полягає метод фарбування бактерій за Грамом у модифікації Г. П. Каліні?
8. Які особливості будови грампозитивних та грамнегативних бактерій?

### ***Лабораторна робота 4 (2 години)***

#### **Методи стерилізації поживних середовищ та мікробіологічного посуду**

**Мета роботи:** вивчити методи стерилізації поживних середовищ та мікробіологічного посуду.

**Матеріали та обладнання:** чашки Петрі, шпатель скляні, піпетки на 1,2 мл, пробірки, колби, вата, марля, нитки, ножиці, папір для загортання скляного посуду, смужки паперу для загортання піпеток.

Стерилізацією називають повне знищення мікроорганізмів, їх спор та всього живого у поживних середовищах, матеріалі, посуді, інструментах тощо. Стерилізація досягається різними способами, але найчастіше повне знешкодження досягається за допомогою високої температури.

1. Скляний посуд, загорнутий у папір, стерилізується **сухим паром** за температури 163–170 °С протягом 1–2 годин у сушильній шафі. У такий спосіб стерилізуються чашки Петрі, колби, пробірки, піпетки.

2. **Прожарювання вогнем** використовують для стерилізації голок, пінцетів, ножиць, шпательів та інших інструментів безпосередньо перед використанням.

3. **Кип'ятіння** у воді використовують для стерилізації шприців, голок, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду.

4. **Пастеризація** – одноразове прогрівання матеріалу за температур нижче 100 °С, спрямоване на знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Пастеризацію використовують у харчовій промисловості для збереження молока, соків, пива тощо. Пастеризацію проводять за 60–75 °С протягом 15–20 хвилин або 80 °С – 15 хвилин.

5. **Стерилізація** насиченим паром під тиском (автоклавування) – найбільш надійний і широко розповсюджений метод стерилізації поживних середовищ та посуду. Він оснований на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою під тиском, більшим за атмосферний. Відомо, що температура збільшується під час збільшення тиску. Наприклад, за тиску 1,5 атм температура пари становить 112 °С, за 2 атм 121 °С, за 3 атм 134 °С. Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини та спори. Таку стерилізацію здійснюють в автоклавах.

6. **Тиндалізація** – дрібна стерилізація парою, що використовується для поживних середовищ, які змінюють свої властивості за температури вище 100 °С. Під час цього нагрівають середовище кілька разів з перервами, найчастіше 3 рази по 30–40 хвилин, а у проміжках живильне середовище ставлять у термостат для пророщування спор.

7. **Хімічна стерилізація** використовується для дезинфекції приміщень, поверхні столів, для знищення патогенних культур мікроорганізмів. Для цього використовують солі важких металів, етиловий спирт, формалін, хлорамін, перикис водню тощо.

8. **Фізична стерилізація** здійснюється за допомогою кварцових ультрафіолетових ламп. Використовується для стерилізації приміщень.

9. **Стерилізація фільтруванням.** Цей метод використовують для стерилізації субстратів, які не витримують нагрівання, рідких середовищ і розчинів, сироваток, які містять термолабільні білки, вітаміни, цукри, деякі антибіотики. Засіб передбачає пропускання розчинів через спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менший за розміри бактерій. Для цього використовують мембранні (колоїдні) фільтри, виготовлені на основі нітроклітковини, фільтри з азбесту із клітковиною, скляні фільтри, виготовлені з фрагментів скла «Пірекс».

## Перебіг роботи

Ознайомитися із заходами стерилізації. Для роботи приготувати стерильну чашку, піпетку, шпатель Дригальського, обгорнути її у папір та колби.

Приготувати корки для пробірок: вату покласти на стіл, розірвати на довгі вузькі смужки 8–10 см, потім розділити їх на більш вузькі та коротші. Краї вати зігнути у смужку 4–5 см, скрутити валик, поступово ущільнюючи його з одного боку. Коли товщина валика досягне діаметра пробірки, залишки ватної смужки відірвати, корок щільно закрутити. Потім її обгорнути марлею, зав'язати ниткою, залишки відрізати ножицями. Готовий корок повинен щільно входити у пробірку на 1–2 см, а широка її частина має виглядати з отвору, щоб її можна було взяти мізинцем і витягти з пробірки.

Посуд стерилізують у сушильній шафі за 165 °С протягом 2 годин.

### **Питання для самоконтролю**

1. У чому суть методів стерилізації, пастеризації?
2. Які методи стерилізації вам відомі?
3. За яких умов відбувається стерилізація в автоклаві?
4. З якою метою здійснюють дрібну стерилізацію? Навіщо середовище поміщають у термостат у проміжках його обробки паром?
5. Що таке хімічна стерилізація та як її здійснюють?
6. Як підготувати хімічний посуд для стерилізації?

### ***Лабораторна робота 5 (4 години)***

#### **Приготування поживних середовищ для мікроорганізмів та культивування грибів**

**Мета роботи:** ознайомитися з класифікаціями поживних середовищ, техніками їх приготування, а також навчитися готувати поживні середовища для мікроорганізмів і культивування грибів.

**Матеріали та обладнання:** автоклав, колби, пробірки, чашки Петрі, вата, марля, терези, картопля, агар-агар, зерна злаків, сіно, лушпиння соняшника, крейда, глюкоза, дистильована вода, електрична плита.

Поживні середовища за складом поділяються на 2 групи: *природні та штучні*. Перші являють собою різні природні продукти: молоко, картопля, кров, м'ясо та ін. Другі складаються з різних хімічних речовин з додаванням продуктів невизначеного складу (м'ясо-пептонний агар та ін.). До штучних також належать синтетичні середовища, виготовлені на основі хімічних речовин (середовище Ешбі). За консистенцією розрізняють щільні та рідкі середовища. Для щільності до них додають желатин (10–12 %) або агар-агар (1,5–3 %).

За призначенням середовища бувають:

**Стандартні** середовища використовують для культивування багатьох видів мікроорганізмів. До них належать: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний желатин (МПЖ), бобово-пептонний агар (БПА), сусло-агар, крохмаль-аміачний агар (КАА) та ін.

**Елективні** (накопичувальні) середовища використовуються для накопичення переважно одного виду мікроорганізмів (відвар сіна, середовище Мюллера та ін.)

**Диференційно-діагностичні** середовища використовують для можливості відрізнити одні види мікроорганізмів від інших на основі обмінних процесів (середовище Левенштейна–Йенсена для виділення збудника туберкульозу, середовище Ендо для виділення бактерій групи кишкової палички). Такі середовища використовують для ідентифікації невідомих видів мікроорганізмів.

### Перебіг роботи

**Картопляно-глюкозний агар (КГА):** беруть 200 г картоплі, очищують і нарізають шматочками. Відварюють картоплю в 1 л дистильованої води впродовж 1 години. Відвар фільтрують. У фільтрат додають 10 г глюкози, 10 г агар-агару і доводять дистильованою водою до 1 л. Живильне середовище доводять до кипіння і розливають у пробірки.

**Середовище Ендо:** 100 мл поживного агару розтоплюють і охолоджують до 70 °С. Додають 1 г хімічної чистої лактози, попередньо розчиненої в невеликій кількості прокип'яченої дистильованої води. В окремих пробірках готують:

- 2–3 мл спиртового насиченого розчину фуксину основного;
- 10 мл 10 %-го водного розчину сульфату натрію (якість сульфату суттєво впливає на середовище Ендо:

А – сульфат повинен бути безводним;

Б – якщо сульфат не кристалічний, його необхідно перекристалізувати або прожарити у сушильній шафі. В останньому випадку сульфат у вигляді аморфного порошку добре зберігається, але під час приготування середовища його беруть у 20 %-му розчині.

У стерильну пробірку відмірюють 1 мл розчин фуксину і доливають розчин сульфату натрію до знебарвлення фуксину (слабо-рожевий колір). Приготовлену суміш вливають у розплавлений агар, ретельно перемішують (не допускаючи утворення піни) і розливають в чашки Петрі. Також саме середовище випускають у вигляді сухого порошку.

**Отримання зернового міцелію для засівання субстрату:** беруть зерна злакових культур і заливають їх водою з розрахунку дві частини води на дві частини зерна. Отриману суміш варять упродовж 15 хвилин, потім зерна просушують і в них додають 1,3 % гіпсу або 0,3 % крейди. Отриманий матеріал перемішують у

банку або колбу з широким горлом на 3/4 об'єму. В середину банки у зернову суміш необхідно вставити дерев'яну паличку, щоб утворився інокуляційний канал. Банки стерилізують в автоклаві.

**Отримання субстрату із соломи та лушпиння соняшника:** в якості субстрату використовують солому / лушпиння соняшника. Перед обробкою солому бажано подрібнити до 3–7 см. Субстрат заливають гарячою водою та залишають на 7–8 годин (для лушпиння 3–4 годин). Це найпростіший варіант пастеризації. Або використовувати автоклавування. Для цього заливають гарячою водою на 30 хвилин, потім її зливають і автоклавують.

### Питання для самоконтролю

1. Які поживні середовища використовують для культивування мікроорганізмів?
2. Що таке елективні поживні середовища?
3. Як приготувати КГА?
4. З якою метою використовується середовище Ендо?
5. Як отримують зерновий міцелій?

### Лабораторна робота 6 (2 години)

#### Санітарно-бактеріологічні дослідження мікрофлори повітря закритих приміщень

**Мета роботи:** вивчити методики санітарно-бактеріологічних досліджень мікрофлори повітря закритих приміщень.

**Матеріали та обладнання:** поживне середовище (МПА), стерильні чашки Петрі, спиртівка, сірники, термостат.

Кількісні методи в мікробіології дають змогу визначити кількість мікроорганізмів у певному об'ємі дослідного матеріалу. Цими методами можна досліджувати мікрофлору повітря у закритих приміщеннях, ґрунтах тощо. У повітрі знаходяться ґрунтові сапрофіти, а також мікроорганізми, що виділяються зі слизових оболонок дихальних шляхів людини. В їх складі можуть бути патогенні та умовно-патогенні мікроби, які довгий час зберігають активність у повітрі. Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря поділяються на:

- седиментаційні, які базуються на принципі механічного осідання мікробів (метод осідання Коха);
- аспіраційні, засновані на активному просмоктуванні повітря за допомогою різних приладів (бактеріовловлювач Речменського, Дьяконова, Кіктенка);

Під час санітарно-гігієнічних досліджень обсіменіння повітря закритих приміщень позначається:

- загальною кількістю мікробів, що знаходяться в  $1 \text{ м}^3$  повітря;
- кількістю в  $1 \text{ м}^3$  повітря санітарно-показових мікробів (гемолітичні стрептококи й патогенні стафілококи).

За їх кількість визначають ступінь забрудненості повітря.

### Перебіг роботи

1. Перед розливом ватну пробку обпалити над полум'ям спиртівки.
2. Стерильне поживне середовище налити тонким шаром на дно чашки Петрі й закрити для охолодження.
3. Чашку Петрі з агаром перенести у приміщення для проведення досліду.
4. Поставити чашку в горизонтальне положення, зняти кришку на 5 хвилин, після чого чашку накрити кришкою, загорнути в папір і поставити в термостат на 3 доби. На папері позначити прізвище, ім'я, групу, дату та місце, де взята проба.
5. Під час аналізу повітря необхідно слідкувати за тим, щоб не було руху повітря.
6. Після культивування підрахувати кількість колоній бактерій та грибів. Знаючи площу чашки Петрі, можна визначити кількість мікроорганізмів у  $1 \text{ м}^3$  повітря.
7. Визначити площу поживного середовища в чашці Петрі за формулою:  $S = \pi r^2$  (наприклад,  $S = 78 \text{ см}^2$ ).
8. Підрахувати кількість колоній на площі  $1 \text{ дм}^2$ , або на  $100 \text{ см}^2$ :  
 $20$  колоній –  $78 \text{ см}^2$ ,  
 $x$  колоній –  $100 \text{ см}^2$ ,  
 $x = 20 \times 100 / 78 = 25$  колоній.  
Тобто на площі  $100 \text{ см}^2$  виросло 25 колоній.
9. Підрахувати кількість бактерій у  $1 \text{ м}^3$  ( $1\,000 \text{ л}$ ) повітря. Експериментально встановлено, що кількість бактерій, які знаходяться на площі  $1 \text{ дм}^2$  ( $100 \text{ см}^2$ ) відповідає кількості бактерій у  $10 \text{ л}$  повітря.
10. Складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 25-10 \text{ л} \\ x-1\,000 \text{ л} \end{array}$$

Знаходимо  $x$ . В  $1 \text{ м}^3$  повітря міститься  $2\,500$  бактеріальних клітин. Колонії грибів не враховуються. Їх наявність підраховуємо окремо. Загальну кількість бактерій у повітрі знаходимо за формулою:

$$x = n \times 60 \times 10\,000 / t \times S,$$

де  $x$  – кількість бактерій на  $1 \text{ м}^2$  за 1 годину;  $n$  – кількість колоній, які виросли у чашці Петрі;  $t$  – час осадження в хвиликах;  $S$  – площа чашки Петрі,  $\text{см}^2$ ; 60 та 10 000 – коефіцієнти для підрахунку кількості бактерій на  $1 \text{ м}^2$  за годину.  
11. Результати записати у таблицю.

### Вміст бактерій в $1 \text{ м}^3$ повітря приміщень

Досліджуване приміщення	Вміст бактерій	Характеристика чистоти повітря

### Питання для самоконтролю

1. З якою метою та якими методами здійснюється кількісний аналіз мікрофлори повітря?
2. У чому суть методу Коха?
3. Як підрахувати кількість мікрофлори в  $1 \text{ м}^3$  повітря?
4. Яке повітря вважається чистим?

### Лабораторна робота 7 (2 години)

#### Виділення чистих культур та клітинні включення

**Мета роботи:** вивчити та опанувати принципи виділення чистих культур мікроорганізмів.

**Матеріали та обладнання:** спиртівка, металеві петлі, сірники, пробірки з поживним середовищем, що захопонуло у прямостоячих пробірках та у нахиленому стані, чашки Петрі з колоніями бактерій, маркер, концентрований розчин йоду, розчин фарби Судан III, метиловий синій, мікроскопи, покривні та предметні скельця, спиртівка.

Основним завданням мікробіологічних досліджень є виділення окремих видів мікроорганізмів та одержання чистої культури. Метод чистих культур є ефективним та доступним. Чиста культура – культура мікроорганізмів, яка з'являється шляхом розмноження однієї клітини. В чисту культуру можуть бути виділені мікроорганізми з ізолюваних колоній, які виросли на поверхні середовища в чашках Петрі. Найчастіше виділяють чисті культури мікроорганізмів у пробірках із нахилом чи косо застиглим середовищем (посів штрихом або зигзагом), або рівно застиглим (посів уколом). Внаслідок життєдіяльності в клітинах мікроорганізмів утворюються запасні включення. До них належать волютин, гранульоза, глікоген, жир та ін.

Волютин – запасна азотиста речовина, яка утворюється з нуклеїнової кислоти, зустрічається у більшості бактерій, дріжджів у вигляді дрібних зерен різноманітної форми та розмірів.

Гранульоза – крохмалеподібна речовина, яка під час гідролізу дає d-глюкозу. Вона міститься у маслянокислих бактеріях, наприклад, *Bacillus amylobacter*. Ця бацила паличкоподібної форми має ендоспору, розкладає крохмаль з великою кількістю газоподібних речовин, фіксує молекулярний азот. Жир як включення зустрічається у клітинах мікроорганізмів. Це можна виявити у старих клітинах дріжджів, як-от *Bacillus mycoides*, *Azotobacter chroococcum*.

### **Перебіг роботи**

#### **Чисті культури**

Колонії бактерій, вирощені у чашках Петрі, пересівають у пробірки з нахиленим або прямим агаром у такий спосіб:

1. Чашку Петрі відкрити не повністю, а тільки злегка, щоб могла увійти петля.
2. У праву руку взяти петлю, прожарити над полум'ям спиртівки, охолодити у повітрі та торкнутися вибраної колонії.
3. У ліву руку великим і середнім пальцями взяти пробірки з поживним середовищем так, щоб нахил середовища було добре видно.
4. Мізинцем і підмізинним пальцями правої руки вийняти корок із пробірки, прожарити краї пробірки над спиртівкою.
5. Занурити петлю у пробірку і торкнутися нею поживного середовища. На середовищі з нахилом обережно провести зигзагоподібну лінію, а у прямому агарі зробити прокол.
6. Після цього вийняти петлю, пробірку над спиртівкою закрити корком. Маркером підписати пробірку, позначити прізвище, групу і дату посіву.
7. Через 3–5 днів розглянути чисті культури мікроорганізмів, які вирости у пробірках.

#### **Клітинні включення**

1. Для виявлення волютину на предметне скло в краплю води додати дослідні мікроорганізми, зробити мазок, зафіксувати його та зафарбувати метиловим синім. Волютинові зерна набувають фіолетового кольору, а протоплазма клітин забарвлюється у блакитний.

2. Для виявлення гранульози на предметне скло нанести бактерії *Bacillus amylobacter* і змішати із краплею слабкого розчину йоду (розчин Люголя). Гранульоза забарвлюється йодом у темно-синій колір.

3. Для виявлення глікогену використовують міцний розчин йоду. На предметне скло нанести *Bacillus mycoides* та змішати із краплею йоду. Глікоген забарвлюється у червоно-бурий колір.

4. Для виявлення жиру у краплину суспензії клітин бактерій *Azotobacter chroococcum* на предметне скло додати краплю Судана III.

### Питання для самоконтролю

1. Що таке чиста культура мікроорганізмів?
2. Який агар називають «прямим», а який «косим»?
3. Як виділяють чисті культури мікроорганізмів?
4. З якою метою виділяють чисті культури мікроорганізмів?
5. Що таке волютин, гранульоза, глікоген?
6. Які включення можна виявити в клітинах мікроорганізмів?

### Лабораторна робота 8 (2 години)

#### Морфологія пліснявих грибів та актиноміцетів

**Мета роботи:** вивчити особливості морфології пліснявих грибів та актиноміцетів, навчитися їх ідентифікувати.

**Матеріали та обладнання:** 5–7-добові культури пліснявих грибів *Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* й актиноміцету *Actinomyces griseus*, предметні покривні скельця; суміш спирту й гліцерину (1 : 1) з додаванням метиленового синього; мікроскопи; препарувальні голки; марлеві серветки.

Плісняві гриби відрізняються від бактерій більш складною будовою та досконалим способом розмноження. Серед них господарське та медичне значення мають пеніцилові, аспергілові та мукові гриби.

Актиноміцети утворюють міцелій, подібний до пліснявих грибів, однак будова ядерного апарату, оболонки й інші особливості свідчать про спорідненість їх більше скоріше з бактеріями, ніж із грибами.

**Мукові плісняви.** До класу *Zygomycetes* належать доволі широко розповсюджені в природі мукові гриби, які ще називають головчастою пліснявою (рис. 10).

На щільних поживних середовищах колонії мукових грибів утворюють повстятий наліт. Вегетативне тіло їх представлене розгалуженим багатоядерним міцелієм, який не має септ (перегородок). Від субстратного міцелію підіймаються міцні гіфи-спорангієносці зі спорангіями, в яких утворюються численні спори. Під час дозрівання спорангій розривається, спорангієспори звільнюються і розносяться у повітрі.

Мукові гриби живуть на органічних субстратах, які гниють, на стінах вологих приміщень у вигляді сірого нальоту. Мукові гриби *Mucor javanicus*,

*Mucor racemosus* використовують у промисловості для виробництва органічних кислот і спирту.



Рис. 10. Гриб *Mucor*

**Пеніцили й аспергіли.** Плісняві гриби родів *Penicillium* та *Aspergillus* належать до класу *Ascomycetes*. Міцелій у них не має кольору, а спори забарвлені, що надає колонії гриба відповідного кольору.

Гриби роду *Penicillium* мають дуже розгалужений септований міцелій, від якого відходять численні конідієносці (рис. 11).

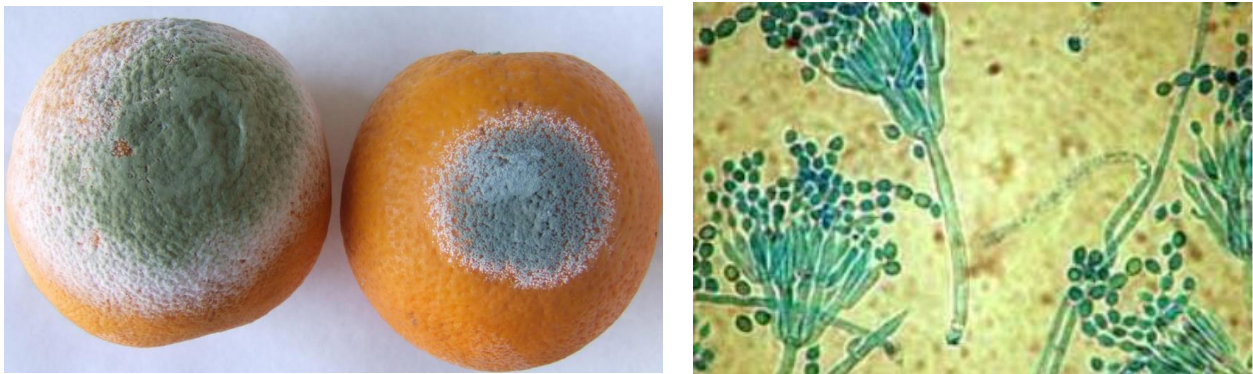


Рис. 11. Гриб *Penicillium*

На їх кінчиках утворюються коротенькі клітини-стерігми. Кожна стерігма несе на собі ланцюжок конідій. Конідієносці з ланцюжками конідій нагадують кисті рук, звідси гриби цього роду отримали назву кистевики. Ці плісняві гриби широко розповсюджені в природі: у ґрунті, кормах, вологих приміщеннях; спричиняють псування продуктів та матеріалів. Багато пеніцилів використовується у промисловості для отримання різноманітних цінних продуктів, наприклад, *Penicillium notanum* та *Penicillium chrysogenum* використовують як продуценти пеніцилу, *Penicillium glaucum* бере участь у дозріванні деяких сортів сиру (зелений сир).

Міцелій грибів роду *Aspergillus* також септований, від нього відходять вертикальні конідієносці (рис. 12).



Рис. 12. Гриб *Aspergillus*

Кінчик конідієносця розширюється у вигляді голівки, або булави, на поверхні якої виростають численні дрібні відростки-стерігми. Від них відшнуровуються ланцюжки пігментованих конідій, які розташовуються радіально і нагадують струмені води, що виливаються з лійки, звідси й інша назва гриба – поливальна пліснява.

Представники роду *Aspergillus* широко розповсюджені в природі і відіграють важливу роль у мінералізації органічних речовин. 40 % ґрунтових аспергілів здатні до антибіотичної активності. *Aspergillus niger* використовується у промисловості для отримання лимонної кислоти з цукрів, із міцелію цього гриба отримують фермент пектиназу.

**Актиноміцети** мають одноклітинний несептований галузистий міцелій, який забарвлюється грампозитивно. Він складається зі сплетінь тонких ниточок – гіфів різної довжини. Міцелій дуже подібний до міцелію грибів, але гіфи значно тонші. Діаметр тонких гіфів 0,1–1,0 мкм, найтовстіших – до 1,5 мкм.

Актиноміцети, що вирощені на щільних поживних середовищах, можуть мати 3 типи міцелію: субстратний, надсубстратний і повітряний. Субстратний міцелій розвивається всередині середовища. Надсубстратний міцелій розвивається на поверхні агаризованого щільного середовища, розростаючись густим плетивом у колонії. Повітряний міцелій утворюється на поверхні колонії. Нитки його відходять від міцелію колоній, розростаючись у густу, пухнасту, оксамитову або борошністу масу (рис. 13).

Колонії на щільних поживних середовищах можуть бути щільними, шкірянистими, міцно зчепленими із середовищем. Деякі види актиноміцетів використовують для виготовлення антибіотиків. Серед актиноміцетів є сапрофіти і паразити.

Останні викликають у людини і тварин важке захворювання – актиномікоз, який супроводжується руйнуванням м'яких тканин. Дуже велику роль відіграють актиноміцети у ґрунтоутворенні та утворенні гумінових речовин (перегною).

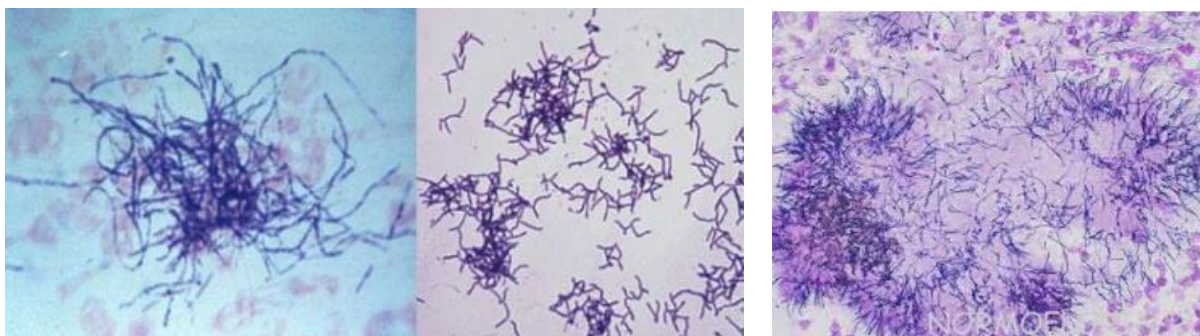


Рис. 13. Міцелій актиноміцету

### Перебіг роботи

**Робота 8.1. Вивчення мікроскопічних ознак колоній пліснявих грибів і актиноміцетів відбувається так:**

1. Розглянути в чашках Петрі колонії грибів.
2. Описати макроскопічні ознаки колоній грибів:
  - а) загальну топографію колоній (плоскі, припідняті, регулярно або нерегулярно складчасті);
  - б) текстуру колоній (порошисті, ворсисті, оксамитові);
  - в) пігментацію вегетативного міцелію колоній;
  - г) пігментацію реверзуму («підшви» колоній).

**Робота 8.2. Підготовка препарату «роздавлена крапля» пліснявих грибів і актиноміцетів, вивчення будови їх конідієносців**

1. На чисте предметне скло нанести краплю суміші спирту з гліцерином.
2. Препарувальною голкою обережно перенести частину міцелію пліснявих грибів або актиноміцетів у краплю суміші на предметному склі. Для отримання препарату культуру актиноміцету треба брати разом із поживним середовищем.
3. Двома препарувальними голками рівномірно розподілити міцелій у краплі на предметному склі й накрити покривним склом.
4. Розглянути препарат за збільшення 15×40.
5. Замалювати гіфи й конідієносці дослідних пліснявих грибів та актиноміцетів.

### Питання для самоконтролю

1. Які особливості будови пліснявих грибів та актиноміцетів? Яке їх значення?
2. Які особливості морфології пліснявих грибів роду *Aspergillus*?

3. Які особливості морфології пліснявих грибів роду *Penicillium*?
4. Які особливості морфології мукорових грибів?
5. Які особливості морфології актиноміцетів?

### **Лабораторна робота 9 (2 години)** **Кількісний аналіз бактерій у воді**

**Мета роботи:** ознайомитися з методиками кількісного аналізу бактерій у воді.

**Матеріали та обладнання:** стерильні чашки Петрі, спиртівка, сірники, штатив з пробірками, мікроскопи, предметні та покривні скельця, стерильна вода, стерильні піпетки на 1–2 мл, колби на 100 мл, поживне середовище (МПА), термостат.

#### **Перебіг роботи**

1. Приготувати десятикратне розведення, для чого взяти 1 мл дослідної води і додати 9 мл стерильної води. З отриманого розчину приготувати такі розведення: 1 : 100, 1 : 1 000, 1 : 10 000.

2. По 1 мл кожного розведення вносять у стерильну чашку Петрі з твердим поживним середовищем. Рідину рівномірно розподіляють по поверхні середовища. Чашки Петрі підписують (прізвище, група, дата, розведення) і ставлять у термостат із температурою 37 °С на три доби.

3. Після інкубації чашки виймають і підраховують кількість колоній. У разі великої кількості колоній дно чашки поділяють на сектори, підраховують кількість колоній у секторі та помножують на кількість секторів.

4. Загальну кількість бактерій в 1 мл ( $x$ ) підраховують за формулою:

$$x = n \times 10^m,$$

де  $n$  – кількість колоній у чашці Петрі;

$m$  – кількість десятикратних розведень.

5. За кінцевий результат приймають середнє арифметичне значення, отримане з усіх чашок.

#### **Питання для самоконтролю**

1. Як можна підрахувати кількість мікроорганізмів в 1 мл води?
2. З якою метою поділяють чашку Петрі на сектори?
3. Якими методами можна визначити кількість бактерій у воді?
4. Що таке загальне мікробне число?
5. З якою метою визначають ЗМЧ?

## **Лабораторна робота 10**

### **Спиртове бродіння**

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями перебігу, хімізмом і збудниками спиртового бродіння.

**Матеріали та обладнання:** бюретка на 100 мл, кристалізатор, пробірка, колба об'ємом 200–250 мл з корком та газовідвідною трубкою, термометр, спиртівка, водяна баня, вапняна вода, кристалічний йод, концентрований лужний розчин, 10 %-вий розчин сахарози, дріжджі.

Спиртове бродіння здійснюється дріжджовими грибами. У процесі спиртового бродіння молекули цукру розкладаються з утворенням етилового спирту та вуглекислоти:



Спиртове бродіння відбувається в анаеробних умовах, тоді як розмноження дріжджів проходить за широкого доступу кисню. Оптимальна температура для спиртового бродіння – 28–30 °С. Спирт, який утворюється, шкідливий для дріжджів, тому за його накопичення бродіння зупиняється. Однак за високої концентрації цукру в розчині дріжджі можуть залишатися живими у середовищі, в якому міститься до 15 % спирту. Оптимальна концентрація цукру в середовищі для більшості рас дріжджів – 10–15 %, рН 4–5.

Спиртове бродіння викликають такі мікроорганізми: дріжджі, *Saccharomyces cerevisiae*, бактерії *Sarcina ventriculi*, мукові гриби.

### **Перебіг роботи**

1. За 30 хвилин до заняття пресовані дріжджі розвести в 10 %-вому розчині сахарози. В колбу налити 50 мл сахарози та 10 мл замулених дріжджів.

2. Колбу закрити корком з газовідвідною трубкою. Нижній зігнутий кінець трубки занурити в пробірку, наповнену водою. Колбу поставити у водяну баню з температурою 30–35 °С.

3. Протягом усього досліду таку температуру підтримувати за допомогою спиртівки. Через 30–40 хвилин, коли все повітря з колби витіснить вуглекислота, останню зібрати в нову пробірку, яка також повинна бути заповнена водою.

4. Для виявлення вуглекислоти долити у пробірку невелику кількість вапняної води, яка від CO<sub>2</sub> стає каламутною. Або пробірку з вуглекислотою розмістити в чашку з 10 %-вим розчином луку: через 20–30 хвилин внаслідок взаємодії вуглекислоти з лугом рівень рідини у пробірці підніметься.

5. Для виявлення спирту відлити у пробірку 10 мл рідини, де відбувається бродіння, долити до неї 1–2 мл луку й підігріти до 60 °С. Потім додати кристали

металевого йоду й продовжувати нагрівати. У присутності спирту випадає жовтий осад йодоформа, який можна визначити за запахом.

б. Сумарна реакція отримання йодоформа:



### Питання для самоконтролю

1. Яке бродіння називають спиртовим?
2. Назвіть збудників спиртового бродіння.
3. Назвіть оптимальні умови для проведення бродіння (температура, концентрація цукру, рН).
4. Які продукти утворюються під час спиртового бродіння?
5. Яке значення спиртового бродіння у народному господарстві?

### Лабораторна робота 11 (2 години)

#### Молочнокисле бродіння

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями перебігу, хімізмом і збудниками молочнокислого бродіння.

**Матеріали та обладнання:** мікроскопи, кедрова олія, предметні та покривні скельця, металеві петлі, штатив з пробірками, колби Ерленмеєра об'ємом 100, 250 мл, піпетки, спиртівка, спирт, ефір, марганцевокислий калій, сірчана кислота, мідний купорос, метиленова синька, карболовий фуксин, аміачний розчин азотнокислого срібла, суміш спирту з ефіром, фільтрувальний папір, молоко, огірковий та капустяний розсіл.

**Молочнокисле бродіння** – анаеробний процес розкладу вуглеводів молочнокислими бактеріями з утворенням молочної кислоти. Молочнокисле бродіння може бути двох типів: типове (гомоферментативне) та нетипове (гетероферментативне).

Збудники гомоферментативного бродіння зброджують вуглеводи з утворенням молочної кислоти:

*Streptococcus lactis* – молочний стрептокок;

*Lactobacillus bulgaricus* – болгарська паличка;

*Lactobacillus acidophilus* – ацидофільна паличка;

*Lactobacillus plantarum* – капуста паличка.

Ключовим ферментом гомоферментативного молочнокислого бродіння є лактатдегідрогеназа:

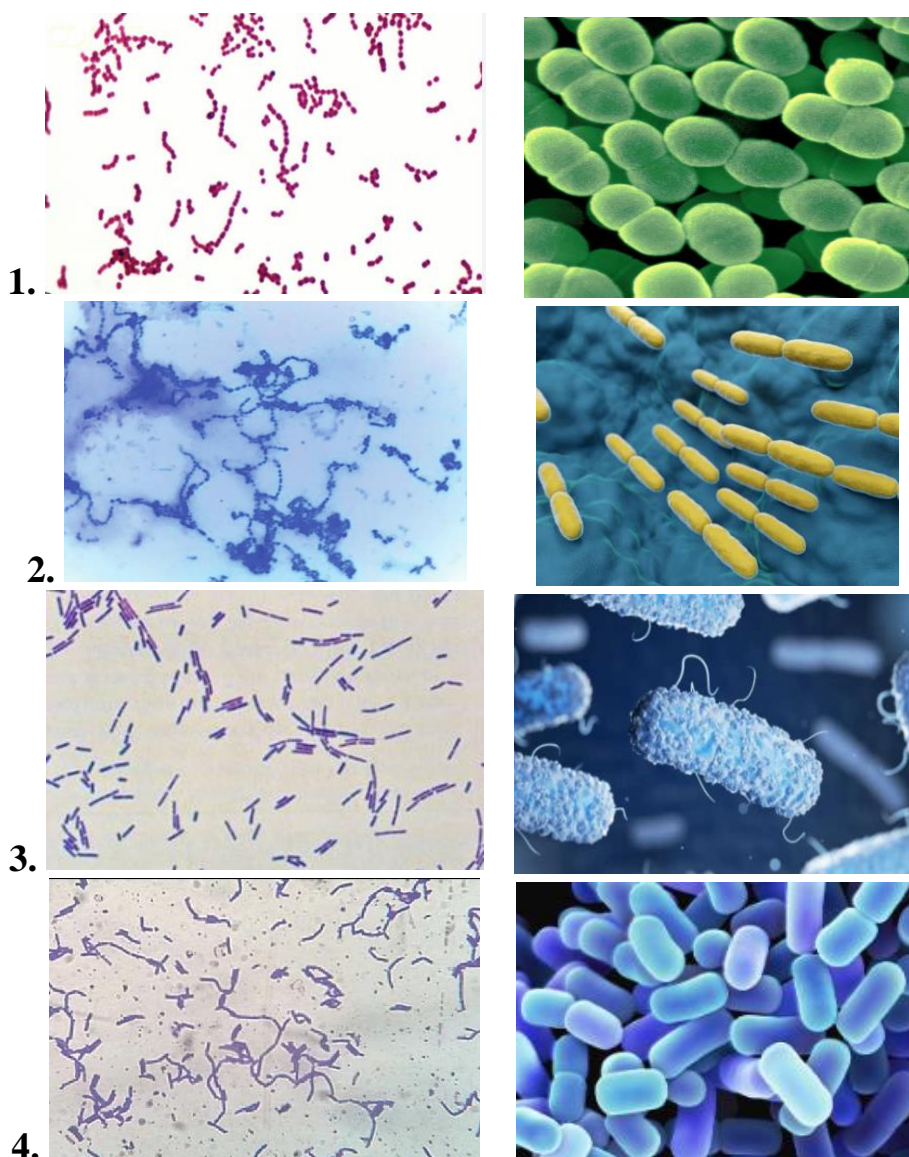


Рис. 14. Молочнокислі бактерії:

1 – *Streptococcus lactis* (молочний стрептокок); 2 – *Lactobacillus bulgaricus* (болгарська паличка); 3 – *Lactobacillus acidophilus* (ацидофільна паличка); 4 – *Lactobacillus plantarum* (капустяна паличка)

Другий тип бродіння здійснюють кишкова паличка *Escherichia coli* і біфідо-бактерії.

Хімізм цього бродіння більш складний, тому під час нього утворюються й інші сполуки: оцтова кислота, бурштинова кислота, етиловий спирт, вуглекислоти, водень. Це пов'язано з тим, що бактерії цього типу мають фермент карбоксилазу, який відсутній у гомоферментативних бактерій:

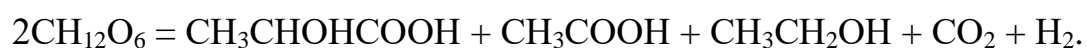




Рис. 15. *Escherichia coli*

Усі нетипові молочнокислі бактерії належать до факультативних анаеробів, але в анаеробних умовах розвиваються лише за наявності в середовищі вуглеводів, бродіння яких утворює, крім молочної кислоти, й інші сполуки.

Молочнокислі бактерії мають велике практичне значення. Їх використовують під час отримання молочнокислих продуктів, під час квашення овочів, силосування кормів тощо.

### Перебіг роботи

1. Свіже молоко розлити в пробірки на 2/3 об'єму та закрити корками.
2. Пробірки поставити в термостат із температурою 30–35 °С.
3. Після утворення в молоці твердого згустку можна починати дослідження та визначення молочної кислоти.
4. Для дослідження приготувати тимчасові або постійні препарати. В останньому випадку препарат підсушити, зафіксувати на спиртівці й забарвити метиленовою синькою або карболовим фуксином.
5. Препарат розглянути за великого збільшення 15×40 або 15×90.
6. Замалювати молочнокислі бактерії: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* та молочний гриб *Oidium lactis*.
7. Визначити молочну кислоту у кислому молоці якісною реакцією – отриманням оцтового альдегіду:

Кисле молоко профільтрувати через паперовий фільтр. До 10 мл фільтрату додати 1 мл 10 %-вого розчину сірчаної кислоти. Нагріти до кипіння й додати краплями 20 %-вий розчин марганцевокислого калію. Молочна кислота майже вся переходить в оцтовий альдегід, який визначається на паперовому фільтрі з аміачним розчином азотнокислого срібла. Під час нагрівання колби оцтовий альдегід випаровується, і під час взаємодії з аміачним розчином срібла спричиняє почорніння фільтрувального паперу.

### Питання для самоконтролю

1. Яке бродіння називають молочнокислим?
2. Назвати збудників гомо- та гетероферментативного молочнокислого бродіння.

3. Які бактерії спричиняють квашення овочів?

4. Яке значення молочнокислого бродіння?

### *Лабораторна робота 12 (2 години)*

#### **Отримання накопичувальної культури збудників маслянокислого бродіння**

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями перебігу, хімізмом і збудниками маслянокислого бродіння.

**Матеріали та обладнання:** термостат, мікроскопи, скальпелі, пробірки, предметні скельця, штативи крейда, картопля, розчин Люголя, FeCl<sub>3</sub>.

Маслянокисле бродіння вуглеводів є одним з етапів кругообігу в природі. В анаеробних умовах здійснюється ферментативне розкладання вуглецевмісних органічних сполук з утворенням масляної кислоти та АТР:



Встановлено, що масляна кислота в невеликих концентраціях разом з іншими органічними кислотами є фізіологічно активною сполукою, яка стимулює ріст рослин. Деякі види маслянокислих бактерій є азотфіксаторами, що покращують азотний режим ґрунтів. Інші використовуються в силосуванні кормів. Масляна кислота спричиняє гіркоту сиру й вершкового масла.

Маслянокислі бактерії – облигатні анаеробні палички перитрихи, грампозитивні. Характерними фізіологічними властивостями маслянокислих бактерій є їх здатність розкласти крохмаль до глюкози та відкладати у своїх клітинах гранульозу.

Збудниками маслянокислого бродіння є представники роду *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pectinovorum*) (рис. 15).

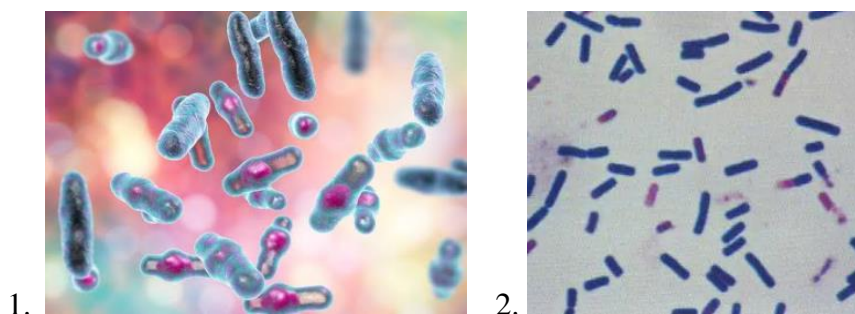
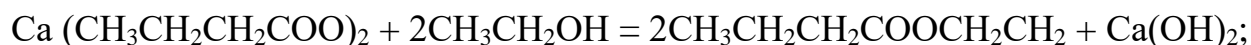


Рис. 16. Збудники маслянокислого бродіння (*Clostridium pasteurianum*):

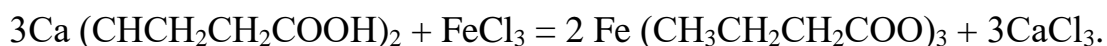
1 – вегетативні клітини; 2 – спорові клітини

## Перебіг роботи

1. Дрібно порізати неочищену картоплю та заповнити нею 2/3 об'єму пробірки.
2. Залити картоплю водопровідною водою.
3. Додати трохи крейди на кінчику скальпеля для нейтралізації кислот, які виділятимуться під час розкладу крохмалю.
4. На етикетці написати прізвище, ім'я та групу. Корком з етикеткою закрити пробірку й поставити у штатив. Пробірки витримати в термостаті за температури 25–27 °С 3–5 діб.
5. Для вивчення краплю розчину з пробірки нанести на предметне скло й додати краплю розчину Люголя. Гранульоза дає з йодом синій колір.
6. Розглянути препарат під мікроскопом та замалювати мікроорганізми, які беруть участь у маслянокислому бродінні.
7. Провести реакцію на масляну кислоту. Вона має запах кислого молока. Під час взаємодії зі спиртами вона утворює ефіри з приємним запахом:
  - а) отримання масляноетилового ефіру (ананасова есенція). До 4–5 мл настою маслянокислих бактерій додати 0,5 мл 96 %-вого етилового спирту та 1–2 мл концентрованої сірчаної кислоти. Під час нагрівання на спиртівці з'являється характерний запах ефіру. Реакція здійснюється за таким рівнянням:



- б) реакція з  $\text{FeCl}_3$ . В окрему пробірку налити приблизно 5 мл рідини й долити 2 мл 5 %-вого розчину  $\text{FeCl}_3$ . Нагріти й виявити коричневий колір маслянокислого заліза, що утворюється за реакцією:



## Питання для самоконтролю

1. Що таке маслянокисле бродіння?
2. Які продукти утворюються внаслідок маслянокислого бродіння?
3. Назвіть мікроорганізми, які є збудниками маслянокислого бродіння.
4. Значення маслянокислого бродіння в природі.

## Лабораторна робота 13 (2 години)

### Накопичувальна культура нітрифікуючих бактерій

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями перебігу процесу нітрифікації та його збудників.

**Матеріали та обладнання:** мікроскопи, предметні та покривні скельця, терези з важками, пінцети, скляні палички, шпателі для ґрунту, ґрунт, колби на 100 мл і одна на 500 мл, фарфорові чашечки, сірчаноокислий амоній, поварена сіль, сірчаноокисле залізо, вуглекислий кальцій, дифеніламін, розчинений в сірчаній кислоті, калій фосфорноокислий, магній сірчаноокислий.

Нітрифікація – процес окислення аміаку до азотної кислоти через проміжну стадію азотистої кислоти. Вперше виділив у чисту культуру і вивчив властивості нітрифікуючих бактерій С. М. Виноградський. Це дуже дрібні рухливі бактерії, які мають форму короткої палички або круглих коків. Спор не утворюють.

Нітрифікуючі бактерії відрізняються суворою спеціалізацією, тобто у окисленні аміаку до азотистої кислоти беруть участь нітрозобактерії (*Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrospira*), а окислення азотистої кислоти до азотної здійснюють нітробактерії (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*). Найкраще серед нітрифікаторів вивчено *Nitrobacter winogradskyi*.

Представники роду *Nitrosomonas* овальної форми у деяких випадках близькі до коків, рухливі завдяки наявності одного джгутика.

Рід *Nitrosocystis* має форми, які здатні утворювати зооглеї, оточені загальною капсулою, всередині якої знаходяться коки.

Рід *Nitrospira* відрізняється поліморфністю (коки і палички).

Нітрифікуючі бактерії переважно належать до типових хемолітотрофів. Між ними існують метаболічні відносини. Саме етапність процесу нітрифікації є характерною рисою таких відносин між мікроорганізмами.

### Перебіг роботи

1. Поставити у термостат накопичувальну культуру нітрифікуючих бактерій. Для цього приготувати поживне середовище такого складу (у % до води):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,2;  $\text{NaCl}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4$  – сліди;  $\text{CaCO}_3$  – 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4$  – 0,05; вода водопровідна – потрібна кількість.

Азот вносять обов'язково у формі амонійної сполуки, яка є джерелом одержання енергії під час окислювання її у нітрати.

2. Розлити поживне середовище у колби по 30 мл.

3. Внести у кожну колбу ґрунт (на кінці шпателя).

4. Колби розмістити у термостаті за температури 30 °С на 14–20 діб.

5. На поверхні рідини утворюється плівка, яка вдає з себе клітини нітрифікуючих бактерій.

6. Скляною паличкою взяти краплю рідини з колби, нанести її на предметне скло, покрити покривним склом і мікроскопувати за збільшення 15×90 з гліцерином.

7. Визначити нітрати – продукти життєдіяльності нітрифікуючих бактерій. Для цього у фарфорову чашку або на скло нанести кілька крапель рідини з колби і додати дифеніламіну. Якщо у колбі є нітрати, рідина посиніє.

8. Замалювати нітрифікуючі бактерії.

### Питання для самоконтролю

1. Який процес називають нітрифікацією?
2. Які бактерії здійснюють нітрифікацію?
3. Хто відкрив процес нітрифікації?
4. Які особливості процесу нітрифікації?
5. Дати характеристику нітрифікуючих бактерій.
6. Яке значення мають нітрифікуючі бактерії у кругообігу азоту у природі?

### Лабораторна робота 14 (2 години)

#### Аеробне розкладання клітковини

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями процесу аеробного розкладання клітковини.

**Матеріали та обладнання:** плоскодонні колби на 100 мл з ватними корками, фільтрувальний папір, пінцети, ножиці, терези з важками, мікроскопи, предметні та покривні скельця, скальпелі, шпатель, циліндр, нітрит натрію, фосфорнокислий калій, сірчаноокислий магній, поварена сіль, сірчаноокисле залізо 1 %-вий розчин, хлористий кальцій, крейда, дистильована вода.

Процес аеробного розкладання клітковини – це процес мінералізації вуглецю та повернення його в атмосферу у вигляді вуглекислого газу. Аеробне розкладання клітковини полягає у такому: за участі ферменту целюлози, який виділяється мікроорганізмами, відбувається гідроліз клітковини до целобіози, які окислюються до кінцевих продуктів з виділенням енергії.

Під час аеробного розкладання клітковини можуть також утворитися уронові кислоти, які, з'єднуючись із білком, беруть участь в утворенні гумусу.

В аеробному розкладанні клітковини приймають участь гриби (плісняві та дріжджі), гриби роду *Torula*, найпростіші тварини (амеби та інфузорії), але найбільш енергійними мінералізаторами є бактерії.

Міксобактерії – активні учасники розкладу клітковини. Найчастіше зустрічаються *Muxococcus hutchinsonii*, бактерії родів *Celvibrio*, *Cellfalcicula*.

*Muxococcus hutchinsonii* – слабозігнута паличка з загостреними кінцями. Під час її росту клітковина спочатку набуває жовтуватого кольору, а потім ослизнюється у жовту масу.

*Celvibrio* – довга, з закругленими кінцями паличка, трохи зігнута. Виділяє пігмент, який фарбує клітковину в зеленуватий колір.

*Cellfalcicula* – паличка із загостреними кінцями, іноді серповидної або веретеновидної форми. Вона фарбує клітковину в зелений колір.

### **Перебіг роботи**

1. Поставити у термостат накопичувальну культуру аеробних мікроорганізмів, які розкладають клітковину. Для цього приготувати поживне середовище у такому складі (у % до кількості води): нітрит натрію – 0,25; фосфорнокислий калій – 0,1; хлористий кальцій – 0,1; поварена сіль – 0,01; сірчаноокислий магній – 0,1; крейда – 0,2; сірчаноокисле залізо – 2 краплі.

2. У колбу налити поживне середовище шаром у 1–1,5 см.

3. Внести у колбу з поживним середовищем ґрунт у кількості 1/2 чайної ложки, крейду на кінці шпателя.

4. Опустити у колбу складчастий фільтр конусом догори.

5. Колбу закрити ватним корком і поставити у термостат на 12–20 діб за температури 25–27 °С.

6. Під час визначення мікроорганізмів, які розкладають клітковину, спочатку розглянути фільтр. Про розкладання клітковини свідчить ослизнення та зміна кольору клітковини на межі стику з поживним середовищем, а також поява на ній кольорових плям різних відтінків: від яскраво-жовтого до іржаво-бурого.

7. На предметне скло петлею або скальпелем зібрати трохи забарвленої клітковини й розглянути у краплі рідини з колби за збільшення 15×90.

8. Замалювати збудників аеробного розкладу клітковини.

### **Питання для самоконтролю**

1. Що таке клітковина?
2. Які мікроорганізми приймають участь у мінералізації клітковини?
3. Якими ферментами здійснюється руйнування клітковини?
4. Охарактеризувати міксобактерії.
5. Яке значення мають збудники розкладу клітковини у кругообігу вуглецю в природі?

### **Лабораторна робота 15 (2 години)**

#### **Мікрофлора тіла людини**

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями мікрофлори тіла людини та дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів.

**Матеріали та обладнання:** мікроскопи, предметні та накривні скельця, стерильні чашки Петрі, спиртівки, пінцети, бактеріологічні петлі, пробірки зі стерильним поживним середовищем (МПА), стерильна вата, фізіологічний розчин або 0,85%-вий розчин NaCl.

На поверхні шкіри людини, на слизистих оболонках, у відкритих порожнинах людини мешкає понад  $10^{13}$  клітин мікроорганізмів. Популяції цих організмів складають нормальну мікрофлору (аутофлору) людського організму. Розрізняють автохтонну, постійну мікрофлору та транзиторну, випадкову – алохтонну.

Мікроорганізми завдяки взаємодії своїх поверхневих структур з протеїнами мембран макроорганізму формують біоплівки й у такий спосіб виконують функцію протиінфекційного захисту людини. Кожній частині організму людини притаманна своя мікрофлора. Оскільки шкіра є відкритою екосистемою, саме тут можна знайти найбільшу кількість алохтонних мікроорганізмів.

До складу постійної нормальної мікрофлори шкіри входять різні коки – *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, а також бревібактерії, коринебактерії та дифтероїди. До того ж на поверхні шкіри можна знайти аеробні спороутворювальні палички роду *Acinetobacter*, які мешкають у повітрі, воді, ґрунті. Більша кількість мікроорганізмів трапляється в місцях концентрації сальних і потових залоз. Співвідношення груп мікроорганізмів залежить від віку, статі, стану імунної системи людини.

### ***Робота 15.1. Дослідження мікрофлори шкіри людини методом відбитків***

Мікрофлору поверхні шкіри людини можна дослідити методом змивів і методом відбитків. Під час використання першого методу стерильною ватою, змоченою стерильним фізіологічним розчином (або у 0,85 %-вому розчині NaCl), протирають поверхню шкіри, нігті, потім вату переносять у пробірку з напіврідким живильним середовищем, ретельно перемішують, і через годину невеликий об'єм такої суспензії з додержанням умов стерильності переносять на тверде живильне середовище у чашках Петрі.

Чашки витримують протягом доби у термостаті за температури 36 °С, а потім – ще 2–3 доби витримують за кімнатної температури. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

### **Перебіг роботи**

1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА).

2. Із додержанням стерильності приблизно 10 мл охолодженого до 40–45 °С МПА внести у стерильну чашку Петрі та залишити до повного застигання.

3. Із додержанням стерильності легко притиснути палець до поверхні агарової пластинки у чашці Петрі.

4. Засіяні у такий спосіб чашки Петрі поставити у термостат за температури 35–36 °С.

5. На наступному лабораторному занятті дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів, які вирости на МПА у чашках Петрі.

### ***Робота 15.2. Дослідження культурально-морфологічних ознак бактерій***

До морфологічних ознак належать форма та розміри бактеріальної клітини, наявність чи відсутність капсул, слизу, джгутиків, забарвлення за Грамом, здатність до спороутворення.

До культуральних ознак належать здатність мікроорганізмів рости на тому чи іншому живильному середовищі, а також характеристика колоній, які вирости на твердому живильному середовищі (наприклад, МПА). Дослідження проводять за допомогою мікроскопа.

*Форма колонії* – округла, ризоїдна, амебоїдна, нитковидна, складчаста, концентрична, неправильна.

*Розмір колонії* – вимірюється лінійкою, виражається в мм. Колонія діаметром 10 мм і більше – велика за розміром, діаметром 1–10 мм – середня, якщо колонія має розмір приблизно 1 мм, її вважають точковою. Розмір дуже дрібних колоній (менше 1 мм) визначають за допомогою окуляр-мікрометра.

*Колір колонії і агару, який її оточує* – прозора, безкольорова, забарвлена. Забарвлення колоній визначають за допомогою шкали кольорів; якщо мікроорганізми виділяють пігмент у середовище, визначають і його колір. Іноді мікроорганізми мають забарвлений в інший колір реверзум (зворотна сторона колонії).

*Поверхня колонії* – гладенька, шершава, складчаста, бугриста.

*Профіль колонії* – плоский; випуклий; кратеровидний; такий, що вростає в агар; бугристий; краплевидний; конусовидний. Край колонії – гладенький, хвилястий, зубчастий, лопатний, неправильний, війчастий, нитчастий, гілчастий.

*Структура колонії* – однорідна, дрібнозерниста, крупнозерниста; волокниста (визначається за допомогою бактеріальної петлі).

### **Перебіг роботи**

1. За допомогою мікроскопа визначити культуральні ознаки обраної колонії мікроорганізму.

2. За допомогою шкали кольорів визначити колір колонії.

3. Виготовити мазки мікроорганізмів та забарвити за Грамом і методом Пешкова.

4. Результати визначення культуральних ознак колоній мікроорганізмів та їх морфології занести в робочий зошит.

### **Питання для самоконтролю**

1. Які мікроорганізми входять до складу мікрофлори тіла людини?
2. Якими методами можна дослідити мікрофлору поверхні шкіри?
3. Які ознаки належать до культуральних, а які до морфологічних?

### **Лабораторна робота 16 (2 години)**

#### **Виявлення чутливості бактерій до антибіотиків**

**Мета роботи:** ознайомитися з методом визначення чутливості бактерій до антибіотиків та навчитися визначити ступінь чутливості різних бактерій до антибіотиків.

**Матеріали та обладнання:** індикаторні диски різних антибіотиків, стерильні піпетки, пробірки з бактеріальною суспензією, пінцети, МПА, стерильні скляні шпатель.

У медичній практиці часто використовують метод індикаторних дисків для вияву антибіотика, необхідного для лікування того чи іншого захворювання. Принцип методу полягає у тому, що паперові диски, насичені різноманітними антибіотиками, накладаються на поживне середовище, засіяне тою чи іншою культурою мікроорганізмів. На вологому середовищі антибіотик дифундує у середовище і зупиняє ріст мікроорганізмів, якщо вони чутливі до нього. Випускаються різнокольорові індикаторні диски: зелені – пеніцилін, фіолетові – стрептоміцин, сині – левоміцитин, жовті – тетрациклін, буро-фіолетові – неоміцин та ін.

### **Перебіг роботи**

1. Поживне середовище у стерильних умовах розлити у стерильні чашки Петрі.
2. Після того, як середовище охолоне, на його поверхню стерильною піпеткою нанести 2–3 краплі бактеріальної суспензії. По всій її поверхні стерильним шпателем розмазати посів.
3. Стерильним пінцетом взяти різні індикаторні диски й покласти їх по одному на середовище на однаковій відстані один від одного.
4. Підписати чашки Петрі, поставити їх у термостат із температурою 30 °С для пророщування.

5. Через 2–3 дні перевірити чашки та відмітити стерильну зону біля індикаторних дисків.

6. Лінійкою виміряти діаметр стерильних зон, результати записати у таблицю.

Досліджувана культура бактерій	Діаметр стерильної зони, мм				
	пеніцилін	стрептоміцин	левоміцитин	неоміцин	канаміцин

7. Якщо стерильна зона становить 11–15 мм, то такі мікроорганізми маловідчутні до антибіотика; якщо 15–25 мм – відчутні і якщо більше 25 мм – високочутливі.

8. Зробити висновки про чутливість досліджуваної культури до антибіотиків.

### Питання для самоконтролю

1. Що таке антибіотики?
2. Як можна визначити ступінь чутливості бактерій до антибіотиків?
3. Чому діаметр стерильної зони середовища свідчить про чутливість бактерій до антибіотика?

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бебенюк Ю. Д., Антипчук А. Ф. Мікробіологія: навчальний посібник. Київ: Університет «Україна», 2010. 149 с.
2. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології: навчальний посібник. Київ: Либідь, 2001. С. 144.
3. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Мікробіологія з основами вірусології» / О. В. Ветрова, О. В. Федотов, К. Г. Древаль, О. В. Чемеріс. Донецьк: ДонНУ, 2011. С. 43.
4. Методичний посібник для виконання лабораторних робіт з курсу «Мікробіологія та вірусологія» / укл. К. С. Решетник, А. К. Рудкевич. Вінниця: ДонНУ імені Василя Стуса, 2021. С. 57.
5. Мікробіологія. Практикум / Т. М. Фурзікова, М. Г. Сергійчук, В. В. Влащенко, Ю. В. Швець, В. К. Позур. Київ: Фітосоціоцентр, 2006. С. 210.
6. Мікробіологія з основами вірусології: практикум для підготовки й проведення лабораторного робіт та самостійної роботи студентів спеціальностей: 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини); 091 Біологія / ХНПУ ім. Г. С. Сковороди. Харків: ХНПУ, 2019. 110 с.
7. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник. Київ: НУНХ, 2004. 470 с.
8. Сергійчук М. Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. С. 231.
9. Технічна мікробіологія: практикум для здобувачів вищої освіти / В. В. Євлаш, Л. В. Газзаві-Рогозіна, А. С. Бикова, О. В. Циганков. Харків: НТУ «ХП», ХДУХТ, 2020. 180 с.
10. Федотов О. В., Велигодська А. К. Практикум з курсу «Мікологія»: навчальний посібник. Вінниця: ДонНУ, 2016. С. 78.

Навчальне видання

*Мікуліч Любов Олександрівна*  
*Рогожук Марія Ігорівна*

## **МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ВІРУСОЛОГІЯ**

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт  
для здобувачів вищої освіти ОС «Бакалавр»  
денної та заочної форм навчання  
спеціальності 091 Біологія та біохімія ОП «Біологія»

Редактор О. А. Солдатова  
Технічний редактор Т. О. Важеніна-Гопрак

Підписано до друку 27.09.2024  
Формат 60×84/16. Папір офсетний.  
Друк – цифровий. Умовн. друк. арк. 2,55.  
Тираж 30. Зам. 16.

Донецький національний університет імені Василя Стуса  
21021, м. Вінниця, 600-річчя, 21  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи  
до Державного реєстру  
серія ДК № 5945 від 15.01.2018