

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. Каразіна**

ПРАКТИКУМ З МІКРОБІОЛОГІЇ

*Методичні рекомендації для студентів 2 курсу денного відділення
біологічного факультету*

Харків – 2009

УДК 579 (076)
ББК 28.4я 73-5
П 69

*Рекомендовано Науково-методичною радою Харківського
національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № від „ ” 2009 року)*

Рецензенти: кандидат біологічних наук, доцент каф. ботаніки ХНУ імені
В. Н. Каразіна **Комариста В. П.**;
кандидат технічних наук, доцент каф. мікології та фітоімунології ХНУ імені
В. Н. Каразіна **Прудникова Т. І.**

П 69 Практикум з мікробіології: методичні рекомендації / **Віннікова О. І.,
Моргуль І. М.** – 2-ге вид., доповнене. – Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна,
2009. – 33 с.

Посібник містить методичні вказівки до загального курсу
„Мікробіологія”, що викладається на біологічному факультеті Харківського
національного університету імені В. Н. Каразіна. Для студентів і викладачів
ВНЗів, коледжів, технікумів біологічного, фармакологічного, сільськогосподар-
ського профілю. Для вчителів біології загальноосвітніх шкіл. Дані методичні
рекомендації можуть використовуватися вчителями для проведення
лабораторних робіт в спеціалізованих класах, в гуртках юних біологів.

УДК 579 (076)
ББК 28.4я 73-5

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, 2009
© О. І. Віннікова, І. М. Моргуль, 2009
© Макет обкладинки, І. М. Дончик, 2009

ВСТУП

Програма загального курсу „Мікробіологія” передбачає висвітлення питань відкриття мікроорганізмів та роль провідних вчених у розвитку мікробіології. У межах курсу передбачається визначення місця прокаріотних мікроорганізмів у системі органічного світу та огляд сучасних проблем систематики мікроорганізмів. Значна частина курсу присвячена вивченню будови та функцій окремих структур прокаріотної клітини, росту та особливостям розмноження мікроорганізмів, їхнього конструктивного та енергетичного метаболізму, мінливості прокаріот. Важливе місце відводиться висвітленню поширення мікроорганізмів у природі, їхній геохімічній ролі та участі у кругообігу речовин. Також певні питання стосуються використання мікроорганізмів у генній інженерії та біотехнології.

До кожного лабораторного заняття додається мікробіологічний словник. Терміни, що наводяться у ньому, є базовими для певної роботи, і студенти повинні запам'ятати їх тлумачення.

I. Принципи організації та особливості роботи в мікробіологічній лабораторії. Стерилізація та дезінфекція

Мікробіологічний словник: автоклав, мікроанаеростат, сухо-жарова шафа, термостат, бактеріальна петля, чашка Петрі, живильні середовища, стерилізація, тиндалізація, дезінфекція.

I.1. Улаштування мікробіологічної лабораторії

Мікробіологічна лабораторія повинна складатися як мінімум з чотирьох приміщень:

1. Кімната, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів.
2. Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – бокс.
3. Автоклавна – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та живильних середовищ.
4. Мийна кімната.

Мікробіологічна лабораторія повинна бути укомплектована приладами й обладнанням, необхідним для роботи з різними групами мікроорганізмів з урахуванням особливостей їх біології, а також для проведення дослідів і виконання мікробіологічних аналізів різних матеріалів.

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю повинен складатися з: автоклава (прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів), сухо-жарової шафи (прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду), термостата (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростата (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), ламінару (прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів), водяної бані, люміностантної камери для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, терезів, електричних шейкерів; мікробіологічних пробірок, колб, циліндрів різної форми й об'єму, піпеток різного об'єму, чашок Петрі різного діаметра, скляних лійок, предметних скелець з лункою та без – всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла, оскільки підлягають нагріванню; бактеріальних петель, голок, шпатель металевих і скляних; ватно-марлевих та гумових пробок; засобів для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо). Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

1.2. Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів

Будь-який організм для росту та розвитку повинен отримувати з оточуючого середовища усі речовини та компоненти, що необхідні йому для синтезу складових клітини й отримання нею енергії, і мікроорганізми не є з цього винятком. Тому у культуральному середовищі, в якому вирощуються мікроорганізми, повинні бути усі поживні речовини в достатній кількості для росту та розмноження мікроорганізмів з урахуванням потреб щодо кожного елемента. Оскільки вода складає до 85% клітини, необхідною є присутність даної речовини у достатній кількості. Також необхідними компонентами поживного середовища для мікроорганізмів є вуглець, азот, фосфор, сірка, калій і натрій, оскільки на долю цих елементів приходиться до 95% сухої маси клітин. Окрім того, майже усім мікроорганізмам потрібні кальцій, залізо, магній, хлор, цинк, мідь та деякі інші елементи, цю групу елементів у рецептах живильних середовищ називають мікроелементами. Зазвичай усі необхідні метали мікроорганізми отримують у вигляді катіонів неорганічних сполук, якщо середовище готують на відстояній та кип'яченій воді, мікроелементи можна не додавати, оскільки вони у слідовій кількості входять до складу

водопровідної води. В залежності від способу життєдіяльності мікроорганізми повинні отримувати вуглець, азот і сірку в певній хімічній формі. Так, для автотрофів вуглець необхідно давати у вигляді CO_2 , для гетеротрофів – у вигляді певних органічних сполук; азот і сірку – у вигляді амінокислот або продуктів первинного розпаду білків – пептонів, а для окремих груп мікроорганізмів – азот і сірка повинні поставлятися у вигляді неорганічних сполук – молекулярного азоту, нітратів, аміаку, сульфатів, сірководню тощо. Також для окремих груп мікроорганізмів необхідні фактори росту (органічні сполуки, які використовуються як попередники синтезу інших речовин, компонентів клітини) – амінокислоти, пурини та піримідини, вітаміни. Оскільки організми поділяються на аеробні й анаеробні, для перших необхідна присутність у середовищі кисню, а для других, навпаки, необхідно скласти безкисневі умови вирощування. Живильні середовища, які використовують для вирощування мікроорганізмів із різними способами життєдіяльності, поділяють на: природні (до їх складу входять продукти рослинного та тваринного походження, які використовують у вигляді екстрактів, бульйонів, настоїв), синтетичні (хімічно чисті сполуки певної концентрації, які змішують у певній послідовності) і напівсинтетичні (природні за походженням, але містять інші речовини у невизначеній концентрації). За консистенцією середовища поділяють на рідкі (водний розчин органічних і неорганічних сполук) і тверді – розчин органічних і неорганічних сполук з доданням гелеутворювачів – мікробіологічного агар-агару (полісахарид водоростевого походження) або желатини (продукт денатурації колагену, речовина тваринного походження). У мікробіологічній практиці часто використовують наступні живильні середовища: м'ясна вода (настій свіжого подрібненого м'яса на водопровідній воді), м'ясо-пептонний бульйон – МПБ (відвар свіжого подрібненого м'яса, або суміш м'ясної води з пептоном і NaCl), м'ясо-пептонний агар (суміш МПБ і агар-агару), м'ясо-пептонна желатина (суміш МПБ і желатини), сусло-агар (суміш неохмеленого пивного сусла й агар-агару), середовища Чапека, Бредмана, Мейєра, Гетчинсона (мінеральні середовища), а також молочна, картопляна вода, шматочки стерильних овочів, натуральні соки.

1.3. Стерилізація та дезінфекція. Методи стерилізації

Стерилізація (*від лат. *sterilis* – безплідний*) – повне знищення усіх живих мікроорганізмів у різних матеріалах, середовищах, предметах. Стерильність – відсутність мікроорганізмів у середовищі, об'єкті, організмі.

Методи стерилізації поділяють на теплові (проводять при підвищеній температурі) та холодні (без нагрівання). До теплових методів належать: стерилізація кип'ятінням, стерилізація паром під тиском (автоклавування), стерилізація текучою паром (тиндалізація), стерилізація сухим жаром (в сухожарових шафах), стерилізація в полум'ї газового пальника або спиртівки, пастеризація (неповна стерилізація). Холодні методи стерилізації, в свою чергу розподіляються на: фізичні (обробка УФ або γ -променями, фільтрування) та хімічні (обробка поверхні хімічними речовинами – 70% етиловим спиртом, фенолом, речовинами, що містять хлор, оксидом етилену).

Дезінфекція (*від фр. des – від + лат. infecere – заражати, псувати*) – знищення організмів, у т. ч. мікроорганізмів, здатних викликати хворобу спеціальними засобами (хімічними, фізичними, біологічними).

2. Морфологія бактерій

Виготовлення фіксованих забарвлених мікробіологічних препаратів

Мікробіологічний словник: *морфологія бактеріальної клітини, мазок, фіксування мазка, барвники, імерсійна система мікроскопа.*

2.1. Форми прокаріот

Три основні форми бактеріальної клітини – кулясту, паличкоподібну та звивисту описав у XVII столітті Антоній Ван Левенгук. За теперішніх часів відомі наступні форми бактеріальної клітини: кулясті (коки) розподіляються на мікрококи (після розподілу розходяться, агрегацій не утворюють), диплококи (з'єднані попарно), тетракоки (з'єднані по 4), стрептококи (утворюють ланцюжки різної довжини), стафілококи (утворюють агрегації у вигляді виноградного грона) та сарцини (утворюють пакети з 8-16-32 клітин); паличкоподібні (циліндричні) – довжина клітини у кілька разів перевищує ширину, можуть мати загострену, закруглену, зрізану форму закінчень клітини, розподіляються на бактерії (не утворюють спор) і бацили (утворюють ендоспори), які можуть з'єднуватися попарно (диплобактерії, диплобацили) або утворювати ланцюжки різної довжини (стрептобактерії, стрептобацили); звивисті розподіляються на вібріони (мають вигляд коми), спірили (клітини мають 1-6 завитків), спірохети (мають більше 6 завитків); а також бактерії, які мають “незвичайну” форму клітини: тороїдні (форма зімкнутого або розімкнутого кільця); простекобактерії (мають вирости клітини); зіркоподібні, трикутні, квадратні. Також до незвичайних форм бактеріальних клітин можна

віднести стебельцеві бактерії (рід *Caulobacter*), або бактероїди групи *Rhizobium* – V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

2.2. Виготовлення мікробіологічного препарату

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

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

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

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

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

3. Фіксація мазка. Проводиться з метою: а) вбити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними; б) прикріпити мазок до поверхні скла, щоб він не змився при подальших маніпуляціях; в) зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин. Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3-4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутріклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96%), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном, тощо.

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

5. Промивання препарату. Проводять дистильованою водою до “чистої води”, тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом і струм води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

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

2.3. Мікроскоп і правила роботи з ним. Використання імерсійної системи мікроскопа

Мікроскоп – оптичний прилад, призначений для вивчення об'єктів, які невидимі для неозброєного ока. В мікробіологічній практиці мікроскоп використовують для вивчення форми та будови клітин мікроорганізмів, спостереження за їх ростом і розвитком. Як відомо, конструкція світлового мікроскопа складається з механічної частини (остов мікроскопа, предметний столик, тубусотримач, тубус, кронштейн для конденсора, револьвер об'єктивів,

гвинт для переміщення конденсора, рукоятки мікро- та макрометричних гвинтів, клеми), оптичної частини (окуляр, об'єктиви, конденсор) і системи освітлення (дзеркало або освітлювач). Окуляри мікроскопа складаються з двох лінз і відрізняються збільшенням (7x, 10x, 15x), яке обирають в залежності від об'єкта дослідження. Об'єктиви – багатолінзові системи, в яких нижня лінза (фронтальна, та, що звернута до об'єкта) дає збільшення, а інші лінзи використовуються для корекції зображення. Найчастіше у мікробіологічній практиці використовують: 8x (10x) – мале збільшення, 40x (60x) – середнє збільшення і 90x (100x) – велике збільшення. Чим більше збільшення об'єктива, тим менше повинна бути відстань від об'єкта до фронтальної лінзи (наприклад, 13.8мм для 8x і 0.12мм для 90x). Об'єктиви, в яких між фронтальною лінзою й об'єктом є повітря, називаються сухими, при роботі з ними частина світлових променів відхиляється та не попадає в око через різницю коефіцієнтів заломлення скла та повітря. Для зменшення кількості відхилених променів (і водночас покращення зображення об'єкта) використовують імерсійні системи з об'єктивами, фронтальну лінзу яких можна занурювати в імерсійну рідину; такі об'єктиви мають чорну стрічку на металевій оправі. Імерсійні рідини (вода, гліцерин, кедрове, вазелінове або терпенове масло, монобромфталейн) мають коефіцієнти заломлення, наближені до показника заломлення скла (1.52).

Порядок роботи з мікроскопом (при використанні імерсійної системи)

Для отримання достовірної інформації про тонку будову клітини мікроорганізму необхідно правильно виставляти освітлення об'єкта. Найбільш зручно для цього використовувати індивідуальні освітлювачі ОИ-31 або ОИ-32.

1. Встановити освітлювач у штатив мікроскопа й увімкнути.
2. Підняти тубус мікроскопа та встановити об'єктив 8x.
3. Підняти конденсор уверх до упору та повністю відкрити діафрагму конденсора.
4. Послабити гвинт, який тримає патрон освітлювача та плавними рухами повернути патрон, дивлячись у окуляр, візуально встановити максимальне освітлення та гвинтом закріпити патрон у даному положенні.
5. На абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички нанести 1-2 краплі імерсійного масла.
6. За допомогою клем закріпити препарат на предметному столику мікроскопа.

7. Прикрити діафрагму конденсора та, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення рівномірно пофарбованої і тонкої ділянки мазка, предметне скло при цьому можна пересувати.
8. Не піднімаючи тубус, повернути револьвер і встановити об'єktiv 90x, при цьому він повинен зануритися в імерсійне масло. Якщо цього не відбулося, опустити об'єktiv у масло за допомогою макрометричного гвинта.
9. Повністю відкрити діафрагму конденсора та за допомогою мікрометричного гвинта встановити максимально чітке зображення об'єкта.
10. Для вивчення іншого об'єкта необхідно підняти тубус мікроскопа, перевести револьвер з об'єктивами на пусте гніздо, або на мале збільшення і тільки після цього встановити інший препарат.
11. Після роботи ватю, змоченою етиловим спиртом, зняти залишки масла з імерсійного об'єктива.

2.4. Дослідження морфології бактерій

на прикладі *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* і *Sarcina flava*

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

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

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

4. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

3. Грампозитивні та грамнегативні бактерії

Мікробіологічний словник: *грампозитивні та грамнегативні бактерії, клітинна стінка.*

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грампозитивні та грамнегативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 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 клітинними покривами 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 прокариот за Грамом залежить від віку культури, факторів зовнішнього середовища тощо.

3.1. Диференціальний спосіб забарвлення бактерій за Грамом (класичний)

Класичний спосіб забарвлення, запропонований Грамом, був дороблений і модифікований багатьма вченими, існує навіть експрес-метод визначення грампозитивності в грампозитивності (жива культура грампозитивних бактерій утворює слиз при обробці 3% КОН протягом 5-10 секунд).

Хід роботи. 1. На одному предметному склі по черзі приготувати мазки *Escherichia coli* (кишкова паличка) та *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка).

2. На зафіксовані у полум'ї пальника мазки покласти невеликі клаптики фільтрувального паперу та нанести на нього генціановий фіолетовий барвник

так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла, легко натиснути на папір бактеріальною петлею.

3. Через 5-6 (7) хв. пофарбований папір зняти та забарвити препарати розчином Люголю – 1 хв., при цьому препарати потемніють.

4. Розчин Люголю злити й обробити препарати 96% етиловим спиртом – 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).

5. Препарати промити до “чистої води”.

6. Дофарбувати препарати фуксином протягом 1-2 хв.

7. Барвник змити водою, препарати висушити та мікроскопіювати з імерсійним маслом.

8. Визначити, яка з запропонованих культур є грампозитивною, а яка – грамнегативною, якщо відомо, що *Vacillus mesentericus* – спороутворювальна бактерія, тому у полі зору будуть спостерігатися слабозабарвлені овальні тільця – спори, також бактерія утворює довгі ланцюги клітин. Кишкова паличка спор не утворює, зрідка в полі зору можуть траплятися короткі ланцюжки по 2-3 клітини.

9. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

4. Генетичний апарат бактеріальної клітини

Мікробіологічний словник: нуклеоїд, бактеріальна хромосома, бактеріальні плазмідди.

Як відомо, головна відміна прокаріотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК. Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокаріот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазмідди – невеликі, замкнені в кільце, ділянки ДНК. Плазмідди, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про

додаткові властивості організму та при діленні бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

4.1. Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза

Оскільки прокаріотні клітини мають достатньо малі розміри, для полегшення процедури мікроскопіювання генетичного матеріалу, рекомендується забарвлювати ядерний матеріал еукріотного мікроорганізму наприклад, дріжджів.

Хід роботи. 1. Виготовити мазок *Saccharomyces cerevisiae* та висушити при кімнатній температурі.

2. Зафіксувати мазок у рідині Карнуа протягом 15 хв.

3. На висушений фіксований мазок нанести барвник Романовського-Гімза та витримати 40-45 хв. в термостаті при температурі 37°C.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена у рожевий колір, а ядерний матеріал – у фіолетовий.

6. Зробити схематичний малюнок з позначенням ядерного матеріалу.

5. Рухливість бактерій

Мікробіологічний словник: бактеріальні джгутики, джгутикова нитка, крюк, базальне тільце, плаваючий і ковзний рух.

Бактерії розподіляються на рухомі (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і нерухомі (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*). До руху здатні бактерії, що мають джгутики (плаваючий рух) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (ковзний тип руху). Здатність бактерій до активного руху була описана у 1676 р. А. Левенгуком, а у 1876 р. Р. Кох сфотографував джгутики та запропонував метод їх фарбування. Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур – нитки, крюка та базального тільця. Нитка джгутика виступає над поверхнею бактеріальної клітини, далі біля поверхні клітини вона приєднується до крюка, який з'єднується з базальним тільцем, що повністю занурене в клітинні покриви та частково – у цитоплазму. До складу базального тільця входить вісь із нанизаними на неї кільцями – у грамнегативних бактерій це кільце L

(вбудоване у зовнішню мембрану), кільце Р (знаходиться в муреїновому шарі), MS-кільце (інтегроване в ЦПМ) і кільце С (частково інтегроване в ЦПМ, частково – занурене в цитоплазму). Також базальна структура має секреторну систему, по якій експортуються білкові субодиниці для збірки джгутикового апарату. Функцією перших двох кілець є підтримка осі базальної структури. Кільце MS є елементом, до якого прикріплюються субодиниці осі, ротора, перемикача напрямку оберту та компоненти експортного апарату. С-кільце виконує функцію перемикача напрямку оберту клітини. У грампозитивних бактерій відсутні L і Р кільця. Рух джгутиків виконується завдяки “мотору”, що входить до складу базального тільця, а саме завдяки його основному компоненту – ротору, який локалізований в MS-кільці. Оберт ротора “мотора” забезпечується трансмембранною протонрушійною силою (або, як виключення, енергією градієнта катіонів натрію), енергія АТФ при цьому не витрачається. Але енергія АТФ витрачається на побудову компонентів джгутикового апарату та на роботу регуляторних систем клітини, які забезпечують оберти джгутика – за годинниковою стрілкою або проти.

5.1. Спостереження за рухом бактерій

Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина – до 15 мкм, а діаметр – 12-18 нм). Простіше спостерігати рух живих бактерій у рідкому середовищі.

5.1.1. Виготовлення накопичувальної культури маслянокислих бактерій

Маслянокислі бактерії (представники р. *Clostridium*) зброджують вуглеводи та деякі органічні кислоти до масляної і ацетатної кислот, H_2 і CO_2 . Клострідії – рухомі (перитрихи) анаеробні бактерії, що мешкають у ґрунті й утворюють спори за клострідіальним або плектридіальним типом.

Хід роботи. 1. Подрібнити нечищену сиру картоплю.

2. Пробірку заповнити шматочками сирі картоплі на 1/3.

3. Для нейтралізації середовища додати невелику кількість крейдяного порошку.

4. Суміш залити водопровідною водою, перемішати, закрити пробкою.

5. Пробірки пастеризувати на водяній бані при $80^\circ C$ протягом 20 хв.

6. Після пастеризації пробірки поставити у термостат при температурі $30^\circ C$ на кілька днів.

5.1.2. Виготовлення препаратів “роздавлена крапля” і “висяча крапля”

Дані типи препаратів використовують для спостереження за живими бактеріями, в тому числі, рухомими. Для виготовлення таких препаратів

використовують знежирені предметні та покривні скельця, а також предметні скельця з лунками.

Метод “роздавленої краплі”

Хід роботи. 1. На предметне скло за допомогою піпетки нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії, у даному випадку – бродильну рідину з клостридіями.

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

3. Препарат мікроскопіювати під об’єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини жовтувато-зеленуватого кольору.

4. Зробити схематичний малюнок.

Метод “висячої краплі”

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

2. По кутам покривного скла за допомогою препарувальної голки нанести невелику кількість вазеліну.

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

2. Препарат мікроскопіювати під об’єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини.

6. Ендоспори бактерій

Мікробіологічний словник: *ендоспори, бацилярний, клостридіальний і плектридіальний типи спороутворення, терморезистентність спор.*

До спороутворення здатна невелика кількість бактерій. Ендоспори утворюють представники невеликої кількості родів (близько 10) і переважно з циліндричною формою клітини, наприклад бактерії родів *Bacillus*, *Clostridium*, *Amphibacillus*, *Sulfobacillus*, як виняток – спороутворювальні бактерії роду *Sporosarcina* мають кулясту форму клітин. Спори бактерій, на відміну від спор еукаріот, не є способом розмноження, вони формуються ендогенно, тобто

всередині материнської клітини та можуть мати центральне, субтермінальне (прикінцеве) або термінальне (кінцеве) положення. Діаметр спори може не перебільшувати ширину материнської клітини (бацилярний тип при центральному або субтермінальному положенні), а може перебільшувати (кlostридіальний тип при центральному або субтермінальному положенні, плектридіальний тип – при термінальному положенні). Раніше вважалося, що у бактерій спори утворюються виключно у відповідь на виникнення несприятливих умов середовища, зараз же більшість вчених схиляється до думки, що ендоспори – це один з етапів розвитку популяції, хоча ця стадія не обов'язкова. Ендоспори, на відміну від вегетативних клітин бактерій, більш стійкі до підвищеної температури (навіть до 140°C), опромінення та дії хімічних речовин. Спори містять до 90% води вегетативної клітини, але вода в них знаходиться у зв'язаному стані, раніше ж вважалося, що спори майже не містять води. Терморезистентність спор пов'язують із вмістом дипіколінової кислоти, якої немає у вегетативних клітинах; стійкість до дії хімічних речовин і опромінення пояснюється багат шаровими оболонками.

Спороутворення контролюється більш ніж 150 генами, причому кожен з етапів утворення спор контролюється певними оперонами. Процес спороутворення починається з ущільнення цитоплазми навкруги нуклеоїда, далі починається процес утворення проспори, при цьому цитоплазматична мембрана інвагується, та в результаті під клітинною стінкою утворюються різні за розмірами дві структури, що оточені мембранами. На наступному етапі цитоплазматична мембрана більшої частини оточує меншу частину – формується проспора (структура, оточена подвійною мембраною всередині материнської клітини). Далі обидві мембрани починають синтез оболонки спори, а у більшості видів проміж мембран формується ще одна оболонка – кортекс. Окрім кортекса формуються внутрішня та зовнішня оболонки спори, а також екзоспоріум. Після того, як спора повністю сформувалася, настає лізис материнської клітини. Період спокою бактеріальних спор може тривати від кількох годин до сотень років.

6.1. Забарвлення спор за методом Пешкова

Хід роботи. 1. На фіксований мазок культури сороутворювальної бактерії *Bacillus subtilis*, *Clostridium sp.* нанести достатню кількість синьки Леффлера та довести барвник до кипіння у полум'ї пальника, при цьому предметне скло спочатку прогрівають над полум'ям по всій довжині, а потім затримують на кілька секунд над полум'ям так, щоб воно торкалося скла. Якщо скло було

достатньо прогрітим, барвник закипає за 10-15 сек. У випадку, коли скло було перегріте, барвник не кипить, а випаровується, при цьому скло не слід тримати в полум'ї більше 10 сек. Після нагрівання скло не кладуть на холодні предмети, щоб запобігти його розтріскуванню.

2. Препарат ретельно промити водою тільки після охолодження скла.

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

4. Препарат промити водою та висушити фільтрувальним папером.

Після такого способу забарвлення спори фарбуються в синьо-блакитний колір, а вегетативні клітини – у рожевий.

5. Під мікроскопом (використовувати імерсійну систему) у полі зору знайти окремі спори, вегетативні клітини та спори в середині вегетативних клітин. Зробити схематичні малюнки з позначенням спор і вегетативних клітин.

7. Клітинні включення мікроорганізмів

Мікробіологічний словник: *включення мікроорганізмів, запасні поживні речовини, волютин, гранульоза, полі- β -оксимаєляна кислота, параспоральні тільця.*

До внутрішньоклітинних включень мікроорганізмів належать запасні речовини (глікоген, крохмаль, гранульоза, волютин, білкові кристали, жири, сірка) та продукти метаболізму.

Запасні поліфосфати (волютин, метахроматинові зерна, тільця Бабеша-Ернста, зараз найчастіше вживається назва – поліфосфатні гранули). Вперше були знайдені у бактерії *Spirillum volutans*. Це запасні поживні речовини мікроорганізмів у вигляді округлих тілець діаметром від 50 нм до 1 мкм, які складаються з конденсованих неорганічних фосфатів. Поліфосфати використовуються клітиною для біосинтезу фосфоліпідів і нуклеїнових кислот, а у разі дефіциту АТФ – фосфорильна група переноситься на АДФ або АМФ. Таким чином, поліфосфатні гранули є макроергічною речовиною, що асимілює енергію. В клітинах поліфосфати визначаються завдяки здатності до метахромазії (зміни кольору), при фарбуванні цих структур синіми барвниками дають червоно-фіолетовий колір. Поліфосфатні гранули трапляються у багатьох мікроорганізмів – азотобактерій, сінної палички, в клітинах молочнокислих бактерій і дріжджів, а також у деяких патогенів – збудників дифтерії, сибірки. Причому, у бактерій гранули розташовані в цитоплазмі, зазвичай в центрі клітини, а в клітинах дріжджів – в вакуолях.

Запасні полісахариди – джерело енергії, в клітинах мікроорганізмів можуть накопичуватися у вигляді зерен крохмалю (ціанобактерії), гранульози – крохмалоподібної речовини (анаеробні спороутворювальні палички), або глікогену (бацили, дріжджі, ентеробактерії). Тваринний крохмаль, глікоген, в клітинах прокариот накопичується у вигляді гранул сферичної форми до 100 нм у діаметрі.

Жироподібні речовини – джерело вуглецю та енергії, утворюються в клітинах в результаті жирового переродження цитоплазми при старінні культури або при вирощуванні культури в умовах надлишку вуглецю та дефіциту азоту. Відкладаються в клітинах у вигляді гранул діаметром до 1 мкм, являють собою краплі полі- β -оксимасляної кислоти, оточені білковою мембраною і трапляються виключно у прокариотних організмів. Окрім гранул полі- β -оксимасляної кислоти в клітинах мікроорганізмів можуть відкладатися ліпіди у вигляді воску (складні ефіри жирних кислот і спиртів), це притаманно дріжджам, нокардіям та іншим актинобактеріям.

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

7.1. Забарвлення волютину

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

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

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

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

5. Зробити схематичний малюнок з позначенням зерен волютину.

7.2. Забарвлення глікогену

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

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

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

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

5. Зробити схематичний малюнок з позначенням гранул глікогену.

7.3. Забарвлення жирів

Хід роботи. 1. На предметне скло нанести невелику краплю рідкої культури *Saccharomyces cerevisiae*, яка була вирощена в умовах надлишку вуглецю.

2. Додати краплю барвника судан III і перемішати бактеріальною петлею.

3. Краплю накрити покривним склом і через 10-15 хв. мікроскопіювати з імерсією.

4. Знайти в полі зору кулясті клітини, в яких цитоплазма безбарвна, а овальні тільця ліпідів набули оранжево-червоного кольору.

6. Зробити схематичний малюнок з позначенням жирових включень.

7.4. Забарвлення білкових кристалів

Хід роботи. 1. Виготовити мазок *Bacillus thuringiensis* і зафіксувати у полум'ї пальника.

2. Зафіксований мазок забарвити фуксином протягом 2-3 хв.

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

4. Зробити схематичний малюнок з позначенням параспоральних тілець.

8. Молочнокислі бактерії

Мікробіологічний словник: *молочнокислі бактерії, молочнокисле бродіння, гомоферментативні бактерії, гетероферментативні бактерії.*

Молочнокислі бактерії – фізіологічна група хемоорганогететотрофних, неспроутворювальних, нерухомих, факультативно анаеробних мікроорганізмів, збудників молочнокислого бродіння. Трапляються у молоці та кисломолочних продуктах, в соліннях, маринадах, у ґрунті, в філосфері та ризосфері рослин, в

кишечнику хребетних. В результаті зброджування цукрів (глюкоза, фруктоза, маноза, сахароза, лактоза, мальтоза та ін.) утворюють молочну кислоту (гомоферментативне бродіння) або молочну, оцтову кислоти, етанол, CO₂ (гетероферментативне бродіння).

8.1. Дослідження молочнокислих бактерій

Хід роботи. 1. На предметне скло нанести краплю кисломолочного продукту або розсолу, додати краплю дистильованої води та за допомогою бактеріальної петлі виготовити мазок.

2. Мазок висушити над полум'ям пальника та зафіксувати сумішшю Никифорова – кілька разів суміш нанести на мазок і злити.

3. На фіксований таким чином мазок нанести кілька крапель метиленового синього на 3-5 хв.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору ланцюжки коків або паличок. Зробити схематичний малюнок.

9. Оцтовокислі бактерії

Мікробіологічний словник: *оцтовокислі бактерії, оцтова кислота, неповне окислення, недоокислювачі, переокислювачі.*

До оцтовокислих бактерій належать два роди хемоорганогетеотрофних, неспроутворювальних, зазвичай рухомих, облігатно аеробних мікроорганізмів, які отримують енергію завдяки окисленню первинних спиртів до карбонових кислот, зокрема, етанолу – до оцтової кислоти, а вторинних спиртів – до кетонів. Представники оцтовокислих бактерій – роди *Gluconobacter* (здатні окислювати етиловий спирт до оцтової кислоти, недоокислювачі) і *Acetobacter* (швидко окислюють етанол до оцтової кислоти, а потім кислоту повільно окислюють далі, з виділенням CO₂, переокислювачі). В природі трапляються на поверхні стиглих ягід або у повітрі, виступають забрудниками бродильних рідин.

9.1. Дослідження оцтовокислих бактерій

Хід роботи. 1. На предметне скло нанести краплю води, в неї за допомогою бактеріальної петлі перенести шматочок плівки з накопичувальної культури бактерій і зробити мазок.

2. Додати розчин Люголю, накрити покривним склом і через 10 хв. мікроскопіювати з імерсійним маслом.

3. Знайти в полі зору забарвлені в жовтий або синій колір поодинокі палички, ланцюжки та зробити схематичний малюнок.

10. Целюлозоруйнівні мікроорганізми

Мікробіологічний словник: *целюлозоруйнівні мікроорганізми, аеробне й анаеробне розщеплення целюлози, целюлосоми, середовище Гетчинсона.*

Як відомо, на поверхні ґрунту та в його верхніх шарах міститься значна кількість рослинних залишків, а основним компонентом клітинних стінок рослин є целюлоза. Целюлоза виступає енергетичним і конструктивним матеріалом для чисельної групи мікроорганізмів – бактерій (клостридії, міксобактерії), актинобактерій, мікроскопічних грибів. Об'єднувальною ознакою є здатність до ферментативного розщеплення целюлози, яке мікроорганізми здатні виконувати як в аеробних, так і в анаеробних умовах. У присутності кисню целюлоза окислюється до CO_2 та H_2O , і цей процес протікає за участі одного організму. На відміну від аеробного окислення, в анаеробних умовах целюлоза окислюється до CO_2 та CH_4 , і до таких реакцій здатні синтрофні мікробні угруповання. Розщеплення целюлози каталізує комплекс ферментів, які можуть виділятися в оточуюче середовище (екзоферменти) або бути пов'язаними з бактеріальною клітиною і знаходитися всередині целюлосом (ендоферменти). Целюлосоми – спеціальні утворення на поверхні бактеріальної клітини та складаються з поліпептидних субодиниць (целюлозні ферменти) і вуглеводних фібрил.

10.1. Отримання накопичувальної культури аеробних целюлозоруйнівних мікроорганізмів

В аеробних умовах розщеплювати целюлозу здатні як еукаріотні мікроорганізми (мікроскопічні гриби родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* та ін.), так і прокаріоти. Це актинобактерії родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та бактерії – *Cytophaga* (довгі палички, злегка зігнуті, з загостреними кінцями), *Cellvibrio* (рухомі короткі, злегка зігнені палички), *Cellfalcicula* (короткі товсті палички з загостреними кінцями) та ін.

Хід роботи. 1. У стерильні конічні колби ємністю 100-200 мл налити 50-100 мл простерилізованого рідкого середовища Гетчинсона.

2. У колбу внести 0.5-1 г ґрунту та на кінчику скальпеля – крейдяного порошку.

3. Із круглого листка фільтрувального паперу скласти складчастий конус і опустити на дно колби широкою стороною донизу.

4. Колбу закрити ватно-марлевою пробкою та поставити у термостат при температурі 25-26°C на 14 діб.

10.2. Дослідження целюлозоруйнівних мікроорганізмів

Через 14 діб уважно роздивитися колбу з накопичувальною культурою целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Найбільш інтенсивно розщеплення фільтрувального паперу відбувалося на межі папір-рідина, де достатньо поживних речовин і кисню для розвитку аеробних мікроорганізмів. В результаті діяльності целюлозоруйнівних мікроорганізмів папір розпадається на окремі волокна, і конус осідає на дно, на самому папері неозброєним оком можна спостерігати слизисті плями жовтуватого або рожевого кольору – результат розвитку мікроорганізмів.

Хід роботи. 1. За допомогою бактеріальної петлі взяти невелику кількість слизу або шматочок напіврозщепленого паперу та розмазати по предметному склу без додавання води.

2. Виготовлений таким чином мазок висушити та зафіксувати у полум'ї пальника.

3. Зафіксований препарат фарбувати барвником фуксин протягом 3-4 хвилин.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору целюлозоруйнівні мікроорганізми різної морфології. Зробити схематичні малюнки.

11. Біологічна фіксація азоту й азотфіксатори

Мікробіологічний словник: *фіксатори азоту, що вільно мешкають, симбіотичні азотфіксатори, асоціативні азотфіксатори.*

Біологічна фіксація азоту – процес зв'язування молекулярного азоту повітря азотфіксувальними мікроорганізмами та переведення його у форму, досяжну для інших організмів, у першу чергу, для вищих рослин. Фіксація азоту відбувається за участю ферментного комплексу – нітрогенази, який

каталізує відновлення N_2 до NH_3 , при цьому джерелом енергії виступає АТФ. Азотфіксувальні мікроорганізми – систематично гетерогенна група, до якої входять азотфіксатори, що вільно мешкають – спороутворювальні палички (*Bacillus*, *Clostridium*), метилотрофні бактерії (*Methylobacter*, *Methylococcus*), тіонові та сіркобактерії (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*), деякі зелені та пурпурні бактерії, більшість ціанобактерій, археї (*Methanolobus*, *Methanosarcina*); симбіотичні (бульбочкові) бактерії групи *Rhizobium*, а також асоціативні азотфіксатори – види родів *Azospirillum*, *Beijerinckia*, що мешкають на поверхні коренів вищих рослин.

11.1. Дослідження асоціативних азотфіксаторів і тих, що вільно мешкають

Представники групи азобактерій (азотфіксатори, що вільно мешкають) – грамнегативні, хемоорганогетеротрофні, аеробні бактерії. Найбільш поширеними є види родів *Azotobacter* і *Azomonas*. Вони мають клітини паличковидної або овальної форми, в основному рухомі – перитрихи, монотрихи. Деякі представники азобактерій здатні синтезувати полісахаридну капсулу, тому на твердих поживних середовищах формують слизисті колонії. Бактерії роду *Azotobacter* можуть утворювати цисти (форми спокою) – структури, що виникають за рахунок появи додаткових слизистих шарів навкруги клітин, і таким чином клітини стають стійкими до висушування. Трапляються азобактерії переважно у нейтральних і лужних ґрунтах, а також у водоймах.

Серед асоціативних азотфіксаторів найбільш поширеними вважаються представники роду *Azospirillum* – потовщені вібріони або прямі короткі палички, часто з загостреними кінцями, переважно рухомі, завдяки полярному джгутику, грамнегативні або грамваріабельні, аероби.

Дослідження азобактерій

Хід роботи. 1. На добре знежирене предметне скло нанести невелику краплю метиленового синього барвника.

2. До барвника додати невелику кількість бактеріальної культури та ретельно перемішати за допомогою бактеріальної петлі.

3. За допомогою покривного скельця рідину розподілити по поверхні предметного скла й утворити тонкий мазок.

4. Препарат висушити при кімнатній температурі та мікроскопіювати з імерсійною системою.

5. Під мікроскопом на темному полі знайти майже незабарвлені кулясті клітини або диплококи. Незабарвлений шар навколо клітин – капсульна речовина, яка затримує барвник. Зробити схематичні малюнки.

Дослідження азоспірил

Хід роботи. 1. Виготовити мазок *Azospirillum sp.*, висушити при кімнатній температурі та зафіксувати в полум'ї пальника.

2. Мазок забарвити фуксином протягом 2-3 хвилин.

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

4. Знайти в полі зору товсті зігнуті клітини рожевого або червоного кольору.

5. Зробити схематичний малюнок.

11.2. Дослідження симбіотичних азотфіксаторів

Бульбочкові бактерії – представники групи *Rhizobium*, здатні проникати в клітини кореня вищих рослин і викликати розростання тканин останнього, при цьому формується бульбочка, всередині якої і розвиваються бактерії. В результаті симбіотичних відносин бактерії отримують поживні речовини, а рослина – азот у досяжній формі (у вигляді амінокислот). Ризобії мають форму палички, рухомі, не утворюють спор, облігатні аероби, не здатні фіксувати азот поза межами бульбочки. Коренева бульбочка утворюється кореневими клітинами, поживні речовини доставляються бактеріям по транспортній системі, сформованій судинами рослини, а всередині бульбочки розвиваються клітини ризобіїв, при цьому вони змінюють форму – стають V-, Y-подібними, перетворюючись на бактероїди. Бульбочкові бактерії виключно видоспецифічні, тобто здатні утворювати симбіоз з певним видом бобових рослин.

Хід роботи. 1. Виготовити мазок культури бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium sp.*, висушити при кімнатній температурі та зафіксувати в полум'ї пальника.

2. Мазок забарвити метиленовим синім протягом 2-3 хвилин.

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

4. Знайти в полі зору тонкі паличкоподібні клітини синьо-блакитного кольору.
5. Зробити схематичний малюнок.

12. Мікрофлора тіла людини

Мікробіологічний словник: *нормальна мікрофлора людини, автохтонна й алохтонна мікрофлора, біоплівки.*

На поверхні шкіри людини, на слизистих оболонках, у відкритих порожнинах людини мешкає понад 10^{13} клітин мікроорганізмів. Популяції цих організмів складають нормальну мікрофлору (аутофлору) людського організму. Розрізняють автохтонну, постійну мікрофлору та транзиторну, випадкову – алохтонну. Мікроорганізми, завдяки взаємодії своїх поверхневих структур з протеїнами мембран макроорганізму, формують біоплівки й таким чином виконують функцію протиінфекційного захисту людини. Кожній частині організму людини притаманна своя мікрофлора. Оскільки шкіра є відкритою екосистемою, саме тут можна знайти найбільшу кількість алохтонних мікроорганізмів. До складу постійної нормальної мікрофлори шкіри входять різні коки – *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. intermedius*, а також бревібактерії, коринебактерії та дифтероїди. Окрім того, на поверхні шкіри можна знайти аеробні спороутворювальні палички (р. *Acinetobacter*), які мешкають у повітрі, воді, ґрунті. Більша кількість мікроорганізмів трапляється в місцях концентрації сальних і потових залоз. Співвідношення груп мікроорганізмів залежить від віку, статі, стану імунної системи людини.

12.1. Дослідження мікрофлори шкіри людини методом відбитків

Мікрофлору поверхні шкіри людини можна дослідити методом змивів і методом відбитків. При використанні першого методу стерильною ватою, змоченою стерильним фізіологічним розчином, протирають поверхню шкіри, нігті, потім вату переносять у пробірку з напіврідким живильним середовищем, ретельно перемішують, і через годину невеликий об'єм такої суспензії з додержанням умов стерильності переносять на тверде живильне середовище у чашках Петрі. Чашки витримують протягом доби у термостаті при температурі 36°C , а потім – іще 2-3 доби витримують при кімнатній температурі. Метод відбитків вважається експрес-методом, він достатньо простий у виконанні та не потребує певних навичок техніки мікробіологічних досліджень.

Хід роботи. 1. На водяній бані розплавити тверде живильне середовище МПА.

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

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

4. Засіяні таким чином чашки Петрі поставити у термостат при температурі 35-36 °С.

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

12.2. Дослідження культурально-морфологічних ознак бактерій

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

Культуральні ознаки. До них належать здатність мікроорганізмів рости на тому чи іншому живильному середовищі, а також характеристика колоній, які вирости на твердому живильному середовищі (наприклад, МПА). Дослідження проводять за допомогою мікроскопа МБС-9.

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

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

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

Поверхня колонії – гладенька, шершава, складчаста, бугриста.

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

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

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

Хід роботи. 1. За допомогою мікроскопу МБС-9 визначити культуральні ознаки обраної колонії мікроорганізму.

2. За допомогою шкали кольорів визначити колір колонії.

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

4. Результати визначення культуральних ознак колоній мікроорганізмів та їх морфології занести до лабораторного журналу.

ТЕМИ СЕМІНАРСЬКИХ ЗАНЯТЬ З МІКРОБІОЛОГІЇ

Історія розвитку мікробіології

(2 години)

1. Життя та діяльність Антонія Ван Левенгука.
2. Роль досліджень Луї Пастера у розвитку мікробіології.
3. Вклад в розвиток мікробіології Едуарда Дженера й Александра Флемінга.
4. Досліди Роберта Коха в галузі медичної мікробіології.
5. Роботи С.М. Виноградського та Мартіна Бейєрінка в галузі ґрунтової мікробіології.
6. Вклад в розвиток мікробіології російських вчених – І.І. Мечнікова, В.М. Шапошнікова, Г.А. Надсона.
7. Капілярні методи дослідження мікроорганізмів – роботи М.Г. Холодного, Б.В. Перфільєва, Д.Р. Габе.
8. Мікробіологія на межі ХХ-ХХІ століть – основні відкриття та напрями досліджень.

Місце мікроорганізмів в системі живих істот

(1 година)

1. Історична довідка про перші спроби класифікації мікроорганізмів.
2. Принципи класифікації мікроорганізмів.
3. Нумерична систематика бактерій М. Адансона.
4. Філогенетична систематика бактерій.

Життєві цикли бактерій, особливості розвитку популяцій мікроорганізмів

(1 година)

1. Способи спороутворення у прокариот.
2. Життєві цикли різних груп бактерій і актинобактерій.
3. Фази розвитку бактеріальної популяції.
4. Особливості розвитку популяції гіфальних мікроорганізмів.

Особливості взаємовідносин мікроорганізмів в природі

(2 години)

1. Коменсалізм у мікроорганізмів.
2. Синтрофізм у мікроорганізмів.
3. Паразитизм у мікроорганізмів.
4. Приклади хижацтва у мікроорганізмів.
5. Антагоністичні взаємовідносини між різними групами мікроорганізмів.
6. Використання мікроорганізмів у виготовленні бактеріальних добрив.

Участь мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі

(1 година)

1. Роль мікроорганізмів у кругообігу азоту.
2. Роль мікроорганізмів у кругообігу сірки.
3. Роль мікроорганізмів у кругообігу вуглецю.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

до загального курсу „Мікробіологія”

1. Роль вітчизняних вчених у розвитку мікробіології (роботи І.І.Мечнікова, С.Н. Виноградського, Б.В.Перфільєва та інших).
2. Роль зарубіжних вчених у розвитку мікробіології (роботи А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, Е. Дженера, А. Флемінга).
3. Постулати Р. Коха.
4. Методи стерилізації. Дезінфекція.
5. Капілярні методи вивчення мікроорганізмів.
6. Принципи систематики мікроорганізмів.
7. Морфологічні типи прокариотів.
8. Особливості організації прокариотної клітини: бактерії і археї.
9. Будова прокариотної клітини: капсула, клітинна стінка, грампозитивні та грамнегативні бактерії, цитоплазматична мембрана, поверхневий S-шар, периплазматичний компартмент, контакти Байєра, нуклеоїд, нуклеоїдосоми, рибосоми, шапероніни, протеасоми, деградосоми, рапідосоми, аеросоми, карбоксосоми, вакуолі, магнітосоми, анаммоксосоми, хлоросоми, хроматофори, тілакоїди, фікобілісоми, клітинні включення, целюлосоми, блебінг-везікули, трубчасті утворення, шипи, газові балони.
10. Типи рухливості у бактерій.
11. Будова, функції, механізм руху поверхневих і периплазматичних джгутиків.
12. Будова та функції стебелець і фімбрій.
13. Спороутворення у бактерій.
14. Археї: особливості метаболізму й екології.
15. L-форми бактерій.
16. Мікоплазми.
17. Рикетсії.
18. Хламідії.
19. Актинобактерії.
20. Фази розвитку бактеріальної популяції.
21. Особливості розвитку популяції гіфальних мікроорганізмів.
22. Автотрофність і гетеротрофність. Джерела травлення та енергії.
23. Особливості фотосинтезу у бактерій.
24. Бактеріохлорофіли.
25. Каротиноїди бактерій.
26. Фікобіліпротеїди.
27. Бактеріородопсин, робота протонної помпи.

28. Групи фототрофних бактерій.
29. Сіркобактерії, тіонові бактерії, сульфат-редуктори.
30. Нитрифікуючі бактерії.
31. Водородні бактерії.
32. Групи залізобактерій.
33. Карбоксидобактерії та метилотрофні бактерії.
34. Оцтовокислі бактерії і виробництво оцту.
35. Процеси амоніфікації і амоніфікуючі мікроорганізми.
36. Мікроорганізми, які руйнують целюлозу.
37. Бродіння. Загальна характеристика.
38. Двофозність бродіння.
39. Гомо- та гетероферментативні молочнокислі бактерії.
40. Шляхи використання молочнокислих бактерій.
41. Спиртове бродіння. Виробництво спирту, пивоваріння та виробництво вина.
42. Бульбочкові азотфіксуючі бактерії: морфологія та фізіологія, механізм проникнення.
43. Азотфіксуючі мікроорганізми, що вільно мешкають.
44. Бактеріальні добрива.
45. Механізм фіксації молекулярного азоту.
46. Участь мікроорганізмів у кругообігу азоту.
47. Участь мікроорганізмів у кругообігу вуглецю.
48. Участь мікроорганізмів у кругообігу сірки.
49. Коменсалізм у мікроорганізмів.
50. Синтрофізм та хижацтво у мікроорганізмів.
51. Антагонізм і паразитизм у мікроорганізмів.
52. Трансформація у бактерій.
53. Трансдукція у бактерій: загальна, специфічна, абортівна.
54. Методи пеніцилінового добору та відбитків.
55. Кон'югація у бактерій.
56. Бактеріальні плазмідни.
57. Використання прокаріотів у генній інженерії.

ВИМОГИ ДО НАПИСАННЯ КУРСОВОЇ РОБОТИ З МІКРОБІОЛОГІЇ

- Курсова робота обсягом 10-15 сторінок формату А4 повинна бути написана від руки.
- Титульна сторінка курсової роботи оформлюється за загальноприйнятими правилами.
- Курсова робота повинна включати наступні розділи: вступ, основна частина (може бути розділена на розділи та підрозділи), заключення (або висновки). Також необхідно скласти зміст та список використаної літератури.
- В тексті курсової роботи в квадратних дужках необхідно вказувати посилання на порядковий номер джерела літератури, без вказівки процитованих сторінок.
- При написанні курсової роботи допускається використання Інтернет-ресурсів, за умови правильного оформлення посилань, але це не повинно бути єдиним джерелом інформації.

Віннікова Ольга Іванівна
Моргуль Ірина Миколаївна

ПРАКТИКУМ З МІКРОБІОЛОГІЇ
Методичні рекомендації для студентів 2 курсу денного відділення
біологічного факультету

Відповідальний за випуск О. І. Віннікова
Комп'ютерний набір та верстка О. І. Віннікова, І. М. Моргуль
Розробка дизайну макета обкладинки І. М. Дончик
Коректор А. І. Мелікова

Підписано до друку 2009. Формат 60x84/16
Папір офсетний. Друк ризографічний
Умовн. друк. арк. Обл.-вид. арк. Наклад 100 прим.
Ціна договірна