

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 II)

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.....	6
Лабораторна робота № 1	6
Лабораторна робота № 2	13
Лабораторна робота № 3	16
Лабораторна робота № 4	20
Лабораторна робота № 5	23
Лабораторна робота № 6	26
Лабораторна робота № 7	29
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	58
Список літератури.....	60

ВСТУП

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

Метою проведення даних 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 даних груп організмів, з умовами їх культивування; отримання і закріплення навичок виділення чистих культур мікроорганізмів з різних екосистем.

Під час виконання лабораторних робіт **студенти повинні володіти** лекційним матеріалом; знати будову, морфологічні особливості, умови життєдіяльності різних груп мікроорганізмів; екологічну роль 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 при роботі з хімічними речовинами», «Правила зберігання та роботи зі світлопольним мікроскопом», «Підготовка мікроскопу до роботи», «Правила роботи з електроприладами», «Правила протипожежної безпеки», «Перша допомога при нещасних випадках», список рекомендованої літератури.

1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1–2

Тема. Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів в штучних екосистемах.

Мета: Ознайомитися з потребами мікроорганізмів в живильних речовинах, принципами і методами приготування живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви : МПА, МПБ, вихідні продукти і матеріали для приготування середовищ, реактиви для приготування середовищ, електроплитка, технічні (аналітичні) ваги, автоклав, апарат Коха, колби термостійкі з ватно-марлевими пробками, чашки Петрі, індикаторний папір на рН, скляні палички, яечний білок, штативи, пробірки з ватно-марлевими пробками, спиртівка, сухий спирт, посуд, фільтрувальний папір, водопровідна вода, дистильована вода.

Навчальні елементи : фактор росту, живильне середовище,

Короткі теоретичні відомості

Для забезпечення своєї життєдіяльності мікроорганізми у процесі живлення використовують органічні та неорганічні сполуки, до складу яких входять наступні групи хімічних елементів:

макроелементи – С, N, H, P, O, S, Ca, Mg , K, Fe (мікроорганізми їх потребують у достатньо великих кількостях);

мікроелементи – Zn, Mn, Co, Mo, B, Cu, I (достатньо присутності слідів цих елементів).

Крім цього, мікроорганізми потребують присутності невеликої кількості органічних речовин – *факторів росту*.

Згідно з потребами живлення мікроорганізмів створюють живильні середовища для їх культивування у лабораторних умовах.

Живильне середовище – це набір органічних та мінеральних речовин, який забезпечує ріст та розвиток мікроорганізмів.

Правильний підбір складу живильного середовища забезпечує можливість виділення чистих культур мікроорганізмів з природних екосистем, вивчення їх морфологічних та фізіологічних властивостей, сприяє швидкому та правильному діагностуванню інфекційних захворювань, надає можливість одержувати накопичувати біомасу мікроорганізмів, корисних для господарської діяльності.

Вимоги до живильних середовищ :

1. Мають містити усі необхідні для мікроорганізмів поживні речовини.
2. Повинні бути уніфікованими, тобто містити окремі інгредієнти в означених співвідношеннях.
3. Мати достатню вологість, бо мікроби живляться за законами осмосу та дифузії (для грибів – 12 % вологи, для бактерій – не менш 20 %).
4. Мати реакцію рН (кислотність), оптимальну для вирощування даного виду мікроорганізмів (для більшості бактерій оптимум рН 7,0–8,0, для пліснявих грибів та дріжджів – рН 4,5–6,8).
5. Бути ізотонічними (осмотичний тиск в середовищі повинен бути таким, як у мікробній клітині).
6. Мати окисно-відновний потенціал, оптимальний для вирощування даного виду мікроорганізмів.
7. Бути стерильними, забезпечуючи тим самим можливість вирощувати чисті культури мікроорганізмів.

Класифікація живильних середовищ за походженням:

1. **Натуральні (природні)** – середовища, які містять речовини тваринного та рослинного походження, мають складний хімічний склад (молоко, яйця, овочі або природний субстрат – звернута сироватка, жовч тощо).
2. **Синтетичні** – середовища, які містять тільки зазначені хімічно чисті сполуки у точно визначених концентраціях.

3. *Напівсинтетичні (штучні)* – містять суміш хімічно чистих сполук та речовини тваринного й рослинного походження.

Класифікація живильних середовищ за призначенням:

1. *Основні* (звичайні) – середовища загального призначення, на яких вирощують більшу кількість видів мікроорганізмів (бобово-пептонний та м'ясо-пептонний агар та ін.).

2. *Спеціальні* – середовища, призначені для вирощування окремих груп мікроорганізмів, які не розвиваються на основних середовищах (середовище Омелянського – для виділення збудників аеробного розкладу клітковини, середовище Чапека – для культивування грибів та ін.).

3. *Елективні* – спеціальні середовища, які вибірково забезпечують оптимальні умови для переважного розвитку одного виду, або групи споріднених мікроорганізмів; інші організми або зовсім не ростуть на таких середовищах, або їх розвиток сильно затримується (середовище С. М. Виноградського для вирощування ґрунтових мікроорганізмів).

4. *Диференційно-діагностичні* – середовища, призначені для ідентифікації окремих видів мікроорганізмів за особливостями обміну речовин клітин цих бактерій. Застосовують для вивчення біохімічних властивостей мікробів та виділення чистих культур. Вони дозволяють виявити ензими, що виділяють мікроби, одні з яких розщеплюють у різному ступені білки та вуглеводи, а інші здійснюють реакції окислення та відновлення (рідкі середовища Гісса з вуглеводами, щільні середовища з індикаторами – Ендо, Левіна, Плоскірева та інші).

5. *Консервуючі* – середовища, призначені для первинного посіву та транспортування дослідного матеріалу.

Класифікація живильних середовищ за консистенцією:

1. *Рідкі*. Складаються з води та розчинених у ній речовин (м'ясна вода, м'ясо-пептонний бульйон, бобово-пептонний бульйон та ін.).

2. *Сипкі* (розварене пшоно, висівки та ін.).

3. **Тверді** (м'ясо-пептонний агар та ін.). Поживні середовища готують додаванням до рідкого середовища ущільнюючих речовин – желатину (10–15 %), агар-агару (1–2 %).

4. **Напіврідкі**. Середовища містять ті ж самі ущільнюючі речовини але в меншій кількості.

Класифікація живильних середовищ за складом:

1. **Прості**.

2. **Складні**.

Етапи приготування живильних середовищ:

1. Варка.

2. Встановлення рН.

3. Освітлювання.

4. Фільтрація.

5. Розлив.

6. Стерилізація.

7. Контроль, до складу якого надходять:

– контроль стерильності;

– хімічний контроль;

– біологічний контроль.

Методи стерилізації посуду та живильних середовищ:

1. Стерилізація під дією високих температур:

– стерилізація пропалюванням в полум'ї горілки;

– стерилізація кип'ятінням;

– стерилізація сухим жаром (в сушильних шафах);

– стерилізація вологим жаром (дробова стерилізація, або тиндалізація);

проводять в апараті Коха чи автоклаві при відкритому випускному крані;

– пастеризація (неповна стерилізація);

– стерилізація в автоклаві парою під тиском (автоклавування).

2. Стерилізація фільтруванням (холодна стерилізація).

3. Стерилізація опромінюванням.

4. Хімічна стерилізація (дезінфекція).

Розлив живильних середовищ.

Живильні середовища готують звичайно у колбах великого об'єму. Перед роботою середовища розливають у стерильні пробірки, колби, матраци або чашки Петрі в залежності від призначення. Агар зручно розплавляти в автоклаві з відкритим вентиляем, або на водяній бані. Желатина легко плавиться при нагріванні на водяній бані до 25–30° С.

Після розплавлення середовища розливають у посуд необхідного об'єму, додержуючись вимог стерильності (біля полум'я в радіусі 10–15 см від його центру).

Живильні середовища розливають безпосередньо із колб та бутлів або за допомогою піпеток, бюреток і інших приборів.

Під час розливу в чашки Петрі живильне середовище наливають у кількості 15–20 мл (шаром 0,25–0,3 см), а у пробірки – шаром не більш, ніж на 1/3 пробірки.

Чашки Петрі після застигання агару ставлять догори дном, щоб конденсаційна вода із внутрішньої сторони кришки не стікала на поверхню живильного середовища і не заважала отриманню ізольованих колоній мікроорганізмів.

Для одержання прямого («стовпчика») агару, або желатини пробірки ставлять у штатив, а для отримання косоного агару («скошеної поверхні» середовища) пробірки кладуть похило на підставку (під кутом 20°), але так, щоб стовпчик середовища внизу пробірки був не менш 1 см, а верхній кінець косяка закінчувався за 3–4 см до пробки.

Хід роботи

1. Приготування м'ясної води (МВ) і м'ясо-пептонного бульйону (МПБ).

Свіже ялове м'ясо, без кісток. Сухожилля та жиру (50 г), нарізають невеликими шматочками, заливають 100 мл водопровідної води і поміщають в термостат з температурою 37° С на 2 год, або в холодильник на 24 год – для

екстрагування з м'яса різних поживних речовин. Потім настій кип'ятять 5–7 хв до посвітління (40–60 хв без попереднього відстоювання-екстрагування), охолоджують при кімнатній температурі, віджимають через марлю, додають води до первісного об'єму. До розчину додають 1 % пептону, 0,5 % NaCl і отримують м'ясо-пептонний бульйон. Встановлюють рН середовища 7,6–7,8, фільтрують через ватяний або паперовий фільтр. Потім МПБ стерилізують в автоклаві при 120° С, 1 атм., 30 хв.

2. Приготування м'ясо-пептонного агару (МПА).

Для приготування м'ясо-пептонного агара до 100 мл МПБ додають 2–3 % агар-агару (1–2–3 г). Агар в середовищі розплавляють в апараті Коха, встановлюють рН 7,6. Потім середовище освітлюють збитим яєчним білком, фільтрують в апараті Коха, розливають у посуд і стерилізують в автоклаві при 120° С, 1 атм., 30 хв. Після охолодження середовище застигає і стає щільним.

3. Приготування м'ясо-пептонної желатини (МПЖ).

До 100 мл МПБ додають 10 % (взимку) і 15 % (літом) желатини (6–10–15 г), розплавляють на водяній бані, доводять рН до 7,6, освітлюють збитим яєчним білком, фільтрують через зволожений паперовий фільтр, розливають у посуд і стерилізують протягом 3 днів при 100° С по 30 хв методом тиндалізації.

4. Приготування молока як живильного середовища.

Збиране молоко розводять на 2/3 водою, фільтрують, розливають по пробірках, закривають ватяними пробками і стерилізують методом тиндалізації в апараті Коха 3 дні по 30 хв. Для визначення утворення мікроорганізмами кислоти у молоко перед стерилізацією можна додати невелику кількість 5 % настойки лакмусу. Тоді утворення кислоти буде визначатися не тільки скипанням молока, але й почервонінням середовища.

5. Приготування рослинного середовища (РС).

Непошкоджену картоплю ретельно миють, чистять. Знову миють і опускають на 2–3 год в 1 % розчин соди для нейтралізації кислот. Із бульб нарізають скибки товщиною 2 мм, натирають крейдою і кладуть в чашки Петрі,

на дно якої поміщають фільтрувальний папір. Підписують і стерилізують 30 хв., 1 атм.

6. Приготування картопляної води (КВ).

20 г натертої картоплі заливають 1 л водопровідної води і кип'ятять 10 хв. Відвар фільтрують через паперовий фільтр або вату, стерилізують 30 хв., 1 атм. в автоклаві. Із картопляної води можна приготувати тверде середовище, додаючи до відвару 10–15 % желатин (або 2 % агар-агар); середовище кип'ятять, визначають рН і стерилізують в автоклаві 30 хв., 1 атм.

7. Приготування агару з ґрунту (ГА).

Із ґрунту видаляють рослинні рештки. Шматочки скла, каміння, інші домішки. Ґрунт перетирають у ступці і просіюють через сито з діаметром отворів 1 мм. Ґрунт поміщають у колбу або пробірку. Доливають дистильованої води (1:5). Суспензію перемішують на качалці 5–10 хв., потім додають 1,5–2 % агар-агару або 10–15 % желатин. Стерилізують при 120° С 1 год. Стерилізацію повторюють через 1–2 доби.

8. Бобовий відвар.

Це гарний поживний субстрат для розвитку бактерій ґрунту, зазвичай гнильної мікрофлори та пліснявих грибів. Для його приготування насіння бобових (гороху, квасолі, бобів) заливають чотирикратною кількістю води та кип'ятять протягом 1 год. чи прогрівають в автоклаві при 0,5 атм. Протягом 20 хв. Відвар фільтрують через вату чи фільтрувальний папір, визначають та встановлюють необхідну рН, додають 1% цукор, розливають по пробірках та стерилізують при 1 атм. протягом 30 хв.

9. Сінні відвари.

10 г сухого високоякісного, краще бобового сіна кип'ятять в 1 л водопровідної води протягом 30 хв. Отриманий відвар фільтрують, визначають та встановлюють рН, додають необхідні солі (краще K_2HPO_4) та цукор (1 %), розливають по пробірках та стерилізують в автоклаві при 0,5 атм. протягом 30 хв.

10. Приготування середовища Чапека.

Середовище Чапека (на 1 л дистильованої води):

NaNO ₃	– 2,0 г
KH ₂ PO ₄	– 1,0 г
KCl	– 0,5 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	– 0,1 г
FeSO ₄ x 7H ₂ O	– 0,1 г
Сахароза	– 30,0 г

11. Приготування середовища Ешбі.

Середовище Ешбі (на 1 л водопровідної води):

K ₂ HPO ₄	– 0,2 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	– 0,2 г
NaCl	– 0,2 г
K ₂ SO ₄	– 0,1 г
CaCO ₃	– 5,0 г
Маніт	– 20,0 г

12. Приготування середовища для *Azotobacter*, рН – 7,3–7,6 (на 1 л дистильованої води):

K ₂ HPO ₄	– 0,5 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	– 0,2 г
FeSO ₄ x 7H ₂ O	– 0,1 г
Маніт	– 20,0 г

Завдання до теми

1. Ознайомитися з потребами мікроорганізмів у живильних речовинах.
2. Ознайомитися з класифікацією та вимогами до живильних середовищ.
3. Приготувати живильні середовища для культивування мікроорганізмів і розлити їх у пробірки й чашки Петрі.
4. Замалювати способи розливу агаризованого живильного середовища (МПА) у пробірки і чашки Петрі.

Контрольні питання

1. Назвати особливості живлення мікроорганізмів.
2. Дати визначення поняттю «живильне середовище» для мікроорганізмів.
3. Яким вимогам повинні відповідати живильні середовища?
4. Які середовища називають ізотонічними, уніфікованими?
5. Які існують середовища за походженням?
6. Привести класифікацію середовищ за призначенням.
7. Які середовища називають елективними?
8. Як розрізняють середовища за консистенцією?
9. Які існують середовища за складом?
10. Назвати основні етапи приготування живильних середовищ.
11. Способи фільтрування живильних середовищ після освітлення.
12. Назвати методи стерилізації різних середовищ.
13. Як зберігають живильні середовища?
14. Назвати умови та способи розливу середовищ у різний посуд.

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

Лабораторна робота № 3–4

Тема. Посів мікроорганізмів на живильні середовища.

Мета: Оволодіти технікою різних видів посівів мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви : термостат, електроплитка, культура бактерій (колонії на агаризованому середовищі; суспензія бактерій), стерильні чашки Петрі, пробірки, стерильні живильні середовища (МПА, МПБ), бактеріологічні петлі, бактеріологічні голки, шпатель Дригальського, стерильні піпетки, гумова груша, стерильні ватні тампони, пінцет, спиртівка, спирт, штатив, піддон, склограф, дезінфікуючий розчин.

Навчальні елементи :

Короткі теоретичні відомості

Посівом (або інокуляцією) називають внесення клітин мікроорганізмів у стерильне середовище. Спосіб посіву на живильне середовище залежить від:

- консистенції середовища;
- якості посівного матеріалу;
- мети дослідження.

Усі способи посіву включають обов'язкову умову – **стерильність**. Мікроорганізми висівають на живильні середовища у спеціально обладнаних боксах біля полум'я пальника спиртівки (відстань у 10 см від полум'я пальника є стерильною зоною). Перед посівом бокс стерилізують за допомогою бактерицидних ламп. Працювати необхідно швидко, без зайвих рухів, щоб уникнути коливань та руху повітря. Під час посівів не дозволяється розмовляти.

Перед посівом необхідно написати на пробірці, колбі, чашці Петрі назву мікроорганізму і дату посіву.

Посів мікробного матеріалу проводять наступними інструментами: бактеріологічною голкою, бактеріологічною петлею, піпеткою, ватним тампоном, шпателем Дригальського. При висіві бактеріальної суспензії петлею рідина повинна зтягнути петлю тонкою плівкою. Піпеткою користуються в тому випадку, коли матеріал засівають у великій кількості або у визначеному об'ємі. Якщо досліджуваний матеріал розподіляється в рідині нерівномірно у вигляді плівки або осаду, то для пересівання використовують частину плівки або осаду.

Хід роботи

1. Посів із пробірки в пробірку на скошену поверхню агару бактеріологічною петлею.

Пробірку з посівним матеріалом і пробірку із стерильним середовищем тримають у лівій руці паралельно одна одній в похилому положенні пробками у напрямку до полум'я пальника. При цьому повинна бути добре видна поверхня середовища, яка засівається, і поверхня середовища з мікроорганізмами. Як правило, пробірку з посівним матеріалом тримають ближче до себе.

Трьома пальцями правої руки (великим, вказівним і середнім) беруть бактеріологічну петлю, тримаючи її як олівець, і стерилізують у полум'ї пальника. Для цього петлетримач злегка обпалюють, проводячи через полум'я пальника, а дріт петлі нагрівають до червоності. Петлю варто тримати в полум'ї пальника вертикально, щоб дріт швидко і рівномірно розжарювався.

Тримаючи петлю у правій руці, мізинцем правої руки і краєм долоні правої руки одночасно виймають обидві пробки з двох пробірок і обпалюють їх кінці в полум'ї пальника, а також горлечка пробірок обпалюють у полум'ї пальника. Після стерилізації петлю вводять у пробірку з мікроорганізмами й охолоджують (щоб не викликати загибель клітин), занурюючи її в конденсаційну воду, або торкаючись нею до поверхні живильного середовища. Охолоджена петля не повинна викликати розплавлювання середовища. Охолодженою петлею знімають із твердого середовища невелику кількість клітин, а з рідкого середовища – кількість клітин, які утворюють плівку на петлі, і вносять у пробірку з стерильним живильним середовищем, не торкаючись стінок і країв пробірки. Після посіву обпалюють горлечко пробірки і пробку в полум'ї пальника і закривають пробірку.

Клітини мікроорганізмів, які залишилися на петлі після пересівання, спалюють. Для цього прожарюють петлю спочатку на ділянці дроту, що примикає до петлетримача, щоб підсохла мікробна маса, після чого петлю у вертикальному положенні прожарюють до почервоніння. При швидкому прогріві всієї петлі відбувається розбризкування мікробних кліток, що призводить до забруднення повітря.

2. Посів у рідке живильне середовище.

Бактеріологічну петлю з посівним матеріалом занурюють у чисте живильне середовище або матеріал, розтирають на стінці судини (над рідиною), а потім змивають рідким середовищем, струшуючи злегка пробірки. При посіві стежити, щоб середовище не вилилося і не замочило пробку (пробірки тримати майже вертикально).

Пересівання з рідкого середовища в рідке можна проводити стерильною градуйованою або пастерівською піпеткою. При посіві градуйованою піпеткою її звільняють від обгортки і правою рукою проводять через полум'я газового пальника, опускають у пробірку з культурою мікроорганізмів і набирають визначену кількість посівного матеріалу. Після пересівання використані піпетки поміщають у дезінфікуючий розчин.

3. Посів бактеріологічною голкою в стовпчик агаризованого середовища.

Бактеріологічною голкою з посівним матеріалом проколюють стовпчик живильного середовища по центру – роблять так званий посів «уколом». (Застосовується для вирощування анаеробів, для вивчення фізіологічних властивостей бактерій, для тривалого збереження культур.)

4. Посів бактеріологічною петлею на поверхню твердого живильного середовища у чашки Петрі.

Невелику кількість посівного матеріалу втирають петлею в поверхню середовища біля краю чашки, кілька разів проводячи петлею із сторони в сторону. Потім на тій ділянці, де закінчилися штрихи, агар проколюють петлею, знімаючи надлишок посівного матеріалу. Посівний матеріал, який залишився на петлі, зигзагоподібними рухами розподіляють по всій поверхні середовища (так званий посів «штрихом»).

У процесі посіву чашку тримають в лівій руці, підтримуючи її дно середнім і безіменним пальцями. Кришку фіксують великим і вказівним пальцями і відкривають її в сторону полум'я пальника настільки, щоб в отвір, який утворився, можна було ввести петлю.

5. Посів бактеріологічною петлею на агар у чашки Петрі по секторах.

Чашку Петрі із сторони дна розкреслюють на сектори. Посів проводять зигзагоподібними рухами від краю чашки до центра. Необхідно стежити, щоб штрихи не заходили на сусідній сектор.

6. Посів ватним тампоном на агаризоване середовище в чашки Петрі.

Тампон з посівним матеріалом вносять у злегка відкриту чашку і круговими рухами втирають його вміст у поверхню середовища, обертаючи при цьому тампон і чашку. Після цього тампон обов'язково знезаражують.

7. Посів газом на агаризованну середовище в чашки Петрі.

Для того, щоб одержати велику кількість мікроорганізмів, проводять суцільний посів газом за допомогою шпателя Дригальського. Для цього посівний матеріал за допомогою бак. петлі (або визначений об'єм рідкої культури стерильною піпеткою) наносять на поверхню живильного середовища біля краю чашки або в її центрі і ретельно розподіляють (розтирають) по поверхні агару шпателем. Надлишок культури видаляють, відсмоктуючи піпеткою в дезінфікуючий розчин.

8. Посів у товщу агаризованого живильного середовища в чашки Петрі.

Посівний матеріал (бактеріальну суспензію) у кількості 0,1–1 мл стерильною піпеткою вносять у стерильну порожню чашку Петрі і заливають 10–20 мл розплавленого, охолодженого до 45–55° С агару. Для перемішування вмісту чашки (мікробних клітин із середовищем) її злегка погойдують і обертають.

Можна попередньо змішати у стерильній пробірці щільне живильне середовище, розплавлене й охолоджене з невеликою кількістю посівного матеріалу, а потім швидко вилити вміст пробірки в чашку Петрі.

Чашки залишають на столі до застигання середовища. Засіяні чашки поміщають у термостат дном угору (щоб утворена конденсаційна вода не заливала посів).

Загальний принцип посіву мікроорганізмів на тверді живильні середовища полягає в максимальному використанні території поверхні щільного живильного середовища.

Вимоги, яких необхідно суворо дотримуватися при посіві мікроорганізмів.

Дотримуватися суворої стерильності:

а) посів робити біля палаючої спиртівки;

б) ретельно стерилізувати в полум'ї бактеріологічну петлю, краї пробірки, ватно-марлеву пробку в момент відкривання і закривання пробірки пробкою;

в) при посіві пробірку тримати нахиленою, майже в горизонтальному положенні отвором до горілки;

г) чашки Петрі відкривати лише настільки, щоб в отвір під кришкою могли пройти бактеріологічна петля або піпетка;

д) при посіві не можна вставати з місця, ходити по кімнаті, розмовляти, кашляти, бо разом з пилом, краплями слини мікроби можуть потрапити і в пробірку (чашку);

е) найкраще посіви робити в спеціальних боксах.

9. Аналіз отриманих результатів.

Розглянути і проаналізувати характер росту культур мікроорганізмів, отриманих після проведення посівів вищевказаними методами. Замалювати ріст мікробів на поверхні твердого живильного середовища після посіву: шпателем Дригальського на агар у чашки Петрі, бактеріологічною петлею методом штриха у чашки Петрі, бактеріологічною петлею методом штриха на косий агар у пробірки.

Замалювати інструменти, які найчастіше використовують для посіву мікроорганізмів: бактеріологічну петлю, бактеріологічну голку, шпатель Дригальського).

Завдання до теми

1. Ознайомитися з методикою різних видів посіву мікроорганізмів на рідкі й тверді живильні середовища.

2. Оволодіти технікою користування різними інструментами для проведення посіву мікроорганізмів.

3. Провести посів мікроорганізмів на живильні середовища різними способами відповідно методики.

4. Замалювати характер росту мікробної культури на МПА після посіву «газоном» в чашки Петрі шпателем Дригальського, «штрихом» на чашки Петрі

і на косий агар в пробірки.

5. Замалювати основні інструменти, які використовують для посіву мікроорганізмів.

Контрольні питання

1. Дати визначення поняттю «посів» мікроорганізмів.
2. Назвати фактори, від яких залежить вибір способу посіву мікробів.
3. Основна умова проведення посіву мікроорганізмів.
4. Правила виконання посіву.
5. Перелічити основні інструменти, які використовують для посіву.
6. Викласти техніку стерилізації бактеріологічної петлі до і після посіву клітин.
7. Назвати способи посіву, які можуть бути використані для висіву анаеробів у різний посуд (пробірки, чашки Петрі).
8. Назвати основні способи посіву мікроорганізмів на тверде середовище в чашки Петрі.
9. Обґрунтувати характер отриманого росту мікроорганізмів на твердому середовищі після висіву методом «штриха» і посіву «газоном».
10. Проаналізувати характер росту посіяної культури мікроорганізмів в рідкому живильному середовищі.

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

Лабораторна робота № 5–6

Тема. Вивчення умов культивування та виділення чистих культур мікроорганізмів з природних екосистем.

Мета: оволодіти методикою отримання чистих культур аеробних мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви : кисле молоко, огірковий розсіл, МПА, МПБ, термостат, мікроскоп, імерсійне масло, предметні і покривні стекла, спиртівка, спирт, барвники, розчин йоду, чашки Петрі, пробірки з ватно-марлевими пробками, штативи, піпетки, гумова груша, бактеріологічна петля, дві скляні

палички, з'єднані гумовими трубочками, скляні палички, піддон, фільтрувальний папір, вата, склограф, дистильована вода

Навчальні елементи :

Короткі теоретичні відомості

I. Умови культивування мікроорганізмів.

Для успішного культивування мікроорганізмів, крім правильно підібраних живильних середовищ і правильно виконаного посіву, необхідно створення оптимальних умов: температури, вологості, освітлення, аерації. Як правило, оптимальні умови вдається підібрати, ретельно відтворюючи умови природної екосистеми.

1. Температура.

Відповідно за відношенням до температурного фактору мікроорганізми поділяють на:

- психрофіли – температурний оптимум нижче 20° С;
- мезофіли – температурний оптимум від 20° до 45° С;
- термофіли – температурний оптимум вище 45° С.

Термотолерантні – мікроорганізми, температурний оптимум яких відповідає середнім температурам, але вони здатні також витримувати і більш високі температури.

Оптимальну температуру для культивування більшості патогенних мікроорганізмів (37° С) забезпечують в термостаті. Чашки Петрі з посівами у термостат для культивування поміщають угору дном. Щоб не допустити охолодження культури, термостат не залишають надовго відкритим.

2. Вологість.

Життя мікроорганізмів неможливо без вологи – живильні речовини проникають в клітину тільки в розчиненій формі. Ці вимоги необхідно враховувати при культивуванні на твердих середовищах: розливати середовище в чашки і скошувати його в пробірках рекомендують саме в день посіву.

3. Освітлення.

Світло для переважної більшості мікроорганізмів не потрібне – їх культивують в темряві. Для вивчення пігментоутворення, яке відбувається найактивніше на розсіяному світлі, культури після культивування в термостаті витримують 2–3 доби при кімнатному освітленні. Освітлення необхідне для вирощування фототрофів. Можна їх виставляти на денне світло, але частіше використовують штучне освітлення.

4. Аерація.

За потребами у вільному кисні мікроорганізми поділяють на:

- облігатні аероби;
- облігатні анаероби;
- факультативні аероби і факультативні анаероби.

Використовують аерацію активну і пасивну.

6. Тривалість культивування.

Вона відрізняється для різних груп мікроорганізмів:

- гриби – при 28–30° С протягом 5–7 діб;
- актиноміцети – при 28–30° С 8–10 діб;
- більшість бактерій – досить 18–24, максимум 48 год інкубації.

Метод поверхневого культивування аеробів на твердих живильних середовищах (МПА) застосовують для виділення чистих культур, одержання колоній (з діагностичною метою), визначення антибіотичних властивостей.

Вирощування аеробів на рідких живильних середовищах частіше проводять з метою накопичення їх біомаси, або визначення впливу на них різних факторів середовища.

Для одержання чистих культур аеробів використовують і біологічний метод. Він ґрунтується на зараженні експериментальних тварин досліджуваним матеріалом, який містить мікробні асоціації. Напр., пневмококи можна виділити з мокротиння, заражаючи чуттєву до них білу мишу. Через 4 год в крові миші виявляють чисту культуру пневмококів, тому як вони випереджають розмноження інших мікроорганізмів

II. Чисті культури мікроорганізмів.

Етапи отримання чистих культур.

Чистою культурою називають популяцію мікроорганізмів, що складається з клітин мікроорганізмів одного виду. Прикладом чистої культури є популяція мікробів, яка виросла після посіву однієї клітини. На твердому живильному середовищі чистою культурою може бути колонія мікроорганізмів.

Колонія – це ізольована популяція, яка утворилася в результаті розмноження однієї клітини мікроорганізму.

Виділення чистих культур мікроорганізмів необхідно для вивчення їх морфолого-культуральних і фізіологічних властивостей, для визначення видової належності мікробів.

В процесі виділення чистої культури відмічають три етапи:

- а) одержують накопичувальну культуру мікроорганізмів;
- б) виділяють чисту культуру з накопичувальної;
- в) визначають чистоту виділеної культури.

Етап одержання накопичувальної культури не обов'язковий у тому випадку, якщо у середовищі виділення передбачається висока чисельність означеного виду мікроорганізмів.

1. Одержання накопичувальної культури.

Накопичувальними називають культури мікроорганізмів, в яких переважає яка-небудь означена група мікроорганізмів. Для одержання накопичувальних культур створюють умови, що сприяють переважному розвитку тих мікроорганізмів, які необхідно виділити. Такі умови називають виборчими, або *елективними*. Забезпечити елективні умови можна тільки у разі добре вивчених або відомих особливостей обміну речовин досліджуваного мікроорганізму. Створюють елективні умови:

- підбираючи особливий склад живильних середовищ;
- забезпечуючи відповідну температуру, рН, режим аерації, освітлення;
- додаючи в середовище речовини, які вибірково інгібують або стимулюють ріст тих чи інших мікробів.

Кращим матеріалом для одержання накопичувальних культур мікробів можуть бути проби з тих місць, де природні умови існування сприяють переважному розвитку досліджуваних мікроорганізмів.

Простежити розвиток накопичувальної культури можна візуально за появою характерних ознак:

– на рідкому середовищі – помутніння; поява плівки, осаду, пухирців газу; зміна забарвлення середовища внаслідок зміни рН під впливом продуктів метаболізму клітин мікробів;

– на твердому середовищі – утворення характерних колоній.

2. Виділення чистої культури мікроорганізмів з накопичувальної.

Виділення чистої культури проводять з отриманої накопичувальної культури або безпосередньо з досліджуваного матеріалу. Чиста культура – потомство однієї клітини, може бути отримана шляхом механічного роз'єднання клітин мікроорганізмів або методами, в яких використовують їх біологічні особливості.

а) Методи механічного роз'єднання мікроорганізмів.

Методом кінцевих (послідовних) розведень отримують чисті культури в рідких живильних середовищах. Для цього суміш мікроорганізмів послідовно розводять стерильним живильним середовищем і із кожного розведення проводять висів у декілька пробірок з тим же середовищем. Намагаються отримати і провести посів настільки розведеною суспензією мікробів, щоб у пробірках опинилося тільки по одній клітині, які дадуть потомство чистої культури. Цей метод використовують у разі чисельної переваги в змішаній популяції досліджуваного мікроорганізму.

Метод Р.Коха – виділення чистої культури з окремої, ізольованої колонії. Принцип методу полягає в розсіванні матеріалу (методом штриха) на поверхні твердого живильного середовища таким чином, щоб отримати висів одиничної клітини й одержати після її росту колонію чистої культури мікроорганізмів.

б) Методи, засновані на використанні біологічних особливостей мікроорганізмів.

Для вирощування анаеробних мікробів видаляють молекулярний кисень з живильного середовища і з оточуючого ці культури простору (кип'ятінням середовища). Також використовується температурний фактор. Для виділення чистих культур патогенних мікробів проводиться зараження чутливих до захворювання тварин.

3. Визначення чистоти виділеної культури.

Чистоту виділеної культури перевіряють декількома способами – візуально, мікроскопічним контролем та висівом на цілий ряд живильних середовищ.

а) Візуально вивчають культуральні властивості чистої культури, тобто перевіряють характер росту виділених мікроорганізмів на твердому або рідкому живильному середовищі.

На твердому середовищі на косому агарі чиста культура росте у вигляді однорідного штриха. На поверхні живильного середовища у чашках Петрі чиста культура утворює однакові за морфологією, консистенцією і пігментацією колонії. Колонії бувають:

- за розміром – краплинні (1 мм), дрібні (1–2 мм), середні (2–4 мм), крупні (4–6 мм і більше);
- за формою – правильно та неправильно округлі, ризоїдні, розеткоподібні;
- за кольором – безкольорові, пігментовані;
- за характером поверхні – гладкі, блискучі, матові, вологі, сухі, слизуваті, складчасті;
- за характером краю колонії – рівні, хвилясті, зубчасті, бахромчасті, зазубрені;
- за структурою колоній – гомогенні, зернисті, волокнисті, крихкуваті;
- за рел'єфом колоній – куполоподібні, конусоподібні, плоскі, кратероподібні;

- за консистенцією – в'язкі, тістоподібні, плівчасті;
- за оптичними властивостями – прозорі, матові, флуоресцюючі, непрозорі, блискучі.

На рідких живильних середовищах характер росту мікроорганізмів менш різноманітний в порівнянні з ростом на твердих середовищах:

- ріст з рівномірною каламутністю рідкого середовища притаманний для факультативних анаеробів;

- придонний ріст з утворенням осаду на дні посуду дають анаеробні мікроорганізми. Отриманий осад може бути густим або скудним, крихкоподібним, гомогенним, волокнистим або у вигляді крупних часток. Осад відрізняється за консистенцією, він може бути в'язким, слизуватим, крихким або пастоподібним;

- пристінний ріст притаманним для деяких бактерій та актиноміцетів. У цьому разі утворюються рихлі хлоп'я або компактні зерна, які прикріплюються до внутрішньої поверхні стінок посуду;

- поверхневим ростом відрізняються аеробні мікроорганізми. Вони утворюють плівку різної густини та консистенції. Плівка може бути ніжною та тонкою, що зникає при струшуванні пробірки (*Bac. subtilis*). Для грибів характерно утворення щільної, сухої, шкіряної плівки. Вона легко знімається цілком у вигляді круглого диску, відповідного діаметру посуду.

б) **Мікроскопічний контроль** складається з підготовки препарату фіксованих клітин, забарвлення за Грамом та дослідження його з імерсійною системою. Живі клітини розглядають за допомогою фазово-контрастного приладу. Чиста культура повинна бути морфологічно однорідною, припустимо лише незначне відхилення розмірів клітин. Виключення складають деякі мікроби, які характеризуються поліморфністю.

в) Після візуального та мікроскопічного контролю перевіряють чистоту отриманої культури **повторним висіванням її на різні середовища** (МПА, картопляний агар, сусло, синтетичні середовища) з ціллю виявлення супутніх мікроорганізмів, які відрізняються за фізіологічними ознаками. Підбір

середовищ та їх склад визначається особливостями обміну речовин отриманої чистої культури та її супутників, що підлягають вилученню.

Хід роботи

1. Отримання накопичувальної культури молочнокислих бактерій та її мікроскопічне дослідження.

Молочнокисле бродіння викликають молочнокислі бактерії, які за морфологічними властивостями поділяють на молочнокислі палички і молочнокислі стрептококи. Готують мазок із сироватки кислого молока, сушать, фіксують в полум'ї пальника. Жир знімають, накладаючи фільтрувальний папір на гарячий мазок. Мазок забарвлюють метиленовим синім (барвник добре забарвлює мікроби і слабо – казеїн молока). Забарвлені препарати вивчають під мікроскопом з використанням імерсії. Результати мікроскопування замальовують.

2. Отримання накопичувальної культури оцтовокислих бактерій та її мікроскопічне дослідження.

Збудники оцтовокислого бродіння – оцтовокислі палички. Їх легко виділити із шумуючих слабоалкогольних напоїв (пива, не кріпленого виноградного вина), огіркового розсолу. В ерленмейєрській колбу наливають тонким шаром 50 мл пива, підкислюють 5–10 мл столового оцту і залишають при 25–30° С. Через 2 доби на поверхні пива з'являється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій. Плівку досліджують мікроскопуванням. Для цього в краплю 1 % розчину йоду на предметне скло вносять шматочок плівки оцтовокислих бактерій, накривають препарат покривним склом і мікроскопують. Оболонка клітин оцтовокислих бактерій синіє під дією йоду. Посиніння плівки можна спостерігати простим оком, якщо в порцелянову чашку, у якій знаходиться шматок плівки, налити 1 % розчин йоду. Інші бактерії посиніння не дають і забарвлюються йодом у жовтий колір. Результати мікроскопування замальовують.

3. Виділення із накопичувальної культури чистої культури молочнокислих бактерій методом Р. Коха.

Посів культури молочнокислих бактерій (з кислого молока) на поверхню МПА, який містить 2 % цукру (глюкозу, лактози або сахарози), у чашку Петрі № 1 проводять методом штриха; потім без додаткового забору посівного матеріалу тією ж бактеріологічною петлею послідовно проводять посів на чашку № 2 і чашку № 3. Через 2–3 доби інкубації в термостаті при 30–37° С на агарі виростають дрібні колонії – поверхневі круглі, краплинні близько 1 мм у діаметрі; глибинні – у вигляді точок. На чашці № 1 відзначають суцільний ріст бактерій протягом всього штриха, на чашках № 2, № 3 – ріст ізольованих колоній.

4. Виділення чистої культури оцтовокислих бактерій із накопичувальної методом послідовних розведень за Пастером.

Сутність методу полягає в приготуванні серії 2-кратних розведень бактеріальної суспензії в пробірках з МПБ. Для роботи використовують стерильний посуд.

Вихідний матеріал – накопичувальну культуру оцтовокислих бактерій – огірковий розсіл, у кількості 1 мл, вносять мірною піпеткою в першу пробірку, яка містить 1 мл МПБ. Потім, ретельно перемішавши, з першої пробірки чистою стерильною піпеткою переносять 1 мл суміші в другу пробірку, із другої в третю і так до 10. Пробірки з посівами підписують і поміщають в термостат при 37° С. Через 2–3 доби інкубації пробірки з посівами перевіряють. З останньої пробірки, у якій спостерігається бактеріальний ріст (у вигляді плівки, осаду і т.п.), відбирають матеріал для мікроскопічного дослідження.

5. Вивчення культуральних властивостей отриманих чистих культур молочнокислих та оцтовокислих бактерій.

Описати характер росту чистих культур: оцтовокислих на рідкому середовищі, молочнокислих – на твердому живильному середовищі.

Кожний тип колоній, які виростили на агарі на останній за висівом чашці Петрі, описати за наведеною схемою:

Таблиця 6.1 – Властивості чистих культур бактерій.

Колонія	Форма	Розмір та діаметр, мм	Колір	Характер поверхні	Характер краю колонії	Консистенція	Морфологія мікробів
1	правильна	2 мм	жовтий	гладка	рівний	в'язка	коки (Гр+)
2	кругла	3 мм	без-кольоровий	шорохувата	хвилястий	крихковата	палички (Гр-)

Для опису краю та структури колоній чашки Петрі, не відкриваючи, поміщають на предметному столику мікроскопу дном уверх. Результати досліджень заносять в Таблицю 6.1.

6. Мікроскопічне дослідження виділених чистих культур мікроорганізмів.

Після опису культуральних властивостей виділених чистих культур проводять їх мікроскопічне дослідження. З цією метою з культуральної рідини чистої культури оцтовокислих бактерій (з останньої за висівом пробірки) та із частки раніше аналізованих колоній (2–3типів) молочнокислих бактерій (з останньої за висівом чашки Петрі) готують мазки, фіксують їх, забарвлюють по Граму і мікроскопують з використанням імерсійної системи. Морфологічна однорідність та своєрідне розташування бактерій у мазку буде свідчити про виділення бактерій у чистому виді. Якщо за морфологією вони відповідають тим, які були у суміші накопичувальних культур, то деяку кількість культуральної рідини оцтовокислих бактерій та частки вивчаємих колоній пересівають на косий агар для отримання чистих культур, виконуючи усі умови стерильності.

7. Пересів чистих культур на стерильні живильні середовища.

Під час пересіву колоній на косий агар необхідно бактеріологічною петлею брати культуру тільки із відміченої, раніше вивченої колонії, не торкаючи інші колонії. Засіяні пробірки підписують і ставлять у термостат на

24 год (48 год) при температурі 37° С.

Завдання до теми

1. Ознайомитися з вимогами мікроорганізмів до умов культивування. Оволодіти методикою виділення чистих культур мікробів.
2. Отримати накопичувальну культуру молочнокислих бактерій. Промікроскопувати бактерії. Замалювати результати мікроскопування.
3. Отримати та промікроскопувати накопичувальну культуру оцтовокислих бактерій. Замалювати результати мікроскопування.
4. Виділити чисті культури молочнокислих та оцтовокислих бактерій з накопичувальних культур, використовуючи метод послідовних розведень (за Пастером) і метод Коха.
5. Відпрацювати техніку перевірки (визначення) чистоти виділених чистих культур молочнокислих та оцтовокислих бактерій.
6. Результати вивчення культуральних властивостей мікроорганізмів (характер росту на середовищах) занести в таблицю. Замалювати результати мікроскопічного дослідження чистоти культур молочнокислих та оцтовокислих бактерій.

Контрольні питання

1. Перелічити основні умови, які необхідні для успішного культивування мікроорганізмів.
2. Назвати фізіологічні групи мікробів за температурним фактором.
3. Які групи мікроорганізмів виділяють за потребою в молекулярному кисні?
4. Пояснити сутність активної і пасивної аерації при культивуванні мікробів.
5. Обґрунтувати необхідність розливу живильних середовищ у день висіву мікроорганізмів.
6. Потреби різних груп мікроорганізмів в освітленні.
7. В якому апараті проводять вирощування мікробів?
8. Дати визначення «чистої» культури мікроорганізмів.

9. Назвати три етапи отримання чистої культури мікроорганізмів.
 10. Які культури називають «накопичувальними»?
 11. У яких випадках не проводять, пропускають етап отримання накопичувальної культури?
 12. Ознаки розвитку й росту накопичувальної культури у середовищі.
 13. Назвати дві групи методів виділення чистої культури мікробів із накопичувальної культури.
 14. Викласти сутність виділення чистої культури методом Коха.
 15. Викласти сутність виділення чистої культури методом кінцевих розведень.
 16. Назвати основні способи (етапи) визначення чистоти виділеної культури.
 17. Викласти сутність візуального дослідження чистоти виділеної культури.
 18. Дати визначення поняттю «колонія» мікроорганізмів.
 19. Критерії оцінювання і вивчення типу отриманих колоній на твердому середовищі.
 20. Сутність мікроскопічного контролю чистоти виділеної культури.
 21. Мета повторного висівання отриманої чистої культури на різні середовища.
 22. Застосування чистих культур мікроорганізмів.
- Література:** [1, с. 1–4; 2, с. 1–3; 3, с. 8–14; 4, с. 6–8; 5, с. 1–3].

Лабораторна робота № 7

Тема. Вивчення ролі мікроорганізмів у розкладу клітковини в природі.

Мета: Ознайомитися з процесом аеробного розкладу клітковини. Вивчити морфологію целлюлозоруйнуючих бактерій.

Обладнання та реактиви : мікроскоп МБИ-1, термостат, ґрунт, імерсійна олія, предметні стекла, бактеріологічна петля, спиртівка, спирт,

пінцет, лоток, скляний місток у ванночці для фарбування препаратів, колби плоскодонні (на 150–250 мл) з ватяно-марлевими пробками, піпетка, гумова груша, фільтрувальний папір, барвник (водяний розчин фуксину), дистильована вода, водопровідна вода, хімічні реактиви: NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaCl , CaCO_3 , FeSO_4 .

Навчальні елементи :

Короткі теоретичні відомості

Клітковина складає від 15 до 60 % сухої маси рослин. На поверхні ґрунту й особливо в його верхніх шарах величезна маса клітковини розкладається аеробним способом. Найбільше активно руйнують клітковину в аеробних умовах бактерії родів: *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Angiococcus*, *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sorangium*, *Polyangium* і ін. Крім бактерій в аеробному розкладанні клітковини беруть участь цвілеві гриби *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* і деякі актиноміцети роду *Streptomyces* і роду *Micromonospora*.

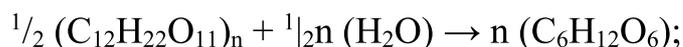
Трансформація мас клітковини йде в різних умовах аерації, при неоднаковій температурі і при різній рН середовища.

Процес аеробного руйнування клітковини починається з ферментативного гідролізу.

Під дією ферменту целлюлази, що виділяється мікроорганізмами, полісахарид клітковина (целлюлоза) гідролізується до целлобіози:

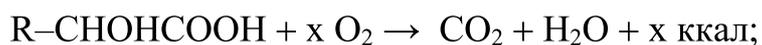


Далі целлобіоза під впливом ферменту целлобіази переходить у глюкозу:



Далі глюкоза в присутності кисню окисляється мікроорганізмами до органічних кислот (оксікислот), а потім до кінцевих продуктів – вуглекислого газу і води. Процес супроводжується виділенням великої кількості енергії:





Склад кінцевих продуктів може бути різним в залежності від виду мікроорганізму, що веде процес руйнування клітковини.

Рід *Cytophaga* представлений довгими паличкоподібними клітинами з загостреними кінцями, трохи вигнутими (2–10 мкм). У старій культурі з'являється багато нитковидних і кулястих інволюційних форм. Колонії жовтого, жовтогарячого, коричнево-бурого кольору, гладкі, слизуваті. Ці бактерії широко поширені в ґрунті.

Рід *Cellvibrio* представлений дрібними, злегка вигнутими паличками, рухливими (2–4 мкм). Колонії вохряно-жовті, зелені, слизуваті. Зустрічаються в ґрунті.

Рід *Cellfalcicula* має вид коротких товстих паличок, серпоподібно-вигнутих, із загостреними кінцями (2,0 x 0,7 мкм). Утворює слизуваті колонії зеленуватого, буро-палевого кольору. Виділяється з ґрунту.

Рід *Sorangium* у молодій культурі має вид порівняно товстих, злегка вигнутих паличкоподібних клітин із заокругленими кінцями (2–5 мкм). При старінні культури утворюються плодові тіла, що складаються з мікроцист. Паличкоподібні клітини коротшають, покриваються товстою оболонкою, набуваючи неправильні обриси. Колонії яскраво-жовтогарячого, фіолетового кольору. Легко виділяється з підзолистих лугових і окультурених ґрунтів, а також із кролячого і кінського гною.

Рід *Polyangium* представлений майже прямими паличкоподібними клітинами з заокругленими кінцями (3,5–8 мкм). При старінні формуються овальні мікроцисти, що з'єднуються в плодові тіла грушоподібної форми. Плодові тіла жовтого, жовтогарячого кольору, сидять безпосередньо на субстраті. Виділяється зі степових ґрунтів, заячого і кролячого калу, а також з поверхні сирих дерев.

Хід роботи

1. Одержання накопичувальної культури аеробних целлюлозоруйнуючих бактерій.

Для нагромадження культури аеробних целлюлозоруйнуючих бактерій готують елективне живильне середовище наступного складу (у % до кількості узятої води):

NaNO ₃	– 0,25
KH ₂ PO ₄	– 0,1
MgSO ₄	– 0,1
CaCl ₂	– 0,1
NaCl	– 0,01
CaCO ₃	– 0,2
FeSO ₄ (1 % розчин)	– 2 краплі
Водопровідна вода	

Живильне середовище розливають в конічні колби на 150–250 мл шаром 1,5–2,0 см. Середовище заражають грудочкою ґрунту і на дно колби в середовище поміщають складчастий фільтр конусом нагору. Колби закривають ватно-марлевими пробками і поміщають у термостат при температурі 25–30° С на 10–14 доби.

На межі живильного середовища та повітря створюються оптимальні умови харчування й аеробного дихання для целлюлозоруйнуючих бактерій. Папір фільтра ослизнюється, розкладається, і фільтр поступово осідає на дно.

2. Вивчення морфології бактерій аеробного розкладу клітковини.

Для мікроскопічного вивчення морфології целлюлозоруйнуючих бактерій на предметне скло поміщають бактеріологічною петлею небагато ослизнюваного паперу фільтра (чи зруйнованих мас клітковини з колби), додають краплю рідини з колби і готують фіксований забарвлений мазок. Забарвлюють мазок фуксином і мікроскопують, користуючись імерсійною системою (об'єктив МІ-90).

На препараті серед волокон клітковини помітні різні целлюлозоруйнуючі бактерії, обривки міцелію грибів, спори грибів (у випадку перегляду зруйнованих мас клітковини).

Препарати детально вивчити і замалювати.

Завдання до теми

1. Одержати накопичувальну культуру целлюлозоруйнуючих бактерій.
2. Приготувати з культуральної рідини і промікроскопувати препарати кліток аеробних бактерій, що розкладають клітковину. Вивчити їхню морфологію. Замалювати переглянуті препарати.

Контрольні питання

1. Охарактеризувати етапи процесу розкладу клітковини.
 2. Проаналізувати хімізм процесу.
 3. Назвати ферментні системи, які задіяні у ферментативному гідролізу целюлози.
 4. Визначити, від яких факторів залежить склад кінцевих продуктів руйнування целюлози.
 5. Привести групи мікроорганізмів, що ведуть розклад клітковини.
 6. Дати аналіз морфології целлюлозоруйнуючих бактерій.
- Література:** [1, с. 1–4; 2, с. 1–3; 3, с. 8–14; 4, с. 6–8; 5, с. 1–3].

Лабораторна робота № 8

Тема. Вивчення процесу фіксації молекулярного азоту вільноіснуючими азотфіксуючими бактеріями.

Мета: Ознайомитися з процесом фіксації молекулярного азоту бактеріями роду *Azotobacter* і роду *Clostridium*. Вивчити морфологію мікроорганізмів.

Обладнання та реактиви : живильне середовище Ешбі, родючий ґрунт, термостат, мікроскоп МБИ-1, предметні і покривні стекла, імерсійна олія, колби на 100–150 мл з ватяно-марлевими пробками, пробірки, штатив для пробірок, пінцет, спиртівка, спирт, гумова груша, піпетки (на 2 мол, 5 мол), лоток, бактеріологічна петля, фільтрувальний папір, 10 % розчин хлориду заліза (III), розчин Люголя (реактив на гранульозу), метиленовий синій, концентрована сірчана кислота, етиловий спирт (96 %).

Навчальні елементи :

Короткі теоретичні відомості

Рослини постійно відчувають нестачу у мінеральному азоті. Запаси азоту в ґрунті поповнюються завдяки фіксації молекулярного азоту повітря мікроорганізмами. Процеси зв'язування молекулярного азоту мікроорганізмами мають особливо велике значення в азотному балансі ґрунту, вони значною мірою сприяють підвищенню її родючості. Найбільш активними вільноіснуючими у ґрунті азотфіксаторами є представники роду *Azotobacter* і маслянокислі бактерії роду *Clostridium*.

Вперше вільноіснуючий азотфіксатор був виділений у 1893 р. С. Н. Виноградським і названий їм на честь Л. Пастера. Їм виявився анаеробний мікроорганізм – *Clostridium pasteurianum*, який веде фіксацію молекулярного азоту в анаеробних умовах на важких кислих ґрунтах. Трохи пізніше (1901 р.) голландський мікробіолог М. Бейєринк виділив іншого представника вільноіснуючих азотфіксаторів, дуже поширеного в ґрунтах *Azotobacter chroococcum*.

У даний час відомо, що молекулярний азот атмосфери можуть засвоювати й інші мікроорганізми: деякі представники грибів, актиноміцетів і синьо-зелених водоростей.

Виділений із ґрунту *Clostridium pasteurianum* використовує як джерело вуглецю вуглеводи й органічні кислоти. Активність азотфіксації *Clostridium pasteurianum* становить 10–12 мг азоту на 1г спожитої органічної речовини. *Clostridium pasteurianum* – рухливі паличкоподібні клітини, розміром 3–7 мкм, одиночні чи розташовані парами і короткими ланцюжками. Спори овальні, формуються ексцентральні, при цьому клітини-спороносці приймають форму лимона. У клітинах накопичується багато гранульози. Колонії білуваті, гладкі, блискучі.

Молоді клітки азотобактера грамнегативні поліморфні палички, але в зрілому віці можуть мати форму диплококів, покриті товстою слизовою

капсулою. Молоді клітки азотобактера рухливі. Під час росту на безазотистих живильних середовищах азотобактер утворює слизуваті опуклі колонії, забарвлені у темно-коричневий (*Azotobacter chroococcum*), у жовтий (*Azotobacter vinelandii*) і інші кольори. Джерелом вуглецю й енергії для азотобактера служать вуглеводи, спирти, органічні кислоти. Джерелами азоту, крім молекулярного, можуть бути солі амонію, нітрати, нітроти, амінокислоти, сечовина.

Біологічна фіксація азоту являє собою ферментативний процес відновлення молекулярного азоту. Мікроби-азотфіксатори володіють однією і тією же ферментною системою, що одержала назву нітрогенази. Нітрогеназа активує молекулу азоту.

Нітрогенази усіх відомих азотфіксаторів складаються з 2 білків: молекула одного з них містить тільки атоми заліза (малий компонент – азоферодоксин), молекула іншого білка містить атоми молібдену й атоми заліза (великий компонент – молібдоферодоксин). В активації молекули азоту бере участь молібден, а сполуки заліза використовуються як переносники електронів.

Для функціонування нітрогеназа вимагає АТФ, енергія розпаду якої використовується для відновлення азоту. Потреба в АТФ у азотфіксуючих мікроорганізмів дуже велика. Так, для відновлення однієї молекули азоту витрачається 12 молекул АТФ.

Аміак, що утворився, реагує з кетокислотами бактеріальної клітини, що перетворюються в амінокислоти. Останні і служать джерелом азоту для рослин.

Для функціонування нітрогенази необхідна не тільки АТФ у якості енергії, але й постійне надходження електронів для відновлення азоту до аміаку. Джерелом АТФ і електронів у анаеробів виступає процес бродіння, у аеробів – процеси аеробного окислювання.

Нітрогеназа, 12 АТФ;



Хід роботи

1. Одержання накопичувальної культури вільноіснуючих азотфіксуючих бактерій.

Для нагромадження вільноіснуючих азотфіксаторів використовують середовище Ешбі. Склад живильного середовища (г/л дистильованої води):

Манітт чи глюкоза, чи сахароза	– 20,0
K ₂ HPO ₄	– 0,2
MgSO ₄	– 0,2
NaCl	– 0,2
K ₂ SO ₄	– 0,1
CaCO ₃	– 5,0

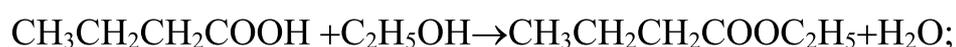
Живильне середовище, не стерилізуючи, розливають у колби об'ємом 100–150 мл шаром 1–1,5 см і заражають парниковим ґрунтом (1/2 чайної ложки). Колби закривають ватяно-марлевими пробками і поміщають у термостат при температурі 28–30° С.

2. Проведення якісної реакції на виявлення у культуральній рідині продуктів метаболізму бактерій.

Через 5–7 доби культивування на поверхні середовища утвориться коричнево-бура плівка азотобактера. Рідина в колбі піниться і видає запах масляної кислоти, що вказує на розвиток у середовищі бактерій *Clostridium pasteurianum*. Утворення масляної кислоти в середовищі виявляють такими способами:

– по реакції з хлоридом заліза (III). 5 мл культуральної рідини переносять у пробірку, додають 2 мл 10 % розчину хлориду заліза (III) і нагрівають до кипіння. Розчин маслянокислого заліза, що утвориться, в минаючому світлі має криваво-червоний колір.

– Беруть 5 мл культуральної рідини, додають до неї 0,5 мл 96 % етилового спирту і 2 мл концентрованої сірчаної кислоти. Суміш нагрівають. При цьому з'являється характерний запах масляноетилового ефіру, що нагадує запах ананаса. Реакція проходить по наступному рівнянню:



3. Вивчення морфології мікроорганізмів.

– Для вивчення морфології мікроорганізмів роду *Azotobacter* готують препарат живих клітин. На предметне скло наносять краплю плівки азотобактера (з поверхні рідини у колбі), забарвлюють метиленовим синім, накривають покривним склом і вивчають під мікроскопом з об'єктивом 40^x. У полі зору добре помітні забарвлені у синій колір рухливі клітини – диплококі.

– Для вивчення морфології мікроорганізмів *Clostridium Pasteurianum* також готують препарат живих клітин. З нижніх шарів рідини у колбі (із дна колби) беруть кілька крапель рідини, наносять на предметне скло, забарвлюють, додаючи краплю розчину Люголя (реактив на гранульозу), накривають покривним склом і вивчають під мікроскопом з імерсійною системою (об'єктив ВІ-40). У полі зору добре помітні веретеноподібні бактерії – *Clostridium pasteurianum*, забарвлені у синій колір (синє забарвлення виникає у результаті взаємодії гранульози, що міститься в клітинах цих бактерій, з йодом з розчину Люголя).

Переглянуті препарати замальовують.

Завдання до теми

1. Одержати накопичувальну культуру вільноіснуючих азотфіксуючих бактерій.
2. Провести якісну реакцію на виявлення у культуральній рідині продукту метаболізму бактерій роду *Clostridium* – масляної кислоти.
3. Приготувати з культуральної рідини і промікроскопувати препарати клітин бактерій роду *Azotobacter* і роду *Clostridium*. Вивчити морфологію мікроорганізмів. Замалювати переглянуті препарати.

Контрольні питання

1. Назвати представників вільноіснуючих аеробних та анаеробних азотфіксаторів.
2. Охарактеризувати процес біологічної фіксації азоту у вільноіснуючих азотфіксаторів.
3. Проаналізувати будову та функції ферментної системи нітрогенази.

4. Дати аналіз складу елективного середовища для одержання (отримання) накопичувальної культури вільноіснуючих азотфіксаторів.

5. Вказати ознаки розвитку бактерій роду *Azotobacter* і роду *Clostridium* на елективному живильному середовищі.

6. Описати морфологічні особливості клітин бактерій: азотобактера та клостридій.

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

Лабораторна робота № 9

Тема. Вивчення процесу фіксації молекулярного азоту симбіотичними азот фіксаторами – бульбочковими бактеріями.

Мета: Ознайомитися з процесом фіксації молекулярного азоту бульбочковими бактеріями. Вивчити морфологію бульбочкових бактерій.

Обладнання та реактиви : коренева система бобової рослини з бульбочками, мікроскоп МБИ-1, імерсійна олія, ботанічна бритва, пінцет, препарувальні голки, метиленовий синій (чи водяний розчин фуксину), предметні і покривні стекла, спиртівка, спирт, лоток, скляний місток у ванночці для фарбування препаратів, вода дистильована, фільтрувальний папір.

Навчальні елементи :

Короткі теоретичні відомості

Бульбочкові бактерії являють собою грамнегативні рухливі аеробні палички; швидкозростаючі форми відносять до роду *Rhizobium*, повільнозростаючі – до роду *Bradyrhizobium*. Бульбочкові бактерії здатні формувати симбіотичні асоціації з бобовими рослинами. У бобових рослин в бульбочках, що утворюються при цьому на коренях, активно йде фіксація молекулярного азоту. Бульбочкові бактерії здатні існувати у ґрунті поза симбіозу з рослинами.

Бульбочкові бактерії виявляють видову специфічність. Звичайно визначений вид бактерій утворює бульбочки тільки на одному чи деяких видах бобових. Так, *Rhizobium trifolii* інфікує корені конюшини, *Rhizobium phaseoli* утворює бульбочки на коренях квасолі. Істотне значення для взаємного пізнання бактерій і рослини мають лектини бобових. Це – білки або глікопротеїни, позбавлені ферментативної активності, але здатні до специфічного зв'язування залишків цукрів. Процеси зв'язування цукрів лектинами подібні з реакціями антиген-антитіло (Рис 12.1.). Лектини можуть визначати хазяйську специфічність, реагуючи з означеними вуглеводними залишками на поверхні симбіотичних бактерій. Поверхні бактерій і клітин рослини містять подібні антигенні детермінанти, що реагують з лектином.

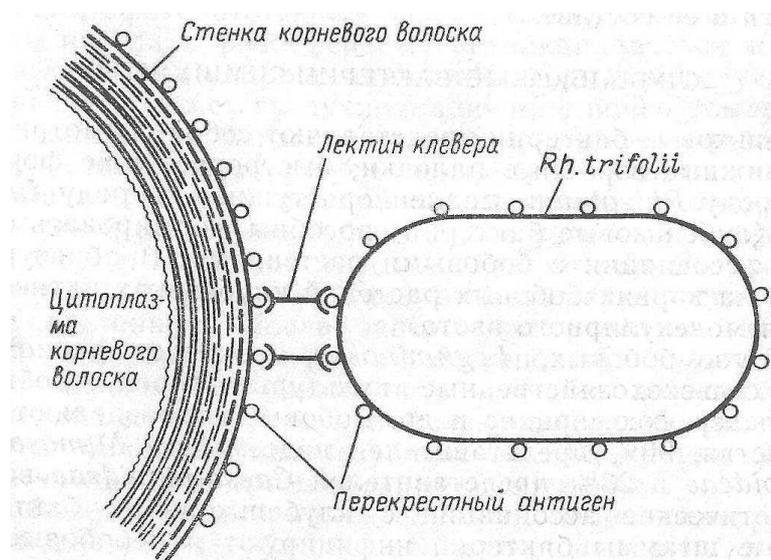


Рисунок. 12.1 – Схема першої фази прикріплення *Rhizobium trifolii* до корневого волоску конюшини (по: Dazzo, 1981.)

Відомі два шляхи вкорінювання бульбочкових бактерій у корінь рослини-хазяїна: через кореневі волоски або «ущелини», що утворюються в основах бічних відгалужень кореня. Після вкорінювання бульбочкові бактерії у кореневому волоску утворюють так звану інфекційну нитку, що представляє собою гіфоподібну слизову масу, у яку занурені клітини бактерій, що розмножуються. Інфекційна нитка проходить по кореневому волоску в клітини кори кореня до ендодерми. Клітини кори кореня, інфіковані бульбочковими

бактеріями, і сусідні, прилягаючі до них клітини активно поділяються, утворюючи бульбочки. У таких рослин, як горох, конюшина, бульбочки дрібні і розташовуються вони на розгалуженнях коренів; у таких, як люпин, квасоля, бульбочки великі, мають вид великих бородавчастих наростів, в основному на головному корені.

Відносини між бульбочковими бактеріями і бобовими рослинами можна визначити як мутуалізм, тобто такий вид симбіозу, при якому обидва симбіонта здобувають користь від спільного співжиття: рослина одержує засвоєні зв'язані форми азоту, а бульбочкові бактерії використовують кореневі виділення – джерело мінеральних солей та сполук, що містять вуглець.

Бульбочки не утворюються на коренях рослин, що виростають в умовах підвищеного вмісту зв'язаного азоту. Знижується число клітин бульбочкових бактерій, що прикріплюються до кореневих волосків рослини. Однією з причин цього є зниження вмісту в коренях рослини лектіну, синтез якого може бути репресований сполуками зв'язаного азоту.

Біологічна фіксація азоту являє собою ферментативний процес відновлення молекулярного азоту до аміаку. Мікроби-азотфіксатори мають ферментну систему, що одержала назву нітрогенази. Нітрогеназа активує молекулу азоту. Для функціонування нітрогенази необхідні АТФ в якості енергії, а також постійне надходження електронів для відновлення азоту до аміаку. Джерелом АТФ і електронів у симбіотичних азотфіксаторів є рослина. Аміак, що утворюється, реагує з кетокислотами бактеріальної клітини, які перетворюються в амінокислоти. Останні і служать джерелом азоту для рослин. Кисень репресує синтез нітрогенази. Самі бульбочки, де відбувається фіксація азоту, варто розглядати як структуру, що обмежує доступ молекулярного кисню.

Нітрогеназа



Хід роботи

1. Вивчення будови бульбочки.

Для вивчення будови бульбочки гострою ботанічною бритвою готують тонкий зріз через бульбочку. Зріз поміщають у краплю води на предметне скло, забарвлюють фуксином або метиленовим синім й мікроскопують при збільшенні мікроскопа (окуляр 15^x, об'єктив 40^x). На препараті добре помітна бактероїдна тканина бульбочки, а в ній проглядається маса бульбочкових бактерій.

Переглянутий препарат замалювати.

2. Вивчення морфології бульбочкових бактерій.

Для більш точного вивчення морфології бульбочкових бактерій варто приготувати фіксований, забарвлений мазок й промікроскопувати його, використовуючи об'єктив МІ-90. Для приготування мазка розрізають бульбочку і віджимають краплю соку в краплю води на предметне скло. Якщо бульбочки маленькі, їх руйнують препарувальними голками й отриманий матеріал добре розмазують по склу. Мазки фіксують і забарвлюють.

На препаратах помітні бульбочкові бактерії різних форм і розмірів, дрібні палички (у молодій культурі), більш великі оперезані палички і бактероїди (при старінні культури). Перевага тієї чи іншої форми залежить від віку бульбочки і фази розвитку бобової рослини. Стадія оперезаних паличок та бактероїдів звичайно збігається з фазою бутонізації і цвітіння бобових рослин і характеризується максимальною інтенсивністю фіксації азоту. Для вивчення бульбочкових бактерій краще використовувати великі бульбочки люпину, квасолі, конюшини.

Переглянутий під мікроскопом препарат замалювати.

Завдання до теми

1. Вивчити етапи процесу взаємодії клітин бактерій з кореневою системою рослини й утворення бульбочки.

2. Приготувати й промікроскопувати препарат зрізу бульбочки. Вивчити будову бульбочки. Замалювати переглянутий препарат.

3. Приготувати з умісту бульбочки препарат бульбочкових бактерій, промікроскопувати. Вивчити морфологію бульбочкових бактерій. Замалювати переглянутий препарат.

Контрольні питання

1. Назвати представників бульбочкових бактерій.
2. Обґрунтувати видову специфічність бульбочкових бактерій.
3. Проаналізувати шляхи вкорінювання бульбочкових бактерій у корінь рослини-хазяїна.
4. Назвати і дати визначення виду симбіотичних взаємовідносин між бульбочковими бактеріями та бобовими рослинами.
5. Вказати ферментну систему, необхідну для протікання біологічної фіксації азоту бактеріями. Її функції.
6. Охарактеризувати умови функціонування нітрогенази у бульбочкових бактерій.
7. Дати аналіз морфологічним формам бульбочкових бактерій.

Література: [1, с. 51–54; 2, с. 40–43; 4, с. 36–38; 11, с. 53–56].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна література

1. Лысак В. В. Микробиология : Учеб. Пособие для студентов биологических специальностей. / В. В. Лысак – Минск : БГУ, 2007.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак – Москва : Мир, 2002.
3. Козлова І. П. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти: Навч. посібник. / І. П. Козлова – Київ : Наук. думка, 2008.
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.
7. Современная микробиология. / Под ред. Й Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – Москва : Мир, 2005.
8. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. / С. Н. Щелкунов – Новосибирск : Сиб. Унив. Изд-во, 2004.
9. Экология микроорганизмов / Под ред. А. И. Нетрусова. – Москва : Изд. центр «Академия», 2004.

Додаткова література

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

