



Міністерство освіти і науки України  
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет агрономії та захисту рослин  
Кафедра землеробства та гербології ім. О.М. Можейка

## **ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ**

**Методичні вказівки до проведення лабораторних занять**

**для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти  
денної та заочної форм навчання зі спеціальності 201 – «Агрономія»**

**Харків  
2024**

Міністерство освіти і науки України  
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет агрономії та захисту рослин  
Кафедра землеробства та гербології ім. О.М. Можейка

## **ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ**

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти  
денної та заочної форм навчання зі спеціальності 201 – «Агрономія»

Затверджено  
рішенням навчально-методичної  
комісії факультету агрономії та  
захисту рослин  
Протокол № 14  
від 13 березня 2024 р.

Харків  
2024

УДК 579:578](072)  
З-14

Схвалено  
на засіданні кафедри землеробства та гербології ім. О.М. Можейка  
Протокол № 1 від 30.01.2024 р.

**Рецензенти:**

*Д.М. Грінченко*, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету;

*О.М. Казюта*, кандидат с.-г. наук, доцент кафедри ґрунтознавства Державного біотехнологічного університету.

З-14 Загальна мікробіологія з основами вірусології: метод. вказівки до проведення лабораторних занять для здобувачів спеціальності 201 – «Агрономія» / укладач О.Ю. Заярна / Держ. біотехнол. ун-т. – Харків, 2024. – 71 с.

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з загальної мікробіології складаються з семи лабораторних робіт, що охоплюють основні аспекти організації, обладнання та роботи в мікробіологічній лабораторії. Кожна лабораторна робота надає детальний опис необхідного обладнання та матеріалів, а також методики проведення експериментів. Роботи охоплюють такі теми, як правила роботи та поведінки в лабораторії, будова мікроскопу та методи приготування препаратів мікроорганізмів. Додатково, включені питання до самоконтролю, що допомагають студентам закріпити знання, отримані під час лабораторних занять. Курс охоплює важливі аспекти мікробіології, від структури бактерій до культивування та вивчення мікроорганізмів у ґрунті та ризосфері.

УДК 579:578](072)

© Заярна О.Ю., 2024

© Державний біотехнологічний університет, 2024

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>Лабораторно-практичне заняття №1</b> <b>ОРГАНІЗАЦІЯ, ОБЛАДНАННЯ І РОБОТА В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ</b> <b>ЛАБОРАТОРІЇ</b> .....	6
1. Правила роботи і поведінка в лабораторії.....	6
2. Будова мікроскопу і основні правила роботи з ним.....	7
3. Методи приготування препаратів мікроорганізмів.....	9
<i>Питання для самоконтролю</i> .....	12
<b>Лабораторно-практичне заняття № 2</b> <b>СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ ПРОКАРІОТ. ФАРБУВАННЯ</b> <b>ЗА ГРАМОМ</b> .....	13
1. Структура бактеріальної клітини прокаріот.....	13
2. Грампозитивні та грамнегативні бактерії. Диференціальний спосіб фарбування бактерій за Грамом.....	19
3. Фарбування спор.....	20
<i>Питання для самоконтролю</i> .....	22
<b>Лабораторно-практичне заняття № 3</b> <b>МОРФОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ МІКРООРГАНІЗМІВ</b> .....	23
1. Розміри бактерій. Визначення розмірів бактерій.....	23
2. Форми бактерій. Мікроскопічне дослідження форм бактерій.....	26
3. Культуральні ознаки бактерій.....	30
4. Визначення якісного складу мікроорганізмів за культуральними і морфологічними ознаками.....	31
<i>Питання для самоконтролю</i> .....	39
<b>Лабораторно-практичне заняття №4</b> <b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ</b> <b>КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ</b> .....	40
1. Живлення мікроорганізмів.....	40
2. Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів.....	46
3. Методи стерилізації.....	49
4. Посів мікрофлори повітря.....	50
<i>Питання для самоконтролю</i> .....	51
<b>Лабораторно-практичне заняття №5</b> <b>КУЛЬТИВУВАННЯ, ПОСІВ І ЗБЕРІГАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ</b> .....	52
1. Культивування мікроорганізмів.....	52
2. Техніка посіву мікроорганізмів на поживні середовища. Зберігання	53

мікроорганізмів.....	
3. Аналіз мікрофлори повітря.....	56
4. Посів мікрофлори води.....	58
<i>Питання для самоконтролю.....</i>	59
<b>Лабораторно-практичне заняття №6</b>	
<b>ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГРУНТУ.....</b>	60
<b>1. Відбір ґрунтових проб і підготовка їх до мікробіологічних аналізів.....</b>	60
<b>2. Виготовлення ґрунтової суспензії методом розведень.....</b>	61
<b>3. Виявлення ризосферних мікроорганізмів.....</b>	62
<b>4. Визначення загальної чисельності мікроорганізмів в ґрунті прямим</b> <b>    підрахунком під мікроскопом.....</b>	63
<i>Питання для самоконтролю.....</i>	64
<b>Лабораторно-практичне заняття №7</b>	
<b>ВИВЧЕННЯ МІКРОБНИХ ЦЕНОЗІВ ГРУНТУ І МІКРОФЛОРИ</b> <b>РИЗОСФЕРИ.....</b>	65
<b>1. Загальний склад і співвідношення ґрунтових мікроорганізмів.....</b>	65
<b>2. Мікроорганізми, що розкладають гумусові речовини.....</b>	66
<b>3. Розкладання мікроорганізмами свіжих органічних залишків з</b> <b>    утворенням гумусу.....</b>	68
<i>Питання для самоконтролю.....</i>	70
<b>СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	71

## ВСТУП

Мікробіологія як наука в останні роки досягла значних успіхів у вирішенні проблем загальної біології, біотехнології, імунології, геронтології, генетики, охорони навколишнього середовища та ін.

Мікробіологія вивчає морфологію, систематику, фізіологію і біохімію найдрібніших і найбільш поширених в природі, невидимих для неозброєного ока живих організмів, які за своїми розмірами дістали назву мікроорганізмів або мікробів. Завдяки діяльності мікроорганізмів відбувається кругообіг речовин у природі, обумовлюється родючість ґрунтів, забезпечується життєдіяльність людей, тварин і рослин.

**Метою курсу мікробіологія** є оволодіння теоретичними основами загальної мікробіології, вивчення найважливіших мікробіологічних процесів, які відбуваються в природі, і зокрема, в ґрунті та при переробці сільськогосподарської сировини з тим щоб навчитися цілеспрямовано управляти діяльністю мікроорганізмів на користь людини; практично впливати на окремі біологічні групи бактерій для підвищення родючості ґрунтів та продуктивності сільськогосподарських культур.

В результаті вивчення дисципліни студент повинен

**знати:**

- морфологію, систематику фізіологію і біохімію мікроорганізмів;
- суть найважливіших мікробіологічних процесів що відбуваються в природі;
- значення мікроорганізмів у виробництві, зберіганні та первинній переробці продукції рослинництва.

**вміти:**

- управляти мікробіологічними процесами, які проходять у ґрунті і впливають на його родючість;
- позитивно впливати на життєдіяльність корисних мікроорганізмів у посівах сільськогосподарських культур та при виробництві різних речовин, що базуються на промисловому використанні мікроорганізмів;
- управляти мікробіологічними процесами при одержанні біологічно активних речовин і енергії;
- застосовувати знання з курсу мікробіології при розробці заходів захисту сільськогосподарських культур від грибкових, бактеріальних і вірусних хвороб.

## Лабораторно-практичне заняття №1

### Тема: **ОРГАНІЗАЦІЯ, ОБЛАДНАННЯ І РОБОТА В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ**

1. Правила роботи і поведінка в лабораторії.
2. Будова мікроскопу і основні правила роботи з ним.
3. Методи приготування препаратів мікроорганізмів.

**Мета:** Ознайомити студентів з правилами роботи в лабораторії, будовою оптичного мікроскопу, правилами роботи з ним, навчитися готувати препарати мікроорганізмів.

**Матеріали і обладнання:** мікроскоп з набором окулярів і об'єктивів, імерсійне масло, фарбовані мазки з різними видами мікроорганізмів, культури мікроорганізмів, пробірки, чашки Петрі, колби, бактеріологічні голки, петлі, шпателі, штативи, предметні і покривні стекла.

#### 1. **Правила роботи і поведінка в лабораторії**

Студенти на практичних заняттях постійно повинні пам'ятати, що вони працюють з мікроорганізмами, які далеко не завжди можуть бути безпечні для здоров'я людини. При необережній роботі з матеріалом, що містить хвороботворчі мікроби, можна заразитися або стати джерелом розповсюдження інфекції. Тому при роботі в мікробіологічній лабораторії або на практичних заняттях з мікробіології необхідно завжди дотримуватися правил особистої і суспільної безпеки:

1. Працювати в лабораторії у спеціальному одязі (в халаті та шапочці).
2. У приміщенні лабораторії не приймати їжу і воду, не палити, не допускати зайвих розмов та непотрібних переходів.
3. Користуватися тільки своїм робочим місцем та закріпленим за ним обладнанням.
4. Дотримуватися чистоти і охайності в роботі, працювати сидячи. Після закінчення роботи ретельно продезінфікувати і вимити руки з милом.
5. Піпетки, предметні і покривні скельця, шпателі, ватні тампони та ін., що використовувалися у період роботи, вміщують у судину з дезінфікуючою рідиною (1% розчин хлораміну, 3% розчин

- фенолу). Пінцети, бактеріологічні петлі і інші металеві предмети фламбують у полум'ї газових пальників.
6. Всі використані матеріали (інфіковані рослини, відпрацьовані культури мікробів та тощо.) спалювати або знезаражувати стерилізацією у автоклаві. Ця робота проводиться співробітниками лабораторії.
  7. Стіл, одяг, взуття та інші предмети, що випадково забруднилися дослідницьким матеріалом або культурою мікроорганізмів (розбилася пробірка, впала крапля), піддаються негайній дезінфекції у присутності ведучого спеціаліста лабораторії, а на заняттях – у присутності викладача.
  8. Після закінчення роботи поставити в термостат засіяні чашки Петрі та пробірки. Культури мікроорганізмів і залишки матеріалу, що досліджували, здати викладачеві, а робоче місце привести у порядок і продезінфікувати.
  9. Проводити вологе прибирання і періодичну дезінфекцію всіх робочих приміщень і стерилізацію обладнання.

## 2. Будова мікроскопу і основні правила роботи з ним

Оптичний мікроскоп – це прилад, здатний давати збільшення у тисячу і більше разів. Він складається з двох основних систем: механічної і оптичної.

До **механічної** відноситься штатив. Нижня частина його має підковоподібну ніжку для опори мікроскопа. До штативу прикріплений предметний столик, який може переміщуватися у різних напрямках за допомогою двох гвинтів, розташованих по його боках. На верхній частині штатива закріплений *тубус* (трубка), нижня частина має спеціальний пристрій, що називається *револьвер* для закріплення об'єктивів. Тубус переміщується вгору і вниз макрометричним і мікрометричним гвинтами. Повний оберт мікрогвинта переміщує тубус на 0,1 мм.

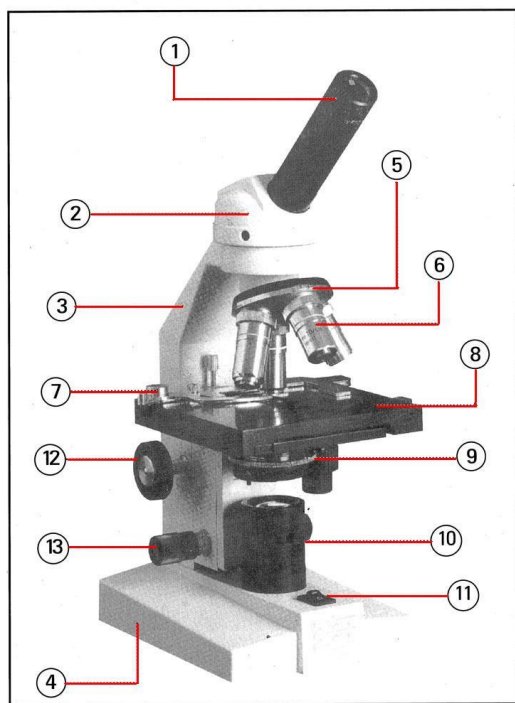
Оптична частина мікроскопа включає *освітлювальний пристрій, об'єктиви і окуляри*. До освітлювального пристрою відносять *дзеркало і конденсор*, що знаходяться під предметним столиком. Одна сторона дзеркала плоска, друга – увігнута. Плоскою поверхнею дзеркала користуються при використанні природного джерела світла, а увігнутим – тільки при штучному освітленні. Конденсор, що складається з двох лінз, збирає промені, що йдуть від дзеркала, і направляє їх на площину препарату, що роздивляються. Кількість світла регулюється діафрагмою, яка знаходиться у нижній частині конденсора. Об'єктив складається із систем лінз і визначає оптичну



потужність мікроскопа. Об'єктиви розділяють на *сухі* і *імерсійні*. Сухими (8х, 40х) користуються при збільшенні від 56 до 600 разів, коли між лінзою об'єктива і препаратом знаходиться повітря. При роботі з імерсійним об'єктивом (90х) попередньо на препарат наносять краплю імерсійного масла, потім опускають тубус і занурюють фронтальну лінзу об'єктива в імерсійне масло. Між склом і лінзою встановлюється гомогенне середовище, що попереджає розсіюванню променів, а потрапляння їх в об'єктив забезпечує добру видимість досліджуємих мікроорганізмів.

При розгляді бактерій майже завжди користуються імерсійним об'єктивом, який дає збільшення від 900 до 1350 разів. Окуляр знаходиться у верхній частині тубуса і складається з 2 лінз, вбираючої – нижньої до об'єктива і очної, зверненої до ока. Набір окулярів мікроскопа МБІ-1 дають збільшення у 7х, 10х, 15х разів. Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшень об'єктива і окуляра.

Для мікробіологічних досліджень застосовують мікроскоп МБІ-1 (рис.1). До більш складних мікроскопів, що використовуються для біологічних досліджень відносяться МБІ-2 та МБІ-3.



1. Окуляр
2. Насадка
3. Штатив
4. Основа
5. Револьверна головка
6. Об'єктиви
7. Координатний столик
8. Предметний столик
9. Конденсор з ірисовою діафрагмою
10. Освітлювач
11. Перемикач (вкл./вимк.)
12. Гвинт макрометричного (грубого) фокусування
13. Гвинт мікрометричного (точного) фокусування

Рис. 1. Будова мікроскопу МБІ-1

**Основні правила роботи з мікроскопом.** Мікроскоп вимагає обережності при користуванні ним і особливого догляду. Джерелом світла

може бути як природне сонячне, так і штучне освітлення спеціальними освітлювачами.

Задовільне освітлення всього поля зору встановлюється при малому збільшенні мікроскопа за допомогою дзеркала і конденсора, а також регулюванням відкриттям діафрагми.

Після встановлення освітлення приступають до вивчення препарату. Об'єктивами з малою збільшеною здатністю (8x, 40x) можна користуватися при розгляді дріжджових клітин і клітин пліснявих грибів. При мікроскопуванні більш дрібних об'єктів, бактерій або структур окремих клітин вказані об'єктиви непридатні. Звичайно для цих цілей застосовують імерсійний об'єктив (90x). Після нанесення на препарат краплі імерсійного масла дивлячись збоку за допомогою макрогвинта об'єктив обережно занурюють у масло нижче фокусної точки. Потім дивлячись в окуляр мікроскопа, повільно макрогвинтом піднімають тубус до гори, до появи у полі зору досліджуваного об'єкта. Тобто, фокусування зображення на мікробіологічному препараті виконують лише при піднятті об'єктива від предметного скла. У подальшому точно наводять поле зору обертами мікроскопічного гвинта, яким і користуються протягом всього часу мікроскопування. По закінченні роботи масло з об'єктива повинно бути відразу ж видалено, спочатку його знімають фільтрувальним папером, а потім чистою сухою батистовою серветкою. Для очищення об'єктива від засохлого імерсійного масла використовують бензол або ксилол. Цими речовинами змочують серветку і обережно протирають лінзу до повного видалення масла.

По закінченні роботи мікроскоп ретельно протирають і ставлять у футляр.

### **3. Методи приготування препаратів мікроорганізмів**

*Техніка взяття культури для приготування препарату.* Стерильною бактеріологічною петлею із пробірки з культурою, яку держать у лівій руці майже у горизонтальному положенні поблизу пальників, беруть невелику кількість мікробної маси. Перед взяттям культури правою рукою виймають ватну пробку з пробірки, затискаючи її між мізинцем і долонею, а краї пробірки обпалюють над полум'ям пальників. Петлю слід держати у правій руці великим, вказівним і середнім пальцями.

Якщо культуру беруть з рідкого середовища, не слід сильно нахилити пробірку, щоб не змочити її краї і пробку. Після взяття культури краї пробірки і пробку обпалюють у полум'ї і закривають пробірку.

**Дослідження живих клітин мікроорганізмів методами «роздавленої» та «висячої» краплі.** В обох випадках можливе фарбування об'єкта однією

фарбою – метиленовий синій або нейтральний червоний у концентраціях від 0,001 до 0,0001%.

Обидва методи застосовують для виявлення рухливості клітин мікроорганізмів, спостережень за розмноженням, утворенням і проростанням спор, встановлення реакції мікроорганізмів на хімічні сполуки і фізичні фактори дії, вивчення розміру клітин, характеру їх розташування і визначення запасних речовин клітини.

Препарати мікроскопують, злегка затіняючи поле зору; конденсор трішки спускають, надходження світла регулюють увігнутих дзеркалом. Спочатку користуються малим збільшенням – об'єктив 8х, після того як знаходять краї краплі, встановлюють об'єктив 40х або імерсійний (90х). Більш чіткі результати можна отримати при мікроскопії у темному полі або у фазовому контрасті.

У випадку використання *метода роздавленої краплі* на чисте предметне скло наносять краплю дистильованої води. В неї вносять культуру і змішують з водою. Накривають краплю покривним склом так, щоб під ним не утворювалися кульки повітря. Скляною паличкою натискають покривне скло до предметного і видаляють надлишок води фільтрувальним папером, підносячи її до краю покривного скла. При розгляді приготованого препарату під мікроскопом з імерсійним об'єктивом на покривне скло наносять краплю кедрового масла.

Для тривалих спостережень за клітинами мікроорганізмів застосовують *метод висячої краплі*. На стерильне покривне скло наносять голкою негусту суспензію мікроорганізмів, що вирощені на рідкому поживному середовищі або підготовлені для даної мети у фізіологічному розчині (0,5 %-ний NaCl). Покривне скло перевертають і поміщають на стерильне предметне з лункою посередині так, щоб крапля вільно звисала над лункою. Для герметичності краї лунки змазують вазеліном.

**Фіксовані препарати мікроорганізмів.** В мікробіології часто застосовують такі препарати. Їх розглядають під мікроскопом зафарбованими. Під фіксацією розуміють таку обробку живого об'єкта, який дає можливість швидко зупинити життєві процеси, зберігши його тонку структуру. В результаті фіксації, клітини міцно прикріплюються до скла і краще зафарбовуються. Фіксація необхідна і у випадку роботи з патогенними мікроорганізмами (для безпеки).

*Приготування мазка.* На чисте знежирене предметне скло наносять краплю дистильованої води. Для знежирення скла використовують суміш етилового спирту і сірчаного ефіру у співвідношенні 1:1. Цю операцію проводять подалі від горілок. Стерильною бактеріологічною петлею з пробірки,

яка містить культуру, беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю води. Краплю ретельно розмазують петлею по склу на площі приблизно 4 см<sup>2</sup>.

Густу суспензію спочатку розводять водою. Стерильною петлею беруть трошки суспензії і переносять у краплю води на інше предметне скло. Суспензію нормальної густоти розмазують тонким шаром по склу, потім мазок сушать на повітрі при кімнатній температурі або при слабкому нагріванні, держачи препарат високо над полум'ям пальників. Сильний нагрів препарату при сушінні не рекомендується, так як білки клітин згортаються, змінюючи їх структуру і форму. Висушений препарат фіксують.

*Фіксацію мазка* проводять на полум'ї пальників (при дослідженні форми клітин) або за допомогою хімічних сполук (при дослідженні внутрішньої структури клітин). У першому випадку препарат 3 -4 рази повільно проводять нижньою стороною на полум'ї пальників. У другому використовують хромові сполуки, формалін, ацетон.

Один із розповсюджених способів фіксації – обробка препарату 96%-ним спиртом або сумішшю рівних об'ємів етилового спирту та ефіру (рідина Никіфорова). Для цього препарат занурюють на деякий час у фіксуючу рідину.

*Зафарбовування препарату.* При фарбуванні мазка препарат вміщують на бактеріологічний місток. На мазок наносять декілька крапель барвника. У залежності від виду барвника і мети досліджень тривалість фарбування змінюється від 1 до 5 хвилин, у окремих випадках до 30 хвилин і довше. Після закінчення фарбування препарат промивають водою, фільтрувальним папером видаляють воду, підсушують на повітрі і мікроскопують.

Існують *прості і диференційовані* методи забарвлення. При простому використовується один барвник, наприклад метиленовий синій, фуксин в лужних або карболовий розчинах. При диференційованому забарвленні різними барвниками зафарбовуються окремі структури клітини, до них відносяться фарбування за Грамом, та тощо.

Для забарвлення мікроорганізмів застосовують *кислі та основні* барвники. Перші вступають у реакцію з речовинами основної, другі – кислотної природи. Оскільки в білках є основні (NH<sub>2</sub>) і кислотні (COOH) радикали, клітинні структури добре фарбуються тими і другими барвниками.

*Із основних барвників найбільш часто застосовують:* червоні – нейтральний червоний, піронін, сафранін, гематоксилін, тионін; сині – вікторія, метиленовий синій; фіолетові – генціанфіолетовий, кристалічний фіолетовий, метиленовий фіолетовий; зелені – янус зелений, метиленовий зелений; коричневі – везувін, хризоїдин; чорні – індулін. *Кислі барвники:* червоні – рожеві – кислий фуксин, еритрозин; чорні – нігрозин; жовті – конго, пікринова

кислота, флуоресциїн. Барвники можна поділити на *позитивні і негативні*. Позитивні барвники фарбують клітини при кімнатній температурі протягом 30-60 с; негативні – навколобактеріальний простір. В результаті клітини мають вигляд силуетів на фоні барвника.

Деякі мікроорганізми (наприклад спірохети) і окремі структури (позаклітинний слиз), які погано виявляються за допомогою позитивних барвників, легко виявляються при фарбуванні препаратів негативними барвниками. Спори без відповідної обробки не фарбуються, тому при забарвленні клітин бацил та кластридій, позитивними барвниками, вони зафарбовуються наче негативним способом: мають вигляд включень в негативних клітинах, що переломлюють світло.

### **Питання до самоконтролю.**

1. Перерахуйте основні правила роботи в мікробіологічній лабораторії?
2. Будова мікроскопа, та його основні деталі?
3. Яка техніка взяття культури для приготування препарату?
4. Яка методика виготовлення препарату «роздавлена крапля»?
5. Яка методика виготовлення препарату «висячої краплі»?
6. Яка техніка приготування фіксованого мазка?
7. Які відомі способи фіксації мазка?
8. Яка методика фарбування за простого фарбування?
9. Які Вам відомі диференційні методи фарбування препарату?
10. Які відомі позитивні та негативні барвники?

## Лабораторно-практичне заняття № 2

### Тема: СТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ ПРОКАРІОТ. ФАРБУВАННЯ ЗА ГРАМОМ

4. Структура бактеріальної клітини прокариот.
5. Грампозитивні та грамнегативні бактерії. Диференціальний спосіб фарбування бактерій за Грамом.
6. Фарбування спор.

**Мета:** Ознайомити студентів із поверхневими та внутрішніми структурами бактеріальної клітини, навчити розрізняти мікроорганізми за спороутворенням та забарвленням за Грамом.

**Матеріал і обладнання:** Мікроскоп, предметні і покривні скельця, шматочки фільтрувального паперу, бактеріологічна петля, пальники, піпетка, дистильована вода, зливна чаша, культура маслянокислих бактерій, настій сіна, карболовий фуксин Ціля, 2 % розчин метиленової синьки, 33% спирт, фуксин Пфейффера, генціан-фіолетовий, розчин Люголя, 96% спирт, триденна плівка ацетатових бактерій, суміш дріжджів, амоніфікуючі бактерії.

#### 1. Структура бактеріальної клітини прокариот.

**Прокаріоти** – це без'ядерні, переважно одноклітинні організми, до яких належать бактерії та археобактерії.

До структур бактеріальної клітини відносять: основні структури - клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, цитоплазма із різними цитоплазматичними включеннями, нуклеоїд; тимчасові структури (клітина їх має на певних етапах життя) – капсули, джгутики, ендоспори та структури, які притаманні окремим групам прокариот (мезосоми, хроматофори тощо) (рис. 2).

#### Поверхневі структури бактеріальної клітини.

До поверхневих структур прокариотичної клітини відносять клітинну стінку, капсули та слиз, джгутики, ворсинки та пілі.

**Клітинна стінка.** Більшість прокариотів, подібно до клітин рослин і грибів, мають клітинну стінку, яка є щільною, еластичною структурою.

**Клітинна стінка** – це тверде, тонке еластичне утворення, яке забезпечує збереження форми клітини. Іншими функціями її є: бар'єрна, захисна, визначає

поверхневий заряд клітини, відповідає за здатність бактерій адсорбувати фаги, має антигенний комплекс.

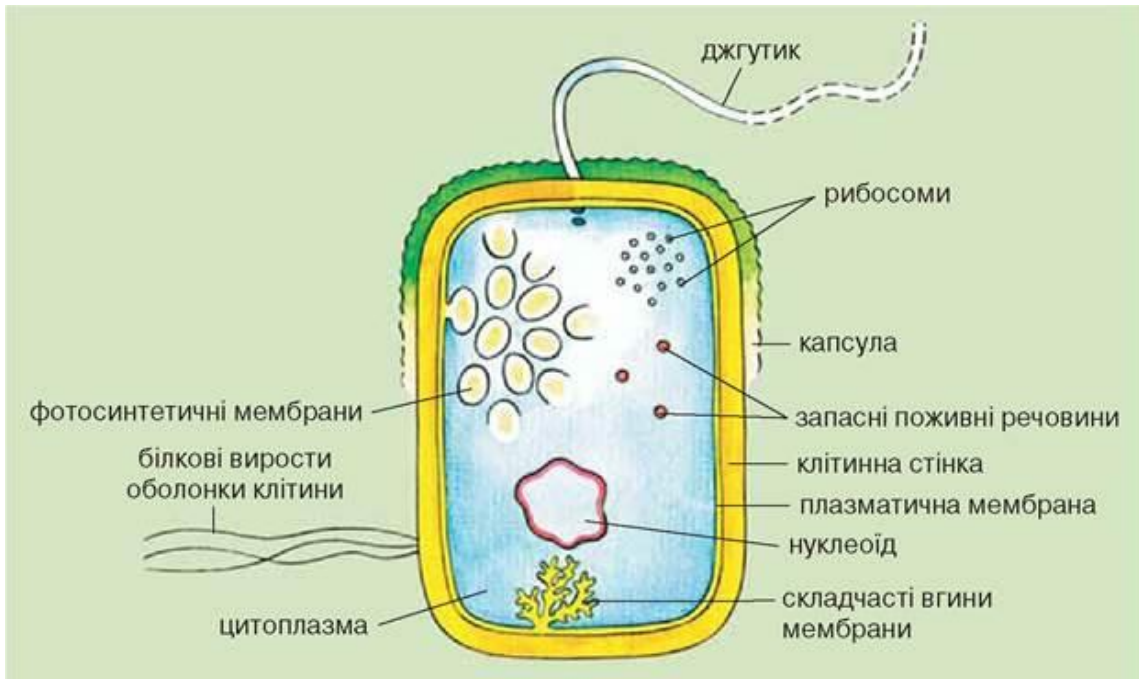


Рис. 2. Структури бактеріальної клітини.

Бактерії, що мають клітинну стінку, залежно від її структури поділяються на фірмікути (товстошкірі) і грацилікути (тонкошкірі). Інакше їх можна ще поділити на грампозитивні і грамнегативні – за здатністю забарвлюватися за методом Грама (рис. 3).



Рис. 3. Схематична будова клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій.

До складу клітинної стінки грампозитивних входить від 40% до 90% пептидоглікану (муреїну). З муреїном зв'язані тейхоєві кислоти – вони є тільки у грампозитивних бактерій. В муреїновий каркас вплетена незначна кількість білків і ліпідів. Клітинна стінка має гомогенну губчасту структуру, пронизану порами і щільно прилягає до цитоплазматичної мембрани.

Клітинна стінка грамнегативних бактерій багат шарова, товщина її 14 - 17 нм. Внутрішній шар клітинної оболонки представлений муреїном, на долю якого припадає від 1 до 10 % її сухої маси. Зовнішній шар клітинної стінки (зовнішня мембрана), утворений фосфоліпідами, ліпополісахаридами, ліпопротеїдами і білками. Основною фракцією зовнішньої мембрани – є ліпіди, які складають 22 % сухої маси клітинної оболонки. Під пептидоглікановим шаром міститься внутрішня цитоплазматична мембрана, до складу якої також входять фосфоліпіди, білки. Структури клітинної стінки грамнегативних бактерій відділені від цитоплазматичної мембрани і розділені між собою електронно-прозорим проміжком, який дістав назву *периплазматичного простору (периплазма)*.

**Капсули та слиз.** Зовні клітинної стінки всі бактерії оточені слизовим шаром, який має різну товщину і конфігурацію, його межі не чіткі. Якщо слизовий шар досить товстий, міцний і оформлений, його називають капсулою. Морфологічно розрізняють два типи капсул: мікрокапсули (товщина менше 0,2 мкм, виявляються тільки при електронній мікроскопії у вигляді шару мукополісахаридних фібрил) і макрокапсули (товщина більше 0,2 мкм, добре помітні при світловій мікроскопії). Основна функція капсули – захисна. Вона захищає бактеріальну клітину від дії несприятливих факторів навколишнього середовища, від механічних пошкоджень, висихання, створює додатковий осмотичний бар'єр, служить перешкодою для проникнення токсичних речовин, фагів. Капсули і слизисті шари не є життєво необхідними компонентами бактеріальної клітини. Можуть бути як капсульні, так і безкапсульні штами. Хімічний склад капсули (98% складає вода) родо-, видо-, і штам- специфічні. За хімічним складом капсули поділяються на капсули вуглеводної природи, які складаються із гомополісахаридів і гетерополісахаридів, а також капсули, які складаються із поліпептидів і полісахаридів. Капсула утримується на поверхні клітинної оболонки в основному за рахунок іонних зв'язків, у деяких бактерій – ковалентними. В утворенні капсул бере участь цитоплазматична мембрана.

**Будова і характер розміщення джгутиків.** Джгутики є органом руху бактерій. Багато патогенних бактерій нерухомі, джгутиків не мають. Рухливі бактерії пересуваються за допомогою джгутиків. За характером розміщення джгутиків бактерії поділяються на наступні групи: (рис 4):

1. Монотрихи – клітини мають один полярно розміщений джгутик.



2. Лофотрихи – клітини мають пучок джгутиків на одному з полюсів. (*Pseudomonas*, *Thiospirillum*);
3. Амфитрихи – клітина має по одному джгутику або по пучку джгутиків на обох полюсах (спірили);
4. Перитрихи – джгутики розміщені по всій поверхні тіла (*Proteus*).

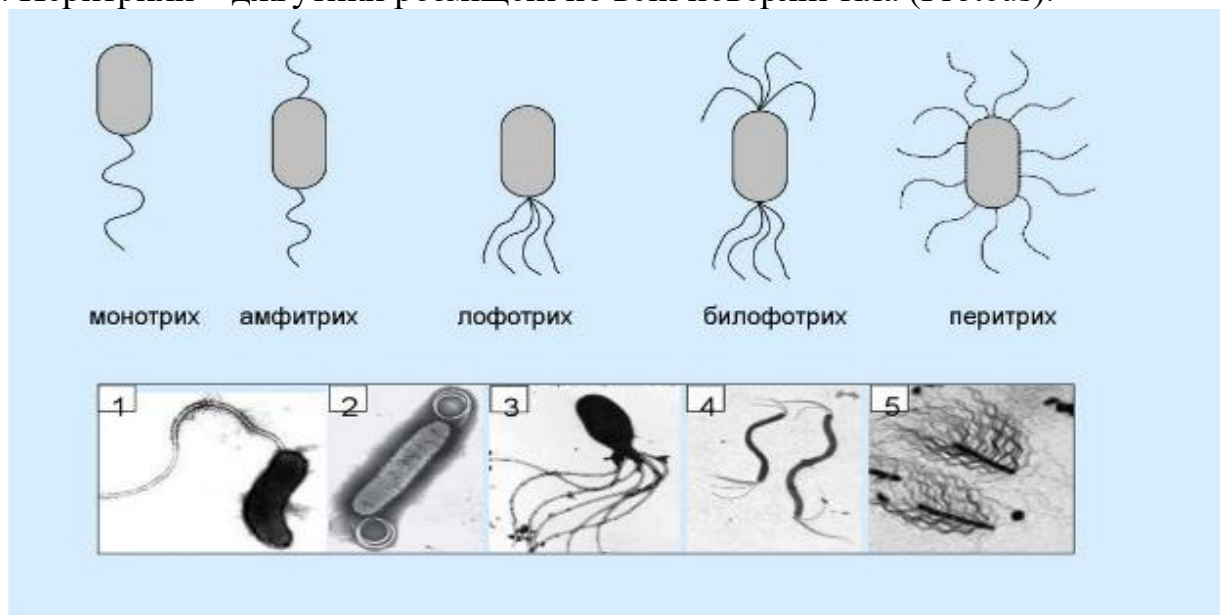


Рис. 4. Характер розміщення джгутиків на поверхні клітини

**Будова, типи і функції ворсинок.** Під електронним мікроскопом на поверхні бактеріальних клітин видимі тонкі ниткоподібні структури, які дістали назву фімбрій, або ворсинок. За розмірами вони тонші і коротші від джгутиків. Довжина їх 0,3–4 мкм, а діаметр 5–10 нм. Ворсинки за будовою є прямими порожнистими циліндрами, які відходять від цитоплазматичної мембрани. Вони складаються із спеціального білка піліну. На поверхні клітини війок може бути від 1–2 до декількох тисяч. Війки можуть мати всі форми бактерій. Функції війок не пов'язані із рухом бактерій. За морфологією, функціями і властивостями нині описано 9 різних типів фімбрій, але найкраще вивчені фімбрії двох типів. Війки першого типу виконують функцію прикріплення клітини до поверхні субстрату, вони беруть участь у транспорті метаболітів, а також захищають бактерію від паразитів. Війки другого типу називають статевими фімбріями, або F- пілі. Статеві ворсинки беруть участь під час кон'югації бактерій. Кінець статевої війки клітини-донора, прикріплюється до білка зовнішньої мембрани клітини-реципієнта. Вважають, що по цитоплазматичному містку через канал F- пілі, або безпосередньо по її каналу проходить передача матеріалу ДНК з клітини-донора в клітину-

реципієнта. Статеві пілі здатні відростати за 4-5 хв, і також швидко скидаються клітиною, що свідчить про активність даної структури.

## Мембрана та її похідні

**Цитоплазматична мембрана (ЦПМ)** оточує цитоплазму бактеріальної клітини і завдяки тургору прилягає до клітинної стінки. Вона складається з подвійного шару фосфоліпідів. Гідрофобні кінці молекул фосфоліпідів і тригліцеридів спрямовані всередину, а гідрофільні «голівки» – назовні. У подвійний шар ліпідів вбудовано білки – так звані інтегральні білки мембран. Вони «плавають» у цьому шарі, пронизуючи його наскрізь або занурюючись в нього частково. Інші білки (периферійні) прикріплені до поверхні ЦПМ (рис. 5).



Рис. 5. Схематична будова цитоплазматичної мембрани

Цитоплазматична мембрана являє собою дуже м'яке, пластичне, майже рідке утворення. У бактерій вона відіграє основну роль в обміні речовин, є осмотичним бар'єром клітини і контролює надходження речовин всередину клітини і вихід назовні продуктів метаболізму. У мембрані є механізми активного транспорту речовин і системи субстратспецифічних ферментів пермеаз. В ній здійснюється синтез мембранних ліпідів, компонентів клітинної стінки і капсули.

У аеробних бактерій часто спостерігають інвагінації ЦПМ у вигляді ламел, трубочок чи пухирців. Їх називають мезосомами. Вважають, що мезосоми виконують функцію мітохондрій у прокаріотичній клітині, оскільки в них локалізовані окислювальні ферменти і ферменти транспорту електронів. Також мезосоми беруть участь у формуванні поперечної перегородки при поділі клітини.

У фотосинтетичних бактерій інвагінації ЦПМ можуть містити фотосинтетичний апарат і брати участь у фотосинтезі. Такі структури називають хроматофорами або пластинчастими тилакоїдами.

### **Внутрішньоклітинні структури, цитоплазма та включення**

**Генетичний апарат** бактерій представлений утворенням, яке дістало назву нуклеоїд (ядроподібне). Нуклеоїд функціонально тотожний ядру еукаріот, але відрізняється деякими особливостями: не має ядерної оболонки, перебуває у безпосередньому контакті з цитоплазмою, не розділений на хромосоми і є аналогом хромосоми еукаріот. Сама молекула ДНК є у формі замкнутого кільця. На відміну від більшості еукаріотів, геном прокаріотів гаплоїдний. Відсутній мітоз і мейоз. Молекули ДНК прокаріотів не зв'язані з гістоновими білками.

Бактерії можуть також містити у цитоплазмі автономну позахромосомну ДНК у вигляді невеликих кілець. Це **плазмід**, які детермінують синтез білків і ферментів, у тому числі й тих, що забезпечують стійкість бактерій до лікарських препаратів. Однак вони не є життєвонеобхідними для бактеріальної клітини і можуть бути відсутніми. Бактерії можуть обмінюватись плазмідами між собою, цей процес дістав назву горизонтальний перенос генів (трансдукція).

**Рибосоми** – це тільця розміром 16-18 нм, вони складаються із РНК (60-65 %), і білка (35-40 %). За амінокислотним складом білок рибосом прокаріот подібний до рибосом еукаріот, але в ньому відсутній триптофан і сірковмісні амінокислоти. Бактеріальна клітина містить від 1500 до 50000 рибосом, кількість яких змінюється протягом її розвитку. Рибосома побудована з двох рибонуклеопротейдних субодиниць: малої 30 S і великої 50 S. Більша частина рибосом об'єднана в полісом-агрегати, які складаються із рибосом і молекул іРНК. Рибосоми є місцем синтезу білка з амінокислот.

### **Цитоплазма та цитоплазматичні включення**

**Цитоплазма (мезозоль)** бактерій займає основний об'єм клітин і є середовищем, яке зв'язує всі внутрішньоклітинні структури в єдину систему. Це напіврідка колоїдна маса, що складається на 70–80 % з води, мінеральних сполук, РНК, білків, ферментів, продуктів і субстратів обміну речовин.

В цитоплазмі є **включення**, які не мають мембрани. Включення бувають двох типів: ті, які виконують функцію запасних поживних речовин; і ті, які містять продукти клітинного метаболізму. Запасні речовини утворюються у

клітині в результаті обміну речовин і їх утворення залежить від умов культивування мікробів. *Запасними поживними речовинами* можуть бути: полісахариди (глікоген, крохмаль); поліфосфати (волютин); сполуки сірки; ліпіди (полімер  $\beta$ -окислення масляної кислоти); поліпептиди (у ціанобактерій – полімер аргініну і аспарагінової кислоти). *Продукти обміну*: деякі білки, сірка, карбонат кальцію. У ціанобактерій виявлені так звані газові вакуолі, які виконують функцію регуляторів плавучості.

## 2. Грампозитивні та грамнегативні бактерії

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 р. датським вченим Г. Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні), а інші бактерії забарвлюються у червоний або рожевий колір (грамнегативні). Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового фіолетового барвника (генціан-віолет) з йодом після обробки мазка спиртом утримується клітинною стінкою одних бактерій і вимивається з покривів інших, тому для їх визначення необхідно використовувати додатковий барвник, і для полегшення диференціювання обирають контрастний – червоний. Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синє-фіолетовий колір відображає фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів. Донедавна розглядалися різні теорії, що пояснюють диференційне забарвлення бактерій за Грамом (наприклад, хімічна, мембранна, ізоелектрична). Згідно сучасних уявлень, після проникнення у клітини розчинна хлорна форма генціан-віолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає у осад, при цьому забарвлюється цитоплазма клітини. При обробці препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) із цитоплазматичної мембрани екстрагуються ліпіди, це призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціан-віолет-йод. Але зазвичай клітина має муреїновий шар (різної товщини та пористості у різних бактерій), який характеризується високою стійкістю до органічних розчинників. Багат шаровий малопористий муреїновий шар перешкоджає вимиванню барвника – клітини забарвлюються у синє-фіолетовий колір (грампозитивно), а при наявності моношару муреїну із крупними порами, клітини забарвлюються за Грамом негативно. Слід зауважити, що характер забарвлення прокаріот за Грамом залежить від віку культури, факторів зовнішнього середовища тощо.

## Диференціальний спосіб забарвлення бактерій за Грамом

*Хід роботи:*

1. На чисте знежирене предметне скло нанести по краплі різних культур (ацетатні мікроорганізми, дріжджі) і зробити мазок.

2. На зафіксовані у полум'ї пальника мазки покласти невеликі клаптики фільтрувального паперу та нанести на нього 1–2 краплі генціан-фіолетового барвника так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла, легко натиснути на папір бактеріальною петлею. Витримати 2 хв.

3. Пофарбований папір зняти та забарвити препарати розчином Люголя – 2 хв, при цьому препарати потемніють.

4. Розчин Люголя злити й обробити препарати 96% етиловим спиртом (1–2 краплі) – 30-60 сек. (нанести кілька крапель спирту, зачекати 10-15 сек., злити, процедуру повторити 2-3 рази, в залежності від товщини мазків та інтенсивності попереднього фарбування, доки крапля спирту, що стікатиме з препарату, стане зовсім безбарвна). На операцію знебарвлення спиртом треба звертати особливу увагу, бо якщо недостатньо обробити спиртом, то усі бактерії зберігають колір, при обробці надміру – усі знебарвлюються.

5. Препарати промити дистильованою водою.

6. Дофарбувати препарати розведеним фуксином протягом 1 хв.

7. Барвник змити водою, препарати висушити та мікроскопувати з імерсійним маслом. Мікрокартина: грампозитивні – фіолетові, грамнегативні – рожеві чи червоні.

8. Визначити, яка з запропонованих культур є грампозитивною, а яка – грамнегативною.

До грампозитивних мікроорганізмів належать більшість кулястих бактерій і паличковидних бацил (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Clostridium Pasteurianum*), а також дріжджі. Грамнегативні мікроорганізми – ацетатні і азотфіксуючі вільноживучі бактерії, спірили, спірохети, безспорові палички (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*).

9. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

### 3. Забарвлення спор

У певні періоди життя (коли бракує поживних речовин, наприклад при накопичуванні продуктів обміну, при висиханні тощо) більшість бактерій утворюють спори.

**Спороутворення** – це пристосування бактерій до несприятливих умов навколишнього середовища, а також один із етапів їх розвитку. У стадії спори бактерії не живляться і не розмножуються. У більшості випадків кожна

бактеріальна клітина утворює тільки одну спору. Процес спороутворення проходить за 1,5–32 год.

Спори дуже стійкі проти різних несприятливих зовнішніх умов. Вони легко переносять вплив високих температур (навіть до 140°C), чималі концентрації отруйних речовин, висушування тощо. Спороутворення розпочинається з того, що протоплазма бактерій поступово стягується до центру або до одного з кінців клітини, ущільнюється, втрачає значну частину води й вкривається важкопроникною для речовин оболонкою. Після цього оболонка материнської клітини відмирає, розчиняється і спора починає самостійне існування. Коли настають сприятливі умови, спори проростають і перетворюються в нормальні вегетативні клітини.

Спороутворення властиве переважно паличкоподібним бактеріям і є досить сталою видовою систематичною ознакою (розподіл на роди *Bacterium* і *Bacillus*). Розмір, форма і положення спори в клітині характерні для кожного виду. Спори можуть мати *центральне*, *субтермінальне* (прикінцеве) і *термінальне* (на кінцях) розташування в клітині (рис. 6.).



Рис. 6. Типи розташування спор у клітині:  
1–центральний (бацилярний); 2–субтермінальний (бацилярний);  
3,5–плектридіальний; 4–кlostридіальний.

Якщо діаметр спори не перевищує діаметра клітини, її називають *бацилярною*, якщо перевищує і спора розташована в центрі – *кlostридіальною*, а якщо спора більша клітини і розташована на одному з кінців – *плектридіальною*.

У зв'язку з особливостями фізико-хімічного складу спор і щільністю малопрониклої оболонки при їх забарвленні спочатку застосовують хімічні речовини, які змінюють структуру оболонки, а вже потім додатково забарвлюють плазму спори контрастним барвником.

*Хід роботи:*

*Метод Ауескі.*

1. Приготувати висушений і фіксований мазок із культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка) і маслянокислих бактерій.

2. Мазок накрити шматком фільтрувального паперу й обробити карболовим Фуксином Ціля. Препарат нагрівати над полум'ям до появи парів повітря, але не доводити до кипіння. По мірі випаровування барвника треба 3-4 рази підливати карболовий фуксин, щоб мазок не підсихав. Насичення мазка в карболовому фуксині проводити протягом 5-7 хв, при цьому клітини й спори рівномірно забарвлюються в червоний колір.

3. Папір зняти, препарат промити водою над зливною чашою і висушити фільтрувальним папером з нижньої сторони препарату.

4. Для знебарвлення цитоплазми клітин, але не спор, препарат обробити 1%-ним розчином сірчаної або соляної кислоти протягом 15-30 с. або 33 %-ним спиртом 1-2 хв. Тривалість знебарвлення дуже коливається і залежить від особливостей препарату, тому дати загальні вказівки неможливо. Коливання можуть бути від кількох секунд до кількох хвилин. Наприклад, при виготовленні препарату спор амоніфікуючих бактерій, рекомендується знебарвлювати цитоплазму протягом 16-18 с.

5. Препарат промити водою, підсушити і забарвити метиленою синькою протягом 1-2 хв.

6. Злити барвник, промити водою, висушити і мікроскопувати за допомогою імерсійної системи.

Забарвлення буде тоді контрастним, коли спори червоного кольору будуть чітко виділятися на блакитному фоні цитоплазми клітини.

7. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

### **Питання до самоконтролю**

1. Назвіть структурні компоненти клітин прокаріот.
2. У чому відмінність грампозитивних та грамнегативних бактерій?
3. Як поділяються бактерії за характером розміщення джгутиків на поверхні клітини?
4. Що таке спороутворення?
5. Назвіть типи розташування спор у клітині.

## Лабораторно-практичне заняття № 3

Тема: **МОРФОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ МІКРООРГАНІЗМІВ.**

5. Розміри бактерій. Визначення розмірів бактерій.
6. Форми бактерій. Мікроскопічне дослідження форм бактерій.
7. Культуральні ознаки бактерій.
8. Визначення якісного складу мікроорганізмів за культуральними і морфологічними ознаками.

**Мета:** Ознайомити студентів із морфологічними і культуральними ознаками мікроорганізмів, навчити розрізняти мікроорганізми за основними таксономічними одиницями.

**Матеріал і обладнання:** Мікроскоп, окуляр-мікрометр, об'єкт-мікрометр, предметні і покривні стекла, бактеріологічна петля, пальники, піпетка, дистильована вода, полоскальниця, кисле молоко, овочевий розсол, культура маслянокислих бактерій, настій сіна.

### Морфологічні ознаки мікроорганізмів

При визначенні виду бактерій і актиноміцетів враховуються морфологічні, культуральні і фізіолого-біохімічні ознаки, а у останніх також і хімічних склад клітинної стінки.

#### 1. Розміри бактерій

Розміри бактерій вимірюються у мікрометрах ( $1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$ ), розміри внутрішніх структур бактеріальних клітин – у нанометрах ( $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$ ). Розміри бактерій, які спричиняють патологію людини, звичайно перебувають у межах 0,1–10 мкм. Типові коки мають близько 1 мкм у діаметрі, мікоплазми – 0,1–0,3 мкм, більшість паличок 2–5 мкм завдовжки і 0,5–1,0 мкм завтовшки, спірохети відповідно 3–20 мкм і 0,1–0,5 мкм.

Розміри мікроорганізмів можуть змінюватись в залежності від віку культури, складу середовища та інших чинників. Порівняно з еукаріотами, прокаріоти мають дуже малий розмір, що і визначає особливості їх біологічних властивостей.

Швидкість з якою поживні речовини і продукти метаболізму дифундують через мембрану клітини – це величина оберненопропорційна розміру клітини. Чим менший розмір клітини, тим більше відношення площі до



об'єму, тим ефективніший обмін речовин з навколишнім середовищем. Це обумовлює високу активність метаболізму мікроорганізмів. Це можна чітко прослідкувати на прикладі сферичних клітин (площа і об'єм кулі).

r – радіус	r = 1 мкм	r = 2 мкм
S – площа поверхні	$S = 4\pi r^2 = 12,6 \text{ мкм}^2$	$S = 4\pi r^2 = 50 \text{ мкм}^2$
V – об'єм	$V = 4/3\pi r^3 = 4,2 \text{ мкм}^3$	$V = 4/3\pi r^3 = 33,5 \text{ мкм}^3$
S/V – активність взаємодії з навколишнім середовищем	S/V = 3	S/V = 1,5

В мікробіології використовують також правило Рубнера: інтенсивність обміну речовин в стані спокою пропорційна не масі тіла, а його поверхні. Порівняння інтенсивності метаболізму бактерій і тварин показує, що вона на кілька порядків вища, ніж у тварин, відповідно у них також вищі темпи росту.

### Визначення розмірів бактерій

Для визначення розмірів бактерій користуються окуляр-мікрометром і об'єкт-мікрометром.

Об'єкт-мікрометр використовують для визначення збільшення об'єктів і ціни поділки барабана окуляр-мікрометра. Об'єкт-мікрометр – металева пластина, в центрі якої є кругле віконце у вигляді предметного скельця. На цьому скельці вигравірувана лінійка на 100 поділок довжиною 1 мм, тобто кожна поділка дорівнює 0,01 мм, або 10 мкм. Окуляр-мікрометр використовують для вимірювання розмірів бактерій. Він складається із корпусу, окуляра з діоптричним механізмом, лічильного барабана з поділками і затискача для закріплення на тубусі мікроскопа. У полі зору окуляр-мікрометра (рис. 7.) видно нерухому лінійку на 8 поділок і рухомі деталі: біштрих і перехрестя, які пересуваються з допомогою барабана.

Для визначення розмірів бактерій необхідно:

1. Визначити ціну поділки шкали барабана окуляр-мікрометра за допомогою лінійки окуляр-мікрометра;
2. Знайти кількість поділок шкали барабана окуляр-мікрометра, в яких вміщується бактеріальна клітина;
3. Визначену кількість поділок шкали барабана, в яких вміщується бактерія, помножити на ціну поділки шкали барабана окуляр-мікрометра при відповідному збільшенні мікроскопа.

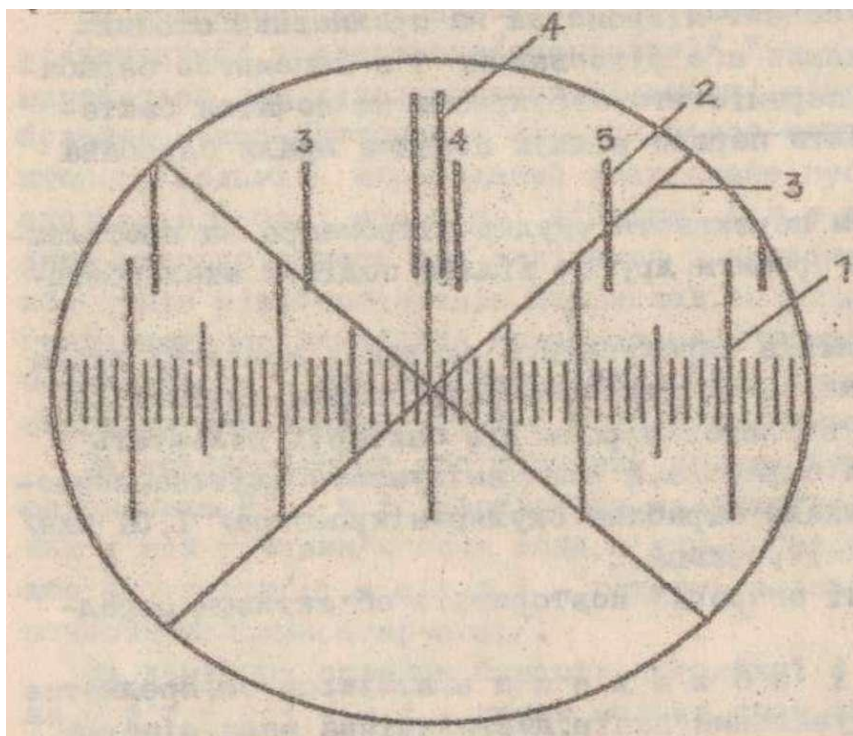


Рис. 7. Загальний вигляд лінійок окуляр- і об'єкт-мікрометрів: 1—лінійка об'єкт-мікрометра; 2—лінійка окуляр-мікрометра; 3—перехрестя; 4—біштрих.

*Хід роботи:*

1. На предметному столику мікроскопа з допомогою затискувачів закріпити об'єкт-мікрометр і знайти чітке зображення лінійки при малому збільшенні мікроскопа.

2. Замість окуляра на тубусі встановити окуляр-мікрометр, закріпити його гвинтом і знайти чітке і симетричне зображення лінійки об'єкт-мікрометра по відношенню до лінійки, біштриха і перехрестя окуляр-мікрометра.

3. Для визначення ціни поділки шкали барабана окуляр-мікрометра за допомогою барабана встановити перехрестя на одну із великих поділок лінійки об'єкт-мікрометра.

4. Зробити перший відлік поділок лінійки об'єкт-мікрометра і шкали барабана окуляр-мікрометра. Для цього відлічити по лінійці окуляр-мікрометра перше число між перехрестям і біштрихом. Наприклад, на рис. 7 перше число буде 3, а друге і третє (по шкалі барабана окуляр-мікрометра) – поділка 41, а разом – 341.

5. Другий відлік поділок зробити після переміщення перехрестя і біштриха окуляр-мікрометра на 10 малих поділок лінійки об'єкт-мікрометра (наприклад, 242).

6. Знайти різницю між першим і другим відліками (341-242=99). Отже для переміщення перехрестя на 10 поділок лінійки об'єкт-мікрометра довжиною 100 мкм (10 поділок × 10 мкм) необхідно 99 поділок шкали барабана окуляр-мікрометра.

7. Визначити ціну поділки шкали барабана окуляр-мікрометра за математичною пропорцією:

$$\begin{aligned} 99 \text{ поділок} &= 100 \text{ мкм,} \\ \text{а } 1 \text{ поділка} &= x \text{ мкм} \end{aligned}$$

$$x = \frac{1 \times 100}{99} = 1,01 \text{ мкм}$$

Таким чином, ціна поділки шкали барабана окуляр-мікрометра при малому збільшенні мікроскопа становить 1,01 мкм.

8. Замість лінійки об'єкт-мікрометра на предметний столик встановити препарат (живий або фіксований) і за допомогою барабана окуляр-мікрометра перемістити перехрестя на початок бактеріальної клітини. Зробити перший відлік поділок шкали барабана окуляр-мікрометра.

9. Знову перемістити перехрестя окуляр-мікрометра на протилежний кінець бактерії і зробити другий відлік поділок шкали барабана окуляр-мікрометра.

10. За різницею відліків вирахувати в скількох поділках шкали барабана окуляр-мікрометра вміщується бактеріальна клітина.

11. Для остаточного визначення розмірів бактерії кількість поділок (різницю) шкали барабана, в яких вміщується клітина, помножити на ціну поділки шкали барабана окуляр-мікрометра (1,01 мкм) при малому збільшенні мікроскопа.

12. Усі вищезазначені операції повторити з об'єктивом середнього збільшення.

## 2. Форми бактерій

**Форма бактерій** може бути різноманітною. Бактерії за формою поділяють на сферичні, циліндричні, звивисті та неправильної форми.

**Кулясті (сферичні)** бактерії, або коки (грец. *kokkos* – зерно, кісточка) мають округлу форму. Вона може бути правильною сферичною, овальною, бобоподібною (один із країв сплюснений або навіть увігнутий, другий - випуклий), ланцетоподібну (один із країв округлий, другий - загострений, має

вигляд ланцета або полум'я свічі). Залежно від розміщення клітин після їхнього ділення коки підрозділяються на групи (рис. 8).

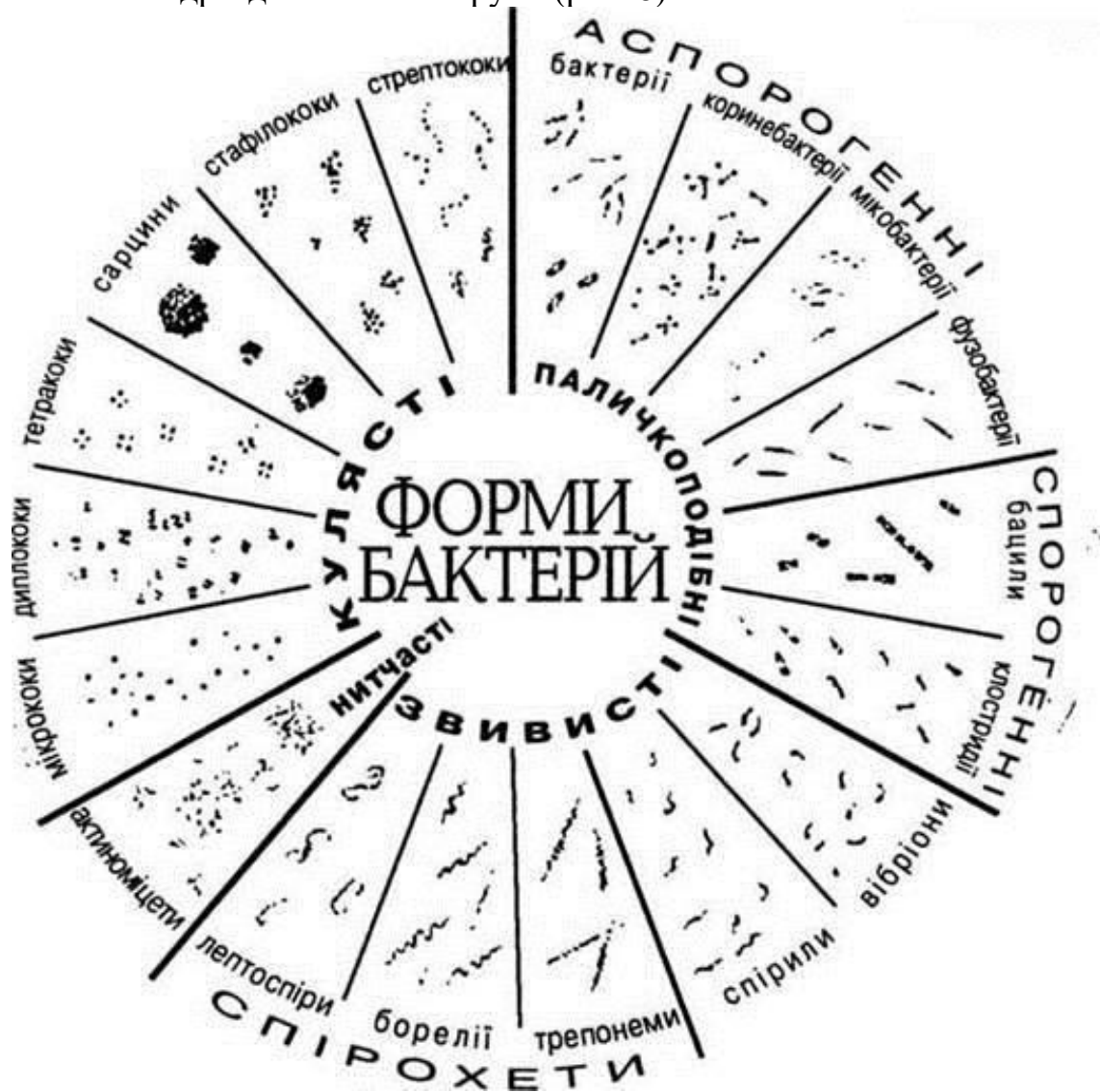


Рис.8. Форми бактерій.

**Мікрококи** в природі зустрічаються у вигляді поодиноких клітин (*Micrococcus agilis*). Мікрококи є на шкірі, в ротовій порожнині, кишківнику, рослинах, ґрунті та повітрі. Серед них практично немає паразитів.

**Диплококи** – подвійні коки (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* – це паразити тварин і людини; *Azotobacter chroococcum* – азотфіксатор, що живе в симбіозі з рослинами).

**Тетракоки** – угруповання чотирьох коків (*Tetracoccus casei*, *Tetracoccus mycodermatis* – нетоксичні мікроби; *Pediococcus acidilactici* – використовують як пробіотики).

**Стрептококи** – бактерії, які внаслідок поділу клітин у одній площині утворюють різної довжини ланцюжки (*Streptococcus pyogenes* – збудник скарлатини, стрептококової ангіни; *Streptococcus pneumoniae* – причина пневмонії та менінгіту; *Streptococcus mutans* – причина зубного карієсу; *Streptococcus thermophilus* – використовують у виробництві швейцарського сиру).

**Сарцини** – коки, які діляться у трьох взаємоперпендикулярних площинах, внаслідок чого утворюються пакети з 8, 16, 32 і т.д. клітин (*Sarcina ureae*, *Sarcina ventriculi*, *Sarcina flava* – складові людської мікрофлори).

**Стафілококи** – скупчення коків у вигляді грон винограду (*Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* – мають токсини і тому є причиною багатьох отруень харчовими продуктами, зокрема ковбасами, сиром; *Staphylococcus pyogenes* – рідкісний патоген, що зустрічається у мікрофлорі шкіри).

Найрізноманітнішою та найчисельнішою групою бактерій є **паличкоподібні (циліндричні)** форми. Їх поділяють на дві групи:

**НЕЗДАТНІ ДО СПОРОУТВОРЕННЯ ПАЛИЧКИ** (*Escherichia coli* – умовний патоген у шлунково-кишковому тракті людини, поширений також у ґрунті, воді; *Pseudomonas denitrificans* – патогенні, живуть у повітрі, ґрунті; *Acetobacter aceti* – оцтовокислі бактерії, використовують для отримання оцту);

**БАЦИЛИ** – палички, які утворюють ендоспори (*Bacillus subtilis* – сінна паличка; *Bacillus brevis* – нетоксичні, живуть у повітрі воді, на рослинах; *Clostridium pasteurianum* – здійснюють масляно-кисле бродіння; *Clostridium tetani* – збудник правця (стовбняка) - уражає нервову систему, викликає судоми скелетних м'язів).

Бактерії та бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді диплобактерій (диплобацил) та стрептобактерій (стрептобацил) – **нитчасті форми**. У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин можуть бути вкриті спільною оболонкою (піхвою) і утворювати трихом (*Thiotryx nivea*, *Beggiatoa alba*, *Beggiatoa gigantea*). Нитчасті форми розповсюджені в намулах, ґрунті і водоймах, особливо з високим вмістом заліза. У водоймах найчастіше зустрічається залізобактерії роду *Leptothrix*, які окислюють закисні форми заліза (FeO) в окисні (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> чи Fe(OH)<sub>3</sub>). При цьому накопичується гідроксид заліза, який надає бактеріям жовтувато-бурого забарвлення. Лептотрікс зустрічається також в зубному нальоті.

**Звивисті форми**. В залежності від ступеня звивистості розрізняють вібріони, спірили і спірохети.

**Вібріони** - злегка вигнуті палички у вигляді коми (*Vibrio cholerae* – збудник холери (зневоднення організму на фоні підвищеної проникності

клітинних мембран), *Bdellovibrio bacteriovorus* – паразити бактерій, *Desulfovibrio desulfuricans* – відіграють важливу роль в процесах біомінералізації, зокрема в кругообізі сірки, представників роду використовують в біоочистці стічних вод, забруднених важкими металами).

**Спірили.** На відміну від вібріонів їх клітини довші, товстіші, звивистіші. Спірили можуть утворювати один або кілька завитків – у вигляді літер С, S або спіралі (*Rhodospirillum rubum* – протеобактерія, яка може жити з використання фотосинтезу, аеробного дихання та спиртового бродіння, окрім того ці бактерії можуть фіксувати молекулярний азот, тому їх використовують як модельні об'єкти для вивчення різних біохімічних процесів; *Spirillum volutans*, *Thiospira winogradskyi* – обидва види патогенні, викликають гостре отруєння і ними можна заразитися при укусі щурів).

**Спірохети** – довгі і тонкі клітини з великою кількістю малих, але крутих завитків, що зумовлене відсутністю твердої стінки і специфічним характером руху. Довжина спірохет перевищує товщину в 5-200 разів (*Treponema pallidum* – збудник сифілісу (має різні прояви – висипка, пухлини, роз'їдання шкіри, ураження серця і нервової системи), *Leptospira* – викликає лептоспіроз, резервуаром бактерій є гризуни, іноді свині. Характеризується ураженням капілярів, печінки, нирок). *Leptospira dentium* – складова мікрофлори ротової порожнини людини.

Описані форми характеризуються здебільшого постійністю форми клітини, яка визначається особливостями будови клітинної стінки бактерій. Однак багато видів бактерій характеризуються поліморфізмом. **Поліморфізм**, або плеоморфізм – це різноманітність морфології бактерій. Бактерії дуже пластичні, легко змінюються під впливом різних несприятливих чинників – антибіотиків, солей літію, високої концентрації хлориду натрію, низького рН, зміни температури, старіння культури. Внаслідок реакцій бактерій на дію цих факторів утворюються різні за формою і величиною клітини. Яскраво виражений поліморфізм властивий бактеріям, позбавленим клітинної стінки, – мікоплазмам і L-формам, а також нокардіоподібним і коринебактеріям, у яких в циклі розвитку спостерігається зміна форм клітин: кок–паличка–кок, можуть бути також форми, які слабо розгалужуються.

До морфологічних ознак актиноміцетів відносять тенденцію до утворення розгалужених гіф, у деяких родин розвивається і міцелій. Гіфи можуть бути дуже короткими або добре розвинутими, діаметр їх варіює у межах 0,5-2,0 мкм, звичайно менше 1,0 мкм. Гіфи можна спостерігати не завжди, так як в окремих родин вони легко фрагментуються. Іноді фрагментація гіф веде до утворення коккоподібних, подовжених або дифтероїдних елементів. Для деяких родин характерно утворення справжніх

спор на повітряних або субстратних гіфах. Спори можуть утворюватися по одній на гіфі, парами або ланцюжками з різної кількості клітин. При великій кількості спор формуються ланцюжки: прямі, у вигляді петлі або спіральні; вони можуть виникнути на гіфі по одній або у вигляді мутовки. В окремих родинах спори в спорангії бувають рухливими або нерухливими в залежності від роду.

Актиноміцети – грампозитивні мікроорганізми, хоча з віком культури забарвлення за Грамом може змінюватися. Серед актиноміцетів можуть бути кислото і спиртостійкі, іноді слабокислотостійкі види.

Майже всі представники групи актиноміцетів аероби, за виключенням деяких родів, види яких можуть бути анаеробами або факультативними анаеробами.

### **Мікроскопічне дослідження форм бактерій**

1. Для вивчення бактерій кулястої форми приготувати препарат з кислого молока (стрептококи) або овочевого розсолу (коки).
2. Для вивчення бактерій паличкоподібної форми мікроскопувати препарат із настою сіна (сінна паличка).
3. Для дослідження бактерій звивистої форми мікроскопувати мазок із нальоту на зубах (спірохети).
4. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

### **3. Культуральні ознаки бактерій**

Характер росту культури на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) і інших рідких середовищах або колоній на м'ясо-пептонному агарі (МПА) і інших щільних середовищах (сусло-агар, агаризоване синтетичне середовище) – важливі систематичні ознаки мікроорганізмів. В першому випадку визначають: характер розвитку плівки (тонка, суха, складчаста, слизиста) і її колір; наявність помутніння (слабке, помірне, сильне); присутність, характер осаду (щільний, великий, пластівцевий) і його колір. *Культуральні ознаки на щільних середовищах наступні.*

Колонії на чашці спочатку групуються за культуральними ознаками. До них відносяться: форма колонії, профіль колоній, край колонії (гладкий, хвилястий, зубчастий, лопатний, ворсистий, розгалужений); поверхня (гладка, шорохувата, складчаста, бугриста); розміри (10 мм і більше у діаметрі – крупна, від 1 до 10 – середня, не перевищуюча 1 мм – крапкова); оптичні властивості (прозора, що просвічується, непрозора, блискуча, матова, флуоресцируюча);

колір (брудно-білий, білий, жовтий, помаранчевий, синій, червоний, чорний і т.д.); структура колонії (однорідна, дрібно- або крупнозерниста, плівчаста, що вростає в агар, що легко знімається голкою з агару); консистенція (масляниста, тістоподібна, слизиста, суха, щільна, що вростає в агар).

При посіві уколом, коли голку з культурою вводять у стовпчик агар-агару у пробірці, визначають інтенсивність росту у верхній, середній або нижній частині уколу.

При вивченні культуральних ознак грибів звертають особливу увагу на пігмент і обумовлену ним забарвленість повітряного міцелія і середовища. Звичайно користуються спеціальними посібниками (шкала кольорів Бондарева і інші для визначення кольору). Значення має консистенція колонії (щільна, шкіряста, що вросла в агар, пухка), міцеліальний обруч; поверхня колонії (борошниста, бархатиста) і запах колонії (грунтовий, ефірний, фруктовий і т.д.).

#### 4. Визначення якісного складу мікроорганізмів за культуральними і морфологічними ознаками

З кожної групи колоній, що вирости на щільних середовищах, готують препарат і визначають за формою клітин, до якого роду мікроорганізмів вони відносяться. Із загального числа мікроорганізмів, що розвиваються на МПА можна виділити наступні роди: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Рід *Pseudomonas*. На МПА утворює колонії круглі, неправильної форми, плоскі і випуклі, слизисті і тістоподібні, що просвічуються, безбарвні або пігментовані ( брудно-білі, сині, синьо-зелені, червоні, жовті, бурі, чорні) (рис. 9).



Рис. 9. Рід *Pseudomonas*: а – колонія, б – бактерія.



Характерна особливість представників цього роду – утворення синьо-зеленого або жовто-зеленого флуоресцентного пігменту. Деякі колонії вдається спостерігати тільки в ультрафіолетових променях. У інших видів пігменти дифундують у середовище, зафарбовуючи його у відповідний колір. Утворення визначеного пігменту залежить від складу і рН середовища.

Клітини *Pseudomonas* прямі або зігнуті, часто із загостреними кінцями, але не спіральні. Вони розташовуються поодинокі, парами або короткими ланцюжками. Розміри клітин  $0,5-1 \times 1,5-4$  мкм. Рухаються ці організми за допомогою джгутиків (монотрихи або лофотрихи), не утворюють чохла, для них невідомі стадії спокою. Частіше всього вони аероби, але деякі в анаеробних умовах можуть використовувати для дихання кисень нітратів. Клітини грамнегативні.

Рід *Flavobacterium*. Утворюють на МПА колонії діаметром 2-3 мм, частіше гладкі, матові, прозорі, жовтого кольору за рахунок каротиноїдних пігментів, не дифундуючих у середовище. Зустрічаються жовтувато-помаранчеві колонії, іноді червоні.

Клітини паличкоподібної форми ( $0,25-0,3 \times 4,0$  мкм), злегка викривлені, більшість нерухливі (рухливі тільки перетрихи), розташовані поодинокі, іноді парами у вигляді коротких ланцюжків, а іноді у вигляді ниток. Ендоспор не утворює, грамнегативні (рис. 10).



Рис. 10. Риба уражена бактеріями з роду *Flavobacterium*.

Рід *Micrococcus*. Утворює на МПА, як правило колонії дрібних і середніх розмірів (2-4 мм у діаметрі). Колонії можуть бути: матові, блискучі, маслянисті; гладкі, випуклі, плоскі; зернисті, мілко складчасті, пастоподібної або слизистої консистенції, іноді зустрічаються сухі, щільні, колір колоній може бути білий, сірий, рідше вони безбарвні, зустрічаються буруваті, жовто-зелені, рожеві і

червоні (рис. 11). Пігменти у середовище не дифундують. Клітини дрібні (0,2-1,5 мкм у діаметрі), поодинокі і з'єднані в пари, у ряд або у вигляді безформних скупчень. Клітини нерухливі, не утворюють ендоспор. Грампозитивні.



Рис. 11. Колонія бактерій роду *Micrococcus*.

*Під Sarcina.* Колонії середніх розмірів; круглі, компактні, випуклі, плоскі, гладкі, бугристі або складчасті, зернистої структури; матові або жирно блискучі; білі, жовті, лимонно-жовті іноді рожеві, червоні. Клітини сферичні (1,8-3,0 мкм у діаметрі) з'єднані у пакети по 8 або більше клітин.

*Під Mycobacterium.* Відноситься до групи актиноміцетів. На МПА ростуть повільно. Спочатку утворюються дрібні, круглі компактні колонії, іноді при піднятті, м'які, пастовидні або слизистої консистенції (розтікаються по середовищу), бувають сухі, крихкі, бугристі, складчасті, матові, блискучі, безбарвні або забарвлені (червоні, помаранчеві, жовті, зелені, сині, бурі, чорні). Пігмент у середовище не виділяють. Молоді клітини розгалужені або кутасті з неправильними контурами (3,0-7,0 × 0,7 мкм), з віком у більшості видів клітини розпадаються на коккоподібні і овальні утворення. Більшість видів грампозитивні (рис. 12).



Рис. 12. Колонія бактерій роду *Mycobacterium*.

Під *Bacillus*. Паличковидні бактерії, здатні утворювати більш або менш термостійкі спори. Під час формування спори зберігається паличковидна форма або спостерігається невелике її потовщення. За характером росту колоній на МПА (або МПА + сусло-агар) можна іноді визначити видову належність бацил. Клітини грампозитивні. Аероби.

*Bacillus megaterium* – утворює колонії гладкі; білі, випуклі, жирно-блискучі, рідко складчасті, краї колоній різко окреслені або хвилясто бахромчасті (рис. 13).

Спори овальні або циліндричні, не ширше материнської клітини, у поперек сягають 2 мкм. Довжина клітин 5-7 мкм і більше.



Рис. 13. Колонія бактерій *Bacillus megaterium*.

*Bac. subtilis* – сінна паличка. Колонії сухі дрібнозморшкуваті, бархатисті, безбарвні або рожеві, зростаються з агаром; краї колонії хвилясті або злегка хвилясті. Палички короткі і тонкі –  $3-5 \times 0,9$  мкм . Спори овальні  $0,9-0,6$  мкм, розташовані не строго центрально, але на деяких середовищах ближче до центру. Клітини рухливі (перитрихи) (рис. 14).



Рис. 14. Колонія бактерій *Bacillus subtilis*.

*Bac. mesentericus* – картопляна паличка. Колонії на МПА тонкі, сухі, зморшкуваті, сірувато-білі, не зростаються із субстратом (рис. 15). Палички тонкі, довгі і короткі, рухливі (3-10 × 0,5-0,6 мкм), іноді палички з'єднані у довгі нитки. Спори овальні і продовгуваті (0,9-0,5 мкм). При формуванні спор клітини не змінюють паличководної форми. Проростання спор екваторіальне.



Рис. 14. Колонія бактерій *Bacillus mesentericus*.

*Bac. mycoides* – грибоподібна паличка. Утворює колонії характерні: плоскі, ризоїдні або міцеліальні, що стеляться по поверхні агару. Пучки ниток відходять від краю колонії, утворюють несправжнє розгалуження; нитки вигинаються направо або наліво, утворюючи право- або лівообертаючі форми колоній (рис. 15). Клітини у попереку – 0,8-1,2 мкм, по довжині в залежності від середовища – 5-7 мкм, але часто 10 мкм і більше. Цитоплазма вакуолізована, з гранулами запасних поживних речовин, форми рухливі (перитрихи). Вид має багато варіантів.



Рис. 15. Колонія бактерій *Bacillus mycoides*.



*Bac. cereus* – колонії товсті, компактні, матові зі складчастим центром і ризоїд ними хвилястими краями; іноді мілкобугристі, з бахромчастими краями, від яких відходять тонкі сплетення ниток (рис. 16). Клітини товсті – 1,0-1,5 мкм у поперек і 3-5 мкм довжини, іноді довші; одиничні і з'єднані у ланцюжки, нитки. Спори овальні 1,2-1,5 × 0,9 мкм, розташовані субтермінально, проростають полярно.

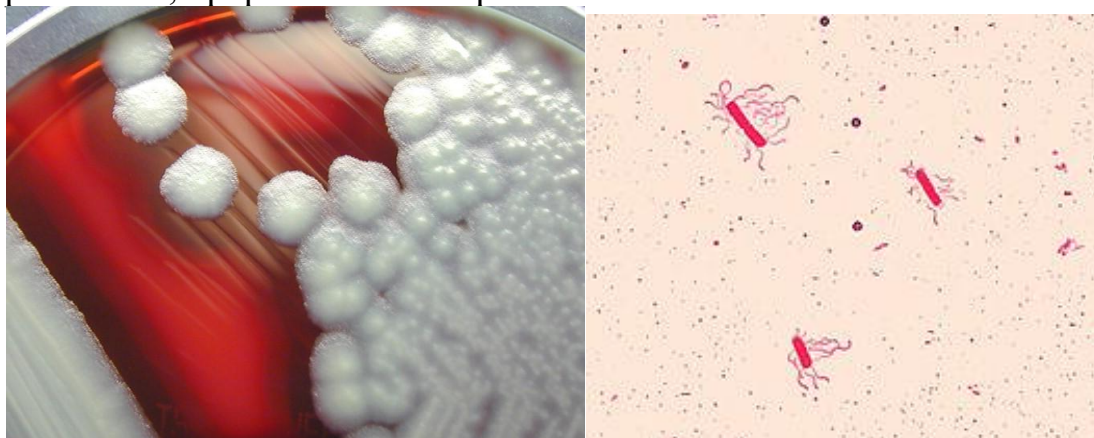


Рис. 16. Колонія бактерій *Bacillus cereus*.

*Bac. idosus* – колонії сухі, матові, плоскі, дрібно зморшкуваті, цілком знімаються з поверхні агару (рис. 17). Клітини тонкі прямі палички, 2-3 × 0,6 мкм, рухливі; спори овальні, дещо товщі материнських клітин, внаслідок чого останні роздуваються при спороутворенні. Частіше спори утворюються в центральній частині клітини.



Рис. 17. Колонія бактерій *Bacillus idosus*.

*Bac. agglomerates* – колонії на МПА дрібні, білі, плоскі, слизисті. Клітини паличкоподібні  $3-6 \times 0,4-0,5$  мкм, поодинокі і в парах, а іноді з'єднані у короткі ланцюжки; рухливі (перитрихи). Спори овальні  $0,5$  мкм у попереку, розташовані ексцентральні.

*Bac. virgulus* – колонії на агаризованих середовищах дрібнозернисті або хвилясті з бахромчастими краями. Мікроорганізм утворює довгі нитки з частими перетинками, що розпадаються на окремі клітини різної довжини ( $4-10 \times 0,7-0,8$  мкм). Спори овальні, поперечник їх більше поперечника клітини, тому при формуванні спор клітини роздуваються, набувають веретеноподібну або булавоподібну форму. Умовний анаероб.

*Bac. brevis* – утворює колонії білі, іноді з жовтуватим відтінком, гладкі, випуклі або плоскі, блискучі з зубчастим краєм, краще розвиваються на синтетичних середовищах (рис. 18). Клітини розміром  $3-5 \times 0,7-1$  мкм, рухливі, рідше з'єднані у ланцюжки. Спори овальні  $0,8-1$  мкм у попереку, розташовані на кінцях клітин, роздувають їх оболонки. Бувають грампозитивні і грамнегативні.

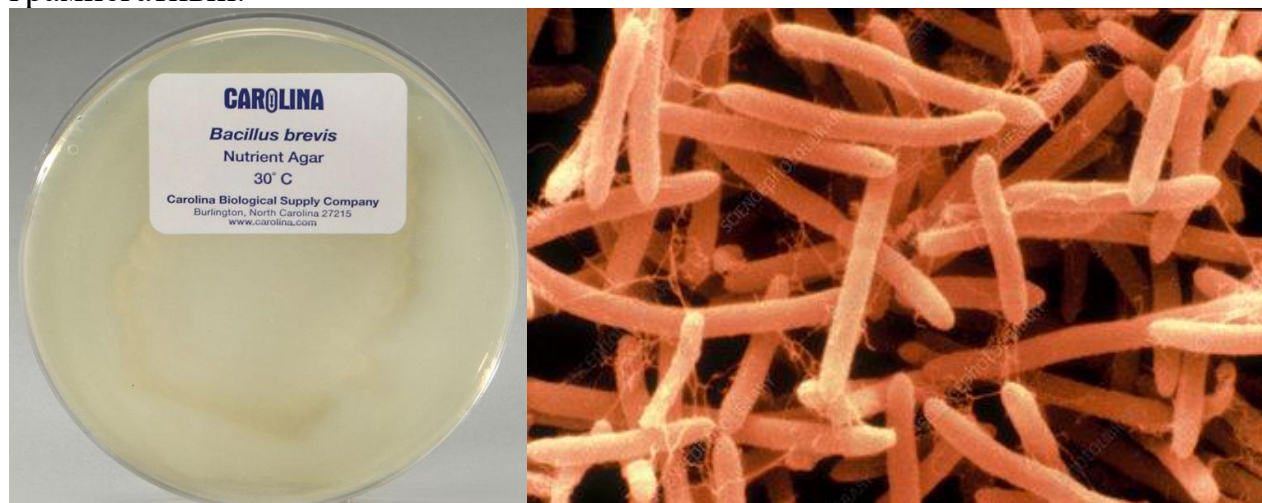


Рис. 18. Колонія бактерій *Bacillus brevis*.

*Bac. polytuxa* – колонії безбарвні плоскі або увігнуті, гладкі і слизисті, іноді краї колоній мають пальчасті вирости, ріст їх на середовищах помірний або гарний. Клітини ( $2,0-7,0 \times 1,0-1,7$  мкм) поодинокі, парні або у коротких ланцюжках, рухливі. Спори овальні, продовгуваті ( $2,6 \times 1,7$  мкм), розташовані в центрі (рис. 19). При спороутворенні клітини роздуваються лимоноподібно або кластеріально. Факультативний аероб.

*Bac. simplex* – колонії гладкі, жирно-блискучі, іноді слизисті, випуклі, ріст гарний. В старих культурах окремі штами набувають жовтувато-буре забарвлення. Клітини дрібні  $2,5 \times 0,6$  мкм. Звичайно поодинокі, ланцюжки не

утворюють. Спори овальні (0,9-0,6 мкм), розташовані субтермінально; зустрічаються в ґрунті.



Рис. 19. Колонія бактерій *Bacillus polymyxa*.

*Рід Actinomyces*. Променеві гриби, утворюють щільні шкірясті колонії різної структури (гладкі, бугристі, складчасті, бородавчасті з борошністим нальотом). Колонії можуть бути різних відтінків, зростаються із субстратом і складаються із несептованих розгалужених ниток (рис. 20).

Актиноміцети, виділені з рослин (ендофіти).  
Продукують рослинні гормони (ауксини), антибіотики.



а



Актиномицети, виділені з ґрунту. Продукують низку біологічно активних речовин та ферментів. Розкладають органічні рештки (вуглеводи, білки, нуклеїнові кислоти), беруть участь у формуванні гумусу.



Актиномицети, виділені з океанічних вод. *Salinispora tropica*, синтезує протипухлинний антибіотик – саліноспорамід А

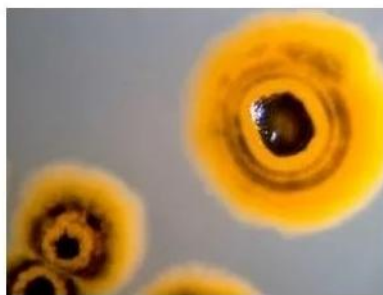


Рис. 20. Колонії грибів з роду *Actinomyces*.

### Питання до самоконтролю

1. Назвіть морфологічні ознаки бактерій.
2. Що відносять до морфологічних ознак актиномицетів?
3. Перерахуйте культуральні ознаки бактерій на рідких поживних середовищах.
4. Перерахуйте культуральні ознаки бактерій на щільних поживних середовищах.
5. Які бувають форми колоній бактерій?
6. Назвіть різновиди профілю колоній бактерій.



## Лабораторно-практичне заняття №4

### Тема: ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ.

5. Живлення мікроорганізмів.
6. Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів.
7. Методи стерилізації
8. Посів мікрофлори повітря.

**Мета:** Ознайомити студентів з призначенням і технологією приготування основних поживних середовищ для вирощування (культивування) мікроорганізмів, а також методами і технікою стерилізації лабораторного посуду, поживних середовищ і інших матеріалів, з апаратурою, що застосовують для стерилізації.

**Матеріали і обладнання:** М'ясо-пептонний агар (МПА), колби на 200 мл, дистильована вода, каструля, електроплитка, терези, воронки, стерильні пробірки і чашки Петрі, автоклав, сушильна шафа, бактеріологічні петлі, скляний посуд.

### 1. Живлення мікроорганізмів

Найважливішими фізичними й хімічними параметрами культивування є: джерело живлення, енергії, рН, ОВП, аерація, температура. Для росту мікроорганізмів необхідна вода. Потреби різних мікроорганізмів щодо складу поживного середовища й інших умов досить різноманітні.

Мінімальні вимоги до середовища культивування: у них повинні бути наявні всі елементи, з яких будується клітина, у такій формі, у який мікроорганізми здатні їх засвоїти.

### Харчові потреби мікроорганізмів

#### *Потреби в хімічних елементах*

За кількісним внеском у будову клітини розрізняють макро- і мікроелементи.

Макроелементи – 10 елементів, що входять в усі організми (С, О, Н, N, S, P, К, Са, Mg, Fe).

Мікроелементи – Mn, Мо, Zn, Cu, Ni, V, В, Сl – містяться в якості домішок у солях макроелементів, надходять із пилом зі скла лабораторного

посуду. Тому для виявлення потреби в мікроелементах потрібні особливі методи.

#### *Джерела вуглецю*

Організми отримують енергію за допомогою фотосинтезу й шляхом окиснення неорганічних сполук, здатні використовувати CO<sub>2</sub> у якості головного джерела вуглецю. Ці автотрофні організми відновлюють CO<sub>2</sub>.

Усі інші організми використовують вуглець із органічних речовин. Органічні речовини є джерелом енергії й вуглецю, частково вони асимілюються для побудови структур клітини й частково окиснюються для одержання енергії.

Із природних органічних сполук на Землі кількісно переважають полісахариди – целюлоза й крохмаль. Структурним компонентом є молекула глюкози.

Для росту мікроорганізмів необхідні наступні умови (оптимальні):

1. рН, температура, умови аерації;
2. джерело енергії;
3. джерело вуглецю;
4. донор водню (електронів).

Необхідні для росту також і фактори росту. Під факторами росту (або ростовими факторами) розуміють макромолекули, необхідні для побудови й функціонування бактеріальної клітини (їх клітини бактерій не здатні синтезувати самостійно). До таких речовин належать:

1. амінокислоти (складові частини білків);
2. пурини й пиримідини ( входить до складу нуклеїнових кислот);
3. вітаміни (входять до складу коферментів): біотин, нікотинова кислота, тіамін, пантотенат, ціанкобаламін. Необхідні в незначних кількостях.

Бактерії, що здатні синтезувати всі необхідні для життєдіяльності речовини належать до **прототрофів**. Якщо бактерії потребують додаткових речовин (факторів росту) належать до **ауксотрофів**. Для культивування таких бактерій на штучних поживних середовищах необхідно вносити до їх складу відповідні ростові фактори «у готовому вигляді».

Основними факторами росту для бактерій, що важко культивуються, є пуринові й пиримідинові основи, вітаміни, деякі (звичайно незамінні) амінокислоти, кров'яні фактори (гемін) тощо.

## Способи живлення й механізми надходження поживних речовин

Для росту й розмноження мікроорганізми потребують речовин, що використовуються для побудови структурних компонентів клітини й одержання енергії.

Поживні речовини можуть надходити до клітини в розчинному стані (це характерно для прокариот) – **осмотрофи**, або у вигляді окремих часток – **фаготрофи**. Переважна більшість бактерій – осмотрофи (поглинання речовин розчинених у воді).

Основним регулятором надходження речовин до бактеріальної клітини є цитоплазматична мембрана. Існує чотири основні механізми надходження речовин:

- пасивна дифузія – за градієнтом концентрації, що не має субстратної специфічності;

- полегшена дифузія – за градієнтом концентрацій, субстратспецифічна, здійснюється за участі спеціалізованих білків переносників пермеаз, що розміщені в мембрані;

- активний транспорт – проти градієнта концентрації, субстратспецифічний (спеціальні білки в комплексі з пермеазами), енерговитратний (за рахунок АТФ), речовини надходять до клітини в хімічно незміненому вигляді;

- транслокація (перенос груп) – проти градієнта концентрацій, за допомогою фосфотрансферазної системи, енерговитратна, речовини (переважно цукри) надходять у клітину у фосфорильованому вигляді.

## Типи живлення мікроорганізмів

**Автотрофи** – мікроорганізми, здатні засвоювати або фіксувати вуглекислоту повітря як єдине джерело вуглецю й синтезувати з неї органічні речовини.

**Гетеротрофи** – організми, що використовують для конструктивного обміну вуглець із складних органічних сполук.

Розрізняють наступні типи гетеротрофії: *паразитизм облігатний внутрішньоклітинний, паразитизм факультативний, сапрофітизм.*

Гетеротрофи, які можуть використовувати в якості джерела вуглецю так звану «мертву органіку» (наприклад, розчин глюкози), називаються **сапрофітами**. Сапрофіти потребують різних концентрацій органічних речовин. **Оліготрофи** – здатні рости при низьких концентраціях органічної

речовини (1–15 мг вуглецю в літрі розчину). *Копіотрофи* – віддають перевагу високим концентраціям поживних речовин (10 грам вуглецю в літрі розчину).

Гетеротрофи, які використовують у якості джерела вуглецю органічні сполуки (метаболіти) живої клітини, називаються *паразитами*. Переважна більшість бактерій цієї групи можуть використовувати в якості джерела вуглецю як «мертву», так і «живу» органіку. Такі бактерії називаються *факультативними паразитами*. Вони здатні рости поза клітини хазяїна при сприятливих умовах, їх можна культивувати на штучних поживних середовищах, до складу яких входять розчини органічних сполук.

Рикетсії й хламідії не можуть використовувати в якості джерела вуглецю «мертву» органіку. Вони можуть розмножуватися тільки в живих клітинах, використовуючи їх органічні речовини для своїх метаболічних процесів, оскільки мають скорочений метаболізм, який залежить від метаболізму хазяїна, їх називають *облігатними паразитами*. Як і віруси, ці бактерії не ростуть на штучних поживних середовищах.

Залежно від механізму перетворення енергії в доступну для клітини біохімічну (макроергічні зв'язки АТФ) розрізняють два типи метаболізму: фототрофний (світло) і хемотрофний.

*Фототрофи* – організми, що використовують енергію сонячного світла, трансформуючи її в хімічну (ціанобактерії, анаеробні, фототрофні сіркобактерії).

*Хемотрофи* – використовують енергію, звільнену при реакціях окиснення/відновлення (ОВР).

Залежно від того, які речовини є донорами електронів, мікроорганізми підрозділяються на 2 групи: органотрофи й літотрофи.

*Органотрофи* – організми, що використовують у якості донора водню органічні речовини.

*Літотрофи* – використовують у якості донорів електронів неорганічні речовини ( $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ ,  $S$ ,  $CO$ ,  $Fe^{2+}$  і ін.).

За трьома вищевказаним критеріями (джерело енергії, джерело вуглецю, донор електронів) виділяють 8 фізіологічних груп (таблиця 1).

### **Потреби мікроорганізмів у кисні**

Кисень надходить у клітину в складі води, вуглекислого газу й органічних речовин. Необхідний і молекулярний кисень. Головна функція  $O_2$  полягає в тому, що він є кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюзі ( $O_2$  до  $H_2O$ ).

Стосовно молекулярного кисню бактерії можна розділити на кілька фізіологічних груп.

## Типи живлення (способи існування) бактерій

Тип живлення	Джерело енергії	Донор електронів	Джерело вуглецю	Представники
Хемолітоавтотрофія	Окисно-відновні реакції	неорганічні речовини	CO <sub>2</sub>	Нітрифікуючі бактерії, тіонові, водневі бактерії, залізобактерії
Хемолітогетеротрофія	Окисно-відновні реакції	неорганічні речовини	органічні речовини	Метанові, метилредуючі бактерії
Хемоорганавтотрофія	Окисно-відновні реакції	органічні речовини	CO <sub>2</sub>	Факультативні метилотрофні бактерії
Хемоорганогетеротрофія	Окисно-відновні реакції	органічні речовини	органічні речовини	Ентеробактерії, молочнокислі, маслянокислі
Фотолітоавтотрофія	Сонячне світло	неорганічні речовини	CO <sub>2</sub>	Деякі пурпурні й зелені бактерії, ціанобактерії
Фотолітогетеротрофія	Сонячне світло	неорганічні речовини	органічні речовини	Деякі пурпурні й зелені бактерії
Фотоорганавтотрофія	Сонячне світло	органічні речовини	CO <sub>2</sub>	Деякі пурпурні бактерії
Фотоорганогетеротрофія	Сонячне світло	органічні речовини	органічні речовини	Деякі пурпурні й зелені бактерії, галобактерії.

1). **Облигатні (обов'язкові, строгі) аероби** – бактерії, здатні одержувати енергію тільки шляхом дихання й тому потребують молекулярного (атмосферного) кисню для дихання (21 %). До них належать сарцини, сінна паличка, туберкульозні паличка, вібріони.

2). **Мікроаерофіли** – бактерії, що потребують низьких концентрацій (низького парціального тиску) вільного кисню (2-5 %), адже високі концентрації кисню пригнічують їхній ріст. Для створення цих умов у газову суміш для культивування звичайно додають CO<sub>2</sub>, наприклад до 10 % концентрації. Представники – молочнокислі бактерії, актиноміцети, азотфіксатори, воденьокиснюючі бактерії.

3). **Факультативні анаероби (або факультативні аероби)** можуть споживати глюкозу й розмножуватися, як в аеробних, так і анаеробних умовах, тобто ростуть за будь-яких умов аерації. Вони можуть перемикаєти свій енергетичний метаболізм із аеробного дихання (за присутності O<sub>2</sub>) на бродіння або анаеробне дихання (за відсутності O<sub>2</sub>). Серед них є мікроорганізми, толерантні до відносно високих (близьких до атмосферних) концентрацій

молекулярного кисню – тобто *аеротолерантні*. Прикладом аеротолерантних мікроорганізмів є бактерії роду *Clostridium*, денітрифікуючі та сульфатредуючі бактерії, а також велика група ентеробактерій.

4). **Облігатні анаероби** розмножуються тільки в анаеробних умовах, тобто за відсутності кисню, який для них є шкідливим чинником. Біохімічно анаеробне дихання протікає по типу бродильних процесів, молекулярний кисень при цьому не використовується (*Metanosarcina*, *Metanobacterium*, *Cl. tetani*, *Cl. perfringes*, *Cl. acetobutylicum*).

Залучення кисню повітря в окисно-відновні реакції супроводжується утворенням перекісного радикалу ( $O^{\bullet}$ ) – атома кисню із зайвим електроном на зовнішній оболонці. Це дуже сильний окиснювач. Залежно від того, як бактерії вирішують проблему його нейтралізації, і залежить їхня здатність існувати в кисневому середовищі. На практиці найпростішим методом визначити відношення досліджуваного виду бактерій до кисню повітря, є реєстрація характеру росту цих бактерій при засіві уколом у стовпчик напіврідкого середовища.

**Облігатні аероби** перекісний радикал, що утворився, за допомогою ферменту супероксиддисмутази переводять у перекис водню. Перекис водню нейтралізується з утворенням води й молекулярного кисню за допомогою, наприклад, каталази. За відсутності кисню такі бактерії не ростуть, тому що не можуть використовувати інші молекули як акцептор електронів.

**Мікроаерофили** ростуть при більш низькому, ніж у атмосферному повітрі, вмісту кисню. До них належать, наприклад, молочнокислі бактерії, які у великій кількості населяють кишечник людини.

**Облігатні анаероби** позбавлені не тільки ферментів, що нейтралізують перекис водню, але й супероксиддисмутази. У результаті чого вони гинуть при найменшому контакті з атмосферним повітрям.

**Аеротолерантні анаероби**, не маючи ферментів, що нейтралізують перекис водню, містять супероксиддисмутази. Такі бактерії витримують короткочасний контакт із атмосферним повітрям, наприклад під час узяття патологічного матеріалу або посіву його на поживне середовище, але культивуватися можуть лише в анаеробних умовах.

## 2. Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів

Для отримання чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх морфологічних і фізіологічних властивостей, а також для накопичення великої кількості мікробів в лабораторних умовах проводять вирощування (культивування) їх на поживних середовищах.

Нормальний розвиток мікроорганізмів буде проходити тільки у тому випадку, коли поживне середовище, на якому вирощуються мікроорганізми, що вивчаються, містить у визначених кількостях всі необхідні для них елементи. В склад поживних середовищ повинні входити і такі компоненти, які забезпечують оптимальні окисно-відновні умови, необхідну реакцію середовища, осмотичний тиск і ін. Факторами, що забезпечують можливість розвитку мікроорганізмів на поживному середовищі є: вологість, температура, аерація. Тому одне і те ж середовище, що є прекрасним поживним субстратом для одних видів мікробів, виявляється зовсім непридатним для культивування інших. Це пояснюється тим, що різні мікроорганізми потребують у своєму розвитку різні джерела “сировини”. Одним бактеріям необхідні готові органічні речовини, вітаміни, цукри, інші – будують тіло з простих неорганічних сполук і вуглекислого газу. Тому немає і не може бути універсального поживного середовища, що однаково задовольняють потреби всіх мікроорганізмів. При культивуванні мікробів готують поживні середовища такого складу, які найкращим чином відповідають вимогам тієї чи іншої групи мікробів або проявлення їх визначених властивостей в залежності від поставленої мети. Тому для виділення і вивчення властивостей мікробів застосовується велика кількість середовищ, які розрізняються за походженням, консистенцією, складом і призначенням.

**Залежно від походження** середовища розділяють на природні і штучні. З останніх виділяють у особливу групу синтетичні середовища.

*Природними* поживними середовищами називаються такі, які представляють собою натуральний продукт – молоко, яйця, овочі або природний субстрат – звернута сироватка, жовч та ін.

*Штучні* поживні середовища готують за визначеними рецептами з різних настоїв і відварів тваринного або рослинного походження в додаванням неорганічних солей, вуглецю і азотистих речовин.

*Синтетичні* середовища готують з хімічно чистих речовин (солей, вуглеводів, амінокислот, вітамінів і ін.), взятих у визначених співвідношеннях.

**За консистенцією** розрізняють рідкі, напіврідкі і щільні (тверді) поживні середовища. Рідкі середовища складаються з води і розчинених у ній речовин (м'ясна вода, м'ясо-пептонний і бобово – пептонний бульон і ін.) Тверді

штучні середовища готують шляхом додавання до рідкого середовища ущільнюючих речовин – желатина (10-15%), агар-агару (1-2%).

Напіврідкі середовища містять ті ж ущільнюючі речовини, але у меншій кількості.

**За призначенням** поживні середовища ділять на звичайні, спеціальні, елективні і диференційно-діагностичні.

*Звичайні* середовища застосовують для вирощування більшості мікроорганізмів. До них відносяться бобово-пептонний і м'ясо-пептонний бульон, м'ясо-пептонний агар та ін.

*Спеціальні* середовища застосовують для виділення і культивування визначених груп або видів мікроорганізмів. Наприклад, середовище Омелянського – для виділення збудників анаеробного розкладання клітковини, середовище Чапека – для культивування грибів і т.д.

*Елективні* середовища придатні для розвитку одного пристосованого до даних умов існування виду мікробів. Супутні мікроорганізми або зовсім не ростуть на таких середовищах, або розвиток їх сильно затримується. До таких середовищ відносяться накопичуюче середовище С.Н. Виноградського для більшості ґрунтових мікроорганізмів.

*Диференційно-діагностичні* середовища застосовують для вивчення біохімічних властивостей мікробів і для виділення чистих культур деяких мікроорганізмів. Вони дозволяють виявити ферменти, що виділяються мікробами, одні з яких розщепляють у різному ступені білки і вуглеводи, а інші визивають реакції окислення і відновлення. Сюди відносяться рідкі середовища Гісса з вуглеводами, щільні середовища з індикаторами – Ендо, Левіна, Плоскирева і ін.

У особу групу виділяються так звані *селективні* середовища, на яких ведеться селекція мікробів проти якоїсь ознаки, наприклад, середовище з додаванням пеніциліну селективне для пеніцилостійких бактерій.

В даний час велику кількість поживних середовищ готують за спеціальними рецептами на виробництві і випускають у вигляді сухих порошоків або рідких концентрацій.

Поживне середовище, що застосовується для культивування мікроорганізмів, повинне задовольняти наступним вимогам:

1. містити необхідні для мікробів поживні речовини: джерела азоту, вуглецю, кисню і водню, неорганічні солі, фактори росту;
2. бути вологою, так як мікроби засвоюють тільки розчинні поживні речовини;
3. бути стерильною, т.к. не повинна містити ніяких сторонніх мікробів.



4. бути прозорою, що забезпечує добрий нагляд за характером росту культури і тими змінами, які проходять у середовищі в результаті життєдіяльності мікроорганізмів;
5. мати відповідну реакцію – рН.

### Приготування тваринних середовищ

**М'ясна вода.** Один кілограм м'яса, звільненого від жиру і сухожиль, подрібнюють на м'ясорубці, заливають двома літрами води і залишають на 18-24 годин у прохолодному місці (4-6 °С) для екстракції. Фарш віджимають, настій кип'ятять 1 год. Після охолодження м'ясну воду фільтрують, доливають води до першопочаткового об'єму, розливають у колби і стерилізують при 120 °С протягом 30 хв.

**М'ясопептонний бульон.** До м'ясної води додають 1% пептона і 0,5% повареної солі і кип'ятять 10 хвилин. Бульйон стерилізують, встановлюють рН 7,2-7,4, підлужуючи при необхідності децинормальним розчином їдкового натру. Після цього знову кип'ятять 15-20 хвилин і фільтрують через паперовий фільтр до повної прозорості. Бульйон розливають у пробірки або колби і стерилізують при 120 °С протягом 20 хвилин.

**М'ясопептонний агар.** Для отримання щільних середовищ застосовують агар-агар. Чистий агар-агар представляє собою полісахариди. До бульйону його додають 2-3 %. Потім середовище нагрівають до повного розчинення агару і встановлюють рН 7,2-7,4, фільтрують через шар вати і марлі, розливають у пробірки або колби і стерилізують при 120 °С протягом 20 хвилин.

### Приготування рослинних середовищ

**Картопляна вода.** 20 грам протертої картоплі заливають 1 л водопровідної води і кип'ятять 15 хвилин. Відвар фільтрують через паперовий фільтр або шар вати, розливають у пробірки і стерилізують у автоклаві при 1 атм протягом 30 хв. З картопляної води готують щільне середовище додаванням 2 % агару. Середовище кип'ятять, встановлюють рН і стерилізують у автоклаві 30 хв при 1 атм.

**Бобовий відвар.** Це добрий поживний субстрат для розвитку клубенькових бактерій, звичайної гнилісної мікрофлори і плісневих грибів. Для його приготування насіння бобових (горох, квасоля, боби) заливають чотирикратною кількістю води і кип'ятять протягом 1 год. або прогрівають у автоклаві при 0,5 атм. протягом 20 хв. Відвар фільтрують через вату або

фільтрувальний папір, встановлюють необхідний рН, додають 1 % цукру, розливають у пробірки і стерилізують при 1 атм. протягом 30 хв.

**Ґрунтовий агар.** Із повітряно-сухого ґрунту видаляють рослинні рештки, каміння, кусочки скла і інших щільних домішок. Ґрунт подрібнюють в ступці і просіюють через сито з діаметром отворів 1 мм. Поміщають ґрунт в колбу, заливають дистильованою водою у співвідношенні 1:5 або 1:9. Суспензію струшують на качалці протягом 5-10 хв, потім додають до неї 1,5-2 % агару. Стерилізують середовище у автоклаві при 120 °С протягом 1 год. Стерилізацію повторюють через 1-2 доби.

### Синтетичні середовища

#### Середовище Чапека (рідке)

	Г
Глюкоза (сахароза)	30,0
Натрій азотнокислий	2,0
Калій фосфорнокислий однозаміщений	1,0
Магній сірчаноокислий	0,5
Калій хлористий	0,5
Залізо сірчаноокисле	0,01
Вода водопровідна	1000,0

Для приготування щільного середовища Чапека додають 4 % агару до рідкого середовища.

### 3. Методи стерилізації

У процесі стерилізації досягається повне знищення всіх мікроорганізмів у поживних середовищах, на посуді, інструментах і інших предметах. Існують різні методи стерилізації. Частіше всього застосовують високі температури.

*Стерилізацію обпаленням* на полум'ї газових пальників або спиртівки деяких металічних або скляних предметів (бактеріологічної петлі, піпетки, предметні стекла) проводять безпосередньо перед їх використанням.

*Кип'ятіння* застосовують для стерилізації інструментів (ножі, пінцети). Для цього використовують стерилізатори, що нагрівають на вогні або з електричним обігрівом. Тривалість кип'ятіння 10-20 хв.

*Стерилізацію сухим жаром* проводять в сушильній шафі або печі Пастера. Тривалість обробки сухим жаром при температурі 150 °С – 2 години, а при 160-170 °С – 1 година. Сухим жаром стерилізують посуд, інструменти, папір, марлю, вату і інші матеріали, що витримують такі температури. Після

стерилізації шафі дають остудитися, так як при різкому охолодженні стекла можуть лопатися.

Найбільш надійний спосіб – *стерилізація насиченою парою* під тиском у автоклаві. Автоклав представляє собою товстостінний котел з масивною кришкою, що герметично закривається. На кришці або на боці котла є паровипускний кран, манометр і попереджувачий кран. Манометр показує тиск пари в автоклаві. Попереджувачий клапан служить для виводу пари при досягненні граничного тиску. Показанням тиску відповідає визначена температура. *При тиску 0,5 атм. вона рівняється 112 °С, при 1 атм. – 120 °С, 1,5 атм. – 127 °С і т.д.* Перед його включенням в роботу в котел заливають воду до відповідної мітки. Потім загрузають предмети, призначені для стерилізації, загвинчують гвинтами кришку і включають електричний струм. Кран для виходу пари залишають відкритим до тих пір, поки з автоклава не піде струм пари. Після цього кран закривають, і тиск всередині автоклава починає підвищуватися. По досягненні необхідного тиску (1-2 атм.) його підтримують протягом 20-30 хв. регулюванням нагріву автоклава. Нагрів закінчують і дають стрілці манометра дійти до 0, після чого відкривають кран, спускають пар, відгвинчують гвинти, піднімають кришку, виймають простерилізовані предмети.

Автоклав можна використовувати і для стерилізації *текучою парою*. У цьому випадку кришку не загвинчують, щоб залишався вільним вихід пари.

Одним з методів стерилізації є *пастеризація*. Цим методом знищують тільки неспоронні бактерії у харчових продуктах (молоко, пиво, вино і т.д.) при повному зберіганні їх поживних властивостей. При пастеризації рідини нагрівають до 70-75 °С протягом 30 хвилин.

#### **4. Посів мікрофлори повітря**

В середовищі, що оточує нас, в атмосфері містяться як сапрофітні мікроорганізми ґрунти, що потрапляють із землі, так і мікроорганізми, що мешкають на слизових оболонках дихальних шляхів людини в закритих приміщеннях. Можуть зустрічатися і патогенні форми, які здатні висіятися в повітрі в закритих приміщеннях.

Посів робиться таким чином: розплавлений агар-агар розливають по чашках Петрі, трохи відкриваючи верхню кришку щоб уникнути занесення мікробів. Налитий до 1/3 донної кришки чашки Петрі агар МПА остуджують, обертаючи чашку по столу. Можна поставити в холод. Потім чашку етикетують, на кришці олівцем по склу вказують дату, прізвище дослідника і варіант досліду. У приміщенні, що вивчається, кришку чашки відкривають на

5 хв. Чашки Петрі повинні стояти на горизонтальній поверхні в приміщенні далеко від протягів і дослідника. Через 5-10 хв. чашки закрити і поставити в термостат при 25-28 °С.

В термостаті чашки тримають кришками вниз, щоб волога, що конденсується, не змочувала посів. Через два-три дні на поверхні спостерігають розвиток колоній мікроорганізмів. Їх підрахунок і аналіз роблять на шостий-сьомий день після посіву.

### **Питання до самоконтролю**

1. Назвіть особливості живлення мікроорганізмів. Що відрізняє їх від інших живих істот?
2. Які типи мікроорганізмів розрізняють, в залежності від відношення їх до джерел вуглецевого живлення?
3. Як розподіляються поживні середовища за походженням?
4. Як розподіляються поживні середовища за консистенцією?
5. Як розподіляються поживні середовища за призначенням?
6. Назвіть вимоги до поживних середовищ.
7. Назвіть поживні середовища з м'яса, методи їх приготування.
8. Назвіть рослинні поживні середовища, методи їх приготування.
9. Перерахуйте методи стерилізації.
10. Які правила роботи з автоклавом? Яким чином відбувається стерилізація насиченою парою.
11. Яким чином роблять посів мікрофлори повітря?

## Лабораторно-практичне заняття №5

### Тема: КУЛЬТИВУВАННЯ, ПОСІВ І ЗБЕРІГАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

5. Культивування мікроорганізмів.
6. Техніка посіву мікроорганізмів на поживні середовища. Зберігання мікроорганізмів.
7. Аналіз мікрофлори повітря.
8. Посів мікрофлори води.

**Мета:** Ознайомлення з методами і технікою посіву мікроорганізмів на поживні середовища, а також апаратурою для культивування мікрофлори. Знайомство із мікрофлорою повітря.

**Матеріали і обладнання:** колекція мікроорганізмів, чашки Петрі, пробірки із поживним середовищем, спиртівки, бактеріологічні петлі, шпателі, спирт 96%.

### 1. Культивування мікроорганізмів

Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається *культивування* (лат. *cultus* – вирощування), а розвинуті мікроорганізми – *культурою*. При розвитку у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при розвитку на щільному середовищі – колонії. Культури можуть бути *чистими* – містять потомство клітин тільки одного виду, і *накопичувальними* – складаються переважно з клітин одного виду мікроорганізмів.

Внесення клітин мікроорганізмів або якогось матеріалу, що досліджується (зразку ґрунту, проби води) у стерильне поживне середовище для отримання чистої або накопичувальної культури називається *посівом*. Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища в інше (стерильне) називається *пересівом, або пасируванням*. (лат. *passus* – чергування).

Звичайно мікроорганізми вирощують при визначеній постійній температурі у термостатах або термостатних кімнатах. У тих і інших постійна температура підтримується за допомогою терморегуляторів.

Культивування при визначеній температурі називається *інкубацією* (лат. *incubatio* – вирощування при штучно створеній температурі).

Вирощують мікроорганізми у скляному посуді: пробірках, колбах, чашках Петрі. Для цього скляний посуд, що не був у роботі, очищують від луг

кип'ятінням у розчині, що містить  $K_2Cr_2O_7$  і концентровану  $H_2SO_4$  (по 6 % кожної).

В пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на щільних середовищах. Рідким середовищем для аеробних культур заповнюють звичайно 1/3 пробірки, для анаеробних – 2/3. Якщо щільне середовище у пробірці призначене для вирощування мікроорганізмів у цій же пробірці, її при підготовці до стерилізації наливають у пробірки на 1/3 – 1/4 їх об'єму.

Після стерилізації пробірки з ще не застиглим середовищем розкладають на рівній поверхні стола з нахилом під невеликим кутом положення для отримання скошеної поверхні агару. Це так звані “косяки”. Щільне середовище, що застигло при вертикальному положенні пробірки, називається *стовпчиком*. Стівпчики, що займають 1/3 – 1/2 пробірки, використовують для посіву культури уколом. Стівпчики поживного середовища на 2/3 об'єму після стерилізації також застосовують для заливки стерильних чашок Петрі для мікробіологічних посівів.

Пробірки із середовищем і культурами слід встановлювати на штативах; пробірки із середовищами, підготовленими до стерилізації, необхідно поміщати у металічні корзини або відра з отворами; пробірки з культурами при інкубації або зберіганні – у картонні коробки.

Мікроорганізми у колбах культивують тільки на рідких поживних середовищах. Для аеробних мікроорганізмів середовище наливають тонким шаром, для анаеробних – колбу заповнюють на 2/3.

У чашках Петрі (подвійні чашки) мікроорганізми культивують лише на щільних середовищах. Висота цього посуду  $\approx 1,5$  см, діаметр  $\approx 8-10$  см, тому діаметр верхньої чашки дещо більший, ніж діаметр нижньої.

Для роботи з мікроорганізмами застосовують спеціальні бактеріологічні петлі, голки і шпателі. Їх виготовляють з платиного дроту, який закріплюють у спеціальних металевих держаках або впаюють у скляні палички. Товщина голок і петель не повинна перевищувати 0,5 мм, шпателю – може бути 1,5 мм і більше. При посівах і пересівах культур мікроорганізмів з колоній, що вирости на щільних середовищах, застосовують голки або шпателі. Останні використовують для взяття клітин мікроорганізмів з колоній, що вросли у субстрат. Суспензії мікроорганізмів беруть петлею.

## 2. Техніка посіву мікроорганізмів на поживне середовище

Посів або пересів завжди проводять поблизу пальників. При посіві клітин мікроорганізмів з *пробірки у пробірку* обидві пробірки (одну з культурою, другу із стерильним поживним середовищем) беруть у ліву руку. Одну

пробірку затискають між вказівним і середнім пальцем (перша пробірка), нижній кінець її вільно лежить на великому пальці з його лівої сторони. Другу пробірку затискають між середнім і безіменним пальцем (друга пробірка). Вона повинна лежати паралельно першій, її нижній кінець розташовується з правої сторони великого пальця. Великий палець, знаходячись між пробірками, повинен бути у природному, не напруженому стані; він злегка утримує їх у паралельному, по відношенню одна до другої, положенні.

Пробірки для взяття мазка необхідно утримувати у положенні нахилом, щоб гарантувати стерильність культури. Якщо їх тримати вертикально, то можливе потрапляння сторонніх клітин мікроорганізмів.

У полум'ї пальників ретельно обпалюють бактеріологічну голку (петлю), тримаючи її у правій руці у відвісному положенні. Мізинцем правої руки виймають із другої пробірки ватну пробку і затискають її між мізинцем і долонею, пробку першої пробірки затискають між безіменним і середнім пальцями правої руки. Знову злегка обпалюють голку і вводять її в пробірку з культурою. Платинова голка охолоджується дуже швидко. Легким дотиком її до колонії мікроорганізмів беруть невелику кількість мікробної маси і переносять у другу пробірку.

Якщо висівають у щільне скошене середовище, голкою з культурою проводять пряму або хвилеподібну стрічку по поверхні середовища легким рухом (не розрізаючи середовище) – *посів штрихом*. Якщо висівають у стовпчик, голку вводять у центральну частину поживного середовища, у товщу його – *посів уколом*. Якщо посів роблять у рідке середовище, нахилити пробірку слід злегка, щоб не замочити пробку і краї пробірки. Пробки перед тим, як ними закрити пробірки, обпалюють над полум'ям. Зручніше спочатку закрити першу пробірку, потім другу.

При посіві на *чашку Петрі* її встановлюють біля пальників. Чашку фіксують на столі лівою рукою. Кришку піднімають великим, середнім і вказівним пальцями настільки, щоб у щілину, що утворилася, вільно проходила петля або шпатель. Посівний матеріал захвачують петлею і штриховими рухами розподіляють по поверхні поживного середовища. Бактеріологічну петлю обпалюють на вогні безпосередньо перед взяттям матеріалу і відразу ж після посіву. Можна нанести краплю посівного матеріалу на поверхню агару петлею або піпеткою, а потім розтерти її стерильним шпателем. Стерильні піпетки і скляні шпателі перед посівом звільнюють від паперу над полум'ям пальників, а після посіву опускають у дезінфікуючий розчин.

На чашках Петрі з нижнього боку, а на пробірках у верхній частині роблять надпис восковим олівцем, де вказують дату, назву засіяного матеріалу

або номер аналізу, номер робочого місця студента. Пробірки і чашки з посівами поміщають у термостат з температурою, оптимальною для конкретного мікроба. Чашки у термостаті розміщують дном вгору, що попереджає стікання конденсаційної вологи з кришки і розмив колоній.

### **Виділення чистих культур аеробів**

Виділення окремих видів мікробів і отримання чистої культури є основою всієї бактеріологічної роботи. При виділенні чистих культур мікроорганізмів з досліджуваного матеріалу, який містить, як правило, суміш різних їх представників, використовують різні методи. Всі їх можна розділити на дві основні групи:

- а) методи, основані на принципі механічного розділу мікробів;
- б) методи, основані на біологічних особливостях самих мікробів.

**Метод послідовних розведень за Пастером** (метод механічного розділення мікроорганізмів). Беруть 7-8 пробірок з 9 мл стерильного рідкого поживного середовища у кожній.

У першу пробірку вносять стерильною піпеткою 1 мл (1г) досліджуваного матеріалу і добре перемішують. В цій пробірці отримується розведення 1:10. З першої пробірки переносять 1 мл суміші у другу, з другої у третю і т.д. При цьому отримують розведення: першопочаткове 1:10, потім 1:100; 1:1000; 1: 10000 і т.д. У цьому випадку, якщо в 1г досліджуваного матеріалу містилося, наприклад, 10 млн. мікробних клітин, то в 1 мл першої попередньої розводки буде міститися 1 млн., у другій (розведення 1:100) – 100 тис., у третій – 10 тис., у четвертій – 1 тис., у п'ятій – 100 мікробних клітин, у шостій – 10, у сьомій – одна мікробна клітина (теоретично).

Склавши умови для росту і розмноження мікробів у пробірці, можна теоретично отримати в останній пробірці чисту культуру того мікроорганізму, який виявився у ній. В інших же пробірках буде рости суміш мікробів.

**Метод фракційного посіву або розтирання за Дригальським.** Три чашки зі стерильним злегка підсушеним поживним агаром розміщують на столі ближче до запалених пальників. У ліву руку беруть пробірку з досліджуваним матеріалом, а у праву – бактеріологічну петлю або піпетку. Великим і вказівним пальцями правої руки піднімають кришку чашки настільки, щоб могла ввійти вільно піпетка або петля. Притримуючись стерильності, петлею або піпеткою захвачують із пробірки матеріал і наносять одну краплю на поверхню поживного середовища. Пробірку з матеріалом закривають пробкою і ставлять на місце. Стерильною петлею або скляним



шпателем розтирають нанесену краплю по всій поверхні поживного середовища. При цьому чашку потрібно обертати.

Після посіву в першій чашці петлю або шпатель виймають, шашку закривають, а петлю (або шпатель) швидко переносять у другу чашку з поживним середовищем. Штриховим посівом або коловими рухами втирають мікроби, що залишилися на петлі або шпателі, у поверхню поживного середовища. Чашку після посіву закривають, а петлю або шпатель з мікробами, що на них залишилися, швидко переносять у третю чашку і аналогічним чином проводять посів. Після посіву чашку закривають. Петлю обпалюють на вогні, а шпатель опускають в посуд з дезінфікуючою рідиною. На кришках роблять надпис., чашки перевертають і ставлять до термостата з відповідною температурою для пророщування.

У цьому випадку у першій чашці буде багато колоній мікробів, у другій – менше, а в третій розвинуться окремі колонії, так як було внесено мало матеріалу.

### **Зберігання мікроорганізмів**

При тривалому зберіганні мікроорганізмів в лабораторних умовах можуть змінюватися окремі їх фізіолого-біохімічні або морфологічні особливості. Щоб запобігти цьому, необхідно зберігати культуру чистою.

Традиційний метод зберігання – пасерування (субкультивування), тобто пересів на свіжі середовища з інтервалами у залежності від виду мікроорганізму, середовища і умов зберігання. Деякі види мікроорганізмів потребують частих пересівів, інші можна не пересівати більше місяця. В процесі такого зберігання не можна допускати пересихання середовища. Пробірки з культурами для цього рекомендують обгортати папером або плівкою і зберігати в умовах, коли процеси життєдіяльності доведені до мінімуму, наприклад, у холодильнику при 5-8 °С.

Існує ряд інших способів зберігання культур: під шаром стерильного вазелінового масла; в ампулах з рідким азотом; у ліофілізованому стані, тобто висушені із замороженого стану. Спороутворюючі бактерії можуть зберігатися роками в стерильному сухому ґрунті або у відповідному середовищі.

### **3. Аналіз мікрофлори повітря**

*Хід роботи:*

1. Описати колонії мікроорганізмів, що вирости в чашках Петрі, за планом. Розрахувати кількість мікроорганізмів в 10 л повітря.

2. З колоній, що цікавлять, приготувати забарвлені за Грамом мазки мікроорганізмів, розглянути з імерсією, замалювати.

***Розрахунки кількості мікроорганізмів при прямому посіві з повітря і план опису колоній, що вирости на агарових пластинках в чашках Петрі.***

Підраховуємо загальну кількість колоній мікроорганізмів, що вирости в чашці Петрі. З однієї клітини мікроорганізмів виростає по одній колонії. Колонії діляться по розмірах (діаметру): великі (4-6 мм), середні (2-4 мм), дрібні (1-2 мм), точкові (менше 1 мм). Великі і середні колонії прораховуються повністю. Для зручності поле чашки Петрі ділять на сектори, прораховувавши колонії в кожному секторі і потім підсумовуючи результат.

Розрахунок числа дрібних і точкових колоній ведуть з використанням спеціального лічильника колоній мікроорганізмів (рис. 21).

Потім отримане число дрібних і точкових колоній підсумовують з кількістю середніх і великих колоній мікроорганізмів, підрахованих на усій площі чашки Петрі. Робимо розрахунок кількості мікробів в 10 л повітря. За приблизними підрахунками (Омелянский) на площі в 100 см<sup>2</sup> осідає впродовж п'яти хвилин стільки мікроорганізмів і спор, скільки їх міститься в 10 л повітря. Якщо в чашці Петрі вирости усього N колоній мікроорганізмів, то в 10 л повітря міститься X мікроорганізмів:

- на площі 78,5 см<sup>2</sup> – N колоній,
- на площі 100 см<sup>2</sup> – X колоній:

$$X = N \times 100 / 78,5.$$



Рис. 21. Лічильник колоній мікроорганізмів СКМ-2.

Допускається, що кожна колонія виникла з однієї клітини або спори. Роблячи розрахунки, з'ясовують відмінності в кількісному складі мікрофлори приміщень, де робиться посів з повітря. Можна поставити досліди з антибіотиками, фітонцидами або ультрафіолетовим опроміненням і зробити висновки, як впливають на зростання колоній вказані чинники.

***Опис колоній мікробів, що вирости на поживному середовищі, проводять за наступними показниками:***

- а) форма колонії – округла, амебоїдна, ризоїдна;
- б) оптичні властивості – прозора, матова, флюоресцирующая, напівпрозора (просвічує), непрозора, блискуча;
- в) колір колонії;
- г) поверхня колонії – гладка, шорстка, складчаста, горбиста;
- д) профіль колонії – плоский, опуклий, кратероподібний, врастаючий в агар;
- е) край колонії – рівний, хвилястий, лопатевий, ризоїдний і т. д.;
- ж) структура колонії – однорідна, дрібно- або великозерниста;
- з) консистенція – масляниста, тістоподібна, в'язка, плівчаста.

З повітря проростає від 30 до 60 % усіх мікроорганізмів і спор, що містяться в ньому.

***Мікроскопічне обстеження мікроорганізмів з найцікавіших колоній, що вирости на поживному середовищі в чашках Петрі.***

Готують фіксовані забарвлені препарати і розглядають їх під мікроскопом з імерсійним об'єктивом. Визначають, до якої групи відносяться виявлені мікроорганізми (коки, палички, сарцини, дріжджі, гриби), встановлюють, як вони забарвлюються за Грамом. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

#### **4. Посів мікрофлори води методом розбавлення**

Беруть пробу води (краще із закритої водойми). 1 мл досліджуваної води наливають в колбу на 100 мл з 99 мл дистильованої води, отримуючи перше розбавлення до 0,01, в 100 разів. Вміст колби збовтують, стерильною піпеткою відбирають 1 мл води і переливають в пробірку з 9 мл стерильної води – отримують розбавлення до 0,001. Відбираючи з пробірки по 1 мл рідини і переносячи її в пробірку з 9 мл стерильної води, отримуємо розбавлення до 0,0001 і т. д. При розбавленні кожного разу користуються стерильною водою і посудом (піпеткою, колбою) (рис. 22).

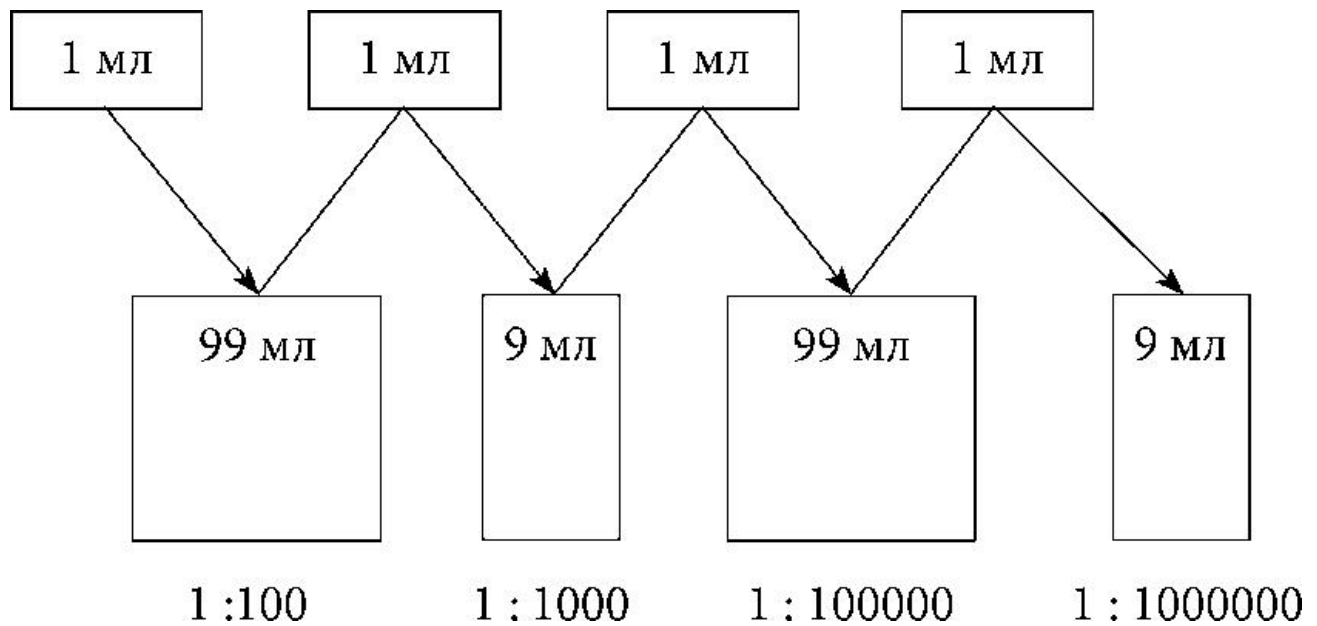


Рис. 22. Загальна схема розбавлення досліджуваної рідини.

Після ретельного збовтування вмісту посудин з кожного беруть 0,1–1 мл рідини і виливають в окремі чашки Петрі на ще теплий агар-агар. Чашки етикетують, відмічаючи міру розбавлення, залишають на тиждень в термостаті при  $T=23-25$  °С. Закладку досліду можна здійснити бригадою, окремо досліджувати мікрофлору води. У звіті про роботу прикласти схему розбавлення води, розрахунки кількості мікроорганізмів в 1 мл води.

### Питання до самоконтролю

1. Що таке культивування мікроорганізмів?
2. Що називається посівом мікроорганізмів?
3. Що таке інкубація мікроорганізмів?
4. Як заповнюються пробірки в залежності від стану поживного середовища?
5. Якими інструментами користуються при посіві мікроорганізмів?
6. Яким чином відбувається посів із пробірки у пробірку?
7. Яким чином відбувається посів штрихом?
8. Яким чином відбувається посів уколом?
9. Яким чином відбувається посів у чашки Петрі?
10. Назвіть, як необхідно проводити послідовні розведення по Пастеру?
11. Назвіть, як необхідно проводити фракційний посів за Дригальським?
12. Назвіть умови і види зберігання мікроорганізмів.

## Лабораторно-практичне заняття №6

### Тема: ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ҐРУНТУ

1. Відбір ґрунтових проб і підготовка їх до мікробіологічних аналізів.
2. Виготовлення ґрунтової суспензії методом розведень.
3. Виявлення ризосферних мікроорганізмів
4. Визначення загальної чисельності мікроорганізмів в ґрунті прямим підрахунком під мікроскопом.

**Мета:** Ознайомлення з методами відбору і підготовкою ґрунтових зразків до висіву на поживне середовище, виявлення ризосферних мікроорганізмів.

**Матеріали і обладнання:** бур, лопата або ніж, скляні банки з корковою пробкою або поліетиленові мішки, молоді корінці рослин, колби з 50 мл стерильної води, стерильний кварцовий пісок, поживне середовище, чашки Петрі, мікроскоп, набір фарбників (фуксин і генціанвіолет), розчин Люголя, етиловий спирт, імерсійне масло, спиртівки.

#### 1. Відбір ґрунтових проб і підготовка їх до мікробіологічних аналізів

Середню ґрунтову пробу одержують змішуванням окремих зразків, кількість яких залежить від мікрорельєфу (рівнинний, хвилястий і т.д.) і розміру площі. *М.А. Красильников (1966) рекомендує з площі до 100 м<sup>2</sup> брати пробу з 3 точок, більше 100 м<sup>2</sup> – з 5, з гектара й більше – з 15.* При дослідженні орних ґрунтів проби відбирають з глибини всього ґрунтового горизонту, відкидаючи верхній 2-сантиметровий шар, при вивченні мікрофлори ґрунтового профілю – по генетичних горизонтах (знизу догори).

Ґрунтові проби відбирають стерильним буром, стерильною лопаткою або стерильним ножом у завчасно підготовлені скляні банки, що закриваються корком, або у стерильні поліетиленові пакети. На банках (пакетах) наклеюють етикетки із зазначенням місця відбору проби, горизонту та інших необхідних відомостей.

Бур, лопату чи ніж в полі перед відбором проб ретельно чистять, потім обливають спиртом і підпалюють.

Ґрунтові зразки аналізують в день відбору. У разі необхідності допускається зберігання їх у холодильнику протягом двох днів. Для більшої однорідності середньої проби, дотримуючись всіх вимог асептики, його ретельно перемішують, видаляючи корені рослин, різні сторонні домішки.

## 2. Виготовлення ґрунтової суспензії методом розведень і посів

На стерильне годинникове скло стерильним шпателем (або алюмінієвою ложкою) поміщають 10 г ґрунту. Щоб при зважуванні в ґрунт не потрапили бактерії з повітря, годинникове скло накривають іншим годинниковим склом (попередньо стекла тарують). Наважку ґрунту переносять у колбу на 250 мл з 90 мл стерильної водопровідної води, струшують 10 хв., краще на механічній гойдалці) і дають відстоятися грубим частинкам ґрунту.

Одночасно із взяттям наважки для аналізу із середньої проби відбирають 10-20 г ґрунту для визначення вологості, так як отриманні при аналізі дані перераховують на 1 г абсолютно сухого ґрунту.

Встановлено, що значно більше мікроорганізмів виявляється, якщо наважку попередньо помістити у стерильну фарфорову чашку або ступку, зволожити (0,4-0,8 мл води, або 0,1 %-ним розчином пірофосфата  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  на один грам ґрунту) і 5 хвилин розтирати стерильним гумовим пестиком або пальцем у стерильній гумовій рукавичці до пастовидного стану.

Перед приготуванням суспензії для кожного зразка готують дві стерильні колби на 250 мл; одна містить 100 мл стерильної водопровідної води, друга – пуста. Водою з першої колби розтерту ґрунтову масу змивають у пусту стерильну колбу. Колбу із суспензією збовтують 5 хв, залишають на 30 с і готують розведення, що містять різні концентрації ґрунту. 1 мл суспензії у першій колбі, що приготовлена тим чи іншим способом, відповідає розведенню  $10^{-1}$ . Наступні розведення ( $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$  і т.д.) краще також робити в колбах на 250 мл з 90 мл стерильної водопровідної води.

З кожного попереднього розведення окремою стерильною піпеткою беруть 10 мл суспензії і переносять у слідуєчу колбу з 90 мл води. Кожний раз піпетку споліскують і залишають. Наступні колби збовтують по 1 хв.

З отриманих розведень проводять посів на щільні і рідкі середовища. Набір середовищ залежить від задач бактеріологічного аналізу ґрунту.

На щільні поживні середовища посів роблять переважно поверхнево. Для цього агаризовані поживні середовища розливають у стерильні чашки Петрі і після охолодження підсушують у термостаті при  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . На поверхню агарової пластини стерильною піпеткою наносять 0,05 мл ґрунтової суспензії із відповідного розведення, потім скляним шпателем розтирають краплю досуха, при цьому відкриту чашку тримають у вертикальному стані біля полум'я пальників. Посів з кожного розведення проводять мінімум на 2-3 паралельні чашки (бажано на 5 чашок).

При визначенні кількості бактерій в ґрунті орного шару для посіву на м'ясо-пептонному агарі (МПА), крохмалоаміачному агарі (КАА), середовищі

Чапека використовують розведення  $10^{-3}$  і  $10^{-4}$ ; на сусло-агарі, МПА + сусло-агар, бідних середовищах (нітритний агар), на середовищі Ешбі застосовують розведення  $10^{-2}$  і  $10^{-3}$ . Для ґрунтів нижніх горизонтів відповідно використовують розведення на один порядок менше.

У випадку глибинного посіву беруть 1 мл ґрунтової суспензії з меншого розведення (на порядок менше), ніж для поверхневого посіву.

Суспензію вносять у стерильну чашку Петрі, заливають агаром, розплавленим і охолодженим до  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , і перемішують з ним. При глибинному посіві показники отримуються більш низькі, ніж при поверхневому.

При обліку мікроорганізмів ґрунту у рідких середовищах останні розливають у колби або пробірки на 20 мл і стерилізують. З кожного розведення, починаючи з самого високого, окремою стерильною піпеткою беруть по 1 мл суспензії і переносять у рідке середовище. З кожного розведення засівають мінімум дві пробірки або колби (краще 3-5).

Коли чисельність окремих груп мікроорганізмів у ґрунті невелика, їх виявляють методом обростання грудочок ґрунту за Виноградським. Відмиті від слідів хлору і прокип'ячені або простерилізовані гелеві пластинки насичують 3-5 мл елективного середовища, для відповідної групи мікроорганізмів. Зазвичай середовище упарюють у сушильній шафі при  $40\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до утворення емалевої поверхні. По поверхні розкладають по трафарету 40-50 грудочок ґрунту діаметром 1-2 мм.

Чашки поміщають у вологу камеру і ставлять до термостату. Якщо в грудочках ґрунту знаходяться відповідні мікроорганізми, то вони починають розвиватися і формують навкруги грудочок колонії. Потім підраховують відсоток оброслих грудочок ґрунту від їх вихідної кількості. Після визначеного терміну інкубації при  $28\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  культури аналізують.

### 3. Виявлення ризосферних мікроорганізмів

**Метод проведення роботи.** 2-3 студента проводять перед всією групою послідовне відмивання коренів рослин у семи колбах, потім висівають культуру на 2 чашках з МПА із 6 і 7 змивів коренів. Із змиву кожний студент готує мазок, фарбує його по Граму, вивчає морфологію ризосферних мікроорганізмів і замальовує у зошит.

**Загальні відомості.** Для обліку ризосферних мікроорганізмів, тісно пов'язаних з коренями (ближня ризосфера), гарні результати дає метод, запропонований Є.З. Теппер. 0,6-1,2 г молодих корінців рослин, звільнених від грудочок ґрунту, промивають у колбі з 50 мл стерильної води протягом 2 хв. Потім стерильним пінцетом наважку коренів переносять у другу таку ж колбу

із стерильною водопровідною водою і так повторюють 7 разів. Останні два промивання (6 і 7) необхідно проводити з додаванням у воду 3-5 г стерильного кварцового піску. Після цього відповідне розведення промивної води висівають на поверхню м'ясопептонного або бобовопептонного агара у кількості 0,05 мл (1 крапля). Розтерши посівний матеріал шпателем по поверхні агарової пластинки, чашки Петрі з посівом поміщають до термостату при температурі 30 °С на три доби. *Кількість колоній, що вирости у чашках Петрі, помножену на ступінь розведення і поділену на вагу коренів, взятих для дослідження, вкаже на чисельність ризосферних бактерій у 1 г коренів.*

#### **4. Визначення загальної чисельності мікроорганізмів в ґрунті прямим підрахунком під мікроскопом**

Цей спосіб найбільш повно відображує чисельність зародків в ґрунті. Він став можливим після того, як американський мікробіолог Конн запропонував застосовувати для забарвлення ґрунтової суспензії кислі барвники, що добре забарвлюють вегетативні клітини мікроорганізмів і слабо – ґрунтові частки.

*Метод Виноградського* дозволяє більш точно визначити чисельність мікроорганізмів в ґрунті. Дослідження за методом Виноградського показали, що різні ґрунтові фракції містять неоднакову кількість мікроорганізмів. Найменше їх у фракціях крупних частин ґрунту, а найбільше – у дисперсній фракції, що містить максимум органічної речовини. Метод має ряд переваг, але він важкий для широкого використання.

*Метод Виноградського у модифікації Шульгіної.* Із середньої ґрунтової наважки беруть 5 г і вносять у колбу Ерленмейера на 250 мл, що містить 50 мл стерильної водопровідної води. Наважку ґрунту слід попередньо розтерти у стерильній агатовій або фарфоровій чашці з невеликою кількістю стерильної води. Для чорноземних і темно-каштанових ґрунтів наважку розтирають з 0,1%-вим розчином пірофосфату натрію. Потім 5 хв збовтують, протягом 2-5 с дають осісти грубим частинкам. Із отриманої рідини стерильною піпеткою беруть 0,01 мл і переносять на добре обезжирене скло. Одночасно із суспензією на скло наносять краплю 0,1%-ного розчину агару (добре відмитий агар готують на дистильованій воді). Агар і суспензію на склі перемішують і стерильним покривним склом розподіляють по трафарету на 4 см<sup>2</sup>. Трафарет роблять наступним чином: на міліметровому папері тушшю заштриховують 4 см<sup>2</sup> і папір приклеюють до предметного скла з нижньої сторони.

Препарат сушать, фіксують 96 %-ним спиртом і фарбують карболовим еритрозином (від 30 хв до 1 доби). При фарбуванні препарат занурюють у розчин еритрозина. Залишок барвника змивають, опускаючи стекла у воду



тильною стороною. Потім препарат знову сушать і продивляються під мікроскопом з імерсійною системою.

Для отримання більш точних результатів підраховують 10 полів зору і середнє число клітин на одне поле зору. Одночасно встановлюють площу поля зору:

$$p = \pi r^2;$$

Діаметр поля зору вимірюють за допомогою об'єктив-мікрометра. Потім знаходять скільки полів зору розміщується на площі мазка в 400 мм<sup>2</sup> за формулою:

$$K = \frac{P}{p}$$

де, K – кількість полів зору, P – площа мазка, p – площа поля зору.

*Приклад.* Якщо діаметр поля зору дорівнює 0,16 мм, площа поля зору відповідає 0,02 мм<sup>2</sup>, то

$$K = 400 \text{ мм}^2 / 0,02 \text{ мм}^2 = 20000$$

Середнє число клітин у полі зору помножують на K і встановлюють число клітин у 0,01 мл суспензії. Для визначення чисельності їх у 1 мл суспензії отримане число збільшують у 100 разів, а у 1 г абсолютно сухого ґрунту – помножують на ступінь розведення і ділять на наважку абсолютно сухого ґрунту, що міститься у 1 г сирого ґрунту.

### Питання до самоконтролю

1. Як одержують середню ґрунтову пробу?
2. Як відбирають ґрунтові проби?
3. Коли аналізують ґрунтові зразки?
4. Назвіть, як необхідно проводити підготовку ґрунтової суспензії до посіву?
5. Назвіть, як необхідно проводити посів на щільні поживні середовища?
6. Які розведення рекомендують сіяти при визначенні кількості бактерій в ґрунті орного шару?
7. Скільки беруть ґрунтової суспензії у випадку глибинного посіву?
8. Назвіть, як необхідно проводити виявлення ризосферних мікроорганізмів?
9. Назвіть, як необхідно проводити підрахунок чисельності мікроорганізмів за Виноградським?

## Лабораторно-практичне заняття №7

### Тема: **ВИВЧЕННЯ МІКРОБНИХ ЦЕНОЗІВ ҐРУНТУ І МІКРОФЛОРИ РИЗОСФЕРИ**

4. Загальний склад і співвідношення ґрунтових мікроорганізмів.
5. Мікроорганізми, що розкладають гумусові речовини.
6. Розкладання мікроорганізмами свіжих органічних залишків з утворенням гумусу.

**Мета:** Володіти методиками визначення кількісного і якісного складу мікрофлори ґрунту, що приймають участь у розкладанні гумусових речовин і різних органічних і неорганічних залишків в ґрунті.

**Матеріали і обладнання.** Предметні стекла, ніж, горілка, розчин карболового еритрозину, мікроскоп, поживне середовище крохмалоаміачного агару (КАА), термостат, педоскоп, осмієва кислота, NaOH, HCl, FeCl<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub>, вівсяна солома, поживні середовища.

#### **1. Загальний склад і співвідношення ґрунтових мікроорганізмів**

**Метод обростання скла за Холодним.** На рівній поверхні ґрунту роблять ножом розріз, глибина якого залежить від досліджуваного горизонту. Відмиті і знежирені стекла щільно прикладають до вертикальної стінки розрізу (одночасно беруть декілька скелець). Їх щільно притискають до стінки і засипають землею. В орному шарі стекла поміщають на 3-5 см нижче поверхні. Зверху розріз закривають ґрунтом і місце, де закладені стекла, відмічають етикеткою. Стекла витримують у ґрунті в залежності від задач від тижня до декілька місяців.

Потім з тильної сторони стекла ґрунт видаляють, скло відокремлюють від стінки і виймають. Нижню сторону витирають сухою ганчіркою, верхню висушують на повітрі і фіксують тричі проводячи тильною стороною над полум'ям пальників. Після фіксації стекла погружають у воду верхньою стороною вниз, не доводячи до дна. При цьому великі частки ґрунту, відмокають і падають на дно, а фіксовані мікроорганізми і дрібні частки залишаються на склі. Після промивки препарат занурюють у розчин карболового еритрозину і витримують з барвником від 30 хв до 24 год.

Забарвлені препарати досліджують під мікроскопом з імерсійною системою.

При мікроскопуванні відзначають характер мікрофлори, щільність обростання і домінуючі форми.

**Метод обростання скла за Холодним у модифікації Рибалкіної і Кононенко.** Він відрізняється від попереднього тим, що на поверхню скла перед закладкою їх у ґрунт наносять тонкий шар крохмалоаміачного агару (КАА). На стерильні предметні стекла наносять 0,2 мл стерильного КАА, очищеного від бактеріальних клітин, і рівномірно розподіляють по скла. Стекла поміщають у чашки Петрі і підсушують у термостаті при 35-45 °С.

Після перевірки скла з агаром на стерильність, вони готові для вживання. Їх витримують у відповідному шарі ґрунту 1-2 тижні і більше. Потім скельця виймають з ґрунту, фіксують і забарвлюють як за методом Холодного.

На готових препаратах, як правило, можна спостерігати розвиток грибного міцелія і асоціації спороносних мікроорганізмів, що активно розвиваються. Виявлені мікробні пейзажі на таких скельцях мають екологічне значення, але не відображують активну мікрофлору природного ґрунту як за методом Холодного.

## 2. Мікроорганізми, що розкладають гумусові речовини

**Метод Перфильєва і Габе.** Вивчення мікробних ценозів ґрунту. Враховуючи, що у природних умовах в ґрунті мікроорганізми розвиваються в основному в капілярах, стінки яких утворені ґрунтовими частинками, Б.В. Перфильєв і Д.Р. Габе сконструювали капілярний прилад – *педоскоп* (рис. 23). Він складається з наборів п'ятиходових капілярних комірок з тонкою кривлею, вставлених у скляну обійму, або тримач, у який можна вставити 5-7 комірок. Тримач являє собою скляний жолоб довжиною 70 мм, шириною 8-11 мм, з плоским дном і нахиленими (під кутом 45°) боковими стінками. Вісі каналів капілярів повинні бути орієнтовані перпендикулярно до вісі тримача.

Педоскопи нумерують. Цифри на скло наносять тушшю, зверху покривають клеєм БФ-2 і поміщають у сушильну шафу при 170 °С. Плівка стає водонепроникною. По декілька педоскопів, завернутих у папір, поміщають у чашки Петрі і стерилізують сухою парою.

У пухкі ґрунти педоскопи вставляють легко. В ущільненні спочатку вводять спеціальний пробійник – металевий стрижень із загостреним кінцем, зроблений за розмірами педоскопу і вставлений у тонкостінний футляр із металу, а потім педоскоп.

Після експозиції у 30 днів або більше педоскопи дістають із ґрунту, поверхню їх ретельно очищують від частинок і роздивляються мікроорганізми, що розвилися у каналах капілярів.

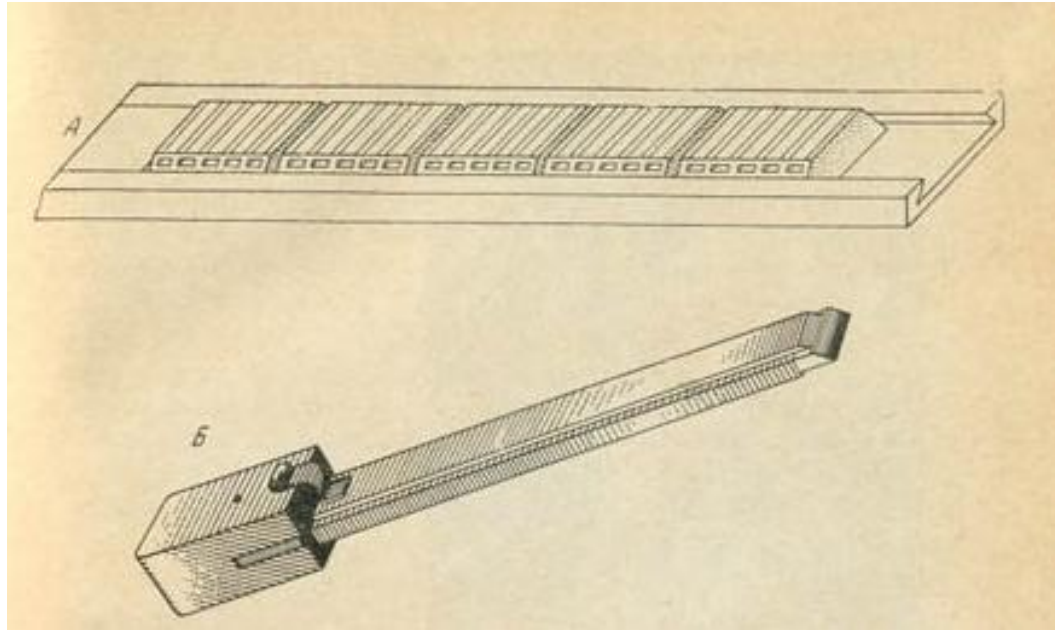


Рис. 23. Педоскоп Б. В. Перфильєва.

А – набір п'ятиходових капілярних комірок з тонкою кривлею;  
 Б – пристрій для введення педоскопу у ґрунт.

Педоскопи, вийняті з ґрунту, встановлюють на спеціальний столик, що попереджує вміст капілярів від висихання. Мікроорганізми у педоскопі фіксують у парах осмієвої кислоти. Для цього комірки на 10 хв поміщають у чашки Петрі, у які налито декілька крапель 2 %-ної осмієвої кислоти. Можна фіксувати і в парах 40 %-ного розчину формаліну. Забарвлюють еритрозином, промивають у склянці з водою.

Комірки за допомогою канадського бальзаму закріплюють на скляній пластині товщиною 0,2-0,3 мм і у спеціальному тримачі ставлять на хрестоподібний столик мікроскопа. У канали капілярів вводять кедрове масло і проглядають з імерсійною системою.

**Метод капілярів Перфильєва і Габе у модифікації Аристовської.**  
 Т.В. Аристовська використала метод Перфильєва і Габе для вивчення біоценозів ґрунту, що приймають участь у розкладанні гумусових речовин. Стінки педоскопу покривають поживним середовищем, що містить фракцію гумусу. У якості поживного субстрату застосовують органо-мінеральні комплекси гумусу, що притаманні досліджуваному типу ґрунтів.

50 г ґрунту заливають 1 л 0,1 н розчином NaOH і через 18-20 год відфільтровують, рН фільтрату обережно доводять 0,2 н розчином HCl до 5. Потім в нього по краплям додають 20 %-ний розчин FeCl<sub>3</sub> до повного випадання гумусових речовин у формі гелю, який відфільтровують і

відмивають від слідів хлору (проба з 1 %-ним  $\text{AgNO}_3$  з додаванням азотної кислоти).

Біля 5 мл гелю розтирають у ступці, збовтують у 1 л води, вносять 0,1 %-ний розчин агару і стерилізують.

Для покриття стінок капілярів середовищем, педоскоп боковою стороною поміщають у чашку Петрі з агаризованим розплавленим субстратом, який заповнює отвори капілярів. Потім поверхню педоскопу ретельно протирають стерильною ваткою, можна підсушити його із середовищем; воно вкриє тільки стінки капілярів. Слід уважно слідкувати, щоб середовище не утворило в каналах капілярів перетинок, які будуть заважати циркуляції по капілярам ґрунтового розчину і ускладнювати забарвлення мікроорганізмів.

### **3. Розкладання мікроорганізмами свіжих органічних залишків з утворенням гумусу**

Основним джерелом гумусу в ґрунті, окрім поживних залишків, є гній. Але при широкому застосуванні мінеральних добрив і інтенсифікації тваринництва він уже не може у повній мірі забезпечити потреби у свіжих органічних речовинах для створення позитивного балансу гумусу в ґрунті. У зв'язку з цим особливий інтерес представляє солома, непридатна для кормових цілей.

Вихід гумусу при внесенні соломи в ґрунт залежить від ряду факторів: типу ґрунту, додаванням мінерального азоту і ступеня аерації. Вихід гумусу при аеробному розкладанні соломи значно вище, ніж в анаеробних умовах.

Оскільки рослинні залишки (у тому числі солома) – складні органічні сполуки, що складаються з різних хімічних компонентів, а живлення у мікроорганізмів специфічне, то представляє інтерес зміна мікробних ценозів, що приймають участь у розкладанні їх і утворенні гумусових речовин.

*Дослід.* Найбільший інтерес представляє розкладання соломи в аеробних умовах. В якості об'єкта дослідження можна використовувати вівсяну або рисову солому. Вівсяна солома містить приблизно 65 % вуглецю і 0,65 % азоту (C:N = 100:1).

Дослід закладається у чашках Петрі на гелевих пластинах, що створює гарні умови аерації і імітує поверхнєве внесення соломи в ґрунт.

Відмиті від слідів хлору гелеві пластинки насичують 3 мл основного мінерального середовища Виноградського без джерел вуглецю і азоту :

Речовина	г на 200 мл дистильованої води
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5
NaCL	0,5
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,01

Так як у соломі відношення С:N різне, то до мінерального середовища додають розчин азоту у вигляді KNO<sub>3</sub> із розрахунку 26 мг азоту на чашку.

У якості єдиного джерела вуглецю на поверхню пластини поміщають 1 г абсолютно сухої подрібненої (до 3-5 мм) маси соломи, при цьому встановлюється С:N = 25:1. Солому зволожують до 60 % і до неї додають 1 мл ґрунтової суспензії розведення (10<sup>-2</sup>). Потім чашки у багатократній повторності поміщають у вологу камеру і у термостат при 25-28 °С.

*Аналіз.* Періодично через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, 270 і 360 днів інкубації – виймають дві паралельні чашки і піддають їх мікробіологічному аналізу. Строки аналізів приблизно приурочені до розкладання окремих хімічних компонентів соломи ( екстрактивних речовин, міжклітинних речовин, целюлози, лігніну). В останні строки аналізу (через 150, 210, 270 і 360 днів інкубації) виймають додатково 2 паралельні чашки, у яких визначають вміст гумусу (сульфо кислоти, гумінові кислоти) у масі соломи і у гелю. Вилучають гумусові речовини 0,1 н розчином NaOH і за методом Тюріна. У витяжках визначають вуглець гумінової кислоти і фульвокислоти. При мікробіологічних аналізах візуально і при збільшенні 30х і 80х продивляються розкладаючу соломі і описують родовий склад грибів, отримавши розвиток у відповідні строки розкладання соломи. Потім останню знімають з поверхні гелю і поміщають у колбу з 99 мл стерильної водопровідної води, збовтують 10 хв і готують розведення (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, і т.д.) і роблять поверхневі посіви на різних середовищах. Враховують сапрофітні бактерії на м'ясо-пептонному агарі (МПА); бациллярні форми у стані спор після пастеризації суспензії – на МПА + сусло-агар; мікроорганізми, що використовують мінеральні форми азоту (у тому числі гриби) – на крахмалоаміачному агарі (КАА); мікроскопічні гриби – на підкисленому сусло-агарі. При розвитку епіфітного гриба *Fumaro* кількість хламідоспор його визначають методом прямого підрахунку. Для цього беруть невелику наважку соломи, готують препарат у роздавленій краплі і продивляються з імерсійним об'активом, кількість хламідоспор у взятій наважці перераховують на загальну масу соломи у чашці. Мікроорганізми автохтонної групи (*Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthobacter*, *Micromonospora* )

підраховують на нітратному агарі. Аналогічний дослід можна поставити і на рисовій соломі.

Результати дослід з вівсяною соломою, інфікованою суспензією дерново-підзолистого ґрунту показали, що оптимальна чисельність грибів, що виявляється на сусло-агарі, відзначається на 15 добу інкубації у період розкладання екстрактивних речовин і активного розкладання целюлози (через 90 діб компостування). Оптимальна чисельність сапрофітних бактерій, що виявляється на МПА, відзначена через 30-60 діб інкубації, а через 120 діб і до кінця досліді їх чисельність різко падає. Мікроорганізми, що використовують мінеральні форми азоту, у тому числі гриби, що виявляються на КАА, найбільший розвиток отримали на 30-90 добу розкладання соломи. Оптимальний розвиток целюлозоруйнівних бактерій на середовищі Гетчинсона відзначається через 30 і 90 діб інкубації; через 120 діб розкладання і до кінця досліді проходить різке падіння їх чисельності. Різке збільшення чисельності мікроорганізмів автохтонної групи, що мінералізують лігнін і гумусові речовини, спостерігається від 150 діб і до кінця досліді.

### **Питання до самоконтролю**

1. Як визначають склад і співвідношення мікроорганізмів за Холодним?
2. Чим відрізняється метод обростання скла у модифікації Рибалкіної і Кононенко від методики Холодного?
3. Який вигляд має педоскоп?
4. Як працювати з педоскопом за Перфильєвим і Габе?
5. Опишіть метод капілярів у модифікації Аристовської.
6. Як вивчають розкладання мікроорганізмами свіжих залишків з утворенням гумусу?
7. У які терміни робляться обліки мікробіологічних досліджень ?
8. Що показали результати досліді з вівсяною соломою?

## Список рекомендованої літератури:

1. Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія Навчальний посібник. – Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Загальна мікробіологія і вірусологія: навч. посібник / Л.С. Ястремська, І.М. Малиновська. – К.: НАУ, 2017. – 232 с.
4. Загальна мікробіологія та вірусологія. Лабораторний практикум [Електронне видання]: навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за освітньою програмою «Біотехнології» спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад. : Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, Л. О. Тітова. – Електронні текстові дані (1 файл: 2.7 МБ, pdf). – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. - 121 с. - Назва з екрана. <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/48861>
5. Загальна мікробіологія, вірусологія, імунологія. Вибрані лекції: Навч. посібник / П. З. Протченко. — Одеса: Одес. держ. ун-т, 2002. — 298 с.
6. Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: Навчальний посібник. – К.: Арістей, 2006. – 284 с.
7. Колтунов В.А., Бородай В.В. Підвищення стійкості плодоовочевої продукції проти хвороб при зберіганні. К.: Колообіг, 2007. – 216 с.
8. Мікробіологія : навч. посіб. / Г.Б. Рудавська, Б.О. Голуб, В.І. Мандрика ; МОН України, Київський нац. торговельно-економічний ун-т. – Київ : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2013. – 296 с.
9. Мікробіологія : підручник / М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, Т.М. Фурзікова та ін. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. – 541 с.
10. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2010. — 623 с.
11. Практична мікробіологія: навчальний посібник / С.І. Климнюк, І.О. Ситник, В.П. Ширококов; за заг. ред.: В.П. Ширококова, С.І. Климнюка. – Вінниця : Нова книга, 2018. – 576 с.
12. Чорна Т. М. Мікробіологія : навчальний посібник / Т. М. Чорна ; Університет державної фіскальної служби України. – Ірпінь : УДФСУ, 2020. – 412 с.
13. Joanne M. Willey, Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton. Prescott's Microbiology. McGraw-Hill, 2011 - Science - 1070 pages
14. Trivedi P.C., Sonali Pandey, Seema Bhadauria. Textbook of Microbiology (English Edition). Aavishkar Publishers, Distributors. – Jaipur 302 003 (Raj.) India, 2010. – 457 p.



Навчальне видання

**ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ  
З ОСНОВАМИ ВІРУСОЛОГІЇ**

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти  
денної та заочної форм навчання зі спеціальності 201 – «Агрономія»

Укладач:

**ЗАЯРНА** Олена Юріївна

Формат 60×84 1/8. Гарнітура Times New Roman  
Електронна версія

Державний біотехнологічний університет  
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44