

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ І ВІРУСОЛОГІЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401– «БІОТЕХНОЛОГІЯ»
(ЧАСТИНА I)

КРЕМЕНЧУК 2016

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни
«Загальна мікробіологія і вірусологія» для студентів денної форми навчання
за напрямом 6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі : к.т.н., доц. А. В. Пасенко

старш. викл. О. О. Никифорова

Рецензент: д.б.н., проф. В. В. Никифоров

Кафедра біотехнології та здоров'я людини

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського

Протокол №__ від_____2016 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	5
Лабораторна робота № 1 Основні прийоми роботи в мікробіологічній лабораторії.....	5
Лабораторна робота № 2 Методи мікроскопічних досліджень.....	10
Лабораторна робота № 3 Морфологія бактерій. Генетичний апарат бактеріальної клітини.....	21
Лабораторна робота № 4 Виготовлення мікробіологічного препарату....	24
Лабораторна робота № 5 Вивчення мікроорганізмів у забарвленому стані.....	29
Лабораторна робота № 6 Ендоспори бактерій. Клітинні включення мікроорганізмів	36
Лабораторна робота № 7 Мікрофлора тіла людини.....	41
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	
Список літератури.....	

ВСТУП

Метою проведення лабораторних робіт є закріплення теоретичних знань, отриманих студентами під час лекційних занять; набуття студентами практичних навичок приготування різних живильних середовищ; засвоєння техніки посіву, забарвлення та мікроскопічного дослідження мікроорганізмів; ознайомлення з морфологічними особливостями представників цих груп організмів, з умовами їх культивування; набуття і закріплення навичок виділення чистих культур мікроорганізмів з різних екосистем.

Методичні вказівки включають опис п'яти тем лабораторних занять. Кожна лабораторна робота включає теоретичну та практичну частину, а також питання для самопідготовки.

Під час виконання лабораторних робіт **студенти повинні володіти** лекційним матеріалом; знати будову, морфологічні особливості, умови життєдіяльності різних груп мікроорганізмів; екологічне значення та розповсюдження цих організмів у природному середовищі.

Студенти повинні вміти працювати з обладнанням хімічної та біологічної лабораторії; володіти технікою проведення хімічних аналізів, біологічних досліджень; мати навички роботи з біологічними об'єктами.

Методи мікробіологічних досліджень дозволять отримати загальні уявлення про мікроконсументи – основну частину третього функціонального царства природи – редуцентів.

Методичні вказівки також містять у своєму складі: «Правила роботи та поведінки в лабораторії», «Правила техніки безпеки під час роботи з хімічними речовинами», «Правила зберігання та роботи зі світлопольним мікроскопом», «Підготовка мікроскопа до роботи», «Правила роботи з електроприладами», «Правила протипожежної безпеки», «Перша допомога при нещасних випадках», список рекомендованої літератури.

1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1

Тема. Основні прийоми роботи в мікробіологічній лабораторії

Мета: ознайомитись з правилами безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії, під час демонстрацій лабораторних робіт; роботи з лабораторним обладнанням, посудом; з правилами користування рідкими, газоподібними, твердими речовинами; поглибити знання про надання першої медичної допомоги в разі недотримання правил поведінки, а саме: потрапляння небезпечних речовин на шкіру, в очі, дихальні шляхи, опіків; ознайомлення з основним обладнанням і лабораторним посудом і прийомами роботи з ним.

Обладнання та реактиви: лабораторне обладнання: штатив для пробірок, металевий штатив, пробіркотримач, спиртівка, шпатель; лабораторний посуд: пробірки, склянки, колби (конічна та плоскодонна), мірні циліндри, скляна паличка, скляна трубка, лійка, піпетка, порцелянова чашка, порцелянова ступка з товкачиком; склянки з рідкими та твердими речовинами-реактивами.

Навчальні елементи : інструктаж, кислотні та лужні розчини, чашки, тиглі, ступки, піпетки, бюретки, мірні колби, мірні циліндри, мензурки, мірні стакани, мірні циліндри, спиртівки із рідким пальним, спиртівки із сухим пальним, електричні плитки, терези аптечні й аналітичні.

Короткі теоретичні відомості

Правила роботи та поведінки в мікробіологічній лабораторії

1. До приміщення лабораторії не можна входити без спеціального одягу – халата, шапочки.
2. Забороняється виходити з лабораторії в халаті або одягати верхній одяг на халат.
3. Категорично забороняється палити, уживати їжу, зберігати продукти, допускати зайві розмови і непотрібні переходи.
4. Працювати в лабораторії в наглухо застібнутому халаті.

5. Основним місцем виконання лабораторних робіт є робочий стіл, на якому необхідно дотримуватися чистоти і порядку.

6. На робочому місці не повинні знаходитись зайві предмети.

7. Користуватись тільки своїм робочим місцем і закріпленим за ним обладнанням.

8. Дотримуватись чистоти й охайності в роботі. Після закінчення роботи ретельно продезінфікувати і вимити руки з милом.

9. Під час роботи з культурами мікроорганізмів дотримуватись загальноприйнятих в бактеріологічній практиці технічних прийомів, які виключають можливість дотику до культур мікроорганізмів.

10. Стіл, одяг, взуття та інші предмети, випадково забруднені дослідним матеріалом або культурою мікробів (розбилась пробірка, впала крапля), негайно дезінфікують у присутності провідного спеціаліста лабораторії, а на заняттях – у присутності викладача.

11. Не можна відносити реактиви загального користування на своє робоче місце.

12. Викидати папір, бите скло та інші відходи можна тільки у спеціально відведене для цього місце, посуд для сміття.

13. Обережно поводитись з вогнем та електронагрівальними приладами.

Правила техніки безпеки під час роботи з хімічними речовинами

1. Усі роботи з отруйними речовинами і речовинами з неприємним запахом, упарювання розчинів з летючими кислотами проводити у витяжній шафі.

2. Досліди з легко запалювальними речовинами необхідно проводити подалі від вогню.

3. Не можна брати хімічні речовини руками і пробувати їх на смак.

4. Під час вливання реактивів не можна нахилитися над отвором судини, щоб уникнути потрапляння бризок на тіло й одяг.

5. Не можна нахилитися над рідиною, яка нагрівається, тому що її може викинути з судини.

6. Для розведення концентрованої кислоти, особливо сірчану, обережно вливають у воду, а не навпаки.

7. Усі дослід з концентрованими кислотами і лугами проводити тільки під тягою у витяжній шафі.

8. Досліди проводити завжди в чистому посуді.

9. Не можна виливати надлишок реактиву з пробірки назад до реактивної склянки.

10. Сушу сіль набирають чистим шпателем або ложечкою, при цьому надлишок реактиву не можна висипати назад до склянки.

11. Не варто плутати пробки від різних склянок. Щоб внутрішня сторона пробки залишалася чистою, пробку кладуть на стіл зовнішньою поверхнею.

12. Після закінчення дослідів залишки реактивів, особливо дорогих або отруйних, заборонено зливати у раковину, їх слід залишати в спеціальному посуді.

13. Дорогі реактиви збирають у спеціально відведений посуд.

Правила роботи з електроприладами

Більшість лабораторних приладів живляться від електромережі. Електричний струм у результаті дії на організм людини може викликати електричний удар, а внаслідок контакту з нагрітим тілом – тепловий опік. Наслідки ураження електричним струмом залежать від тривалості його дії на людину. Тому головна задача першої допомоги – якомога швидше звільнити постраждалого від дії електричного струму.

1. У лабораторії слід користуватися електроприладами тільки заводського виготовлення, користуючись паспортом та інструкцією заводу-виробника.

2. Усі прилади повинні бути заземленими.

3. Для вимкнення електроприладів у лабораторії повинен бути рубильник загального вимкнення від електромережі.

4. Не доторкатися, не вмикати і не вимикати без дозволу викладача рубильники й електричні прилади.

5. Забороняється доторкатися голими руками до оголених або несправних

електропроводів, розеток, рубильників, вимикачів.

6. При ураженні людини електрострумом постраждалого треба негайно звільнити від дії електроструму, вимкнувши електроприлад від мережі, користуючись для цього предметами, які не проводять електрострум.

7. Після звільнення постраждалого від дії електроструму негайно надати йому першу медичну допомогу і у разі необхідності викликати лікаря.

Правила протипожежної безпеки

1. Досліди з легко запалювальними речовинами необхідно проводити подалі від вогню.

2. Обережно поведіться з нагрівальними приладами. У разі перегорання спіралі електроплитки відключіть плитку від електромережі.

3. Під час проведення експериментів, у яких можливе самозаймання, необхідно мати під руками пісок, повсть і т. д.

4. Для тушіння запаленого бензину, спирту, ефіру та інших органічних речовин користуються піском.

5. У разі заpalення горючих речовин швидко погасіть пальник, вимкніть електронагрівальні прилади, залиште судину з вогнебезпечною речовиною і гасіть пожежу:

– палаючі рідини прикрийте повстю, а потім, якщо потрібно, засипте піском, але не заливайте водою;

– у разі заpalення лужних металів гасіть полум'я тільки сухим піском, але не водою.

6. В усіх випадках пожежі в лабораторії негайно викличте пожежну команду і до приходу пожежної команди скористайтеся вуглекислотним вогнегасником.

Перша допомога при нещасних випадках

У лабораторії трапляються випадки, які вимагають невідкладної медичної допомоги, – поранення рук склом, опіки гарячими предметами, кислотами, лугами. У всіх нещасних випадках необхідно в той же час звернутися до лаборанта або викладача! В особливо серйозних випадках (при сильних опіках,

отруєннях) необхідно негайно звернутися до лікаря! Для надання першої медичної допомоги в лабораторії є аптечка.

Основні правила першої допомоги зводяться до:

1. У разі поранення склом видаліть осколки з рани, змажте краї рани розчином йоду і перев'яжіть бинтом.

2. При опіках рук або лица хімічним реактивом змийте реактив великою кількістю води, потім розведеною оцтовою кислотою (у разі опіку лугом) або розчином соди (у випадку опіку кислотою), а потім знов промийте водою.

3. При опіках гарячою рідиною або гарячим предметом обпалене місце обробіть свіжоприготованим розчином перманганату калію, змажте обпалене місце маззю від опіків або вазеліном. Можна присипати опік питною содою і забинтувати.

4. При хімічних опіках очей промийте очі великою кількістю води, а потім зверніться до лікаря.

Хід роботи

1. Ознайомитись із правилами роботи в мікробіологічній лабораторії та правилами техніки безпеки під час роботи з хімічними речовинами.

2. Вивчити правила роботи з електроприладами та правила протипожежної безпеки.

3. Навчитися надавати першу допомогу при нещасних випадках.

Завдання до теми

1. Набуття навичок поведження з речовинами, які вимагають обережного поведження.

2. Набуття навичок застосування мікробіологічним обладнанням.

3. Засвоєння правил техніки безпеки під час роботи в мікробіологічній аудиторії.

Контрольні питання

1. Що забороняється роботи в мікробіологічній лабораторії ?

2. Які основні правила першої допомоги?

Література: [1, с. 1–2; 2, с. 1–3; 3, с. 2–4; 4, с. 1–3].

Лабораторна робота № 2

Тема. Методи мікроскопічних досліджень

Мета: вивчення будови та принципу роботи світлопольного мікроскопу; набуття навичок роботи з сучасним світлопольним мікроскопом та оволодіння різними методами мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви: мікроскоп, імерсійне масло, культура мікроорганізмів (бактерій і дріжджів), предметні і покривні стекла, фізіологічний розчин, барвники, чорний папір, фільтрувальний папір, скляні палички, штатив, спиртівка, спирт, бактеріологічна петля, піддон, скляні палички, з'єднані гумовими трубочками, піпетки, гумова груша, дистильована вода.

Навчальні елементи: світлопольна мікроскопія, мікроскоп, монокуляр, біокуляр, імерсійний об'єктив, ахромат, апохромат, план ахромат.

Короткі теоретичні відомості

1. Світлопольна мікроскопія.

Принцип роботи світлопольного мікроскопу.

Відомо, що можливості людського ока обмежені природою. Чутливі рецептори зорового нерва у сітківці мають порівняно невеликий діаметр (кілька мікронів). І якщо промені світла від двох точок, розміщених дуже близько одна від одної, потрапляють на один і той же рецептор, то зображення цих об'єктів зливається, і око не розрізняє їх як дві точки. Здорове людське око на відстані 25 см від об'єкта формує зображення двох точок останнього роздільно, якщо вони знаходяться на відстані не менше 0,1 мм. Найменша відстань між двома точками, зображення яких око формує окремо, називається розподільною відстанню. Чим менша вона для певного пристрою, тим більша його розподільна здатність (d). Для того, щоб збільшити розподільну здатність ока, люди здавна почали застосовувати збільшувальні скельця (лінзи).

Мікроскопом називається прилад з певним розташуванням лінз у ньому, за допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні і тисячі разів.

Перший складний мікроскоп сконструював італійський учений Галілей у

1610 р., а вперше термін «мікроскоп» запропонували у 1646 р. А. Кірхер і І. Гевелій.

Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об'єкти у світлі, яке проходить через лінзи, називають *світловими*, або *біологічними*. Вони призначені для вивчення об'єктів, які мають розмір не менш 0,2 мкм, для вивчення більш дрібних мікроорганізмів використовують електронні мікроскопи.

Розрізняють *прості і складні* світлові мікроскопи. Оптика простих являє собою одну лінзу з великим збільшенням, а в складних мікроскопах – складається з об'єктива (для отримання збільшення зображення об'єкта) та окуляра (для подальшого збільшення отриманого зображення та його розгляду).

Біологічні світлові мікроскопи залежно від галузі їх застосування, складності будови та комплектації різною оптикою, поділяються на робочі (Р), лабораторні (Л), дослідницькі (Д).

Будова мікроскопа

Мікроскоп складається з механічної та оптичної систем.

До *механічної* частини належать: штатив (який складається з прямокутної основи та тубусотримача); закріплений на штативі тубус з револьвером з отворами для об'єктивів; предметний столик для препарату; пристрій для закріплення конденсора та світлофільтрів; механізми грубого (макрогвинт) і тонкого (мікрогвинт) пересування предметного столика та тубусотримача.

Оптична частина складається з об'єктивів, окулярів та освітлювального пристрою (дзеркало, освітлювач, конденсор Аббе, відкидна лінза, світлофільтр). Цифри на металічній оправі *окуляра* (5^x, 7^x, 10^x, 15^x, 20^x) указують на його власне збільшення.

Розрізняють *монокулярний* (має один окуляр) і *бінокулярний* (два однакових окуляра) тубуси. Крім того, тубус може бути прямим, вертикальним і наклонним.

Основною частиною мікроскопа є *об'єктив*, від якого залежать основні

його якості: власне збільшення, розподільна здатність і чіткість зображення.

Розрізняють сухі та імерсійні об'єктиви.

Сухим називають такий об'єктив, між фронтальною лінзою якого і об'єктом міститься повітря. Під час використання **імерсійних** об'єктивів між фронтальною лінзою об'єктива і досліджуваним об'єктом міститься крапля оптично прозорої імерсійної рідини: кедрове масло, гліцерин, вода. У цій однорідній системі промені світла не заломлюються, а потрапляють в об'єктив, не змінюючи свого напрямку, оскільки показники заломлення скла і імерсійної рідини майже однакові (скла – 1,52; дист. води – 1,3; кедрового масла – 1,52; гліцерину – 1,4; повітря – 1,0).

Власне збільшення об'єктива

Власне збільшення об'єктива знаходиться в зворотній залежності від фокусної відстані фронтальної лінзи (табл. 2.1). Сильні об'єктиви мають фокусну відстань 1,5–2,0 мм, середні – 5–12 мм, слабкі – 18–25 мм, найслабкіші – 50–60 мм. Біологічні мікроскопи здебільшого оснащені трьома змішаними об'єктивами зі збільшенням 8^x, 20^x, 40^x, 90^x. Перші три називають «сухими», оскільки під час їх використання між об'єктом і об'єктивом знаходиться повітря. Об'єктиви зі збільшенням 90^x називаються імерсійними (лат. *immersion* – занурювати), оскільки під час роботи їх обов'язково занурюють в імерсійну рідину, яка знаходиться між об'єктивом та об'єктом.

Таблиця 2.1 – Деякі оптичні параметри об'єктивів світлопольного мікроскопа

Власне збільшення об'єктива	Числова апертура	Фокусна відстань, мм	Робоча відстань, мм	Діаметр поля зору
8	0,20	18,2	8,53	2,20
20	0,54	8	1,40	1,00
40	0,65	4,3	0,60	0,50
90	1,32	2	0,10	0,05

Чіткість зображення

Чіткість зображення досліджуваного об'єкта залежить від міри усунення в об'єктивах явищ хроматичної і сферичної аберацій.

Суть хроматичної аберації полягає в тому, що складне біле світло під час проходження через лінзу, яка може бути подана як система призм, розкладається на спектр і сформоване зображення стає кольоровим.

Сферична аберація обумовлена тим, що промені світла, потрапляючи на різні точки двовипуклої лінзи, заломлюються неоднаково, тому що товщина лінзи у діаметрі змінюється. У результаті зображення точки утворюється не у вигляді точки, а в вигляді шару розсіювання.

У сучасних мікроскопах аберації усуваються за допомогою корекційних лінз. За мірою усунення оптичних дефектів об'єктиви поділяють на ахромати, апохромати і планахромати. В *ахроматах* за допомогою приблизно 6 корекційних лінз частково усунено хроматична аберація. В *апохроматах*, які складаються з 10 чи 12 корекційних лінз сферична і хроматична аберації усунені майже повністю. Об'єктиви, що повністю усувають кривизну поля зору, називають *планахроматами*.

Розподільна здатність мікроскопа

Розподільна здатність мікроскопу – це здатність об'єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих точок. Іншими словами, це та мінімальна відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. Чим більша розподільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об'єкт можна побачити. У 1873 р. німецький учений Ернст Аббе вивів формулу розподільної здатності мікроскопа:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha'}$$

де d – найменша відстань між деталями об'єкта, що сприймаються роздільно (розподільна здатність); λ – довжина хвилі світла; $n \sin\alpha'$ – числова апертура об'єктива; n – показник заломлення оптичного середовища, яке знаходиться між досліджуваним об'єктом та фронтальною лінзою об'єктива; $\sin\alpha'$ – кутова

апертура об'єктива (половина отвірного кута, що утворюється двома крайніми променями, які ще потрапляють в об'єктив); α – апертурний кут об'єктива мікроскопа, який максимально дорівнює 90° , $\sin 90^\circ = 1$.

Отже, було встановлено пряму пропорційну залежність між розподільною здатністю та довжиною хвилі світла, а також зворотна пропорційна залежність між цією розподільною здатністю та числовою апертурою. Е. Аббе довів, що немає сенсу безмежно підвищувати збільшення світлового мікроскопа. Підвищити розподільну здатність мікроскопу можна:

– за допомогою освітлення досліджуваного об'єкта променями світла з меншою довжиною хвиль (ультрафіолетовими);

– або збільшенням показника заломлення оптичного середовища, яке межує з лінзою об'єктива, щоб приблизити його до показника заломлення скла, на якому міститься об'єкт (цього досягають за допомогою імерсійної системи).

У разі освітлення об'єкта світлом з довжиною хвилі 550 нм, до якого найбільш чутливе око, розподільна здатність мікроскопа для *сухої системи* дорівнює:

$$d_{\text{сух.}} = \lambda / (2n \sin \alpha) = 550 / 2 \cdot 1 \cdot 1 \approx 300 \text{ нм};$$

для *імерсійної системи*:

$$d_{\text{ім.}} = \lambda / (2n \sin \alpha) = 550 / 2 \cdot 1,5 \cdot 1 \approx 200 \text{ нм.}$$

Загальне збільшення мікроскопа

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива, помноженому на збільшення окуляра. Наприклад, за використання окуляра 15^\times і об'єктива 90^\times матимемо збільшення зображення у $15 \cdot 90 = 1350$ разів.

2. Інші методи мікроскопічного дослідження.

Фазово-контрастна мікроскопія

Призначена для вивчення живих незабарвлених об'єктів. Світлові хвилі (промені) характеризуються довжиною хвилі (колір), амплітудою (інтенсивність, яскравість світла) і фазою (фазові зміни світла після проходження через об'єкт око не сприймає).

У фазово-контрастному мікроскопі спеціальний конденсор і спеціально влаштований об'єктив регулюють зміни фази світлових хвиль і перетворюють різницю фаз у різницю інтенсивності світла, завдяки чому деталі будови об'єкта стають доступними для ока.

Мікроскопія в темному полі

Призначена для досліджування дуже малих (знаходяться за межею розподільної здатності мікроскопа) і слабкоконтрастних (слабкопоглинаючих світло) живих об'єктів. Використовують спеціальний конденсор темного поля, центр якого затемнений, пучок світлових променів не потрапляє в об'єктив, поле зору темне.

Об'єкт освітлюється лише променями, що потрапляють на нього під кутом. Розсіюючись на об'єкті, частина променів змінює напрям і потрапляє в об'єктив. Об'єкт сприймається у полі зору як точка, що світиться на темному фоні. Цей метод дозволяє одержати уявлення про зовнішню форму мікроорганізмів і їх рух.

Люмінесцентна (ультрафіолетова, флуоресцентна) мікроскопія

Позитивні якості методу: більша розподільна здатність, ніж у світлопольного, темнопольного і фазовоконтрастного мікроскопів; чіткість зображення; висока специфічність; можливість застосування методу для живих і фіксованих клітин і проведення кількісних досліджень.

Метод ґрунтується на тому, що деякі структури клітини, опромінені світловими променями синьо-фіолетової ділянки спектра, починають світитися, випускаючи промені з іншою (більшою) довжиною хвилі (первинна люмінесценція). Деякі хімічні сполуки (флуорохроми) також поглинають ультрафіолетові промені і частина поглиненої енергії випускається у вигляді світла з великою довжиною хвиль, що належать до видимої частини спектра. Якщо такими речовинами обробити клітини мікробів, а потім опромінити їх ультрафіолетом, то вони будуть світитися на темному фоні поля зору (вторинна люмінесценція).

Електронна мікроскопія.

Призначена для вивчення дуже малих за розміром об'єктів. В електронному мікроскопі замість світлових променів використовують пучок електронів, що мають хвильові властивості. Довжина видимого світла у світловому мікроскопі дорівнює 550 нм, а пучкам електронів високої енергії (100 кВт) відповідає довжина хвилі приблизно 0,04 нм. Відповідно, розподільна здатність і корисне збільшення електронного мікроскопа на кілька порядків вищі, ніж у світлового. Пучок електронів рухається в безповітряному просторі від джерела електронів у напрямку до флуоресцентного екрана і обумовлює його рівномірне світіння. Якщо на шляху електронів помістити будь-який об'єкт, то залежно від його щільності електрони будуть більше чи менше затримуватись і відповідні місця на екрані виявляться більш чи менш затемненими.

Правила зберігання та роботи зі світлопольним мікроскопом

1. Мікроскоп зберігати закритим (під чохлам чи в ящику).
2. Переносити мікроскоп можна тільки тримаючи його за тубусотримач. При цьому тримати його необхідно перед собою, не опускаючи вниз, бо з тубуса можуть випасти окуляри.
3. Перед початком роботи слід перевірити стан оптики і, у разі потреби, протерти її (тільки ззовні) пензликом чи м'якою тканиною.
4. Розбирати окуляри і об'єктиви категорично забороняється.
5. Після роботи з імерсійною системою фронтальну лінзу об'єктива ретельно очищують від оливи м'якою тканиною, змоченою в бензині, після чого витирають насухо.
6. Не дозволяється зберігати чи працювати з мікроскопом у присутності кислот чи водяної пари.
7. Механічні частини, що зазнають тертя, двічі–тричі на рік протирають ксилолом чи бензином і змазують маслом.
8. Кожен студент має користуватися під час заняття тільки одним мікроскопом.

Підготовка мікроскопа до роботи

1. Налагодити освітлення дзеркалом і конденсором. У положенні, коли окуляри і об'єктив 8^x встановлені на свої робочі місця, конденсор має бути майже повністю піднятий до предметного столика, а апертурна діафрагма в конденсорі повністю відкрита, дзеркало поверніть так, щоб направити світло вгору по оптичній осі. Макрогвинтом установіть об'єктив у положення, у якому джерело світла знаходиться в фокусі, після чого виведіть його в центр за допомогою дзеркала.

2. Розмістіть предметне скло на предметному столику і закріпіть його зажимами.

3. Поворотом револьвера встановіть потрібний об'єктив. Якщо розглядають препарат з імерсією, то наносять краплину оливи на скло з препаратом, перед тим, як помістити його на предметний столик. Якщо спочатку потрібно знайти потрібне поле зору з малим збільшенням, тоді масло зручніше наносити в проміжному положенні під час переходу з одного об'єктиву на інший (імерсійний).

Лінзи оптичної системи мають бути чистими.

4. Замалюйте мікроскопічну картину, під малюнком вкажіть назву об'єкта і збільшення мікроскопа, з яким розглядали препарат.

Після роботи з імерсією тубус підніміть, об'єктив протирають тканиною, змоченою в спирті, бензині або фільтрованим папером.

Техніка світлопольної мікроскопії (з імерсією)

Настроїти освітлення: підняти до упору конденсор, відкрити діафрагму, установити плоске дзеркало, опустити об'єктив малого збільшення (8^x) на відстань близько 0,5 см від предметного скла, обертаючи дзеркало, відрегулювати освітлення так, щоб усе поле зору було освітлене рівномірно й яскраво.

Після настройки світла на сухий фіксований забарвлений препарат наносять краплю імерсійної олії. Установлюють імерсійний об'єктив (90^x) і, дивлячись збоку, обережно опускають макрометричним гвинтом тубус

мікроскопа до занурення об'єктива в олію.

Стежати за тим, щоб не пошкодити скло і не зіпсувати лінзу. Потім, спостерігаючи в окуляр, макрогвинтом повільно піднімають тубус і фокусують об'єкт. Тонке фокусування здійснюють за допомогою мікрометричного гвинта.

Після роботи кедрову олію негайно видаляють з об'єктива і конденсора. Олію знімають фільтрувальним папером, остаточно видаляють його м'якою ганчіркою, змоченою ксилолом або очищеним бензином.

4. Замалювати переглянутий препарат.

5. Приготувати препарат мікроорганізмів «роздавлена крапля». При цьому дуже суворі вимоги висуваються до якості предметних і покривних стекол і приготування препарату.

Предметні стекла повинні бути не товще 1,1–1,2 мм, покривні – 0,17 мм, без подряпин і забруднень.

Під час приготування препарату варто звертати особливу увагу на відсутність пухирців повітря і крупних часток.

6. Промікроскопувати препарат мікроорганізмів «роздавлена крапля» методом темнопольної мікроскопії:

– Налаштувати освітлення (встановлюють світло за Келером).

– Заміняють світлопольний конденсор на темнопольний (або поміщають у центр звичайного світлопольного конденсора Аббе кружок чорного паперу).

– На верхню лінзу конденсора наносять імерсійне масло або в крайньому разі дистильовану воду (з показником заломлення, близьким до показника заломлення скла).

– Піднімають конденсор до зіткнення з нижньою поверхнею предметного скла.

– Об'єктив малого збільшення фокусують на препарат.

– За допомогою центруючих гвинтів переводять у центр поля зору світлу пляму (яка іноді має затемнену центральну ділянку) – центрують конденсор.

– Піднімаючи й опускаючи конденсор, добиваються зникнення затемненої світлої плями. Якщо це зробити не вдається, то треба перевірити

товщину предметного скла (під час використання товстих предметних стекол – конус світла фокусується в товщі скла).

– Після правильної настройки світла встановлюють об'єктив необхідного збільшення і досліджують препарат.

У разі правильної настройки освітлення на темному полі можна буде спостерігати клітини бактерій як яскраві точки, які світяться.

7. Замалювати переглянутий препарат.

8. Розрахувати загальне збільшення мікроскопа (при якому розглядали препарат).

9. Розрахувати розподільну здатність мікроскопа (при якій мікроскопували препарат).

Установка світла за Келером

– Установлюють освітлювач напроти дзеркала мікроскопа.

– Умикають лампу і направляють світло на плоске дзеркало мікроскопа.

– Поміщають препарат на предметний столик мікроскопа.

– Закривають дзеркало мікроскопа аркушем білого паперу і фокусують на ньому зображення нитки розжарення лампи.

– Прибирають аркуш паперу з дзеркала.

– Закривають апертурну діафрагму конденсора.

Змінюючи положення дзеркала і злегка пересуваючи патрон лампи, фокусують зображення нитки розжарення лампи на апертурній діафрагмі (зображення нитки розжарення лампи повинно дорівнювати діаметру апертурної діафрагми конденсора).

– Відкривають апертурну діафрагму конденсора, прикривають польову діафрагму освітлювача і значно зменшують розжарення лампи.

– З малим збільшенням ($10\times$), дивлячись в окуляр, одержують різке зображення препарату.

– Злегка повертаючи дзеркало, переводять зображення польової діафрагми, яке має вигляд світлої плями, у центр поля зору. Опускаючи і піднімаючи конденсор, одержують різке зображення країв польової діафрагми

(навколо них може бути видна кольорова смужка).

– Розкривають польову діафрагму освітлювача до країв поля зору, збільшують розжарення нитки лампи і злегка (на $1/3$) зменшують розкриття апертурної діафрагми конденсора.

– Під час заміни об'єктива необхідно перевірити настройку освітлення. Освітленість препарату можна регулювати тільки нейтральними світлофільтрами або зміною розжарення лампи за допомогою реостату.

Хід роботи

1. Приготувати фіксований забарвлений препарат бактеріальних клітин.
2. Підготувати мікроскоп до роботи.
3. Промікрископувати препарат за допомогою імерсійного об'єктива.

Завдання до теми

1. Ознайомитися з роботою, будовою світлопольного мікроскопа, оптичними характеристиками об'єктивів мікроскопу, формулами розрахунку загального збільшення і розподільчої здатності мікроскопу.

2. Засвоїти методи мікроскопічного дослідження об'єктів (світлопольну, фазово-контрастну, люмінесцентну, електронну мікроскопію та мікроскопію в темному полі).

3. Провести мікроскопічне дослідження фіксованого забарвленого препарату культури мікроорганізмів з використанням техніки світлопольної мікроскопії (з імерсією). Результати дослідження замалювати.

4. Промікрископувати препарат «роздавлена крапля» культури дріжджів у темному полі. Результати дослідження замалювати.

5. Розрахувати загальне збільшення і розподільчу здатність мікроскопа для кожного дослідження.

Контрольні питання

1. Які мікроскопи називають світловими?
2. Принцип роботи світлопольного мікроскопа.
3. Будова світлопольного мікроскопа: механічна й оптична частини.

4. Збільшення об'єктів світлопольного мікроскопа. «Сухі» й імерсійні системи.

5. Чіткість зображення об'єктів. Хроматична, сферична аберації об'єктів.

6. Розподільна здатність мікроскопа. Способи її підвищення.

7. Формула розрахунку розподільчої здатності мікроскопа.

8. Загальне збільшення мікроскопа.

9. Техніка установки світла мікроскопа за Келером.

10. Перелічити методи мікроскопічного дослідження.

11. Сутність, застосування фазово-контрастної мікроскопії.

12. Сутність, застосування методу мікроскопії в темному полі.

13. Викласти техніку виконання темнопольної мікроскопії з використанням світлопольного мікроскопа.

14. Сутність, переваги і застосування методу люмінесцентної мікроскопії.

15. Особливості первинної і вторинної люмінесценції.

16. Сутність і призначення електронної мікроскопії.

Література: [3, с. 11–12; 5, с. 7–8; 6, с. 8–14; 7, с. 8–9; 12, с. 7–9].

Лабораторна робота № 3

Тема. Морфологія бактерій. Генетичний апарат бактеріальної клітини

Мета: вивчити основні форми бактеріальної клітини, виявити відміну прокаріотних організмів від еукаріотів.

Обладнання та реактиви: мікроскоп, імерсійне масло, пальник, метиленовий синій, фуксин, предметні й покривні стекла, спиртівка, спирт, бактеріологічна петля, фізіологічний розчин, культура бактерій.

Навчальні елементи: морфологія бактеріальної клітини, мазок, фіксування мазка, барвники, імерсійна система мікроскопа, нуклеоїд, бактеріальна хромосома, бактеріальні плазмідні.

Короткі теоретичні відомості

Форми прокариот

Три основні форми бактеріальної клітини – *кулясту, паличкоподібну та звивисту* описав у XVII столітті Антоній Ван Левенгук. На сьогодні відомі такі форми бактеріальної клітини:

1. *Кулясті (коки)* розподіляються на:

- мікрококи (після розподілу розходяться, агрегацій не утворюють);
- диплококи (з'єднані попарно);
- тетракоки (з'єднані по 4);
- стрептококи (утворюють ланцюжки різної довжини);
- стафілококи (утворюють агрегації у вигляді виноградного грона);
- сарцини (утворюють пакети з 8–16–32 клітин);

2. *Паличкоподібні (циліндричні)* – довжина клітини у кілька разів перевищує ширину, можуть мати загострену, закруглену, зрізану форму закінчень клітини, розподіляються на:

- бацили (аеробні бактерії), які можуть з'єднуватися попарно (диплобацили) або утворювати ланцюжки різної довжини (стрептобацили);
- клостридії (анаеробні бактерії).

3. *Звивисті* розподіляються на:

- вібріони (мають вигляд коми),
- спірили (клітини мають 1–6 завитків),
- спірохети (мають понад 6 завитків);

4. *Бактерії, які мають «незвичайну» форму клітини:*

- тороїдні (форма зімкнутого або розімкнутого кільця);
- простекобактерії (мають вирости клітини);
- зіркоподібні, трикутні, квадратні.
- стебельцеві бактерії (рід *Caulobacter*),
- бактероїди групи *Rhizobium* – V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

Генетичний апарат бактеріальної клітини

Головна відмінність прокаріотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК.

Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми.

Бактеріальна хромосома компактно упакована, у ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК.

В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокаріот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазмідні – невеликі, замкнені в кільце, ділянки ДНК. Плазміни, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про додаткові властивості організму та під час ділення бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

Хід роботи

Дослідження морфології бактерій на прикладі *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* і *Sarcina flava*

1. Виготовити мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником метиленовий синій (час контакту з клітинами – 3–5 хв.), промити водою та висушити.

2. Виготовити мазок культури *Staphylococcus aureus* (стафілокок золотистий) або *Sarcina flava* (сарцина жовта), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником фуксин (час контакту з клітинами – 1–2 хв.), промити водою та висушити.

3. На обидва препарати нанести імерсійне масло та роздивитися за допомогою імерсійної системи мікроскопа.

Завдання до теми

1. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.
2. Зробити схематичний малюнок з позначенням ядерного матеріалу бактеріальної клітини.
3. Відобразити відміну прокаріотних організмів від еукаріотів.

Контрольні питання

1. Назвати основні органоїди й органели бактеріальної клітини та розповісти про їх будову та функції.
2. Навести типи морфологічної структури бактерій.
3. Перелічити особливості фізіологічної діяльності бактерій.

Література : [2, с. 13–14; 5, с. 17–19; 8, с. 8–10; 10, с. 6–8; 11, с. 7–8].

Лабораторна робота № 4

Тема. Виготовлення мікробіологічного препарату

Мета: оволодіти технікою приготування мікробіологічного препарату, препаратів «роздавлена крапля» і «висяча крапля» і виготовлення мазка.

Обладнання та реактиви: мікроскоп, імерсійне масло, предметні й покривні стекла, спиртівка, спирт, бактеріологічна петля, фізіологічний розчин, фільтрувальний папір, культура бактерій, культура дріжджів, розчин йоду, чорна туш, фуксин Циля, метиленовий синій, 96 % етиловий спирт, барвники за методом Романовського-Гімза, гумова груша, скляні палички, з'єднані гумовими трубочками, піддон, штатив, піпетки, скляні палички.

Навчальні елементи: живий забарвлений стан, фіксований забарвлений стан, препарат «роздавлена крапля», препарат «висяча крапля».

Короткі теоретичні відомості

Мікроскопічні дослідження мікроорганізмів проводять у *живому* (препарат «роздавлена крапля», препарат «висяча крапля») або *фіксованому забарвленому* стані (препарат «фіксований забарвлений мазок»). Мікроскопію мікробних клітин у живому стані застосовують переважно для вивчення їх розмірів, форми, структури, рухливості, характеру розмноження, впливу на

клітину хімічних подразників. Для цього найчастіше готують препарати *«роздавлена крапля»* і *«висяча крапля»*. Мікроорганізми у цих препаратах можна забарвлювати – прижиттєве забарвлення. У препараті «висяча крапля» мікроорганізми можна вивчати протягом тривалого часу – тиждень чи більше.

Виготовлення мікробіологічного препарату

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися певних правил з техніки безпеки під час роботи з живими культурами мікроорганізмів, а саме:

- відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
- під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними;
- відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати за полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором униз;
- під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
- скло з незафіксованими мікроорганізмами повинне знаходитися виключно за полум'ям пальника;
- залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
- не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
- після закінчення роботи ватною, змоченою 70 % етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

Для вивчення форми прокаріотної клітини найчастіше використовують метод фіксованих забарвлених препаратів. Виготовлення мікробіологічного препарату таким методом включає ряд послідовних операцій:

Виготовлення мазка.

На чисте знежирене предметне скло нанести невелику краплю дистильованої води, у неї за допомогою стерильної бактеріальної петлі внести

невелику кількість маси мікроорганізмів і розподілити по поверхні скла. Мазок повинен бути тонким, діаметром близько 1 см. Якщо культура мікроорганізмів вирощувалася на рідкому живильному середовищі, за допомогою стерильної піпетки на чисте знежирене предметне скло наносять невелику краплю культуральної рідини, яка містить мікроорганізми. Краплю, яка містить мікроорганізми можна розподілити по склу за допомогою стерильної бактеріальної петлі, або розподілити за допомогою грані іншого предметного (покривного) скла.

Висушування мазка

Проводять без нагрівання, при кімнатній температурі до повного випаровування води з поверхні предметного скла.

Фіксація мазка

Проводиться для того, щоб:

а) убити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними;

б) прикріпити мазок до поверхні скла, щоб він не змився під час подальших маніпуляцій;

в) зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин. Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3–4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутріклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96 %), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном, тощо.

Способи фіксації:

а) *Фізичний – фіксація жаром* – у полум'ї пальника. Спосіб застосовують для дослідження морфології мікробних клітин, але цей метод не придатний для вивчення їх будови, бо під дією високих температур структура клітин суттєво змінюється. Для фіксації висушений препарат кілька разів проводять крізь полум'я пальника. Для цього скло беруть пінцетом або великим і вказівним пальцями і триразово проводять крізь верхню частину полум'я

пальника протягом 3–6 сек. Швидкість і кратність проведення скла з мазком крізь полум'я регулюється відчуттям печіння в пальцях.

б) Хімічний – хімічними речовинами (рідинами або парами). Спосіб застосовується у вивченні внутрішньої структури клітин, мазків з крові та ін. матеріалів. Рідкі фіксатори: безводний метиловий спирт (3–5 хв); 96 % етиловий спирт (5–10 хв); суміш Никифорова – етиловий спирт і ефір у співвідношенні 1 : 1 (10–15 хв); ацетон (5 хв). Парами кислоти і формаліну фіксують протягом декількох секунд.

Забарвлення мазка

Може бути простим (використовується один барвник) і диференціальним (використовується кілька барвників у певній послідовності). На охолоджений після фіксування мазок піпеткою наносять кілька крапель барвника (мазок повинен бути повністю вкритий шаром барвника), при цьому піпетка не повинна торкатися поверхні скла. Для кожного барвника існує свій час контакту з поверхнею зафіксованих клітин. У разі диференціального забарвлення барвники витримують на мазку вказаний у методиці час і змивають водою або певним розчином.

Промивання препарату

Проводять дистильованою водою до «чистої води», тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом і струмись води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

Висушування препарату

Промите скло ретельно витирають з нижнього боку клаптиками фільтрувального паперу, а з іншого боку – обережно промокають воду з залишками барвника та висушують на повітрі або над полум'ям пальника. У разі неякісного висушування скла погіршується якість зображення під мікроскопом.

Виготовлення препаратів «роздавлена крапля» і «висяча крапля»

Ці типи препаратів використовують для спостереження за живими

бактеріями, в тому числі, рухомими. Для виготовлення таких препаратів використовують знежирені предметні та покривні скельця, а також предметні скельця з лунками.

Метод «роздавленої краплі»

Хід роботи

1. На предметне скло за допомогою піпетки нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії, у цьому разі – бродильну рідину з клостридіями.

2. До краплі додати розчин Люголя та накрити покривним скельцем так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Лишки рідини видалити фільтрувальним папером.

3. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40^x. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини жовтувато-зеленуватого кольору.

Метод «висячої краплі»

Хід роботи

1. На покривне скельце нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії.

2. На кути покривного скла за допомогою препарувальної голки нанести невелику кількість вазеліну.

3. Покривне скло накрити предметним склом із лункою та легко натиснути на нього. Предметне скло з приклеєним до нього покривним обережно перевертають покривним склом угору. У разі правильного виготовлення препарату крапля не торкається стінок лунки, а завдяки силі поверхневого натягіння тримається на покривному склі та вільно провисає у лунці предметного скла.

4. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40^x. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини.

Завдання до теми

1. Ознайомитися зі складними й простими методами забарвлення мікробів; засвоїти методику й етапи приготування препаратів мікроорганізмів – «роздавлена крапля» фіксованого мазка.

2. Приготувати препарат «роздавлена крапля» культури дріжджів. Провести їх прижиттєве забарвлення і промікроскопувати. Результати мікроскопування замалювати.

3. Приготувати препарат «висячої краплі» культури інфузорій. Провести їх прижиттєве забарвлення і промікроскопувати. Результати мікроскопування замалювати.

Контрольні питання

1. Назвати основні препарати, які використовують для мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.

2. Викласти методику приготування препарату «роздавлена крапля».

3. Назвати етапи приготування фіксованого препарату мікроорганізмів.

4. Мета проведення фіксації клітин. Способи фіксації.

Література: [1, с. 25–27; 4, с. 56–58; 7, с. 28–34; 9, с. 6–8].

Лабораторна робота № 5

Тема. Вивчення мікроорганізмів у забарвленому стані

Мета: оволодіти технікою простих і диференційованих методів забарвлення мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви : мікроскоп, імерсійне масло, предметні й покривні стекла, спиртівка, спирт, бактеріологічна петля, фізіологічний розчин, фільтрувальний папір, культура бактерій, культура дріжджів, розчин йоду, чорна туш, фуксин Циля, метиленовий синій, 96 % етиловий спирт, барвники за методом Романовського-Гімза, гумова груша, скляні палички, з'єднані гумовими трубочками, піддон, штатив, піпетки, скляні палички.

Навчальні елементи: орієнтовний (простий) метод забарвлення, диференційний (складний) метод забарвлення, грампозитивні бактерії, грамнегативні бактерії

Короткі теоретичні відомості

Забарвлення фіксованого препарату

Забарвлення мікроорганізмів виконують на спеціально обладнаному

столі, вкритому лінолеумом, пластиком, склом і т. д. на столі повинна стояти посудина з дистильованою водою; підставка з двох трубочок або паличок, які з'єднанні гумовими трубками з обох боків (для розміщення препаратів); пінцети, циліндри, піпетки, фільтрувальний папір, набір барвників, ємкість для їх зливу. Стіл для забарвлення повинен стояти поруч з водопровідним краном.

Переважно барвники, що використовують у мікробіологічній практиці, є сполуками, найчастіше похідними бензолу і його гомологів, які одержують або шляхом хімічного синтезу, або з кам'яновугільної смоли. Вони можуть бути основними, кислими і нейтральними. У кислих барвників іон, який надає забарвлення (хромофор), є кислотою і під час забарвлювання інтенсивніше зв'язується з цитоплазматичними (основними) компонентами клітини. У основних барвників роль хромофора виконує катіон, тому він більш інтенсивніше зв'язується з ядерними (кислими) компонентами клітини. Деякі барвники не утворюють хімічних сполук, а просто розчиняються або осаджуються на оточуючому матеріалі. У механізмі забарвлення мають значення як хімічні, так і фізичні процеси.

У лабораторних умовах можна швидко визначити, який характер (кислий чи основний) має водний розчин того чи іншого барвника. Для цього на фільтрувальний папір наносять краплю досліджуваного барвника. Унаслідок того, що фільтрувальний папір заряджений негативно, то при основних властивостях барвника вода розтікається у вигляді безбарвної зони навколо фіксованої плями барвника, при кислих – барвник і вода розтікаються однаково. У практиці мікробіологічних досліджень частіше використовують основні барвники. Це пояснюється тим, що більшість бактерій несе на поверхні клітини негативний електричний заряд і в їх цитоплазмі переважають речовини з кислими властивостями. За співвідношенням клітинних речовин до основних, кислих чи нейтральних барвників, уведено відповідно поняття базофілія, ацидофілія та нейтрофілія. Такий розподіл є відносним, бо більшість речовин є амфотерними сполуками і залежно від рН середовища можуть мати кислі, нейтральні чи основні властивості.

У мікробіологічній практиці частіше застосовують такі барвники:

- червоні – фуксин основний і фуксин кислий, нейтральний червоний, конго червоний, еозин К, еритрозин;
- сині – метиленовий блакитний, толуїдиновий блакитний;
- зелені – малахітовий зелений, діамантовий зелений, янус зелений;
- фіолетові – генціан фіолетовий, кристалічний фіолетовий, гематоксилин;
- коричневі – основний коричневий, хризоїдин;
- жовті – пікринова кислота, флуоресцеїн;
- чорні – індулін спирторозчинний, нігрозин водорозчинний та ін.

Використання різних барвників, їх концентрація та тривалість впливу на клітину зумовлюються особливостями структур, які досліджуються, і властивостями барвників.

Методи забарвлення поділяють на *орієнтовні (прості) і диференційні (складні)*, які виявляють хімічні та структурні особливості бактеріальної клітини.

Простий метод забарвлення

У простому методі використовують один тільки барвник.

Під час простого забарвлення зафарбовується вся клітина, так що добре простежуються її форма й розміри.

Техніка забарвлення фіксованих препаратів мікроорганізмів

Фіксований препарат поміщають на підставку (на дві скляні палички, що з'єднані гумовими трубочками і розташовані на бортиках кювети) для забарвлення, досліджуваним матеріалом угору. Піпеткою наносять на препарат розчин барвника.

Після закінчення означеного часу барвник обережно зливають, препарат промивають водою і висушують фільтрувальним папером. Забарвлений препарат мікроскопують.

Метиленовим синім і лужним синім Леффлера забарвлюють препарат протягом 3–5 хв, фуксином Пфейффера – 1–2 хв.

Техніка прижиттєвого забарвлення мікроорганізмів

Більшість барвників, які використовуються в мікробіологічних дослідах, токсичні. Тому для прижиттєвого забарвлення мікроорганізмів їх використовують у дуже малих концентраціях від 0,001 до 0,0001 %.

Найчастіше використовують метиленовий синій та ін. барвники. Краплю досліджуваного матеріалу змішують на предметному склі з краплею барвника і накривають покривним склом. Мікроскопують за допомогою об'єктива 40^x.

Забарвлення гранул глікогену

На чисте знежирене предметне скло нанести піпеткою суспензію 2-добової культури мікробів (дріжджів).

Додати краплю концентрованого розчину йоду.

Препарат обережно накрити покривним склом, щоб не утворилися пухирці повітря.

Промікроскопувати за допомогою об'єктивів 40^x, 90^x.

У полі зору мікроскопа в клітинах дріжджів і бактерій глікоген простежується у вигляді гранул червоно-коричневого кольору.

Складні методи забарвлення

Складні, спеціальні методи забарвлення використовують для виявлення спор, капсул, джгутиків, різних структур й органел, клітинних включень у клітинах мікроорганізмів і т. д. У складних методах забарвлення використовуються декілька барвників послідовно або комплекс барвників (у комплексі).

Забарвлення за Грамом.

Метод забарвлення за Грамом є найуніверсальнішим із складних методів забарвлення, уперше запропонований у 1884 р. датським ученим Х. Грамом.

Метод має важливе діагностичне значення для визначення виду бактерій. Усі бактерії за своїм відношенням до цього методу забарвлення поділяють на дві групи: *грампозитивні і грамнегативні*.

Сутність методу полягає в тому, що клітинна стінка бактеріальних клітин одних видів міцно утримує утворену нерозчинну комплексну сполуку

барвників з йодом під час обробки (знебарвленні) їх спиртом – грампозитивні бактерії; в інших видів клітинна стінка не утримує цей комплекс (барвника з йодом), і під дією спирту барвник вимивається, клітини легко знебарвлюються – грамнегативні бактерії.

1. Приготуйте мазок з досліджуваного матеріалу. Мазок має бути тонким, бо інакше важко буде оцінити результати забарвлення. Мазок висушіть на повітрі або високо над полум'ям і зафіксуйте 4–5 разів у полум'ї спиртівки.

2. На предметне скло з мазком накладіть смугу фільтрувального паперу і зверху залийте карболовим розчином генціана фіолетового або покладіть смугу фільтрувального паперу, задалегідь насиченого барвником (модифікація Сінева), на яку налейте 2–3 краплі води і щільно притисніть папір до мазка. Фарбуйте 1–2 хв, при цьому забарвлюються як позитивні, так і негативні бактерії.

3. Зніміть папір, залийте фарбою і, не промиваючи препарат водою, налейте на мазок розчин Люголя на 1–2 хв (до почорніння).

4. Злийте розчин Люголя і, не промиваючи препарат водою, нанесіть 1–2 краплі 96 % етилового спирту на 0,5–1 хв. Препарат злегка погойдуйте для рівномірного відходження фіолетових струмочків фарби. Щоб запобігти зайвому знебарвленню клітин, можна до спирту додати розчин йоду. Спирт знебарвлює клітини грамнегативних бактерій, а грампозитивні зберігають забарвлення.

5. Препарат швидко, щоб не збільшити експозицію дії спирту, промити водою.

6. Препарат забарвлюють розчином фуксину червоного 1–2 хв для контрастного забарвлення грамнегативних бактерій.

7. Фарбу злити, препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопувати з імерсійною системою (об'єktiv 90^x).

У полі зору мікроскопа грампозитивні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні – у червоний.

Забарвлення за Романовським-Гімза (ядер, нуклеоїдів, найпростіших, спірохет, рикетсій)

Використаний барвник складається із суміші азуру, еозину, метиленового синього. Безпосередньо перед використанням його розчиняють дистильованою водою (рН 7,0–7,2) з розрахунку 1 : 10.

Свіжий, висушений на повітрі препарат фіксують етиловим чи метиловим спиртом протягом 5–15 хв, або у спирті-ефірі 30 хв і довше.

На препарат наливають розведений розчин барвника і забарвлюють протягом 30–45 хв.

Розчин барвника зливають, промивають дистильованою водою.

Препарат висушують на повітрі (не слід висушувати нагріванням, тому що під час нагрівання руйнуються азурові гранули).

У результаті забарвлення отримують ядра червоно-фіолетові, еозинові гранули червоно-фіолетові, базофільні гранули сині, нейтрофільні гранули червоно-фіолетові, протоплазма лімфоцитів синя, ядра кров'яних паразитів і найпростіших яскраво-червоні, джгутики і блефаропласт яскраво-червоні, цитоплазма блакитна, спірохети і рикетсії – бузкувато-сині або рожеві.

Забарвлення за Буррі-Гінсом (виявлення капсул)

Деякі види бактерій продукують слизувату речовину. Слизуватий шар буває різний за товщиною, формою і хімічним складом. Якщо він досить міцний і має визначену форму й структуру, його називають капсулою.

На предметне скло наносять краплю чорної туші, розведеної у 10 разів. У приготовану краплю туші на предметне скло вносять краплю культури. Ребром шліфувального скла готують мазок (так само як мазок крові). Для цього до краплі дослідної рідини на предметному склі під кутом 45° підводять край шліфувального скла, крапля розтікається по краю скла, після чого швидким рухом шліфувального скла готують мазок.

Мазок висушують, фіксують хімічним способом (спиртом чи сулемою) або фізичним (у полум'ї пальника). Після хімічної фіксації обережно промивають водою.

Забарвлюють фуксином Пфейффера (або фуксином Циля) 3–5 хв. Обережно промивають і висушують на повітрі.

Препарат мікроскопують за допомогою імерсійної системи.

Поле зору у препараті чорне, клітини – червоні, капсули – незабарвлені.

Хід роботи

I. Простий метод забарвлення.

1. Приготувати препарат «роздавлена крапля» і провести прижиттєве забарвлення метиленовим синім культури дріжджів.

Промікроскопувати за допомогою об'єктиву 40^x.

Результати замалювати.

2. Провести забарвлення гранул глікогену розчином йоду в клітинах дріжджів. Приготувати для цього препарат «роздавлена крапля». Забарвлений препарат промікроскопувати за допомогою об'єктива 40^x. Результати замалювати.

II Складні методи забарвлення.

1. Провести забарвлення за Буррі-Гінсом для виявлення капсул у культурі мікроорганізмів. Для цього приготувати фіксований мазок досліджуваної культури мікробів. Забарвлений препарат промікроскопувати за допомогою імерсійної системи.

2. Провести забарвлення за Романовським-Гімза для виявлення нуклеоїдів у клітинах бактерій. Для цього попередньо приготувати фіксований мазок досліджуваної культури бактерій. Забарвлений препарат промікроскопувати за допомогою імерсійної системи.

Завдання до теми

1. Одержати навички прижиттєвого забарвлення клітин, забарвлення за Грамом, Романовським-Гімза, виявлення гранул глікогену, капсул у клітинах мікробів.

2. Провести виявлення гранул глікогену методом забарвлення в препараті «роздавлена крапля» культури дріжджів. Препарат промікроскопувати, результати замалювати.

3. Провести забарвлення нуклеоїдів у фіксованому препараті клітин бактерій. Препарати промікроскопувати, результати замалювати.

4. Провести забарвлення капсул у фіксованому препараті клітин бактерій. Препарати промікроскопувати, результати замалювати.

Контрольні питання

1. Дати визначення складним і простим способам забарвлення мікроорганізмів.

2. Застосування різних способів забарвлення клітин мікробів.

3. Назвати барвники, які використовують для забарвлення мікробів. На які дві групи їх поділяють?

4. Викласти сутність методу забарвлення за Грамом.

5. У якій колір забарвлюються грам-негативні і грам-позитивні мікроорганізми?

Література: [1, с. 1–4; 2, с. 1–3; 3, с. 8–14; 4, с. 6–8; 5, с. 1–3].

Лабораторна робота № 6

Тема. Ендоспори бактерій. Клітинні включення мікроорганізмів

Мета: вивчення спороутворення бактерій, ознайомлення із основними клітинними включеннями мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви: мікроскоп, імерсійне масло, предметні й покривні стекла, спиртівка, спирт, бактеріологічна петля, синька Леффлера, пальник, барвник нейтральрот, фільтрувальний папір, 96 % етиловий спирт, розчин Люголю, барвника судан III, фуксин.

Навчальні елементи: ендоспори, бацилярний, кластридальний і плектридальний типи спороутворення, терморезистентність спор, включення мікроорганізмів, запасні поживні речовини, волютин, гранульоза, полі- β -оксимасляна кислота, параспоральні тільця.

Короткі теоретичні відомості

Ендоспори бактерій

До спороутворення здатна невелика кількість бактерій. Ендоспори

утворюють представники невеликої кількості родів (близько 10) і переважно з циліндричною формою клітини, наприклад, бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Amphibacillus*, *Sulfobacillus*, як виняток, – спороутворювальні бактерії роду *Sporosarcina* мають кулясту форму клітин.

Спори бактерій, на відміну від спор еукаріот, не є способом розмноження, вони формуються ендогенно, тобто всередині материнської клітини та можуть мати центральне, субтермінальне (прикінцеве) або термінальне (кінцеве) положення.

Діаметр спори може не перебільшувати ширину материнської клітини (бацилярний тип у центральному або субтермінальному положенні), а може перебільшувати (кlostридіальний тип у центральному або субтермінальному положенні, плектридіальний тип – у термінальному положенні).

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

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

Спороутворення контролюється понад 150 генами, причому кожен з етапів утворення спор контролюється певними оперонами. Процес спороутворення починається з ущільнення цитоплазми навкруги нуклеоїда, далі починається процес утворення проспори, при цьому цитоплазматична мембрана інвагується, та в результаті під клітинною стінкою утворюються різні за розмірами дві структури, що оточені мембранами.

На наступному етапі цитоплазматична мембрана більшої частини оточує меншу частину – формується проспора (структура, оточена подвійною мембраною всередині материнської клітини). Далі обидві мембрани починають синтез оболонки спори, а у більшості видів проміж мембран формується ще одна оболонка – кортекс. Окрім кортекса формуються внутрішня та зовнішня оболонки спори, а також екзоспоріум.

Після того, як спора повністю сформувалася, настає лізис материнської клітини. Період спокою бактеріальних спор може тривати від кількох годин до сотень років.

Клітинні включення мікроорганізмів

До внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів належать запасні речовини (глікоген, крохмаль, гранульоза, волютин, білкові кристали, жири, сірка) і продукти метаболізму. Запасні поліфосфати (волютин, метакроматинові зерна, тільця Бабеша-Ернста, зараз найчастіше вживається назва – поліфосфатні гранули).

Уперше були знайдені у бактерії *Spirillum volutans*. Це запасні поживні речовини мікроорганізмів у вигляді округлих тілець діаметром від 50 нм до 1 мкм, які складаються з конденсованих неорганічних фосфатів. Поліфосфати використовуються клітиною для біосинтезу фосфоліпідів і нуклеїнових кислот, а у разі дефіциту АТФ – фосфорильна група переноситься на АДФ або АМФ.

Одже, поліфосфатні гранули є макроергічною речовиною, що асимілює енергію. У клітинах поліфосфати визначаються завдяки здатності до метакроматинії (зміни кольору), під час фарбування синіми барвниками ці структури дають червоно-фіолетовий колір.

Поліфосфатні гранули трапляються у багатьох мікроорганізмів – азотобактерій, сінної палички, у клітинах молочнокислих бактерій і дріжджів, а також у деяких патогенів – збудників дифтерії, сибірки. Причому, у бактерій гранули розташовані в цитоплазмі, зазвичай у центрі клітини, а в клітинах дріжджів – у вакуолях. Запасні полісахариди – джерело енергії, у клітинах мікроорганізмів можуть накопичуватися у вигляді зерен крохмалю

(ціанобактерії), гранульози – крохмалоподібної речовини (анаеробні спороутворювальні палички), або глікогену (бацили, дріжджі, ентеробактерії).

Тваринний крохмаль, глікоген, у клітинах прокариот накопичується у вигляді гранул сферичної форми до 100 нм у діаметрі.

Жироподібні речовини – джерело вуглецю та енергії, утворюються в клітинах у результаті жирового переродження цитоплазми під час старіння культури або у разі вирощування культури в умовах надлишку вуглецю та дефіциту азоту. Відкладаються в клітинах у вигляді гранул діаметром до 1 мкм, являють собою краплі полі- β -оксимасляної кислоти, оточені білковою мембраною і трапляються виключно у прокариотних організмів.

Окрім гранул полі- β -оксимасляної кислоти в клітинах мікроорганізмів можуть відкладатися ліпіди у вигляді воску (складні ефіри жирних кислот і спиртів), це притаманно дріжджам, нокардіям та іншим актинобактеріям.

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

Забарвлення спор за методом Пешкова

Хід роботи

1. На фіксований мазок культури спороутворювальної бактерії *Bacillus subtilis*, *Clostridium sp.* нанести достатню кількість синьки Леффлера та довести барвник до кипіння у полум'ї пальника, при цьому предметне скло спочатку прогривають над полум'ям по всій довжині, а потім затримують на кілька секунд над полум'ям так, щоб воно торкалося скла. Якщо скло було достатньо прогрітим, барвник закипає за 10–15 сек. У разі, коли скло було перегріте, барвник не кипить, а випаровується, при цьому скло не слід тримати в полум'ї більше 10 сек. Після нагрівання скло не кладуть на холодні предмети, щоб

запобігти його розтріскуванню.

2. Препарат ретельно промити водою тільки після охолодження скла.

3. Вологий препарат дофарбувати барвником нейтральрот протягом 2–3 хв.

4. Препарат промити водою та висушити фільтрувальним папером. Після такого способу забарвлення спори фарбуються в синьо-блакитний колір, а вегетативні клітини – у рожевий.

5. Під мікроскопом (імерсійна система) у полі зору знайти окремі спори, вегетативні клітини та спори в середині вегетативних клітин.

Забарвлення волютину

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Rhodotorula sp.*, висушити та зафіксувати в полум'ї пальника.

2. На фіксований мазок нанести синьку Леффлера на 5–6 хв.

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

4. Знайти в полі зору овальні клітини, у яких цитоплазма забарвлена в бузково-блакитний колір, а зерна волютину – у червоно-фіолетовий.

Забарвлення глікогену

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Bacillus subtilis* і висушити при кімнатній температурі.

2. Мазок зафіксувати 96 % етиловим спиртом, для цього на сухий мазок нанести кілька крапель спирту та дочекатися повного його випаровування.

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

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

Забарвлення жирів

Хід роботи

1. На предметне скло нанести невелику краплю рідкої культури *Saccharomyces cerevisiae*, яка була вирощена в умовах надлишку вуглецю.
2. Додати краплю барвника судан III і перемішати бактеріальною петлею.
3. Краплю накрити покривним склом і через 10–15 хв мікроскопіювати з імерсією.
4. Знайти в полі зору кулясті клітини, у яких цитоплазма безбарвна, а овальні тільця ліпідів набули оранжево-червоного кольору.

Забарвлення білкових кристалів

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Bacillus thuringiensis* і зафіксувати у полум'ї пальника.
2. Зафіксований мазок забарвити фуксином протягом 2–3 хв.
3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.

Завдання до теми

1. Зробити схематичні малюнки з позначенням спор і вегетативних клітин.
2. Зробити схематичний малюнок з позначенням зерен волютину.
3. Зробити схематичний малюнок з позначенням гранул глікогену.
4. Зробити схематичний малюнок з позначенням жирових включень.
5. Зробити схематичний малюнок з позначенням параспоральних тілець.

Контрольні питання

1. Чим відрізняються спори бактерій від спор еукаріот?
2. Назвіть етапи спороутворення у бактерій.
3. Що належить до внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів?

Література: [3, с. 41–44; 6, с. 22–23; 8, с. 48–54; 9, с. 16–18; 12, с. 44–45].

Лабораторна робота № 7

Тема. Мікрофлора тіла людини

Мета: ознайомлення із мікрофлорою шкіри людини методом відбитків і змивів, вивчення культурально-морфологічних ознак бактерій.

Обладнання та реактиви: живильне середовище МПА, водяна баня, чашки Петрі, термостат.

Навчальні елементи: нормальна мікрофлора людини, автохтонна й алохтонна мікрофлора, біоплівки.

Короткі теоретичні відомості

На поверхні шкіри людини, на слизистих оболонках, у відкритих порожнинах людини мешкає понад 10¹³ 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 таким чином 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 належать різні коки – *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. intermedius*, а також бревібактерії, коринебактерії та дифтероїди. Окрім того, на поверхні шкіри можна знайти аеробні спороутворювальні палички (*p. 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.

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, 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 при температурі 36° С, а потім – іще 2–3 доби витримують при кімнатній температурі. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

Дослідження культурально-морфологічних ознак бактерій

Морфологічні ознаки

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

Культуральні ознаки.

До них 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 МБС-9.

Форма колоній – округла, ризоїдна, амебоїдна, нитковидна, складчаста, концентрична, неправильна.

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

Колір колоній і колір оточуючого агару – 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 колоній – гладенька, шершава, складчаста, бугриста.

Профіль колонії – плоский; випуклий; кратеровидний; той, що вростає в агар; бугристий; краплевидний; конусовидний.

Край колонії – гладенький, хвилястий, зубчастий, лопатний, неправильний, війчастий, нитчастий, гілчастий.

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

Хід роботи

1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище МПА.
2. Із додержанням стерильності приблизно 10 мл охолодженого до 40–45° С МПА внести у чашку Петрі та залишити до повного застигання.
3. Із додержанням стерильності легко притиснути палець до поверхні агарової пластинки у чашці Петрі.
4. Засіяні таким чином чашки Петрі поставити у термостат при температурі 35–36° С.
5. На наступному лабораторному занятті дослідити культурально-морфологічні ознаки колоній мікроорганізмів, які виростили у чашках Петрі.

Завдання до теми

1. За допомогою мікроскопу МБС-9 визначити культуральні ознаки обраної колонії мікроорганізму.
2. За допомогою шкали кольорів визначити колір колонії.
3. Виготовити мазки мікроорганізмів і забарвити за Грамом і методом Пешкова.
4. Результати визначення культуральних ознак колоній мікроорганізмів і їх морфології занести до лабораторного журналу.

Контрольні питання

1. Чим відрізняється «метод відбитків» від «методу змивів» дослідження мікрофлори шкіри людини?
2. Назвіть культуральні ознаки мікроорганізмів.
3. Які ознаки бактерій належать до морфологічних?

Літератур а: [5, с. 56–57; 7, с. 18–23; 8, с. 35–37; 10, с. 76–78].

2 КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ

A 90–100 відмінно (зараховано)

Відповідь чітка, структурована, логічна; включає у себе узагальнення та систематизовані поняття; побудована на основі матеріалів лекцій, кількох підручників; аргументоване посилання на додаткові наукові джерела (атласи, схеми), спеціальну літературу, власні наукові доробки, володіння латиною, наведення прикладів, порівняльний аналіз.

BC 75–89 добре (зараховано)

Відповідь логічна, чітка, структурована; глибоке розуміння матеріалу, яке включає у себе узагальнення та систематизацію понять; побудована на основі лекцій та кількох підручників.

DE 60–79 задовільно (зараховано)

Відповідь послідовна, чітка, структурована; роз'яснення переважної більшості понять; глибоке пояснення позицій; використання лекційного матеріалу та одного підручника.

FX 35–59 незадовільно (з можливістю повторного складання)

не зараховано

Послідовне, але не повне відтворення матеріалу; відповідь не достатньо структурована; роз'яснювання більшості позицій; знання 1/3 латинських термінів латиною.

F 0–34 незадовільно (з обов'язковим повторним вивченням курсу)

не зараховано

Виступ поверхневий, базується на основі прочитаної лекції; відповідь хаотична, фрагментарна; відтворення заученого матеріалу без усвідомлення його суті. Відповідь не послідовна, безструктурна; розуміння і розкриття тільки окремих понять; без латинських термінів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна література

1. Лысак В. В. Микробиология : учеб. пособие для студентов биологических специальностей / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 320 с.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва : Мир, 2002. – 244 с.
3. Козлова І. П. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти : навч. посібник / І. П. Козлова. – Київ : Наук. думка, 2008. – 435 с.
4. Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты / Е. Н. Кондратьева. – Москва : изд-во МГУ, 1996. – 312 с.
5. Нетрусов А. И. Общая микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – Москва : Academia, 2007. – 340 с.
6. Современная микробиология / Под ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – Москва : Мир, 2005. – 270 с.
7. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. Унив. Изд-во, 2004. – 178 с.
8. Экология микроорганизмов / Под ред. А. И. Нетрусова. – Москва : Изд. центр «Академия», 2004. – 243 с.

Додаткова література

9. Андреюк Е. И. Основы экологии почвенных микроорганизмов / Е. И. Андреюк, Е. В. Валагурова. – Київ : Наук. думка, 1992. – 170 с.
10. Антипчук А. Ф. Водна мікробіологія / А. Ф. Антипчук, І. Ю. Кіреєва. – Київ : Нац. Аграрн. Ун-т, 2003. – 205 с.
11. Гусев М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – Москва : Academia, 2007. – 197 с.
12. Кожевин П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин. – Москва : Изд-во МГУ, 1985. – 105 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни
«Загальна мікробіологія і вірусологія» для студентів денної форми навчання
за напрямом 6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі: к.т.н., доц. А. В. Пасенко
старш. викл. О. О. Никифорова

Відповідальний за випуск заст. зав. кафедри к.х.н., доц. О. В. Новохатько

Підп. до др. _____ 2016 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.
Ум. друк. арк. _____. Наклад _____ прим. Зам. № _____. Безкоштовно.

Видавничий відділ
Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600