


Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр
«Мала академія наук України»

Антоненко С. В.

ОСНОВИ МІКРОБІОЛОГІЇ

Лабораторний практикум

Київ – 2017



Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр «Мала академія наук України»

Антоненко С. В.

ОСНОВИ МІКРОБІОЛОГІЇ

Лабораторний практикум

Київ 2017

УДК 579.2 + 579.6

Основи мікробіології : лабораторний практикум /
уклад. С. В. Антоненко – К., 2017. – 44 с.

Посібник містить теоретичний та практичний матеріал з курсу «Основи мікробіології». Лабораторний практикум розрахований на учнів хіміко-біологічної школи Малої академії наук України.

УДК 579.2 + 579.6

© Антоненко С. В., 2017

© Національний центр
«Мала академія наук України», 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
ПРАВИЛА ПОВЕДІНКИ ПІД ЧАС РОБОТИ У БІОЛОГІЧНОМУ КАБІНЕТІ	5
ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ.....	7
<i>Мікробіологія як наука.....</i>	7
<i>Встановлення мікробіології як науки. Короткі історичні відомості.....</i>	8
<i>Ультраструктура та морфологія прокаріот.....</i>	9
<i>Фізіологія мікроорганізмів</i>	14
<i>Ріст і розмноження бактерій</i>	15
<i>Мікрофлора ґрунту, води та повітря.....</i>	17
<i>Мікрофлора тіла людини</i>	19
<i>Культивування бактерій.....</i>	21
ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА	23
ДОДАТКИ.....	38
ЛІТЕРАТУРА.....	42

ПЕРЕДМОВА

З моменту першого опису мікроорганізмів А. Левенгуком, наука про них – мікробіологія – почала свій стрімкий розвиток. На сьогодні мікробіологія – це наука із трьохсотлітньою історією, за цей тривалий період вдалося зібрати велику кількість наукових даних про особливості будови мікроорганізмів, їх фізіологію, видове різноманіття, екологію та значення в житті людини. У сучасному світі знання з мікробіології стали важливими не лише при підготовці медичних працівників, а й у повсякденному житті. Адже знання та дотримання правил особистої гігієни можуть вберегти від небезпечних інфекційних захворювань, збудниками яких є мікроорганізми.

Основною метою цього посібника є надання методичної допомоги учням для більш ефективного засвоєння знань, закріплення теоретичного матеріалу, а також осмисленого виконання лабораторних робіт під час вивчення курсу «Основи мікробіології». Основна увага надається з'ясуванню місця прокаріотних мікроорганізмів у системі органічного світу, вивченню будови та функцій окремих структур прокаріотної клітини, метаболічних процесів, росту та розмноженню мікроорганізмів, встановленню основного видового складу мікрофлори людини, розгляду санітарно-мікробіологічних норм повітря, води та ґрунту, визначенню ролі мікроорганізмів в житті людини. В загальному, даний комплекс знань, допоможе учням у формуванні сучасного наукового світогляду та вихованні правил особистої гігієни.

Для досягнення даної мети необхідно виконати ряд завдань, які відповідають основним етапам роботи:

1. Підбір та опрацювання літератури з курсу, яка відображає особливості їх морфології та ультраструктури, вивчає фізіологію прокаріотичної клітини, ріст та розмноження, видовий складу, поширення в природі та культивування мікроорганізмів в лабораторних умовах.

2. Вивчити правила та вимоги техніки безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії, ознайомитися з основним лабораторним посудом та правилами його стерилізації, навчитися готувати поживні середовища та оволодіти навичками культивування мікроорганізмів, дослідити мікрофлору людини, повітря, води та ґрунту, встановити вплив світла, фітонцидів антибіотиків на ріст, розмноження, фізіологічні особливості бактерії, визначити роль мікроорганізмів у медицині, біотехнології, харчовій промисловості та повсякденному житті тощо.

3. Проаналізувавши отримані експериментальні дані, зробити висновки та розробити рекомендації щодо дотримання правил особистої гігієни.

Правила поведінки під час роботи в біологічному кабінеті

I. Загальні положення

1.1. Під час роботи в кабінеті біології будьте обережними, дотримуючись порядку й чистоти на робочому місці, дотримуйтесь правил безпеки. Безладність, поспішність, необачність у роботі й порушення правил техніки безпеки можуть привести до нещасних випадків.

II. Вимоги безпеки перед початком роботи

- 2.1. Чітко з'ясуйте порядок і правила проведення досліду.
- 2.2. Перевіряйте наявність і надійність посуду, приладів та інших предметів, необхідних для виконання завдання.
- 2.3. Звільніть робоче місце від усіх непотрібних для роботи предметів та матеріалів.
- 2.4. Починайте виконувати завдання тільки з дозволу вчителя.
- 2.5. Виконуйте тільки ту роботу, що передбачена завданнями або доручена вчителем. Виконувати роботи не пов'язані з завданням забороняється.
- 2.6. Не відволікайтеся самі і не відволікайте інших від роботи сторонніми розмовами.

III. Вимоги безпеки під час виконання роботи

- 3.1. Для виконання завдання користуйтеся посудом і приладами виданими вчителем.
- 3.2. Нагріваючи рідини, тримайте посудину отвором від себе і не спрямовуйте на сусідів.
- 3.3. Обережно поведіться з гострими предметами (ножицями, препарувальними голками).
- 3.4. Розбавляючи концентровані кислоти водою, обережно доливайте кислоту у воду, а не навпаки.
- 3.5. Посуд, у якому проводять досліди з органічними розчинниками, перед заповненням повинен бути чистим та сухим.

IV. Вимоги безпеки після закінчення роботи

- 4.1. Розлиті випадково кислоти або розчини лугів збирайте і зливайте в місця вказані вчителем.
- 4.2. Після закінчення роботи ретельно вимийте руки з милом.

V. Особливості роботи в мікробіологічній лабораторії

- 5.1. До приміщення мікробіологічної лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу – халату.
- 5.2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.

- 5.3. Перед початком занять черговий повинен одержати від лаборанта дрібний інвентар.
- 5.4. Для попередження розсіювання мікроорганізмів не залишати відкритими пробірки, колби, чашки з культурами мікроорганізмів.
- 5.5. Після роботи металеві інструменти (пінцети, скальпелі, мікробіологічні петлі) необхідно прожарити на вогні.
- 5.6. Після використання скляні піпетки, предметні і покривні скельця з живими препаратами, шпателі необхідно занурити у кристалізатор з дезінфікуючим розчином.
- 5.7. Після закінчення занять учні миють посуд, прибирають робоче місце.
- 5.8. Черговий учень повинен здати дрібний інвентар та прослідкувати за порядком в лабораторії.

VI. Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

- 6.1. Не пробуйте хімічні речовини на смак, адже будь-яка з них у тій чи іншій мірі є отруйною.
- 6.2. Не заглядайте в посудину зверху (навіть у пробірку), тому що у випадку виштовхування рідини може статись нещасний випадок.
- 6.3. Нагріваючі рідини, не залишайте їх без нагляду навіть на короткий час.
- 6.4. При виявленні несправності установок негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя.
- 6.5. При попаданні на шкіру, одяг будь-яких речовин негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя та змийте їх великою кількістю води.

З правилами ознайомлений /-на

П.І.П.

(дата)

(підпис)

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Мікробіологія як наука

Мікроорганізми – це найдрібніші переважно одноклітинні істоти, видимі в мікроскоп, характеризуються величезною різноманітністю видів, надзвичайно широко поширені в природі і є єдиними формами живої матерії, що заселяють будь-які, самі різноманітні субстрати довкілля, включаючи і більш високоорганізованих представників тваринного і рослинного світу. Вони заселили Землю ще задовго до появи рослин і тварин, близько 3–4 млрд років тому.

Мікробіологія – це наука, яка вивчає будову, біологію, екологію мікроорганізмів, а також зміни викликані ними в організмах людей, тварин, рослин і в неживій природі.



Мал. 1. Розділи мікробіології

Успіхи у мікробіології відкрили нові можливості для профілактики та лікування багатьох інфекційних захворювань, у боротьбі з якими медицина раніше була безсила. Невід’ємною стала участь мікроорганізмів у розвитку харчової промисловості, сільського господарства, вони широко використовуються у системах біологічного очищення води. У природі вони розкладають складні речовини на прості, які знову використовуються організмами, вони першими оселяються на материнській гірській породі та обумовлюють ґрунтоутворюючі процеси, ціанобактерії здатні до фотосинтезу, тощо. Таким чином, незважаючи на патогенність деяких видів, існує величезна кількість мікроорганізмів, роль яких в природі та житті людини є неocenною, без них зупинився б колообіг речовин в природі і життя на Землі стало б неможливим.

Встановлення мікробіології як науки. Короткі історичні відомості.

I – Евристичний етап:

Гіппократ (460–370 рр. д. н. е.) – вперше висловив думку про те, що в повітрі під час епідемій містяться особливі хвороботворні утворення – «міазми».

Авіцена (980–1037 рр. д. н. е.) – запропонував теорію про те, що існують невидимі для людини, живі організми, які передають захворювання через воду і повітря.

Антоні ван Левенгук – сконструював світловий мікроскоп, перші описи мікроорганізмів.

II – Морфологічний (описовий) етап:

Д. Самойлович (1744–1805) – дослідив інфекційне захворювання – чуму.

Е. Дженнер (1749–1823) – розробив методику щеплень проти віспи.

Д. Іванов (1864–1920) – відкрив неклітинні форми життя – віруси на прикладі збудника захворювання тютюна – тютюнової мозаїки.

III – Фізіологічний етап:

Л. Пастер (1822–1895) – з'ясував фізіологічні особливості процесів бродіння і гниття, – роль мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі, відкрив анаеробні мікроорганізми, розробив принципи асептики, методи стерилізації, методи вакцинації. Відкинув теорію самозародження бактерій.

IV – Імунологічний етап:

І. І. Мечников (1845–1916) – основоположник імунології, розробив теорію фагоцитозу і обґрунтував клітинну теорію імунітету.

П. Ерліх (1854–1915) – розробив гуморальну теорію імунітету. Між І. Мечниковим та П. Ерліхом тривалий час точилася дискусія з приводу отриманих даних. Мечников першим зрозумів, що ці теорії доповнюють одна одну. В 1908 р. І. І. Мечникову та П. Ерліху була присуджена Нобелівська премія за відкриття двох головних механізмів імунітету: клітинного (фагоцитоз) і гуморального (антитілоутворення).

А. Флемінг (1881–1955) – відкрив пеніцилін і почалася ера антибіотикотерапії, яка призвела до революційного прогресу медицини.

V – Молекулярно-генетичний етап:

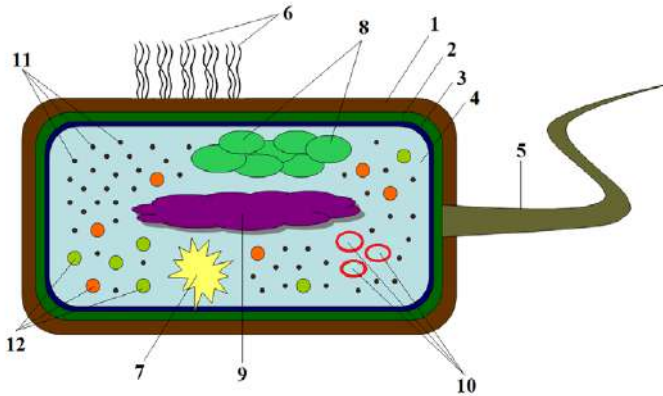
Сучасний етап розвитку мікробіології, вірусології та імунології, він розпочався у другій половині ХХ ст. у зв'язку з досягненнями в області генетики та молекулярної біології, створенні електронного мікроскопа.

Д. Уотсон і Ф. Крік (1953) – розшифрували структуру молекули ДНК.

Генна інженерія сприяла впровадженню промислового виробництва біологічно активних речовин – гормонів, ферментів, інтерферона, вакцин.

Ультраструктура та морфологія прокаріот

Прокаріоти (*Prokariota*) – це доядерні мікроорганізми, які не володіють типовим клітинним ядром і хромосомним апаратом, клітина складається із оболонки, цитоплазматичної мембрани, яка може утворювати вп'ячування в цитоплазму, та власне цитоплазму з нуклеоїдом, рибосомами та включеннями. А також мають додаткові елементи будови: капсулу, плазміди, джгутики, фібрії тощо (див. мал. 2, А). Прокаріоти широко поширені в навколишньому середовищі: ґрунті, воді, на рослинах, в організмі людини і тварин.



А



Б

Мал. 2. А – схема будови прокаріот: 1 – капсула; 2 – клітинна стінка; 3 – клітинна мембрана; 4 – цитоплазма; 5 – джгутик; 6 – фібрії; 7 – мезосома; 8 – фотосинтетичні мембрани; 9 – нуклеоїд; 10 – плазмід (позахромосомні спадкові елементи); 11 – рибосоми; 12 – включення.

Б – мікрофотографії бактерій (за Леонтьєва А. В., Шевяхова Ю. Б.)

Клітинна стінка – захищає прокаріот від зовнішніх впливів, надає їм характерної форми, підтримує сталість внутрішнього середовища, через неї відбувається транспорт поживних речовин і виділення метаболітів, на її поверхні розміщуються різноманітні рецептори. Основним хімічним компонентом клітинної стінки є специфічний гетерополімер – пептидоглікан (муреїн). Клітинна стінка характерна для всіх бактерій, за винятком L-форм і мікоплазм.

Деякі представники можуть додатково утворювати поверхневу слизову оболонку – **капсулу** – зовнішній потовщений слизовий шар,

який захищає бактерії від фагоцитозу у внутрішньому середовищі організму, а в умовах оточуючого середовища сприяє прикріпленню до субстрату, захисту від радіації, токсинів та бактеріофагів.

Цитоплазматична мембрана – створює фізичний, осмотичний і метаболічний бар'єр між внутрішнім вмістом прокаріотичної клітини і зовнішнім середовищем. Вона досить тонка, складається з білків та фосфоліпідів. Цитоплазматична мембрана утворює впинання в цитоплазму у вигляді змішаних мембранних систем, які називаються **мезосомами**. Вони беруть участь у діленні клітини і розходженні дочірніх хромосом після реплікації; також припускається виконання ними центральної функції у дихальній активності прокаріот.

Цитоплазма – внутрішнє середовище прокаріотичної клітини, до її складу входить вода, мінеральні речовини, білки, вуглеводи, ліпіди, вітаміни, спадковий матеріал клітини, а також рибосоми та різні включення.

Нуклеоїд – спадковий апарат клітини. Так як у прокаріот відсутнє диференційоване ядро, його функції виконує нуклеоїд, який представлений однією довгою кільцевою молекулою ДНК. В нуклеоїді відсутні ядерна мембрана, гістонові білки, нуклеосомна організація хроматину.

Також прокаріотична клітина може містити **позахромосомний генетичний матеріал** у вигляді плазмід, вони не є життєво необхідними елементами, а забезпечують додаткові властивості, наприклад, стійкість бактерій до певних антибіотиків тощо.

Рибосоми – являються білоксинтезуючими системами клітини, а тому можуть стати мішенню для дії багатьох антибіотиків.

Також як додаткові елементи у будові прокаріот виділяють: джгутики, пілі (фібрії, війки), спори, включення.

Джгутики – органи руху прокаріот у вигляді спірально зігнутих циліндричних утворень білкової природи на поверхні клітини, які кріпляться базальним тільцем до цитоплазматичної мембрани.

Пілі (фімбрії, ворсинки, війки) – це прямі циліндричні утворення білкової природи, які рівномірно покривають поверхню клітини і виконують адгезивну функцію. Складаються з білка піліна.

Включення – внутрішньоклітинні структури бактерій, природа і функції яких досить різні. В одних випадках включення є продуктами обміну бактеріальної клітини, а в інших – запасом поживних речовин.

Вони мають діагностичне значення при вивченні морфології збудника з метою лабораторної діагностики бактеріальних інфекцій.

Деякі прокаріоти в несприятливих умовах здатні утворювати особливі захисні форми – **спори**, метаболізм такої клітини зведено до нуля, вони резистентні до нагрівання, радіації, висихання та впливу хімічних речовин. Завдяки цим властивостям, мікроорганізми можуть довго зберігатися і забезпечувати збереження виду в несприятливих умовах.

Форма бактерій та їх розміри мають велике таксономічне значення і є важливими критеріями при їх ідентифікації. Таким чином, прокаріоти поділяють на декілька груп:

1. Коки – клітини кулястої форми, розрізняють декілька груп коків по взаємному розташуванню окремих клітин.

1.1. Мікрококи – характеризуються поодиноким і безладним розташуванням клітин. Як правило, це сапрофітні мікроорганізми і за звичайних умов не викликають захворювань у людини. Проте в осіб з імунодефіцитними станами або у тих, хто переніс складні операції, трансплантації органів і тканин, вони можуть спричинити гнійно-септичні ускладнення.

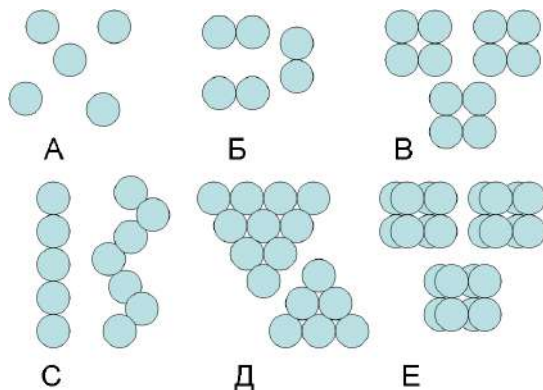
1.2. Диплококи – розміщуються попарно, після поділу не розходяться, а існують парами. Типовими представниками є збудники епідемічного цереброспінального менінгіту.

1.3. Тетракоки – коки, які розміщуються по чотири, а після поділу у двох взаємно перпендикулярних площинах утворюють тетради. Як правило, ці мікроорганізми не патогенні для людини.

1.4. Стрептококи – коки, які після поділу в одній площині не розходяться, а формують ланцюжки, що складаються з 3–4, а деколи й десятків клітин круглої або еліпсоподібної форми. Частина їх є сапрофітами, представниками нормальної мікрофлори людини, інші викликають важкі гнійно-септичні процеси (пневмонію, менінгіт, остеомієліт, холецистит, сепсис тощо). Доведена роль стрептококів у розвитку скарлатини, ревматизму, бешихи.

1.5. Стафілококи – коки, які діляться в декількох площинах, клітини розташовуються хаотично, у вигляді скупчень, що нагадують виноградне гроно. Стафілококи – трапляються в повітрі, ґрунті, організмі людини і тварин. Чисельні їх представники спричиняють різноманітні гнійно-септичні захворювання, практично в організмі людини немає органів і тканин, які не ушкоджуються стафілококами.

1.6. Сарцини – коки, у яких поділ відбувається в трьох взаємно перпендикулярних площинах, утворюють скупчення кубічної форми. Патогенних представників серед них немає.



Мал. 3. Схема коковидних форм бактерій: А – мікрококи; Б – диплококи; В – тетракоки; С – стрептококи; Д – стафілококи; Е – сарцини

2. Паличкоподібні – паличкоподібні бактерії (розміром 1,0–10,0 мкм, товщина від 0,5 до 2,0 мкм) мають різноманітну форму (циліндричну, еліпсоподібну, овальну, веретеноподібну, у вигляді барабанної палички або тенісної ракетки). Їх кінці можуть бути рівні або нібито обрублені й навіть увігнуті (збудник сибірки), заокруглені (кишкові палички, збудники черевного тифу, дизентерії). Трапляються паличкоподібні форми із загостреними кінцями (фузобактерії), булавоподібними потовщеннями на них. Часто трапляються мікроорганізми, що мають розгалуження (мікобактерії туберкульозу). Це дозволяє розпізнавати вид мікроорганізмів, що має велике значення при лабораторній діагностиці. За здатністю утворювати спори розподіляються на бактерії, бацили, клостридії та ракетсії.

2.1. Власне бактерії – мікроорганізми, які не здатні до утворення спор. До них належать збудники сальмонельозів, черевного тифу, дифтерії, туберкульозу, кашлюка.

2.2. Бацили – здатні утворювати спори, розмір яких не перевищує діаметр клітини (збудники сибірки).

2.3. Клостридії – здатні утворювати спори, розмір яких перевищують розмір клітини (збудники газової анаеробної інфекції, правця, ботулізму).

2.4. Ракетсії – найдрібніші паличкоподібні бактерії, облігатні внутрішньоклітинні паразити.

3. Спіралеподібні бактерії – мають звивисту, штопороподібну форму. До цієї групи прокариот належать вібріони, спірили, спірохети.

3.1. Вібріони – бактерії, з одним невеликим вигином розміром 1/4 завитка спіралі, що надає їм схожість із комою. Представниками цієї групи є збудники холери і холероподібні вібріони, які населяють водоймища.

3.2. Спірили – бактерії, які мають декілька вигинів в одному чи декількох місцях, що надає їм форму спіралі. Патогенним представником є спірила, яка викликає у людини «хворобу укусу щурів».

3.3. Спірохети – тонкі, довгі бактерії також мають спіральної форми і розрізняються між собою числом завитків і довжиною (довжина може сягати 500 мкм, а діаметр збудників – 0,3–1,5 мкм).

4. Ниткоподібні бактерії для людини непатогенні. Є мешканцями ґрунтів, водоймищ, беруть участь у процесах кругообігу речовин у природі. До цієї групи належать синьо-зелені водорості, коренебактерії тощо.

5. Незвичайної форми бактерії – це, в основному, вільноживучі мікроорганізми, які беруть участь у процесах біодеградації різноманітних природних сполук.



Мал. 4. Незвичайні форми бактерій: 1 – бактерії типу шестикутної зірки; 2 – бактерії, які утворюють вирости (простеки); 3 – бактерії, які галузяться; 4 – пластинчасті клітини архебактерій; 5 – тороїди; 6 – трикутні; 7 – гантелеподібні бактерії; 8 – стебельцеві бактерії; 9 – трихоми не циліндричні; 10 – червоподібні бактерії; 11 – клітини, з'єднані в пластинки

Фізіологія мікроорганізмів

Фізіологія мікроорганізмів – окремий розділ мікробіології, який вивчає живлення, дихання, розвиток мікроорганізмів при взаємодії з чинниками зовнішнього середовища.

Живлення вельми складний процес, який відбувається за рахунок безперервного проникнення певних поживних речовин через напівпроникну оболонку і виділення з клітини продуктів обміну. Можливість проникнення речовин залежить від розміру, структурної будови молекули, її здатності до розчинення у компонентах цитоплазматичної мембрани, концентрації речовин тощо. Так як оболонка бактерій непроникна для білків та інших складних сполук, необхідних для живлення клітини, ці речовини засвоюються після розщеплення ферментами. Велике значення для нормального харчування бактерій має правильне співвідношення концентрацій солей всередині клітин і в навколишньому середовищі. Найбільш сприятливі умови харчування створюються при концентрації солей у навколишньому середовищі, рівній 0,5% розчину NaCl. При попаданні в 2–10%-ний розчин NaCl відбувається зморщування бактеріальної клітини – зневоднення, яке робить її нездатною до розмноження. На цьому заснований спосіб консервування продуктів за допомогою соління.

За способом живлення бактерії можна поділити на 6 груп:

- 1) **Аутотрофи** – бактерії, які самостійно синтезують органічні речовини з неорганічних; як джерело енергії використовують неорганічний вуглець;
- 2) **Гетеротрофи** – харчуються готовими органічними сполуками;
- 3) **Сапрофіти** – гетеротрофи, які утилізують органічні залишки відмерлих організмів;
- 4) **Паразити** – бактерії, які існують за рахунок органічних речовин живих клітин і тканин, викликають захворювання;
- 5) **Фототрофи** – фотосинтезуючі бактерії, як джерело енергії використовують світло;
- 6) **Хемотрофи** – бактерії, які живляться за допомогою хемосинтезу, оскільки органічні речовини синтезуються з неорганічних за рахунок енергії хімічних реакцій. До них належать нітрифікуючі, залізо- і сіркобактерії.

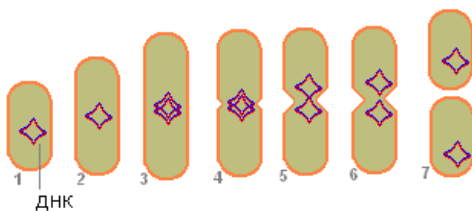
Дихання бактерій. Бактерії, як і вищі організми, для дихання використовують кисень. Проте Л. Пастер виявив тип бактерій на які згубно діє наявність вільного кисню в середовищі. Енергію, яка необхідна для життєдіяльності, вони отримують в процесі бродіння. Таким чином, виділяють 3 групи бактерій по відношенню до молекулярного кисню:

- 1) **Облігатні аероби (обов'язкові)** – можуть існувати лише при наявності кисню в середовищі;
- 2) **Облігатні анаероби** – існують на середовищі без кисню, який для них токсичний (кlostридій ботулізму, стовбняк, гангрена тощо);
- 3) **Факультативні анаероби** – можуть рости, як при наявності кисню, так і без нього, оскільки вони можуть переключатися з дихання на бродіння (більшість патогенних і сапрофітних мікроорганізмів).

Ріст і розмноження мікроорганізмів

Ріст – збільшення бактеріальної клітини в розмірах без збільшення числа особин в популяції. Популяція – це сукупність бактерій одного виду (чиста культура), або різних видів (змішана асоціація), які розвиваються в обмеженому просторі.

Розмноження бактерій – процес, що забезпечує збільшення числа особин в популяції. Бактерії характеризуються високою швидкістю розмноження. Найчастіше бактерії розмножуються нестатевим, бінарним, поділом. У кулястих бактерій може проходити по будь-якому з діаметрів клітини; у паличковидних і звивистих бактерій перегородка ділить тіло впоперек; поділ спірохет може відбуватися вздовж тіла бактерії.



Мал. 5. Схема поділу бактеріальної клітини: 1, 2 – бактерії, які накопичили достатньо поживних речовин, збільшилися в розмірах і готуються до процесу поділу; 3, 4 – молекули ДНК бактеріальної клітини приєднуються до стінки бактерій; 5, 6 – ДНК розходиться між двома клітинами; 7 – поділ цитоплазми, закінчення поділу

Виділяють декілька фаз росту бактерій:

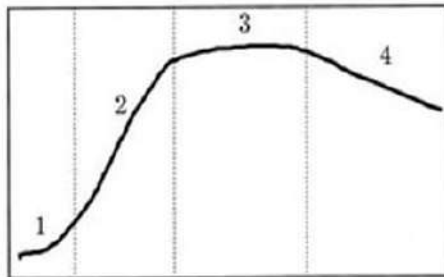
1) **лак-фаза (початкова фаза):** охоплює проміжок часу від моменту висівання бактерій на живильне середовище й до досягнення максимальної швидкості росту. В цей період бактерії пристосовуються до умов культивування. Тривалість цієї фази залежить від зовнішніх умов, віку і видової специфічності бактерій.

2) **лог-фаза або експоненціальна фаза:** в цей період розмноження бактерій відбувається з найбільшою швидкістю. Кількість клітин збільшується в геометричній прогресії. Внаслідок інтенсивного розмноження клітин відбувається швидке поглинання поживних речовин із живильного середовища і нагромадження в ньому шкідливих продуктів обміну. Це, своєю чергою, сповільнює розмноження культури і лог-фаза переходить у наступну фазу.

3) **стаціонарна фаза:** настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватись. У цей період кількість новоутворених клітин дорівнює числу відмерлих, а тому кількість живих клітин деякий час залишається незмінною. Разом з цим стаціонарна фаза характеризується максимальною величиною біомаси, максимальною життєдіяльністю мікробної популяції.

4) **фаза відмирання:** відмирання бактерій переважає над розмноженням, зростає гетерогенність культури тощо. Такий стан бактеріальної популяції зумовлюється зміною фізико-хімічних властивостей поживного середовища та іншими несприятливими чинниками. Фаза відмирання досі ще недостатньо вивчена.

5) **фаза виживання:** виживання окремих клітин, які збереглися протягом тривалого часу в умовах загибелі більшості клітин популяції.



Мал. 6. Фази росту бактерій: 1 – лак-фаза; 2 – лог-фаза; 3 – стаціонарна фаза; 4 – фаза відмирання

Швидкість поділу бактеріальної клітини за сприятливих умов дуже велика і становить близько 30 хвилин. Якби всі бактерії залишилися живими, то через добу вони суцільним шаром покрили б всю земну кулю. Насправді ж у природі немає таких ідеальних умов, за яких бактерії могли б безперешкодно розмножуватися. Однак цього не відбувається, оскільки більша частина бактерій гине внаслідок несприятливих умов зовнішнього середовища: нестачі харчування і вологи, коливань температури, згубного впливу продуктів обміну, поїдання бактерій іншими організмами та багато інших чинників – усе це негативно позначається на розмноженні бактерій. І все ж немає такого місця на землі, такого предмета, які б не були всіяні різними бактеріями. Варто бактеріям потрапити на харчові продукти, які є для них поживним середовищем, як незабаром ці продукти виявляться зіпсованими внаслідок масового розмноження на них мікроорганізмів. Тому дуже важливо при переробці та зберіганні харчових продуктів створити такі умови, які виявилися б несприятливими для бактерій і запобігли їх масове розмноження. З цією метою застосовують низькі і високі температури, висушування, (видалення вологи з продукту) і ряд інших факторів, які несприятливо діють на бактерії.

Мікрофлора ґрунту, води та повітря

Ґрунт. Ґрунт є основним вмістилищем мікробного світу й головною ареною його життєдіяльності, він включає сотні й тисячі видів бактерій, грибів, найпростіших, мікоплазм і вірусів. Загалом склад мікрофлори ґрунту залежить від його типу, стану, складу рослинності, вологості, середньої температури. Основні представники мікрофлори ґрунту: нітрифікуючі, денітрифікуючі, азотфіксуючі бактерії, сіркобактерії, залізобактерії, ціанобактерії, гриби, найпростіші. Кількість бактерій в 1 г ґрунту величезна: від 200 млн у глинястому ґрунті до 5 млрд у чорноземному. Найбільше бактерій у верхньому шарі ґрунту – на глибині 5–15 см. У глибоких шарах (1,5–6 м) трапляються одиничні особини; їх виявлено і в артезіанській воді. Бактерії відіграють важливу роль у ґрунтоутворюючих процесах, самоочищенні ґрунту, а також у кругообізі речовин у природі. Родючість ґрунту залежить не тільки від наявності неорганічних та органічних речовин, а й від різних видів мікроорганізмів, що зумовлюють якісний склад ґрунту.

Вода. Мікрофлора води, адаптована до умов місцезнаходження, а саме освітленості, насиченості киснем і вуглекислим газом, вмісту поживних речовин тощо. У верхніх шарах води переважають аеробні мікроорганізми, в нижніх шарах і на дні аероби. Основними представниками прісних водойм є паличкоподібні (псевдомонади, аеромонади), кокковидні (мікрококи), ниткоподібні (актиноміцети). Крім того, за рахунок забруднення зливовими і стічними водами можуть з'являтися і представники патогенної мікрофлори людини і тварин (кишкова паличка, збудники дизентерії, холери, лептоспірозу і т. д.).

Широко поширені мікроорганізми і у водах морів та океанів, до них належать галобактерії і галококи, які адаптувались до існування в умовах високих концентрацій солей. Із прибережної зони морів систематично висіваються галофільні вібріони, які спричиняють у людей гострий гастроентерит, що виникає в результаті вживання у їжу малосольної риби, а також недостатнього термічно оброблених креветок і мідій.

Ступінь біологічного забруднення води прийнято виражати **сапробністю** води (ступінь насиченості води органічними речовинами). Розрізняють три зони сапробності:

1) **Полісапробна зона** – дуже забруднена вода, бідна на кисень і багата на органічні сполуки. Кількість бактерій в 1 мл досягає 1 млн і більше, переважають *E.coli* та анаеробні бактерії, які спричиняють процеси гниття і бродіння;

2) **Мезосапробна зона** (зона помірного забруднення) – число бактерій в 1 мл становить сотні тисяч, *E.coli* наявна у незначній кількості;

3) **Олігосапробна зона** – характерна для чистої води. Кількість бактерій у ній незначна, близько кількох десятків або сотень на 1 мл води, *E.coli* у цій зоні відсутня.

Повітря. Мікрофлора повітря дуже різноманітна за рахунок мікроорганізмів, які надходять до нього з ґрунту, води і живих організмів. Видовий склад мікрофлори повітря залежить від ступеня його забруднення, температури, осадів, характеру місцевості, вологості та інших факторів. Прямі сонячні промені, перепади температури і вологості викликають загибель мікрофлори повітря. Чим вища концентрація у повітрі пилу, газів, кіптяви, тим більше в ньому бактерій. Кожна частинка пилу або диму може адсорбувати їх на своїй поверхні. Унікальним складом може володіти мікрофлора закритих приміщень, яка визначається частотою провітрювання кімнат, якістю і регулярністю прибирання, кількістю людей в приміщенні тощо. У повітрі великих міст міститься велика кількість бактерій, в той час як у сільській місцевості мікроорганізмів значно менше. Найбідніша мікрофлора повітряних просторів над лісами, морями, горами.

Загалом кількість бактерій у повітрі коливається у широкому діапазоні від кількох особин до багатьох десятків тисяч екземплярів в 1 м³. Залежно від пори року якісний і кількісний склад мікрофлори повітря значно змінюється. Якщо взяти загальну кількість мікроорганізмів у повітрі взимку за 1, то весною вона становитиме – 1,7, влітку – 2, восени – 1,2 одиниць. Основними представниками мікрофлори повітря є актиноміцети, сарцини, мікрококи, бацили, гриби. Серед патогенних представників можуть бути збудники дифтерії, туберкульозу, коклюшу, скарлатини, менінгіту, ангіни, парагрипу, грипу, кору, аденовірусних інфекцій тощо. Повітряний шлях є провідним при передачі респіраторних інфекцій (повітряно-крапельний або повітряно-пиловий шлях).

Мікрофлора тіла людини

Організм людини населяють понад 500 видів бактерій, біля 50 видів вірусів і понад 20 видів найпростіших. Загальна кількість мікроорганізмів досягає 10^{14} , що в 10 разів більше, ніж всіх клітин макроорганізму. Важливою особливістю нормальної мікрофлори є її індивідуальність й анатомічна стабільність. В різних ділянках тіла вона неоднакова, оскільки кожний біотоп характеризується своєрідними умовами для існування мікроорганізмів. Найбільше епідеміологічне значення мають представники мікробних угруповань шкіри, верхніх дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, сечо-статевих органів. Так на **поверхні шкіри** однієї людини виявляли від 85 млн до 1 млрд особин мікроорганізмів. Типовими представниками серед яких є сардини, плісеневі й дріжджові гриби, непатогенні коринебактерії та умовно-патогенні бактерії (стафілококи, стрептококи), можуть траплятися кластридії правця, анаеробної інфекції та ін. Живлення їх забезпечується виділеннями жиркових і сальних залоз, відмерлими клітинами і продуктами розпаду. Найсприятливіші умови для життя мікроорганізмів – у **ротовій порожнині**. Слина – важливий поживний субстрат. У ній є амінокислоти, білки, ліпіди, вуглеводи, неорганічні речовини. Більшість видів мікроорганізмів порожнини рота – аероби й факультативні анаероби, типовими представниками серед яких є різні види стрептококів, бактероїдів, лактобактерій, лептотриксів, фузобактерій, актиноміцетів, спірохет та інші.

Стравохід у здорових людей не містить мікроорганізмів, або їх дуже мало. У **шлунку** прижилися дріжджі, сарцини, кампілобактерії, рідко виявляють лактобактерії, стафіло- і стрептококи. У **тонкому кишечнику** знаходять ентерококи, біфідобактерії, лактобактерії тощо. Найбільш численна й різноманітна мікрофлора **товстого кишечника**, всього описано понад 260 видів бактерій. Основну її масу становлять анаеробні мікроорганізми. У деяких людей у кишечнику знаходять ентеровіруси, які при порушенні опірності організму можуть викликати різноманітні захворювання. В ряді випадків у випорожненнях можна виявити різні види найпростіших. Стійкі порушення нормальних мікробіоценозів називають дисбактеріозами. При цьому відбуваються зміни самого складу автофлори та кількісного співвідношення окремих її представників: значне зменшення видів нормальної мікрофлори аж до повного їх зникнення, або появи у великій кількості тих, які в нормі рідко трапляються. Це, в основному, стафілококи, грамнегативні палички, дріжджоподібні гриби *Candida* та кластридії.

Мікрофлора дихальних шляхів. Разом з повітрям людина вдихає величезну кількість частинок пилу й адсорбованих на них мікроорганізмів. Дослідним шляхом доведено, що кількість мікроорганізмів у повітрі, яке ми вдихаємо, у 200–500 раз більша, ніж у тому, яке видихаємо. Більшість їх затримується у порожнині носа і лише

невелика частина проникає в бронхи. Кінцеві розгалуження **бронхів і альвеоли легень** звичайно стерильні. У верхніх дихальних шляхах (носова частина глотки, зів) є кілька відносно постійних видів бактерій (стафілококи, стрептококи, непатогенні коринебактерії, пептококи та ін.). При ослабленні захисних сил організму в результаті охолодження, нестачі вітамінів, бактерії, які постійно перебувають у дихальних шляхах, стають здатними спричиняти гострі респіраторні захворювання, ангіну, пневмонію, бронхіт та ін. **Слизова оболонка носа** продукує муцин і лізоцим, які мають захисну дію. У порожнині носа є і секреторні антитіла. Однак, незважаючи на це, мікрофлора порожнини носа відносно стала – гемолітичний, або носовий, мікрокок, непатогенні коринебактерії, стафілококи, стрептококи, сапрофітні грамнегативні диплококи, капсульні грамнегативні бактерії, та ін. Крім бактеріальної мікрофлори, у дихальних шляхах протягом тривалого часу можуть зберігатися, не спричиняючи патологічних процесів, багато вірусів, зокрема аденовіруси.

Мікрофлора **очей і вух**. У 47% здорових людей **слизова оболонка очей** не містить мікроорганізмів, у решти на кон'юнктиві виявляють стрептококи, гемофільні бактерії, мікоплазми, деякі види вірусів. У окремих випадках автофлора очей (як і проникнення бактерій ззовні) може викликати кон'юнктивіти тощо. Шкіра **зовнішнього слухового проходу** заселена стафілококами та дифтеріодами. Рідше тут трапляються псевдомонади й ентеробактерії. **Середнє і внутрішнє вухо стерильні**. Періодично до них можуть проникати мікроорганізми з носоглотки, але вони швидко гинуть. За певних умов при масивному проникненні бактерій в середнє вухо виникає отит.

Культивування бактерій

Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається **культивуванням**, а вирощені мікроорганізми – культурою. При вирощуванні мікроорганізмів у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при вирощуванні на твердому середовищі – колонії. Колонія – це потомство однієї клітини, яка потрапила на агаризоване середовище. За виглядом колоній іноді можна розрізнити окремі види мікроорганізмів.

Для того, щоб культивування було успішним лабораторія повинна бути укомплектована різними приладами й обладнанням, необхідним для роботи з мікроорганізмів з урахуванням особливостей їх біології, а також для проведення дослідів і виконання мікробіологічних аналізів різних матеріалів. Одним із невід'ємних моментів функціонування мікробіологічної лабораторії є стерилізація лабораторного посуду.

Стерилізація – це повне звільнення будь-якого матеріалу від вегетативних клітин мікроорганізмів та їх форм, що перебувають у стадії спокою (спор). В основу процесу стерилізації покладена здатність деяких чинників викликати загибель мікробних клітин та їх спор.

Методи стерилізації поділяють на теплові та холодкові.

1) теплові – проводять при підвищеній температурі, до них належать: стерилізація кип'ятінням, стерилізація парою під тиском (автоклавування), стерилізація текучою парою (тиндалізація), стерилізація сухим жаром (в сухо-жарових шафах), стерилізація в полум'ї газового пальника або спиртівки, пастеризація (неповна стерилізація).

2) холодні – проводять без нагрівання, які в свою чергу поділяють 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 – знищення організмів, у т. ч. мікроорганізмів, здатних викликати хворобу спеціальними засобами (хімічними, фізичними, біологічними).

В лабораторних умовах бактерії культивують на **штучних поживних середовищах**. В залежності від харчових потреб того чи іншого виду харчові середовища повинні містити відповідні речовини необхідні для пластичного та енергетичного метаболізму.

Таким чином виділяють декілька груп поживних середовищ:

1) Основні – м'ясо-пептидний агар (МПА), м'ясо-пептидний бульйон (МПБ) – за своїм складом, наявністю живильних речовин вони придатні для культивування багатьох різноманітних видів бактерій.

2) *Спеціальні* – для виділення і вирощення мікроорганізмів, які не ростуть на простих середовищах (наприклад, для культивування стрептокока додають цукор).

3) *Елективні* – їх використовують для цілеспрямованого виділення та накопичення бактерій з матеріалу, який містить багато сторонніх мікробів. Додавання антибіотиків до складу живильних середовищ робить їх елективними відносно антибіотикостійких штамів.

4) *Диференційно-діагностичні* – це велика група середовищ, які дозволяють визначити певні біохімічні властивості мікроорганізмів і проводити їх первинну диференціацію. Вони поділяються на середовища для визначення протеолітичних, цукролітичних, редуруючих властивостей тощо.

Мікроорганізми зазнають вплив зовнішнього середовища. До факторів, які активно діють на ріст і розмноження мікроорганізмів належать: фізичні (температура, висушування, іонізуюче випромінювання, ультразвук, тиск) і хімічні. Більшість мікроорганізмів вирощують на поживному середовищі при температурі +37 °С протягом 1–2 діб у стерильних умовах з відповідним рН, осмотичним тиском, тощо.

Антибіотики – хіміотерапевтичні препарати природного походження або синтетичні аналоги, які мають вибіркиму здатність подавляти і затримувати ріст мікроорганізмів. Природні антибіотики продукують різні організми (гриби, бактерії і водорості). Мішенню антибіотиків є тільки жива клітина, на спори вони не діють. Деякі групи мікроорганізмів володіють стійкістю до антибіотиків (резистентністю). Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків може бути природною і набутою. Особливості розвитку резистентності до різних груп антибіотиків мають практичне значення для вибору препарату, схем лікування, визначення показів до спільного призначення медикаментів.

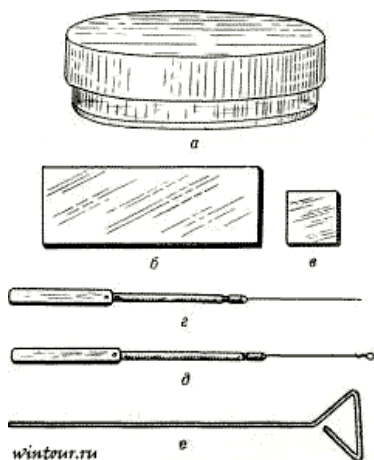
ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Практична робота № 1

ЗНАЙОМСТВО З ОСОБЛИВОСТЯМИ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ ТА ПРАВИЛАМИ РОБОТИ В НІЙ

Завдання 1. Вивчити правила техніки безпеки під час роботи у мікробіологічній лабораторії (див. ст. 5–6).

Завдання 2. Познайтися із обладнанням, посудом мікробіологічної лабораторії (див. мал. 7).



Мал. 7. Мікробіологічний посуд:

- а – _____
- б – _____
- в – _____
- г – _____
- д – _____
- е – _____

Завдання 3. Освоїти правила стерилізації обладнання, лабораторного посуду, поживних середовищ.

Стерилізація – це повне звільнення об’єктів навколишнього середовища від мікроорганізмів і спор. Виділяють декілька типів стерилізації:

Фізичний –

Хімічний – _____

Біологічний –

Механічний –

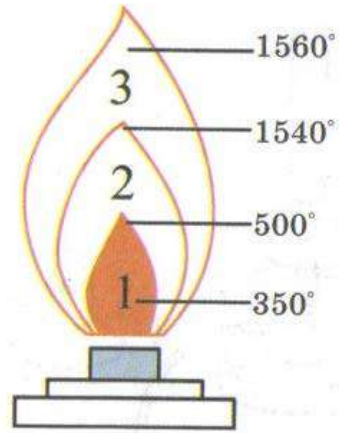
Стерилізація бактеріологічної петлі прожарюванням в полум'ї спиртів:

1. Бактеріологічну петлю беруть у праву руку і в горизонтальному положенні вносять її в нижню частину полум'я спиртівки, потім переводять в положення близьке до вертикального.

2. Нагрівають у верхній частині полум'я спочатку нижню, а потім верхню частину дроту.

3. Прожарюють 5–7 с.

4. Петлю рекомендується тримати у полум'ї пальника майже вертикально, щоб дріт був рівномірно розпечений на всьому протязі.



Мал. 8. Будова полум'я

5. При прожарюванні треба пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній та периферійних частинах полум'я, тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки (див. мал. 8).

Висновки: _____

Практична робота № 2

ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Завдання 1. Навчитися готувати поживні середовища для культивування різних груп мікроорганізмів. Отримати чашки Петрі із твердим поживним середовищем.

Основними компонентами будь-якого живильного середовища для культивування мікроорганізмів є сполуки вуглецю і азоту. Вони і визначають специфічність більшості живильних середовищ. Для приготування поживних середовищ використовують чистий посуд, що не містить сторонніх речовин. Поживні середовища стерилізують, і надійно закривають. Зберігають стерильні поживні середовища у прохолодному, помірно сухому приміщенні, у щільно закритих шафах, захищених від дії світла і висихання. На кожен колбу із середовищем прикріплюють етикетки зі складом (або назвою) і датою приготування.

Розрахувати наважки компонентів для приготування 50 мл агаризованого NB поживного середовища:

NB – _____

Агар – _____

dH₂O – _____

Розлив середовища у чашки Петрі:

1. Тверде поживне середовище розплавляють на водяній бані та охолоджують до 50 °С.

2. Над полум'ям спиртівки стерилізують отвір колби з середовищем, виймають пробку. Відкриту колбу тримають в нахиленому положенні горловиною в бік полум'я.

3. До стерильної чашки Петрі заливають 15–25 мл поживного середовища, піднявши кришку чашки Петрі з одного боку (в бік полум'я). Поживне середовище повинно рівномірно розподілитися по всій поверхні чашки.

4. Чашку Петрі закривають кришкою, залишивши невелику щпарину та чекають 10–15 хв поки середовище застигне.

5. Пробку обпалюють в полум'ї спиртівки і закривають колбу.

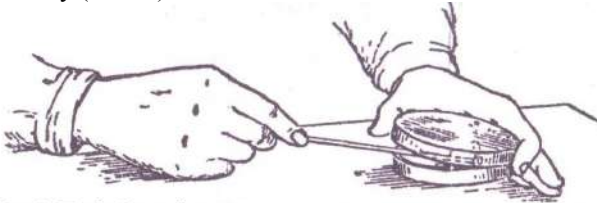
Завдання 2. Оволодіти техніками культивування мікроорганізмів:

Мікроорганізми культивують (вирощують) на твердому та рідкому середовищі. На **твердому середовищі** мікроорганізми утворюють окремі колонії (потомство однієї клітини). Посів мікробіологічної культури на чашку Петрі здійснюють як петлею так і шпателем.

Посів бактеріальної культури на тверде середовище:

1. На водяній бані розігріти агаризоване поживне середовище та розлити його у стерильні чашки Петрі. Зачекати 10–15 хв поки середовище застигне.

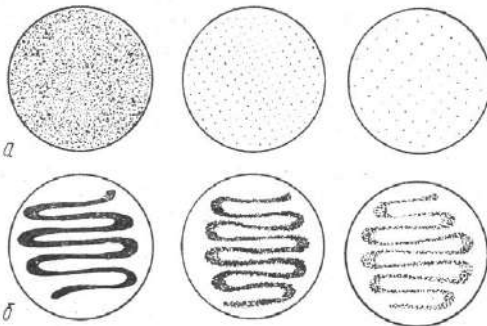
2. Піднявши край чашки проводять посів петлею (методом виснажуючого штриха по поверхні)/шпателем (певний об'єм рідини розвозять шпателем Дригальського по всій поверхні середовища) і закривають чашку (мал. 9).



Мал.9. Посів бактеріальної культури на агаризоване середовище

3. Чашку Петрі позначають (культура, дата, дослідник) і розміщують її у термостаті догори дном, щоб крапельки води, які утворюються з пари на кришці чашки, не потрапили на поверхню середовища і не розмивали ізольовані колонії.

4. Аналіз колоній, які вирости після інкубації.

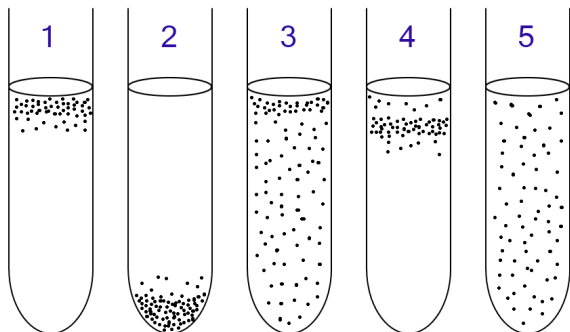


Мал. 10. Зростання мікроорганізмів на поверхні твердого поживного середовища:

а – після посіву шпателем;

б – після посіву бактеріологічною петлею

Досить часто мікроорганізми вирощують **на рідкому середовищі**. При цьому слід пам'ятати, що на рідкому середовищі виділити окрему колонію не можливо, вони утворюють суспензії, осад або плівку. Для вирощування мікроорганізмів на рідкому середовищі зазвичай використовують колби та пробірки. При вирощуванні аеробних організмів у колбі/пробірці з рідким середовищем культуру весь час струшують у термостаті-качалці. Різні види бактерій по різному зростають на рідких поживних середовищах (див. мал. 11).



Мал. 11. Ріст різноманітних видів бактерій на рідких поживних середовищах:

1 – холерний вібріон на поверхні лужної пептонної води утворює ніжну блакитну плівку;

2 – стрептокок на цукровому бульйоні утворює придонний або пристінковий ріст, при цьому бульйон залишається прозорим;

3 – бактерії тифопаратифозної групи (збудники черевного тифу, паратифів А та В) при рості на МПБ дають рівномірне помутніння;

4 – спороутворюючі бактерії (*B.subtilis*) на м'ясопептонному бульйоні утворюють грубу плівку;

5 – на водно-сироватковому середовищі під шаром стерильного вазелінового масла розмноження лептоспір не супроводжується зовнішньою зміною середовища

Висновки: _____

Практична робота № 3

ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Завдання 1. Оцінити інтенсивність росту бактеріальної культур при різних значеннях температури і рН середовища, результати дослідів занести до таблиці № 1. Зробити висновки.

1.1. У рідке поживне середовище з різними значеннями рН внести по 2 краплі суспензії мікроорганізмів. Пробірки підписати, поставити в термостати із різними значеннями температури на 48 год.

1.2. Візуально оцінити ріст досліджуваної культури в пробірках. Умовно позначити відсутність росту « – », незначний ріст « + », середній ріст « ++ », значний ріст « +++ ». Результати спостережень занести до таблиці:

Таблиця № 1. Вплив рН середовища та температури на ріст бактерій

Назва культури	рН середовища	Температура	Ріст

Висновки:

Завдання 2. Дослідити вплив світла на ріст мікроорганізмів.

2.1. На дно чашки Петрі із зовнішньої сторони наклеїти букви з чорного паперу, таким чином утворивши певне слово, наприклад, «світло». Альтернативою можуть бути різні геометричні фігури тощо.

2.2. Чашку Петрі із твердим поживним середовищем повернути дном вгору і залишити під дією прямого сонячного світла на 2–3 години. Після цього чашку помістити в термостат на +37 °С на 1–2 доби.

2.3. Уважно розглянути чашку Петрі та з'ясувати, де ріст колоній відбувається інтенсивніше, на затемненій чи на освітленій частині? Пояснити чому. Зробити висновки.

Висновки: _____

Завдання 3. Вивчити стійкість бактерій до антибіотиків.

3.1. Розігріти на водяній бані агаризоване поживне середовище, почекати, поки середовище охолоне до температури +40...50 °С та внести антибіотик, середовище залити у чашку Петрі. Зачекати 10–15 хв, поки середовище застигне. Також підготувати контрольний варіант – чашку Петрі без антибіотика.

3.2. Відомо, що грошові купюри, копійки, жетони метро несуть на собі велику кількість різних мікроорганізмів. Для перевірки цих даних легенько зробити відбиток копійки/жетона метро на поживному середовищі чашки Петрі та залишити в термостаті за температури +37 °С на 1–2 доби.

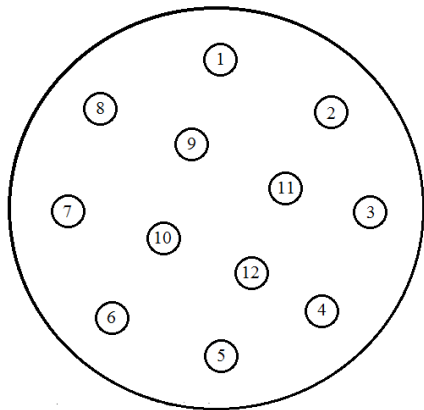
3.3. Уважно розглянути колонії, що проявилися на чашках Петрі, з'ясувати, на якій чашці Петрі колонії більш численні і різноманітні, з антибіотиками чи без них (контрольний варіант)? Чому?

Висновки _____

Завдання 4. Визначити вплив фітонцидів, ефірних олій на ріст і розвиток мікроорганізмів.

4.1. На тверде поживне середовище висіяти різні штами мікроорганізмів.

4.2. Стерильні шматочки паперу змочити у різних ефірних олія, сокові цибулі, часнику тощо та за допомогою стерильного пінцету рівномірно покласти на тверде поживне середовище у чашці Петрі (див. мал. 12).



Мал. 12. Визначення впливу фітонцидів та ефірних олій на ріст і розвиток мікроорганізмів:

- 1 – _____
- 2 – _____
- 3 – _____
- 4 – _____
- 5 – _____
- 6 – _____
- 7 – _____

- 8 – _____
- 9 – _____
- 10 – _____
- 11 – _____
- 12 – _____

4.2. Чашку Петрі закрити кришкою і залишити на 1–2 доби у термостаті за температури +37 °С.

4.3. Проаналізувати отримані дані. Зробити висновки, як різні ефірні олії, сік цибулі, часнику впливають на ріст і розвиток мікроорганізмів.

Висновки: _____

Практична робота № 4

ДОСЛІДЖЕННЯ САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНИХ НОРМ ПОВІТРЯ, ВОДИ ТА ҐРУНТУ

Завдання 1. Дослідити мікрофлору повітря навчальної кімнати, парку/пришкільного саду та узбіччя дороги.

1.1. Чашку Петрі із твердим середовищем залишити відкритими на 20 хв у навчальній кімнаті, парку/ділянці пришкільного саду, узбіччі дороги для осідання бактерій із повітря.

1.2. Чашки Петрі закрити кришкою і залишити на 1–2 доби у термостаті за температури +37 °С.

1.3. Дослідити колонії, що проявилися (*користуючись додатком 2*). Результати спостереження занести до таблиці № 2 та зробити відповідні висновки.

Завдання 2. Дослідити мікрофлору води.

2.1. За допомогою піпетки чи бактеріальної петлі на поверхню середовища чашки Петрі внести декілька крапель кип'яченої води, води із під крану та води із річки, після цього скляним шпателем ретельно втерти її у середовище.

2.2. Чашку Петрі залишаємо на 1–2 доби у термостаті за температури +37 °С.

2.3. Досліджуємо колонії (*користуючись додатком 3*), що проявилися. Результати спостереження занести до таблиці № 2 та зробити відповідні висновки.

Завдання 3. Дослідження мікрофлори ґрунту:

3.1. У стерильну колбу об'ємом 100 мл вносять 1 г ґрунту та роблять серію розведень у стерильній воді, таким чином отримують ґрунтову витяжку.

3.2. За допомогою піпетки чи бактеріальної петлі на поверхню середовища чашки Петрі наносимо декілька крапель ґрунтової витяжки та скляним шпателем ретельно втираємо її в середовище.

3.3. Чашки Петрі залишаємо на 1–2 доби у термостаті за температури +37 °С.

3.4. Досліджуємо колонії (*користуючись додатком 4*), що проявилися. Результати спостереження занести до таблиці № 2 та зробити відповідні висновки.

Таблиця № 2. Визначення санітарно-мікробіологічних норм повітря, води та ґрунту

Характ. Зразки	Варіанти дослідження	Загальна кількість виявлених колоній	Санітарно-мікробіологічна оцінка
Повітря	Зразок 1		
	Зразок 2		
	Зразок 3		
Вода	Зразок 1		
	Зразок 2		
	Зразок 3		
Ґрунт	Зразок 1		
	Зразок 2		
	Зразок 3		

Висновки

Практична робота № 5

МІКРОФЛОРА ЛЮДИНИ

Завдання 1. Дослідити мікрофлору рук людини за принципом «відбитків пальців».

1.1. Посів здійснюється доторканням пальців до поверхні поживного середовища (утворення так званих відбитків).

1.2. Чашки Петрі залишають у термостаті за температури +37 °С на 1–2 доби.

1.3. Дослідити мікрофлору, яка виросла на чашці Петрі (*користуючись додатком 1*), результати спостережень занести до таблиці № 3 «Дослідження мікрофлори людини».

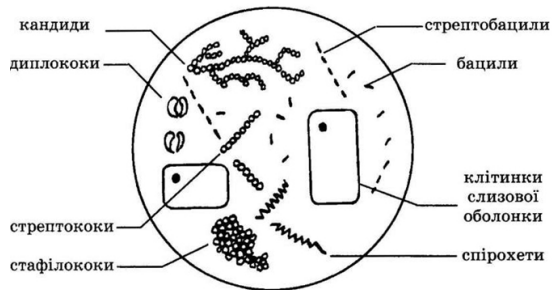
Завдання 2. Дослідити мікрофлору зубного нальоту.

2.1. За допомогою стерильних вушних паличок взяти трохи зубного нальоту та тонкими мазками висіяти його на підготовлені чашки Петрі. Чашки Петрі залишають у термостаті за температури +37 °С на 1–2 доби.

2.3. Дослідити мікрофлору, яка виросла на чашці Петрі (*користуючись додатком 1*), результати спостережень занести до таблиці № 4 «Дослідження мікрофлори людини».

2.4. Зробити мазок зубного нальоту, забарвите його метиленовим синім та розглянути під мікроскопом різні форми бактерій, які трапляються у ротовій порожнині людини. Замалювати їх до зошита та спробуйте визначити відповідно до мал. 13.

Завдання 3. Аналіз отриманих результатів:



Мал. 13. Мікрофлора людини

3.1. Порівняти результати двох досліджень з'ясувавши, де більш багата мікрофлора на руках людини чи у роті.

Пояснити отримані дані. Запропонувати рекомендації щодо дотримання правил особистої гігієни.

Таблиця № 3. Дослідження мікрофлори рук людини

1. П. І. П. _____
2. Дата початку дослідження _____
3. Дата закінчення дослідження _____
4. Поживне середовище _____
5. Умови культивування _____
6. Джерело досліджуваного зразка _____
7. Опис мікрофлори:

Власт. колоній П./н. колоній	Розмір колоній	Форма колоній	Поверхня колоній	Форма краю	Консистенція	Колір колоній	Запах колоній	Заг. кількість кол.

8. Загальна кількість виявлених колоній _____

9. Висновки _____

Дата

Підпис

Таблиця № 4. Дослідження мікрофлори ротової порожнини людини

1. П. І. П. _____

2. Дата початку дослідження _____

3. Дата закінчення дослідження _____

4. Поживне середовище _____

5. Умови культивування _____

6. Джерело досліджуваного зразка _____

7. Опис мікрофлори:

П./н. колоній	Власт. колоній	Розмір колоній	Форма колоній	Поверх- ня колоній	Форма краю	Консис- тенція	Колір колоній	Запах колоній	Заг. кількість кол.

8. Загальна кількість виявлених колоній _____

9. Висновки _____

Дата

Підпис

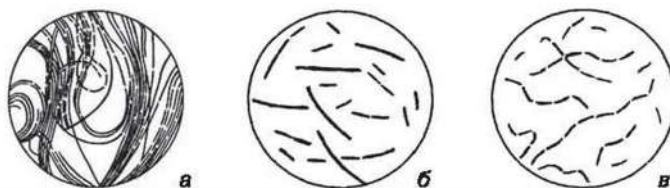
РОЛЬ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЖИТТІ ЛЮДИНИ

Завдання 1. Розглянути чашки Петрі з кисломолочними продуктами. Вказати їх морфологічні особливості, відмітити запах колоній, що він нагадує?

Завдання 2. Мікроскопіювання молочних бактерій:

2.1. На предметному склі виготовити мазок із кисломолочного продукту, висушити його та зафіксувати протягом 5–10 хв у суміші Нікіфорова (5% етиловий спирт і диетиловий ефір, 1:1) для усунення жиру. Це полегшує фарбування та мікроскопіювання бактерій.

2.2. Фіксований препарат зафарбувати метиленою синькою (5 хв) і розглянути в імерсійній системі мікроскопа (див. мал.14).



Мал. 14. Молочнокислі бактерії під мікроскопом:

а – болгарська паличка; б – лактобацила кислотолюбна;
в – сирна паличка

2.3. Замалювати бактерії, які вдалося зафіксувати до робочого зошита, зробити висновки.

Завдання 3. Якісна реакція на молочну кислоту:

3.1. У фарфорову чашку внести 5–10 крапель кисломолочного продукту або його сироватки і додати по краплях фенольний реактив, який складається з суміші 5%-них розчинів карболової кислоти і хлориду заліза (III) (1:2), розведених подвійною кількістю води.

3.2. При наявності молочної кислоти спостерігається зміна забарвлення із синього на жовтий внаслідок утворення лактату заліза.

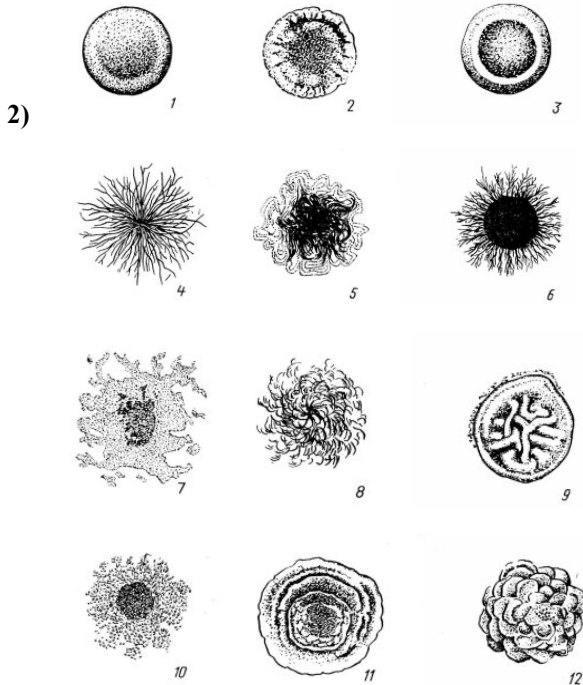
Завдання 4. Навести приклади, в яких галузях ще, окрім харчової, використовуються мікроорганізми. Зробити висновки про їхнє значення в житті людини.

Висновки

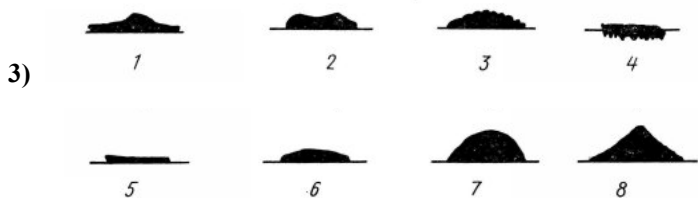
ДОДАТКИ

Додаток 1. Властивості колоній мікроорганізмів:

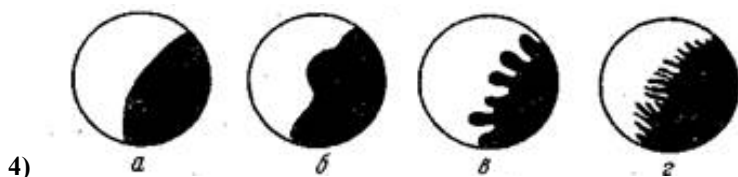
1) Розмір колонії – розмір колонії досить важлива ознака за якою можна визначити різні види роди і навіть типи бактерій. Таким чином, виділяють точкові – діаметр 1 мм, дрібні – діаметр 1–2 мм, середні – діаметр 3–4 мм, великі – діаметр більше 4 мм.



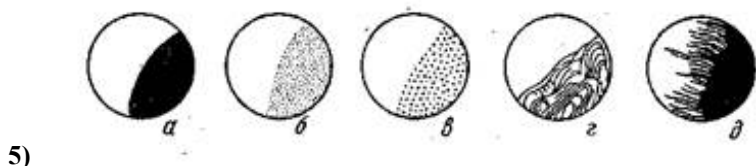
Форма колонії: 1 – кругла; 2 – фестончастий край; 3 – кругла з валиком по краю; 4, 5 – ризоїдні; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоїдна; 8 – ниткоподібна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна.



Поверхня колонії: 1 – вигнутий; 2 – кратероподібна; 3 – горбисті; 4 – врослений в субстрат; 5 – плоский; 6 – випуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібна.



Форма краю колонії: а – рівна; б – хвиляста; в – лопатевидна; г – бахромчата.



Структура колонії: а – однорідна; б – дрібнозерниста; в – крупнозерниста; г – струмінеподібна; д – хвиляста.

6) **Колір колонії** – залежить від пігменту, бувають білі, жовті, ярко сині, червоні і т. д.

7) **Запах колонії** – менш важлива ознака колонії, оскільки асоціації, які він викликає мають суб'єктивний характер.

Додаток 2. Підрахунок мікробного числа повітря за формулою Омелянського:

$$X = \frac{n \times 5 \times 10^4}{t \times \pi r^2}$$

де, x – кількість мікроорганізмів в 1 м^3 повітря;

n – кількість колоній мікроорганізмів, які вирости у чашці Петрі;

t – час осадження, хв;

πr^2 – площа чашки Петрі, становить близько 70 см^2 ;

$5 \text{ і } 10^4$ – коефіцієнти для перерахунку кількості мікроорганізмів у 1 м^3 .

Мікробіологічні норми повітря:

Оцінка чистоти повітря	Літній період	Зимовий період
	Число мікроорганізмів	Число мікроорганізмів
Чисте	<1500	<4500
Забруднене	>2500	>7000

Додаток 3. Мікробіологічні показники безпеки питної води

№ з/п	Найменування показників	Одиниці виміру	Нормативи для питної води		
			водопровідної, з пунктів розливу та бюветів	з колодязів та каптажів джерел	фасованої

Мікробіологічні показники

1	Загальне мікробне число при $t \text{ } 37 \text{ }^\circ\text{C}$ – 24 год	КУО/см ³	≤ 100 (≤ 50)**	не визначається	≤ 20
2	Загальне мікробне число при $t \text{ } 22 \text{ }^\circ\text{C}$ – 72 год	КУО/см ³	не визначається	не визначається	≤ 100

Додаток 4. Насиченість ґрунту мікроорганізмами.

1) Насиченість ґрунту мікроорганізмів визначається за формулою:

$$a = \frac{b \times v \times 1000}{d \times g}$$

де, а – кількість клітин в 1 г ґрунту;

б – середня кількість колоній з однієї чашки Петрі;

в – розведення, з якого було зроблено висів;

г – об'єм суспензії, який вносили на поживне середовище;

д – вага ґрунту, який брали для аналізу.

2) Підрахунок загальної кількості мікроорганізмів (ЗМЧ).

Для підрахунку спершу вираховують середнє арифметичне з усіх чашок Петрі та визначається ЗМЧ ґрунту.

Наприклад: посіяно 1 см³ суспензії ґрунту з розведення 10⁴; на чашці з агаром виросло в середньому 70 колоній; отже ЗМЧ = 70 x 10⁴ = 7 x 10⁵ бактерій.

Санітарно-мікробіологічна оцінка ґрунту

Характеристика ґрунту	ЗМЧ
Чистий	>5 x 10 ⁵
Помірно забруднений	<5 x 10 ⁶
Сильно забруднений	5 x 10 ⁶

ЛІТЕРАТУРА

1. Анатомия бактерий / [под ред. Г. П. Калини] ; пер. с англ. – М., 1960.
2. Борисов Л. Б. Краткий справочник микробиологической терминологии / Л. Б. Борисов, И. С. Фрейдлин. – М., 1985.
3. Векірчик В. М. Практикум з мікробіології : навч. посіб. / В. М. Векірчик. – К. : Либідь, 2001.
4. Віннікова О. І. Практикум з мікробіології : метод. рекомендації / О. І. Віннікова, І. М. Моргуль. – [2-ге вид., доповн.]. – Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2009.
5. Голуб С. М. Мікробіологія. Методичні вказівки до лабораторних робіт / С. М. Голуб, В. О. Голуб, Ю. В. Мельничук. – Луцьк, 2012.
6. Жегунов Г. Ф. Цитологические основы жизни / Г. Ф. Жегунов, Г. П. Жегунова. – Х., 2004.
7. Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов / Н. Д. Иерусалимский. – М., 1963.
8. Камышева К. С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / К. С. Камышева. – Ростов-на-Дону, 2010.
9. Климнюк С. Практична мікробіологія / [С. Климнюк, І. Ситник, М. Творко, В. Ширококов]. – Тернопіль, 2004.
10. Медицинская микробиология / [под ред. В. И. Покровского]. – М., 2001.
11. Определитель бактерий Берджи. – М., 1997. – Т. 1.
12. Пішак В. П. Медична біологія / В. П. Пішак, Ю. І. Бажора, Ш. Б. Брагін. – Вінниця, 2004.
13. Радченко О. Практикум із загальної мікробіології : навч. посіб. / [О. Радченко, Л. Степура, Д. Домбровська та ін.]. – К., 2011.
14. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов. – М., 2004.

Для нотаток

Формат 60x84/16. Друк цифровий.
Папір офсетний 80 г/м².

