

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ВИКОНАННЯ ПРАКТИЧНИХ РОБІТ  
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ  
**«ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ І ВІРУСОЛОГІЯ»**  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ  
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401– «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо практичних 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\_\_\_\_\_2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік практичних занять.....	6
Практичне заняття № 1 Обладнання бактеріологічної лабораторії. Знайомство з основними методами лабораторних досліджень.....	6
Практичне заняття № 2 Методи стерилізації.....	14
Практичне заняття № 3 Підрахунок клітин мікроорганізмів під мікроскопом.....	21
Практичне заняття № 4 Вимірювання розмірів клітин.....	24
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	28
Список літератури.....	29

## ВСТУП

Практичні роботи є важливим етапом навчального процесу, що дозволяє вдосконалювати теоретичну й практичну підготовку студентів. Практикум проводиться паралельно з теоретичним курсом, що дає можливість глибше й повніше засвоїти матеріал.

**Мета навчального курсу** «Загальна мікробіологія та вірусологія» – вивчення сучасного стану мікробіологічної науки, отримання практичних навичок вивчення мікроорганізмів у обсязі, необхідному для розуміння протікання основних процесів, зв'язку мікробіології із суміжними науками, сільським господарством, медициною та біотехнологією, що має створити студентам підґрунтя для викладання та проведення біохімічних досліджень у науково-дослідних чи виробничих установах.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студенти повинні:

**знати:**

- основні завдання та значення курсу;
- систематику мікроорганізмів;
- основні метаболічні процеси у мікроорганізмів;
- системи енергозабезпечення мікроорганізмів;
- конструктивний метаболізм у мікроорганізмів;
- елементи інтеграції метаболічних шляхів;
- техніку безпеки під час роботи з мікроорганізмами;
- вплив чинників зовнішнього середовища на мікроорганізми та їх екологію;
- використання мікроорганізмів у народному господарстві та медицині;

**уміти:**

- користуватися приладами та обладнанням мікробіологічної лабораторії;
- вирощувати та досліджувати певні види мікроорганізмів;
- виконувати аналізи складу мікроорганізмів та активності деяких ферментів;

- оформляти результати лабораторних робіт;
- проводити математичну і статистичну обробку експериментальних даних;
- користуватися довідниками та каталогами;
- підбирати та використовувати наукову та методичну літературу;
- застосовувати теоретичні знання на практиці.

Підготовка до практичного заняття передбачає теоретичне опрацювання матеріалу певної теми і знайомство з методикою виконання роботи. До початку заняття в робочому зошиті мають бути описані принцип методу та хід роботи. Після закінчення практичної частини студенти захищають роботу у викладача.

Основна мета практикуму – закріплення теоретичних знань шляхом формування практичних навичок у мікробіології. У процесі виконання робіт студенти опановують сучасні методи експериментальних досліджень та уміння аналізувати отримані результати.

Практичні роботи містять виклад принципу методу, перелік основних матеріалів, реактивів й устаткування, детальний опис ходу роботи й очікуваних результатів. Побудова робіт дозволяє проводити їх без додаткових вказівок, що особливо актуально наразі у зв'язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного розв'язання наукових проблем.

# ПЕРЕЛІК ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

## Практичне заняття № 1

**Тема. Обладнання бактеріологічної лабораторії. Знайомство з основними методами лабораторних досліджень**

**Мета:** набути навичок роботи з лабораторним посудом: пробірками, чашками Петрі, бактеріологічними петлями, градуйованими і пастерівськими піпетками, спиртівками, предметними скельцями.

**Навчальні елементи:** бактеріологічна петля, чашка Петрі, бактеріологічний метод, серологічний метод.

### Короткі теоретичні відомості

**Завданнями мікробіологічної лабораторії є:**

- Діагностика інфекційних захворювань;
- Виявлення носіїв патогенних мікробів;
- Дослідження об'єктів зовнішнього середовища;
- Отримання імунобіологічних препаратів.

Для виконання всіх правил роботи із заразним матеріалом і проведення досліджень лабораторія повинна мати набір приміщень: лабораторні кімнати, бокси, стерилізаційні, мийні. Лабораторні кімнати призначені для проведення досліджень. Вони повинні бути просторими і світлими. Стіни покривають плиткою або покривають олійною фарбою; підлогу покривають лінолеумом, столи – пластиком. Вікна мають бути орієнтовані на північ або північний схід. У кімнатах має бути підводка холодної і гарячої води.

**Матеріалом для досліджень найчастіше є виділення людини:** кров, сеча, харкотиння, випорожнення, гній, виділення ран тощо. Окрім цього, досліджують об'єкти зовнішнього середовища на вміст мікробів, які прямо чи опосередковано впливають на здоров'я людини.

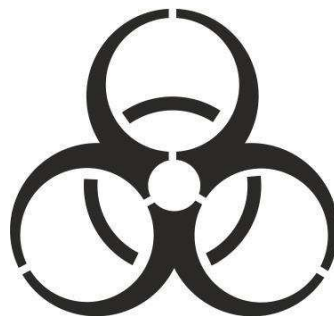
**Вимоги** щодо влаштування приміщення, безпеки робіт і правил поведінки персоналу мікробіологічної лабораторії викладені в Державних санітарних правилах «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях

(відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю» (ДСП 9.95.-080-02), затверджених МОЗ України 28.01.2002. Мета Правил – створення безпечних умов праці, забезпечення індивідуальної та загальної безпеки, запобігання винесенню інфекцій за межі лабораторії, нещасним випадкам і професійним захворюванням.

Мікробіологічні лабораторії організують при лікарнях, поліклініках, санітарно-епідемічних станціях, медичних науково-дослідних інститутах, вищих і середніх спеціальних навчальних закладах.

За призначенням мікробіологічні лабораторії бувають: бактеріологічні, вірусологічні, мікологічні, паразитологічні, імунологічні. Окремо існують лабораторії для діагностики особливо небезпечних інфекцій, шкірно-венеричних інфекцій, а також туберкульозу.

### **1 Структура мікробіологічної лабораторії**



#### **Міжнародний знак «Біологічна небезпека»**

Мікробіологічна лабораторія – це складний самостійний структурний підрозділ закладу, що виконує експериментальні, діагностичні або виробничі роботи з патогенними біологічними агентами. Специфіка роботи потребує ізоляції її від інших приміщень. Вимоги до планування та складу приміщень лабораторії, їх обладнання залежать від конкретних завдань, обсягу досліджень, призначення, централізації лабораторної служби. Лабораторія має бути забезпечена водопроводом, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, а також бути газифікованою. На входних дверях потрібно позначити назву лабораторії і міжнародний знак «Біологічна небезпека». На дверях мають бути кодові замки.

Приміщення мікробіологічної лабораторії за ступенем небезпеки для персоналу ділять на три зони: «заразна» зона – приміщення, у яких проводять роботу з біологічним матеріалом; «умовнозаразна» зона – приміщення, у яких проводять роботу і знезараженим біологічним матеріалом; «чиста» зона – приміщення, у яких не проводять роботу з біологічним матеріалом.

Приміщення лабораторії слід розташовувати відповідно до ходу виконання аналізів і до основних потоків технологічного процесу. Дослідження патологічного матеріалу проводять у лабораторній кімнаті.

**Лабораторна кімната** має бути просторою, світлою, непрохідною. Для зручності оброблення дезінфекційними розчинами і миття стіни облицьовують глазурованою плиткою на висоту 1,5 м або фарбують олійною фарбою світлих тонів. Поверхня дверей, підлоги має бути рівною, без виступів, легко митися, стійкою до дезінфекційних засобів.

Робочі поверхні столів потрібно виготовляти з водонепроникного, кислото- і лужностійкого, незгораючого матеріалу, який не псується від оброблення вогнем і дезінфекційними розчинами. Столи, на яких проводять мікроскопію, розміщують біля вікон.

**Оснащення бактеріологічної лабораторії** має забезпечувати умови для праці персоналу. У ній слід розмістити: термостати, холодильники, стерилізатори, центрифуги, дистилятор, нагрівальні прилади.

Лабораторна кімната має бути обладнана водопроводом. Раковини зі змішувачами холодної та гарячої води розміщують біля виходу. Біля раковини встановлюють пристрої, у яких мають постійно знаходитись розчини для дезінфекції рук і мийні засоби. У лабораторній кімнаті повинні бути мікроскопи, інструменти для виконання досліджень.

Дослідження у стерильних умовах проводять у боксах.

Площа **боксу** має бути розрахована на роботу одночасно двох осіб. Перед роботою і після неї приміщення боксу обробляють дезінфекційними розчинами і опромінюють бактерицидними лампами.



## **Оснащення мікробіологічної лабораторії**

Робочі місця в лабораторії мають бути постійно оснащені всім необхідним для повсякденної роботи.

Для роботи потрібні: мікроскоп, спиртівки, сухий спирт, бактеріологічні петлі, предметні та покривні скельця.

**Лабораторний посуд:** чашки Петрі, пробірки, банка з ватою, пінцет, піпетки, ножиці, скальпель, склянка з дезінфекційними розчинами для піпеток і для відпрацьованих предметних скелець, невелика склянка з прикритою кришкою для покривних скелець, фіксатори для мазків, фільтрувальний папір, сірники, олівці для скла (маркер), гумові груші, 70 % етиловий спирт, стериліум для оброблення рук, пробірки з ізотонічним розчином натрію хлориду, імерсійне масло.

Перед початком роботи предмети на столі потрібно розмістити так, щоб середина столу була вільною.

Дезінфекційні розчини для оброблення рук, посудина для піпеток, банка для відходів мають бути розміщені справа від працівника на відстані, що дає змогу, не встаючи з робочого місця, обробляти руки, занурювати в дезінфекційний розчин піпетки й інший відпрацьований матеріал.

Спиртівка повинна знаходитися у центрі столу на відстані 30 см від його краю.

Об'єкти з посівами, незасіяні поживні середовища розміщують зліва на однаковому рівні зі спиртівкою.

Для **фарбування мазків** обладнують спеціальне місце, на якому потрібно мати: барвники, спирт, пісочні годинники, пінцет, промивалку з дистильованою водою, лоток з місточком, фільтрувальний папір.

## **Правила поведінки і роботи в мікробіологічній лабораторії:**

1. До роботи допускають співробітників тільки після ознайомлення з правилами поведінки і режимом роботи.
2. Усі працівники підлягають профілактичним щепленням
3. До роботи допускаються особи не молодше 18 років

4. Кожен співробітник повинен мати халат, шапочку, змінне взуття, маску, гумові рукавички.

5. У лабораторних кімнатах забороняється палити, приймати їжу, голосно розмовляти.

6. У разі попадання досліджуваного матеріалу на руки, халат, стіл, інші об'єкти необхідно терміново провести дезінфекцію і повідомити вищій за посадою особі.

Режим роботи в лабораторіях залежить від ступеня небезпеки зараження для осіб, які працюють з хвороботворними мікробами.

### **Мікроби за ступенем небезпеки зараження ними поділяють на групи:**

1. Особливо небезпечні – збудник чуми.
2. Збудники холери, бруцельозу, туляремії, сибірки, сапу, лептоспірозу
3. Збудники черевного тифу, дизентерії, туберкульозу, дифтерії, коклюшу та ін.
4. Сальмонели, протей, ешерихії, стафілококи, стрептококи, збудники газової гангрені та ін.

З матеріалом, можливо зараженим збудниками особливо небезпечних інфекцій (ОНІ), працюють у спеціальних лабораторіях з дозволу органів охорони здоров'я.

## **2 Принципи основних методів мікробіологічних досліджень**

Важливою умовою ефективності лабораторних досліджень є доцільний вибір методу. Основні вимоги, яким мають відповідати сучасні методи, – це висока специфічність і чутливість. У сучасних мікробіологічних лабораторіях використовуються такі методи.

**Мікроскопічний** – виявлення збудника під мікроскопом у мазках, виготовлених з патологічного матеріалу. Застосовують для діагностики гонореї, сифілісу, туберкульозу, малярії тощо.

**Бактеріологічний (вірусологічний, культуральний)** посів патологічного матеріалу на поживні середовища, зараження культури клітин, курячих ембріонів, виділення чистої культури збудника та його ідентифікація.

Використовують для діагностики більшості хвороб бактеріальної, вірусної, грибкової природи: черевного тифу, чуми, мікроспорії, грипу та ін. Нині розроблено автоматичні аналізатори, за допомогою яких протягом декількох годин (4–24) можна визначити вид збудника.

**Імунологічний (серологічний**, від лат. *serum* – сироватка) – виявлення специфічних антитіл у сироватці крові або антигенів у патологічному матеріалі. Для цього використовують імунні реакції.

**Молекулярно-генетичний** – виявлення РНК або ДНК збудника в патологічному матеріалі. Для цього використовують:

- метод гібридизації ДНК або РНК (метод ДНК-, РНК-зондів);
- метод ПЛР.

Молекулярно-генетичний метод найбільш специфічний і чутливий, він дає змогу ідентифікувати будь-який біологічний об'єкт навіть за незвичайної концентрації його нуклеїнових кислот у досліджуваному матеріалі. Метод ЛПР дає змогу виявити 1 молекулу нуклеїнової кислоти в зразку, що досліджується.

**Методи лабораторних досліджень.**

**Мікроскопічний метод (бактеріоскопічний, вірусоскопічний, протозооскопічний)**

Метод дає змогу виявити характерні морфологічні особливості збудника й має важливе значення для діагностики гонореї, менінгококового менінгіту, туберкульозу, лепри, сифілісу, поворотного тифу, віспи, малярії, лейшманіозу, токсоплазмозу тощо.

**Бактеріологічний метод** зводиться до посіву матеріалу від хворого на відповідні живильні середовища, виділення та ідентифікації чистої культури. Він має вирішальне значення для діагностики черевного тифу, дизентерії, холери, дифтерії, чуми та інших хвороб.

**Серологічний метод** базується на виявленні специфічних антитіл у сироватці крові хворих до певного збудника. Для цього використовують різні імунологічні (серологічні реакції): РА, розгорнута РА, РЗК, РП, РІФ, ІФА, РПГА тощо.

## **Хід роботи**

### **Правила роботи з бактеріологічною петлею**

1. Бактеріологічна петля складається з петлетримача і самої бактеріологічної петлі довжиною 6–8 см.
2. У неробочому стані стерилізована бактеріологічна петля розташовується в стаканчику (штативі), опираючись на петлетримач.
3. Для роботи бактеріологічну петлю беруть за петлетримач як письмове перо.
4. Стерилізують бактеріологічну петлю в полум'ї пальника. Для цього власне петлю під кутом 45 градусів уводять в середню частину полум'я, розпалюють до червоного, потім для стерилізації петлетримача його проводять у полум'я 2–3 рази.
5. Зробивши необхідну маніпуляцію бактеріологічною петлею (посів, пересівши), її знову стерилізують зазначеним вище способом і повертають на місце, ставлячи петлетримач униз.

### **Правила роботи з чашками Петрі**

1. Чашка Петрі призначена для культивування мікробів на щільному живильному середовищі.
2. Чашка Петрі складається з кришки більшого діаметра і донної частини – меншого діаметра. У донну частину вноситься живильне середовище
3. Зберігаються чашки Петрі донною частиною вгору.
4. Переглядаючи зростання мікробів, які вирости на чашці Петрі, її беруть за бічні краї кришки середнім і вказівним пальцями, вказівним підтримують донну частину. Піднімають чашку до рівня очей, розташовуючи на 15–20 см від очей, донна частина чашки звернена до обличчя. Таким чином переглядають, чи вирости колонії в прохідному світлі.

### **Правила роботи з пробірками**

1. У лабораторних пробірках відбувається зростання мікроорганізмів на щільних або рідких середовищах.
2. Пробірки повинні добре закриватися ватно-марлевими пробками.

Частина пробки повинна увійти в отвір пробірки, а інша – підніматися над колбою так, щоб її зручно було захопити лівою рукою, затиснувши між долонною поверхнею і мізинцем.

3. Пробірки тримають у лівій руці, розташовуючи між великим і вказівним пальцем так, щоб вміст пробірки було добре видно.

### **Робота з градуйованими і пастерівськими піпетками**

1. Піпетки в роботі використовуються стерильними, загорнутими в папір.

2. Градуйовану піпетку беруть посередині однією рукою. Іншою в цьому місці надривають папір і стягують його з піпетки в протилежні сторони. Потім беруть піпетку ближче до кінця, але не торкаючись до «ротової» частини піпетки, і перед роботою додатково стерилізують, провівши 2–3 рази в полум'ї пальника.

3. Пастерівські піпетки і шпателі перед роботою витягують з паперу, у якому їх стерилізували і додатково стерилізують у полум'ї пальника.

### **Робота з предметними стеклами**

1. Предметні стекла призначені для приготування мазків.

2. Підготовлені стекла зберігаються у банці із сумішшю Никифорова.

3. Перед роботою скло витягують пінцетом з банки і кладуть на спеціальний місток у лоточку.

4. Руками предметні скельця беруться тільки за ребра.

### **Завдання до теми**

1. Ознайомтеся зі структурою та обладнанням бактеріологічної лабораторії. Замалювати лабораторний посуд в альбом.

2. Вивчіть правила роботи в бактеріологічній лабораторії. Основні положення правил запишіть в альбом.

3. Запишіть в альбом принципи основних методів мікробіологічних досліджень.

4. Ознайомтеся з організацією робочого місця лаборанта.

5. Ознайомтеся з правилами техніки безпеки, охорони праці в галузі

професійної безпеки, протиепідемічного режиму, чинних наказів МОЗ України під час роботи обладнанням, апаратурою, патогенним матеріалом, кислотами, лугами, реактивами.

### **Контрольні питання**

1. Перелічить завдання мікробіологічної лабораторії.
2. Які є матеріали для мікробіологічних досліджень?
3. Назвіть набір приміщень мікробіологічної лабораторії.
4. Опишіть оснащення мікробіологічної лабораторії.
5. Які правила поведінки і роботи в мікробіологічній лабораторії?
6. Зробіть характеристику мікробів за ступенем небезпеки зараження.

**Література:** [1, с. 3–7; 2, с. 8–9; 3, с. 5–7; 9 с. 1–5].

### **Практичне заняття № 2**

#### **Тема. Методи стерилізації**

**Мета:** ознайомлення з методами стерилізації поживних середовищ, посуду, одягу.

**Обладнання та реактиви:** автоклав, сухо-жаровий стерилізатор, стерилізатор водний, чашки Петрі, колби, піпетки, шпателі, папір для загортання посуду, вата, марля, нитки.

**Навчальні елементи:** стерилізація, пастеризація, автоклавування, пористі скляні фільтри, мембранні фільтри, азбестові фільтри.

#### **Короткі теоретичні відомості**

**Стерилізація** – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці. У практичній роботі стерилізацію трактують як методи, які застосовують для знищення всіх форм життя як на поверхні, так і всередині об'єктів стерилізації.

Стерилізують поживні середовища, посуд, інструменти для недопущення розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах.

Розрізняють стерилізацію: термічну, хімічну, фільтруванням та

опроміненням.

## **1 Термічна стерилізація**

**Прожарювання вогнем** (фламбування) застосовують безпосередньо перед використанням для стерилізації петель, голок, пінцетів, ножиць, шпательів, скляних паличок, предметних і покривних скелець та іншого дрібного інструменту.

**Кип'ятіння у воді** використовують для стерилізації шприців, голок, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду, фільтрів у стерилізаторах. При цьому гинуть переважно вегетативні клітини, спори бактерій зберігають життєздатність.

**Пастеризація** – одноразове короткочасне прогрівання матеріалу при температурах, нижчих  $100^{\circ}\text{C}$  для знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Луї Пастер.

Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості, для обробки продуктів, які втрачають смакові і поживні якості під час кип'ятіння: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін.

Пастеризацію зазвичай проводять при  $60\text{--}75^{\circ}\text{C}$  протягом 15–30 хв чи при  $80^{\circ}\text{C}$  15 хв. Інколи нагрівають матеріал до  $90^{\circ}\text{C}$  і одразу ж охолоджують.

**Дробну стерилізацію** використовують для стерилізації середовищ, які псуються під дією температур вище  $100^{\circ}\text{C}$ . Цей метод був запропонований англійським вченим Тиндалем. Принцип тиндалізації заснований на використанні багаторазового прогрівання середовищ текучою парою (у парі киплячої води при температурі  $100^{\circ}\text{C}$  протягом 30–40 хвилин).

Обробку текучою парою проводять 3 рази у автоклаві з незагвинченою кришкою. Час прогрівання відмічається з моменту енергійного виділення пари. У проміжках між прогріваннями середовища вміщують у термостат (температура  $28\text{--}30^{\circ}\text{C}$ ) для пророщування спор.

Середовища, які не витримують нагрівання при  $100^{\circ}\text{C}$ , прогривають обережніше при  $60\text{--}80^{\circ}\text{C}$  4–5 хвилин.

**Стерилізацію сухим жаром** при температурі 170° С, 160° С або 140° С здійснюють у сушильних шафах відповідно протягом 1 год, 2 год і 3 год.

Нагрівання за допомогою сухого жару значно слабше впливає на мікроорганізми, ніж волога пара. Водночас можуть серйозно пошкоджувати такі матеріали, як гума, папір, вата, тканина. Тому цей прийом переважно використовують для стерилізації предметів, які є непроникними для пари, зокрема посуду (чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо).

Температура в сушильній шафі не повинна перевищувати 170° С, оскільки у протилежному випадку з вати та деяких сортів паперу можуть виділятися смолисті речовини, жирні кислоти, що мають здатність пригнічувати ріст мікроорганізмів. Ці речовини у невеликих кількостях також можуть виділятися й при значно нижчих температурах, а під час охолодження шафи осаджуватись на її стінках.

Тому час від часу слід очищувати стінки печі. Для попередження інтенсивного змішування холодного забрудненого повітря зі стерильним вмістом шафи її небажано відкривати до охолодження.

**Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування)** найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації поживних середовищ і посуду. Цей метод ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою під тиском, вищим від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає з підвищенням її тиску. Наприклад, при тиску 1,5 атм. температура пари становить 127° С, 2 атм. – 135° С.

**Автоклавування** забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини і найстійкіші спори. Стерилізацію парою під тиском здійснюють у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах.

Для правильного автоклавування необхідно повністю витіснити повітря з робочої камери, оскільки повітря затримується між предметами, які автоклавуються, унаслідок чого вони можуть не нагріватися до заданої температури. Окрім того, заповнювати автоклав слід таким чином, щоб не перешкоджати вільному рухові повітря.



Перед стерилізацією поживні середовища і посуд слід ізолювати від зовнішнього середовища. Для цього колби і пробірки закривають ватними пробками: чашки Петрі, піпетки, шпателі загортають у папір чи кладуть у паперові пакети. Посуд зазвичай стерилізують при 1 атм. 20–30 хв. Температура та тривалість автоклавування поживних середовищ визначається передусім їх складом. Термолабільні субстрати (молоко, желатинові середовища, середовища з цукрами, вітаміни тощо) зазвичай стерилізують при 0,5 атм., протягом 15–30 хв, пивне сусло та сусло-агар – при 0,7 атм 20 хв, м'ясо-пептонні середовища – при 1 атм. 20 хв.

Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкцій. Оскільки автоклав – апарат, що працює при високому тиску і високій температурі, неправильна експлуатація його може бути причиною нещасних випадків. Для роботи з автоклавом допускаються тільки особи, які мають спеціальну підготовку і дозвіл відповідної інстанції. Для контролю правильного режиму стерилізації використовують кілька методів: за допомогою прямого вимірювання температури, максимальних термометрів або хімічних індикаторів.

Перший спосіб здійснюють за допомогою термопар, розташованих у різних частинах камери. Зручнішим є використання максимальних термометрів і патентованих хімічних індикаторів. Останні змінюють своє забарвлення внаслідок прогрівання протягом певного часу при заданій температурі.

## **2 Хімічна стерилізація**

Хімічну стерилізацію використовують для дезінфекції приміщення, столів, знищення патогенних культур мікроорганізмів тощо. Для стерилізації цим методом застосовують солі важких металів (найчастіше ртуті, міді, цинку), 50–60 % розчин етилового спирту, – оксихіноліну, лізол, формалін (41 % розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, пероксид водню, перманганат калію, пропіолактон, йод, йодоформ, детергенти та інші хімічні сполуки.

Обладнання із дзеркальними, оптичними поверхнями, радіодеталі, а також вироби з термолабільних пластмас (чашки Петрі, центрифужні пробірки

тощо) стерилізують, застосовуючи газовий метод. Найчастіше використовують оксид етилену, метилбромід, формальдегід, пропіолактон, озон тощо.

Газову стерилізацію здійснюють у спеціальних герметичних апаратах. Під час стерилізації суворо контролюють концентрацію газу, тиск, вологість, температуру і тривалість обробки, у більшості випадків процес відбувається при температурі 45–70° С. Режим стерилізації різними газами неоднаковий. Предметами, простерилізованими газами, можна користуватися лише через 24 години (після десорбції газів).

### **3 Стерилізація ультрафіолетовими променями**

Приміщення (стерильні бокси, операційні, реанімаційні), інколи вироби з термолабільних пластмас стерилізують за допомогою ультрафіолетових променів у діапазоні 260–280 нм. Час опромінення, який встановлюють експериментально, залежить від потужності бактерицидної лампи, від розміру об'єкта стерилізації. Для обробки УФ-променями дрібних предметів їх одразу після стерилізації кладуть у стерильний обгортковий матеріал або стерильний посуд, де і зберігають до використання.

### **4 Стерилізація фільтруванням**

Метод часто застосовують для стерилізації субстратів, які не витримують нагрівання, зокрема, сироваток, рідких середовищ і розчинів, які містять термолабільні білки, вітаміни, вуглеводи, деякі антибіотики. Спосіб полягає в пропусканні рідин через спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менший за розміри бактерій. У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують:

**а) мембранні (колоїдні) фільтри**, виготовлені на основі ефірів целюлози. Це диски різного діаметра товщиною 0,1–0,5 мм. Розміри пор вітчизняних мембранних фільтрів коливаються в межах від 0,35 до 3,5 мкм. Фірма «Міліпор» (Франція, США) продукує фільтри з розміром пор від 0,01 до 14 мкм, фірма «Синпор» (Чехія) – від 0,12 до 4 мкм. На практиці придатність фільтрів для стерилізації встановлюють шляхом пробного фільтрування через них суспензії дрібних мікроорганізмів. Для перевірки на стерильність фільтрат

у великих кількостях висівають на поживні середовища. Якщо протягом 5 діб тест-мікроорганізм не проросте, фільтри можуть бути використані для стерилізації;

**б) азбестові фільтри Зейца** виготовляють із суміші азбесту і целюлози. Їх недоліком є те, що азбест адсорбує речовини рідини, а фільтрат забруднюється волокнами;

**в) пористі скляні фільтри** виготовляють із фрагментів скла «пірекс», сплавляючи диски фільтрів впаяні в скляні лійки – держачи різної форми.

Скляні фільтри нестандартні, тому перед використанням їх обов'язково перевіряють, як і мембранні фільтри. Для прискорення фільтрації на фільтрі зазвичай створюють перепад тисків, якого найчастіше досягають відкачуванням повітря за допомогою вакуумного насоса чи компресора.

Серйозним недоліком цього способу стерилізації є те, що фільтрування через будь-який фільтр, окрім видалення з розчину суспендованих у ньому частинок, може також призвести до різкої зміни властивостей фільтрату. Так, під час фільтрування може змінюватися рН розчину, у фільтрат можуть потрапляти різні іони, гліцерин тощо.

### **Хід роботи**

У ході роботи необхідно ознайомитися з будовою автоклава та сухо-жарового стерилізатора, приготувати ватно-марлеві пробки, підготувати та простерилізувати посуд.

#### **1 Приготування ватно-марлевих пробок**

Для приготування пробки плоский шматок вати, узятий уздовж волокна, скачують валиком. Щоб додати пробці міцність, її прокочують між долонею й чистим склом, що лежить на столі. Довжина пробки для звичайної пробірки приблизно 4 см. Пробка повинна входити в пробірку на 1,5–2,0 см. Для зберігання форми пробку виймають із пробірки, злегка обертаючи. Зручно обернути пробку чистою марлевою серветкою. Перед стерилізацією пробки можна прикрити паперовими ковпачками. Не можна обертати пробки посуду, який буде стерилізуватися в автоклаві, целофаном, фольгою або іншими

матеріалами, що не пропускають пари, тому що пара повинна обов'язково проникати через пробку в посуд, інакше середовища не нагріються до потрібної температури й не простерилізуються. Використовуючи скляні, гумові, коркові та інші пробки, їх обгортають подвійним шаром обгорткового паперу й стерилізують прив'язаними до склянки, із закритою ватною пробкою. Пробки в посуді заміняють стерильно в полум'ї пальника.

## **2 Підготовка посуду до стерилізації**

а) пробірки закривають ватно-марлевими пробками та, з'єднавши по три штуки, обгортають папером і перев'язують нитками;

б) колби закривають ватно-марлевими пробками, на які зверху надівають паперові ковпачки;

в) шпатель кладуть у паперові конверти;

г) піпетки загортають у полосу паперу шириною 4–5 см, попередньо в піпетку зверху поміщають шматок вати;

д) чашки Петрі загортають у папір по 3 штуки.

Увесь посуд та інструменти перед підготовкою та стерилізацією повинні бути вимиті та просушені.

## **3 Стерилізація**

Увесь посуд та інструменти кладемо в сухо-жаровий стерилізатор на 2 год при температурі 160° С

### **Завдання до теми**

1. Зробити схематичний малюнок автоклава.
2. Визначити методи стерилізації.

### **Контрольні питання**

1. Визначте поняття «стерилізація».
2. Назвіть види стерилізації.
3. Як стерилізуються продукти, які не переносять нагрівання вище 100°С?
4. Як стерилізується приміщення, поверхня меблів та одяг працівників мікробіологічної лабораторії?

**Література:** [4, с. 3–7; 5, с. 8–10; 6, с. 7–8; 10 с. 13–15].

### Практичне заняття № 3

#### Тема. Підрахунок клітин мікроорганізмів під мікроскопом

**Мета:** ознайомитися з методикою підрахунку клітин мікроорганізмів під мікроскопом за допомогою камери Горяєва-Тома.

**Обладнання та реактиви:** Дріжджі хлібопекарські *Saccharomyces cerevisiae*, камера Горяєва-Тома, мікроскоп, капіляри або піпетки.

#### Короткі теоретичні відомості

Підрахувати клітини мікроорганізмів під мікроскопом можна, використовуючи:

- рахункові камери,
- капіляри Перфильєва,
- препарати фіксованих і пофарбованих клітин, приготовлені на предметних стеклах або мембранних фільтрах.

Ці методи дозволяють визначити загальну кількість клітин в одиниці об'єму. Варто пам'ятати, що підраховуються всі клітки, як живі, так і мертві. Основне обмеження більшості зазначених методів – необхідність досить високих концентрацій клітин в одиниці досліджуваного субстрату.

#### Підрахунок клітин у рахункових камерах

Цей метод рекомендується використовувати для підрахунку великих об'єктів – дріжджів, одноклітинних водоростей, конідій грибів і деяких великих бактерій. Зазвичай використовують камеру Горяєва-Тома, хоча можна застосовувати й інші рахункові камери.

Камера Горяєва являє собою товсте предметне скельце, розділене бороздками. На центральну частину скельця нанесена сітка. Площа квадрата-сітки вказана на одній із сторін предметного скельця і складає  $1/25 \text{ мм}^2$  (великий квадрат) або  $1/400 \text{ мм}^2$  (малий квадрат). Частина предметного скельця, на якій розташована сітка, на 0,1 мм нижча за дві інші сторони. Це глибина камери.

Працюючи з камерою, необхідно дотримуватися визначеного порядку її заповнення.

По-перше, заглиблення сіткою покривають спеціальним шліфованим покривним скельцем до появи кілець Ньютона (ретельно притирають покривне скельце до сторін камери). Далі камеру заповнюють суспензією мікроорганізмів яку вносять крізь бороздку камери капіляром або піпеткою.

Підрахунок клітин починають через 3–5 хвилин після заповнення камери. Цей час необхідний для того, щоб клітини осіли і під час підрахунку були видимі в одній площині. Кількість клітин підраховують з об'єктивом 8<sup>x</sup> та 40<sup>x</sup>. Підраховують клітини в 10 великих або 20 маленьких квадратах сітки, переміщаючи останні по діагоналі. Підраховують усі клітини, що лежать у квадраті сітки, а також клітини, що пересікають верхню і праву сторону квадрата. Кількість клітин у великому квадраті не повинна перевищувати 20, а в малому 10. У протилежному випадку суспензію розводять водопровідною водою.

Для отримання достовірного результату загальна кількість підрахованих клітин має бути не менше 600. Підрахунок клітин повторюють 3–4 рази, при цьому кожний раз камеру монтують заново і заповнюють дріжджовою суспензією. Кількість клітин в 1 мл суспензії розраховують за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{hS} n,$$

де  $M$  – кількість клітин в 1 мл суспензії;  $a$  – середня кількість клітин у квадраті сітки;  $h$  – глибина камери в мм;  $S$  – площа квадрату сітки в мм<sup>2</sup>;  $10^3$  – коефіцієнт переводу см<sup>3</sup> у мм<sup>3</sup>;  $n$  – розведення суспензії мікроорганізмів.

### **Хід роботи**

#### **1 Провести підрахунок кількості дріжджових клітин в 1 мл суспензії.**

У камерах Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера та інших можна підрахувати великі мікробні клітини дріжджів, спори грибів, великі бактерії, одноклітинні водорості.

Дріжджові клітини у рідких субстратах підраховують після попереднього розбавлення водою. У мірну колбу ємністю 100 см<sup>3</sup> вносять 2,4 або 10 см<sup>3</sup> дріжджової суспензії залежно від передбаченої концентрації клітин. Для

забарвлення мертвих дріжджових клітин додають 20–30 см<sup>3</sup> метиленового синього (1:5000) або 1–5 см<sup>3</sup> концентрації 1:40.

Камеру та спеціальне шліфоване покривне скло добре промити і висушити. На поверхню сітки нанести по невеликій краплі підготовленого розбавлення і накрити покривним склом. Рідина під покривним склом має розтікатися рівномірно по всій сітці, без пухирців.

Для того щоб об'єм рідини точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притерти до бічних площадок камери, допоки не з'являться так звані кільця Ньютона. Можна, спочатку притерти покривне скло, потім за допомогою піпетки заповнити камеру суспензією мікроорганізмів. Клітини підрахувати через 3–5 хв після заповнення камери, щоб клітини осіли і були видними в одній площині. Рухливі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку слід знищити нагріванням або додати 0,5 см<sup>3</sup> 40 % розчину формаліну.

Камеру поставити на предметний столик мікроскопа і розглядати спочатку з об'єктивом 8<sup>x</sup>, потім 40<sup>x</sup>. Клітини підрахувати в п'яти (можна в десяти) великих квадратах по діагоналі, або по кутках сітки і в центрі. Урахувати всі клітини, що містяться всередині великого квадрата і на суміжних лініях, якщо вони більш як наполовину лежать у середині квадрата. Клітини, що перетинаються суміжною лінією навпіл, слід рахувати на двох з чотирьох сторін квадрата; клітини, розміщені за межами квадрата, не враховувати. Кількість клітин у 1 см<sup>3</sup>:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot \frac{b}{c}}{1000},$$

де  $a$  – сума клітин, підрахована в п'яти (або в десяти) великих квадратах сітки;  $b$  – розбавлення вихідного субстрату;  $c$  – кількість малих квадратів, у яких проводився підрахунок.

## **2 Визначення кількості клітин методом посіву на агаризовані середовища в чашки Петрі (чашковий метод)**

Метод набув широкого застосування для визначення кількості

мікроорганізмів у природних і виробничих субстратах ( воді, ґрунті, сировині, напівфабрикатах і готових продуктах). Уважають, що кожна жива клітина, висіваючись на агаризоване середовище, утворює колонію.

### **Завдання до теми**

1. Зробити схематичний малюнок камери Горяєва.
2. Розрахувати кількість клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в 1 мл суспензії за формулою.
3. Описати методику підрахунку дріжджів у камері Горяєва.
4. Провести підрахунок клітин мікроорганізмів під мікроскопом.

### **Контрольні питання**

1. За допомогою яких методик можна підрахувати кількість клітин мікроорганізмів у певному обсязі?
2. Що собою являє камера Горяєва-Тома?

**Література:** [1, с. 23–27; 4, с. 18–19; 7, с. 17–19; 8, с. 15–18; 11 с. 13–17].

### **Практичне заняття № 4**

#### **Тема. Вимірювання розмірів клітин**

**Мета:** ознайомитися з методикою вимірювання розмірів мікроорганізмів.

**Обладнання та реактиви:** мікроскоп, об'єктивний мікрометр, окулярний мікрометр, культура дріжджів.

#### **Короткі теоретичні відомості**

Дріжджові клітини вимірювали під мікроскопом за допомогою гвинтового окулярного мікрометра

**Окулярний мікрометр** являє собою круглу скляну пластинку, у центрі якої знаходиться лінійка довжиною 5 мм. Лінійка поділена на 50 частин. Окулярний мікрометр вставляють в окуляр. Для цього викручують окулярну лінзу окуляра, поміщають на його діафрагму окулярного мікрометра намітками вниз та закручують лінзу.

Однак діленнями окулярмікрометра не можна виміряти величину клітини, тому що їх видно через об'єктив та окуляр, а поділи лінійки – тільки через



верхню лінзу окуляра.

Тому, до початку вимірювання величини клітин необхідно визначити ціну поділки окулярного мікрометра мікроскопа, що роблять за допомогою об'єктивного мікрометра.

**Об'єктивний мікрометр** – це металічна пластина з вирізом у центрі. У виріз вставлене скло, на якому нанесена лінійка довжиною 1 мм. Вона поділена на 100 частин, тобто поділка об'єктивного мікрометра складає 0,01 мм, або 10 мкм.

Для визначення ціни поділки окулярного мікрометра об'єктивний мікрометр поміщають на столик мікроскопа та фокусують з незначним збільшенням. Зображення лінійки переміщують у центр поля зору і тільки після цього змінюють об'єктив на той, за яким визначатимуть розміри клітин.

Переміщаючи столик мікроскопа і повертаючи окуляр, установлюють мікрометри так, щоб їх шкали були паралельні і одна перекривала другу. Ціну поділки окулярного мікрометра визначають за принципом Ноніуса, тобто суміщають одну поділку шкали окулярного і об'єктивного мікрометрів і визначають наступні ділянки їх суміщення.

Визначають, скільком діленням об'єктивного мікрометра відповідає одна поділка окулярного мікрометра. Наприклад, дві поділки об'єкта – мікрометра (20 мкм) відповідають п'яти поділкам окуляра – 53 мікрометра, тобто, одна поділка окуляра – мікрометра дорівнює 4 мкм (20:5).

Якщо тепер на столик мікроскопа покласти препарат з клітинами мікроорганізму і розглядати його з таким же збільшенням, то можна визначити розмір клітини. Для цього визначають, якій кількості поділок окулярної лінійки відповідає розмір вимірюваного об'єкта, і помножують це число на ціну поділки окулярного мікрометра. Оскільки для вимірювання краще використовувати живі, а не фіксовані клітини (фіксація і фарбування призводять до зміни розмірів клітин) проводили вимірювання дріжджових клітин також за допомогою фазово-контрасного пристрою

## **Визначення розмірів клітин фазово-контрасною мікроскопією**

Препарати живих кліток мікроорганізмів за кольором і прозорістю мало відрізняються від навколишнього середовища, тому що світлові промені, проходячи через живу клітку, не змінюють своєї амплітуди, хоча і змінюються по фазі.

Метод фазово-контрастної мікроскопії дозволяє перетворити невидимі фазові зміни внаслідок дії світлової хвилі під час проходження через мікробну клітину у видимі амплітудні і таким чином підвищити контрастність зображення.

Оптична система, що використовується для одержання фазового контрасту, складається з фазової пластини і кільцевої діафрагми.

**Фазова пластина** – це коло напилювання із солей рідких металів на одну з лінз об'єктива, що забезпечує зміну фази минаючої хвилі на  $1/4$ , що призводить до перетворення фазових розходжень в амплітудні.

**Кільцева діафрагма** – це непрониклива для світла пластина, що має прозору щілину у вигляді кільця, через яку надходить світло в конденсор. Фазовий ефект досягається завдяки точному сполученню фазового кільця з проекцією кільцевої діафрагми.

Фазово-контрастний пристрій складається з набору фазових об'єктивів, що мають на металевій оправі крім позначки збільшення ще і позначку «Ф», револьверного конденсора з набором кільцевих діафрагм, кожна з яких відповідає фазовій пластині визначеного об'єктива, і допоміжного мікроскопа, призначення якого – центрування кільцевої діафрагми стосовно фазової пластинки об'єктива.

Застосування фазово-контрастного пристрою не збільшує здатність мікроскопа, але дає можливість побачити прозорі об'єкти більш чітко і навіть виявити деякі структури в клітинах дріжджів. У роботі з фазово-контрастним пристроєм для вимірювання дріжджових клітин застосовують також гвинтовий окулярний мікрометр МОВ-1-15.

### **Хід роботи**

1. Визначити довжину та ширину дріжджових клітин.
2. Визначити середній розмір дріжджової клітини.

### **Завдання до теми**

1. Провести вимірювання розмірів дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Провести вимірювання розмірів клітин бактерій роду *Azotobacter* і роду *Clostridium*. Вивчити морфологію мікроорганізмів. Замалювати переглянуті препарати.

### **Контрольні питання**

1. Що являє собою окулярний мікрометр?
2. Що являє собою об'єктивний мікрометр?
3. Методика визначення розміру клітин мікроорганізмів.

**Література:** [1, с. 45–47; 3, с. 18–19; 4, с. 25–28; 9 с. 33–35].

## **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 і 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 недостатньо 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 непослідовна, 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. Древис, 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 практичних 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. \_\_\_\_\_ 2017 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