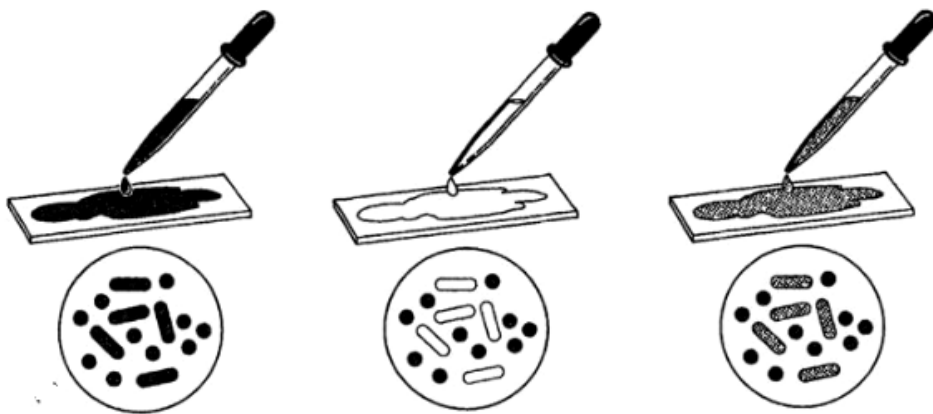


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**Національний авіаційний університет**

# **ЛАБОРАТОРНИЙ ЗОШИТ** **ІЗ ЗАГАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ** **І ВІРУСОЛОГІЇ**

**для студентів напряму підготовки**  
**6.051401 «Біотехнологія»**



**Київ 2017**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
Національний авіаційний університет

ЛАБОРАТОРНИЙ ЗОШИТ  
ІЗ ЗАГАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ  
І ВІРУСОЛОГІЇ

для студентів напрямку підготовки  
6.051401 «Біотехнологія»

Київ 2017

УДК 579:602.4(076)  
ББК Е40я7  
Л 124

Укладач *Л. С. Ястремська* – канд. с.-г. наук, старш. наук. співроб.

Рецензент *О. А. Васильченко* – канд. мед. наук, доц. (Національний авіаційний університет)

*Затверджено методично-редакційною радою Національного авіаційного університету (протокол № 6/15 від 17.12. 2015 р.).*

Л 124      **Лабораторний зошит із загальної мікробіології і вірусології** / уклад. Л. С. Ястремська. – К. : НАУ, 2017. – 144 с.

Лабораторний зошит призначений для організації самостійної роботи студентів із загальної мікробіології і вірусології. У лабораторному зошиті наведено методики виконання лабораторних робіт, заходи безпеки під час роботи, обладнання, матеріали, реактиви. Для опанування навичок самостійної роботи в зошиті запропоновано схему послідовності дій виконання лабораторної роботи, оформлення протоколу дослідів, питання для самопідготовки. До кожної теми подано запитання для допуску до виконання лабораторних робіт згідно з навчальною програмою. До кожного модуля наведено питання з теоретичної і практичної частин дисципліни.

Для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія».

# КОНТРОЛЬНИЙ ЛИСТ

виконання лабораторних робіт із загальної мікробіології і вірусології

студентом \_\_\_\_\_ курсу \_\_\_\_\_ групи

ННІ \_\_\_\_\_  
(назва інституту)

Кафедри \_\_\_\_\_  
(назва кафедри)

\_\_\_\_\_ (прізвище, ім'я, по батькові)

Номер теми	Обсяг завдань згідно з календарним планом					Дата та відмітка про виконання (заповнює викладач)			
	Конспект	Перевірка засвоєння теоретичного матеріалу	Експеримент	Підготовка до модульної контрольної роботи	Модульна контрольна робота	Конспект	Засвоєння теоретичного матеріалу	Експеримент	Модульна контрольна робота
Тема 1									
Тема 2									
Тема 3									
Тема 4									
Модуль I									
Тема 5									
Тема 6									
Тема 7									
Тема 8									
Тема 9									
Модуль II									
Тема 10									
Тема 11									
Тема 12									
Тема 13									
Тема 14									
Модуль III									
Тема 15									
Тема 16									
Тема 17									
Модуль IV									

# ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

## *Організація мікробіологічної лабораторії*

*До складу мікробіологічної лабораторії входять:*

- 1) лабораторна кімната для проведення занять;
- 2) стерилізаційна, де встановлені автоклав та інші стерилізаційні апарати;
- 3) мийна;
- 4) препарувальна, пристосована для зберігання середовищ і культур, у ній знаходиться холодильник;
- 5) застеклений бокс для проведення робіт, що потребують абсолютної стерильності (для пересівання чистих культур, посівів), у ньому встановлюють бактерицидну лампу (БУФ-15) на висоті 2 м від підлоги.
- 6) аудиторна лабораторія (для проведення занять зі студентами).

## *Загальні правила роботи в мікробіологічній лабораторії*

*Під час роботи в мікробіологічній лабораторії необхідно дотримуватися таких правил:*

1. Працювати слід у спецодязі (халатах, хустках).
2. У лабораторії повинні бути наявні протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги, засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри та ін.).
3. Перш ніж запалити спиртівку, треба підтягнути гніт і випустити пари спирту, що зібралися. Гасячи спиртівку, потрібно накрити її ковпачком.

*Категорично забороняється запалювати спиртівку від полум'я іншої спиртівки та переміщувати запалену спиртівку*

4. Слід обережно відкривати пробірку, чашку з культурою, фламбувати (прожарювати) у полум'ї спиртівки пробірку (край чашки).
5. Бактеріологічну петлю, скальпель, пінцет після кожного контактування з культурами фламбують у полум'ї спиртівки.

*Забороняється класти в кишеню халата або на стіл пробірки з культурами, їх потрібно залишати в склянці чи ставити в штатив*

6. Для розплавлення щільних поживних середовищ потрібно користуватися водяною банею, попередньо послабивши корки в колбах. Кип'ятіння розчинів на електроплитці здійснюють на азбестових прокладках у термостійких колбах.
7. Нагрівання рідини в пробірках на спиртівці проводять за допомогою тримача – під кутом 45° шийкою в бік, від себе.
8. Працюючи з електроприладами, не вимикати/вмикати прилад мокрими руками.
9. Після закінчення мікробіологічних робіт руки дезінфікують 70 об. % розчином етанолу та миють із милом.
10. З робочого столу прибирають усі предмети, окрім мікробіологічного комплексу.
11. Відпрацьований мікробний матеріал кладуть у дезінфікувальну рідину або до автоклавної кімнати.

*У лабораторії забороняється:*

- приймати їжу, палити, зберігати продукти харчування;
- протирати вологою ганчіркою ввімкнені прилади;
- працювати з надтріснутим скляним посудом.

За студентом у лабораторії закріплюють постійне місце й обладнання. На робочому місці не має бути нічого зайвого.

## Основні матеріали та обладнання, потрібні студентам до кожного заняття (мікробіологічний комплекс)

**Мікробіологічний комплекс:** мікроскоп з освітлювачем, спиртівка, сірники, бактеріологічні петлі, шпатель та голки; градуйовані та неградуйовані (пастерівські) піпетки, предметні та покривні скельця, промивалка з водою, вата, олівець по склу або маркер; фільтрувальний папір, дезінфікувальна рідина, набір барвників, скляний місток, кристалзатор (ємність) для фарбування препаратів, імерсійна олія.

Справність обладнання перевіряє лаборант перед кожним заняттям, додає все необхідне, що потрібно для проведення дослідів конкретної лабораторної роботи.

### Спеціальне мікробіологічне обладнання

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі, шпателі (рис. 1.1).

Бактеріологічну петлю (голку) перед взяттям клітин мікроорганізмів *фламбують* у полум'ї спиртівки до почервоніння. Потрібно тримати петлю у полум'ї вертикально, щоб дріт був рівномірно прожарений по всій довжині. Найвища температура спостерігається у верхній та периферійних частинах (рис. 1.2) полум'я пальника, тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки. Одразу ж після стерилізування петлю (голку) вводять до посудини з мікроорганізмами.

Щоб не зашкодити клітинам мікроорганізмів, петлю *спочатку охолоджують*, притуляючи її до внутрішньої поверхні судини або до поживного середовища, вільних від клітин мікроорганізмів, і тільки після цього захоплюють невелику кількість мікробної маси.

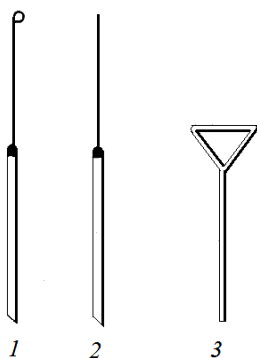


Рис. 1.1. Бактеріологічні петля (1), голка (2), шпатель Дригальського (3)

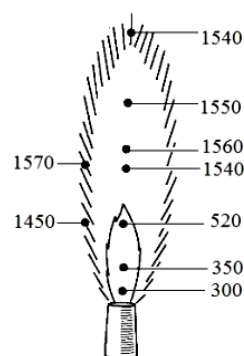


Рис. 1.2. Значення температури (°C) у різних ділянках полум'я пальника

### Правила виконання лабораторних робіт та оформлення їх результатів

Підготовка до лабораторного заняття передбачає:

#### Теоретичне опрацювання матеріалу даної теми

**На цьому етапі потрібно:** підготуватись до відповідей на питання для допуску до виконання лабораторної роботи, ознайомитись із методикою виконання роботи, порядком виконання дослідів. На підставі теоретичного аналізу спланувати порядок виконання експериментальної роботи. Треба знати, які мікроорганізми і з якими властивостями будуть використовуватись для роботи, знати, як працювати з ними; які реактиви, обладнання, посуд необхідно використати; послідовність виконання всіх необхідних дій; у якій формі записувати результати спостережень, вимірювань, мікроскопувань.

#### Експериментальне виконання роботи

**На цьому етапі потрібно:** відібрати необхідне обладнання, реактиви, посуд, культури мікроорганізмів або необхідні речовини; провести досліди з посіву, пересіву або виготовлення препаратів, уважно спостерігаючи за мікробіологічними об'єктами, використовуючи світловий мікроскоп; використати обладнання, посуд для приготування середовищ, провести інкубування

посівів, а після закінчення культивування зробити записи спостережень, замальовки у протоколі лабораторної роботи до встановленої форми.

*Опрацювання експериментальних даних*

*На цьому етапі потрібно:* виконати необхідні рисунки мікроскопічних досліджень, записати спостереження, які проводилися протягом усього періоду культивування (зміни морфологічних, культуральних, біохімічних властивостей організмів), вплив температури, рН, опромінення на життєдіяльність досліджуваних мікробіологічних об'єктів, скласти рівняння біохімічних реакцій, якщо експеримент кількісний, виконати необхідні обчислення, якщо якісний – записати спостереження до таблиці за встановленою формою; проаналізувати отримані результати, відповісти на питання до конкретних дослідів, оформити їх у зошиті та захистити роботу.

*Лабораторна робота вважається виконаною лише після її захисту перед викладачем в індивідуальному порядку.*

**З правилами роботи в мікробіологічній лабораторії ознайомлен(а) і зобов'язуюсь їх виконувати** \_\_\_\_\_ (прізвище, ім'я, по батькові студента) \_\_\_\_\_ (дата) \_\_\_\_\_ (підпис)

## Модуль I

### СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

#### Тема 1. МЕТОДИ ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ЇХ МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

##### Питання для допуску до виконання лабораторної роботи

1. Яке місце займає мікробіологія в системі біологічних дисциплін?
2. Яка роль мікроорганізмів у природі та діяльності людини?
3. Назвіть групи організмів, що відносять до об'єктів мікробіології.
4. За якими основними напрямками розвивається мікробіологія сьогодні?
5. Назвіть найбільш важливі відкриття в історії мікробіології.
6. Які сучасні методи дослідження використовує мікробіологія?
7. Які існують методи мікроскопічного дослідження?
8. Які є методи виготовлення цитологічних препаратів?
9. Як готують вітальні (тимчасові) препарати?
10. Як готують фіксовані препарати? Назвіть етапи виготовлення.
11. Назвіть одиниці виміру клітин у мікроскопуванні.
12. Які барвники використовують для фарбування клітин?
13. Для яких цілей використовують фазовоконтрастний, інтерференційний, поляризаційний та інші мікроскопи?
14. Які є основні типи електронних мікроскопів?
15. Які типи світлових лабораторних мікроскопів використовують для роботи з мікробіологічними препаратами?
16. Яка головна частина мікроскопа?
17. Що таке розподільна здатність мікроскопа?
18. На які типи поділяють об'єктиви мікроскопа?
19. Які максимальні збільшення у світлових лабораторних мікроскопів?
20. Які об'єктиви світлового мікроскопа застосовують для невеликих збільшень?

**Мікробіологічний словник:** спиртівка, фламбування, бактеріологічні петлі, шпатель, мазок, барвники, імерсійна система мікроскопа.

**Література:** [2–5]; [7–11].

#### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

##### Завдання 1.1. Методи виготовлення препаратів мікроорганізмів для мікроскопічного дослідження

**Матеріали та обладнання:** скельця з лунками, набір барвників: генціанвіолет, водний розчин фуксину, метиленовий синій (1:40), спирт 96 об.%, скляний місток, кристалізатор, імерсійна олія, чисті культури (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina flava*).

##### Порядок виконання роботи

###### Дослід 1.1.1. Виготовлення препарату «роздавлена крапля»

1. Приготуйте предметне та покривне скельця. Візьміть пробірку з культурою в ліву руку і помістіть її похило між великим і вказівним пальцем на відстані 3–5 см від полум'я (рис. 1.3, а).
2. Профламбуйте петлю (рис. 1.3, б).
3. Відкрийте пробірку, затискаючи корок правою долонею (рис. 1.3, в).
4. Стерильну петлю введіть у пробірку з культурою, охолодіть, доторкнувшись до внутрішньої поверхні пробірки, а потім візьміть нею невелику кількість біомаси мікроорганізмів (рис. 1.3, г).



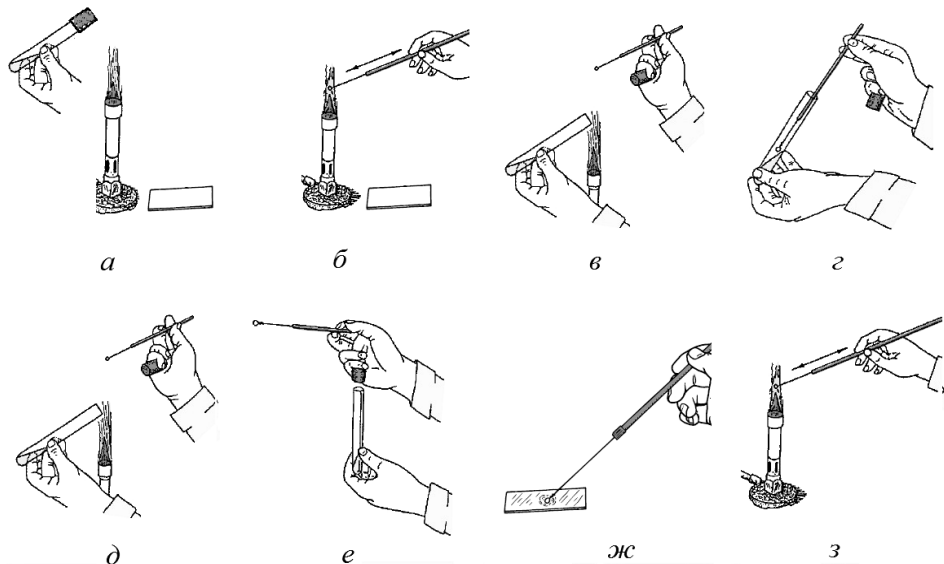


Рис. 1.3. Схема відбору біомаси мікроорганізмів для виготовлення препарату

5. Обпаліть краї пробірки та корка – закрийте пробірку, поставте її в штатив (рис. 1.3, *д-е*).

6. Петлею з біомасою зробіть штрих на склі, розітріть штрих петлею круговими рухами, щоб вийшла суспензія, що трохи опалісцує (рис. 1.3, *ж*).

7. Профламбуйте петлю (рис. 1.3, *з*).

8. Отриману суспензію мікроорганізмів накрийте покривним склом. Щоб у полі зору не було пухирців повітря, розташуйте покривне скло під кутом 40–45 °, доторкніться ним до краю краплі і, коли вона розподілиться вздовж межі, обережно накрийте краплю суспензії покривним скельцем (рис. 1.4, *в, з*).

9. Мікроскопуйте.

10. Розглянутий під мікроскопом препарат «роздавлена крапля» замалюйте в табл. 1.1 з відповідним збільшенням мікроскопа, за якого проводили дослідження.

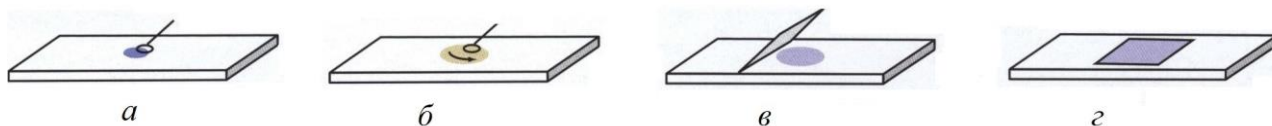


Рис. 1.4. Схема виготовлення препарату «роздавлена крапля»

### Дослід 1.1.2. Виготовлення препарату «вісяча крапля»

1. На середину покривного скла нанесіть маленьку, з чіткими краями краплю суспензії мікроорганізмів (рис. 1.5, *а*).

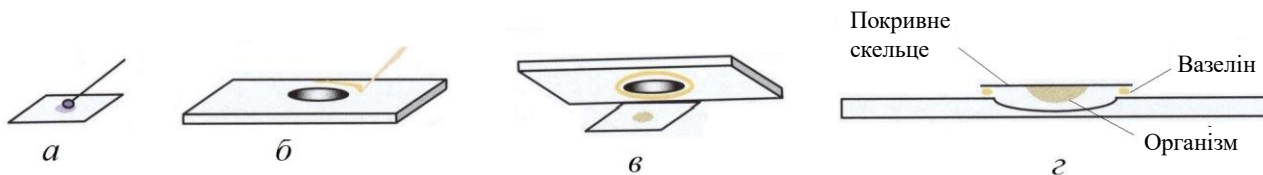


Рис. 1.5. Схема виготовлення препарату «вісяча крапля»

2. Краї предметного скла з лункою попередньо змастіть вазеліном (рис. 1.5, *б*).

3. Краплю матеріалу покрийте предметним склом з лункою, краї якої змащені вазеліном (рис. 1.5, *в*).

4. Переверніть предметне скло з прилиплім до нього покривним склом (рис. 1.5, *г*). Крапля виявляється вісячою у герметично закритій вологій камері, з якої рідина випаровується дуже повільно, і тому препарат лишається придатним для спостереження довгий час.

5. Мікроскопуйте «вісячу краплю» з плоским дзеркалом і звуженою діафрагмою.

Розглянутий під мікроскопом препарат «вісяча крапля» замалюйте в табл. 1.1 з відповідним збільшенням мікроскопа, за якого проводили дослідження.

## Зображення прижиттєвих та фіксованих клітин

Рисунок дослідженого прижиттєвого препарату _____ (назва препарату, мікроорганізму латинською мовою)	
«Висяча крапля», збільшення $\times 40$ 	«Роздавлена крапля», збільшення $\times 90$ 
Рисунок дослідженого фіксованого препарату _____ (назва препарату, мікроорганізму латинською мовою)	
Барвник _____ Збільшення $\times 40$ 	Барвник _____ Збільшення $\times 90$ 

**Дослід 1.1.3. Приготування фіксованого забарвленого препарату**

1. Приготуйте суспензію мікроорганізмів методом, аналогічним до описаного вище.
2. Висушіть препарат на повітрі, або тримаючи скло високо над полум'ям (рис. 1.6, б).
3. Зафіксуйте препарат, тобто вбийте клітини і забезпечте їх прилипання до поверхні скла. Для цього скло з препаратом проведіть тричі через верхню частину полум'я (термічна фіксація) (рис. 1.6, в). Можна фіксувати препарати, обробляючи їх метиловим чи етиловим спиртом, сумішшю Нікіфорова, ацетоном (хімічна фіксація).

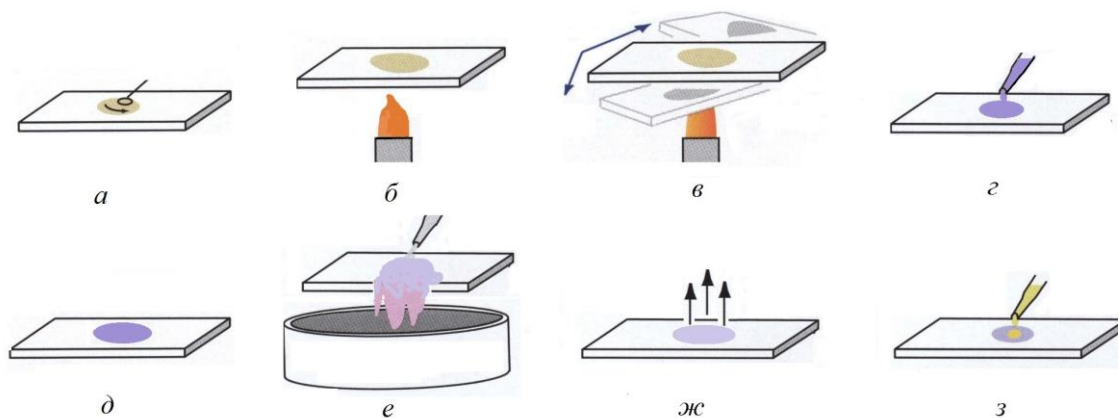


Рис. 1.6. Схема послідовного виготовлення фіксованого забарвленого препарату

4. На фіксований препарат крапніть кілька крапель барвника (фуксин, метиловий синій). Розподіліть барвник по всій поверхні мазка (рис. 1.6, з).

5. Залиште фарбу на препараті з фуксином протягом 1–2 хв, метиленовим синім – 3–5 хв (рис. 1.6, *д*).
6. Потім фарбу злийте, препарат добре промийте дистильованою водою (рис. 1.6, *е*).
7. Скло з країв протріть серветкою, препарат висушіть (рис. 1.6, *ж*).
8. Нанесіть на сухий препарат краплю імерсійної олії (рис. 1.6, *з*) і розгляньте препарат під мікроскопом (об'єктив  $\times 90$ ).
9. Замалуйте розглянутий препарат до табл. 1.1.

**Дайте відповіді на питання:**

1. Яке спеціальне обладнання використовують у мікробіологічній лабораторії?  
\_\_\_\_\_
2. Яких правил необхідно дотримуватися в мікробіологічній лабораторії?  
\_\_\_\_\_
3. Перелічіть, які основні матеріали та обладнання потрібні студентів до кожного заняття?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
4. У яких частинах полум'я пальника спостерігається найвища температура? За яких умов лабораторна робота вважається виконаною? \_\_\_\_\_
5. Які існують основні способи виготовлення препаратів для мікроскопування?  
а) \_\_\_\_\_  
б) \_\_\_\_\_
6. Які особливості виготовлення препарату «роздавлена крапля»? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
7. Які дві мети теплового фіксування мазка?  
а) \_\_\_\_\_  
б) \_\_\_\_\_
8. Яка мета приготування пофарбованого фіксованого препарату? \_\_\_\_\_
9. Чому час є важливим фактором приготування фіксованого препарату? \_\_\_\_\_
10. Як проводять фіксацію мікроорганізмів на предметному склі? \_\_\_\_\_
11. Чому необхідно добре просушити мазок для імерсійної мікроскопії? \_\_\_\_\_
12. Які барвники використовують для фарбування клітин? \_\_\_\_\_
13. Скільки потрібно брати мікробіологічних «петель» для виготовлення мазка? \_\_\_\_\_
14. Як би ви визначили, що мазок, приготований для мікроскопування, є правильним? \_\_\_\_\_

Висновок до завдання 1.1	

**Завдання 1.2. Вивчити будову світлового оптичного мікроскопа, правила користування ним під час роботи з імерсійною системою**

**Матеріали та обладнання:** мікроскоп з освітлювачем, предметні та покривні скельця, вата, маркер; фільтрувальний папір, серветка, дезінфікувальна рідина, імерсійна олія, фіксовані препарати мікроорганізмів.

## Порядок виконання роботи

1. Використайте для роботи з мікробіологічними препаратами лабораторні світлові мікроскопи типу МБР-1, ЛОМО, «Біолам» (рис. 1.7). Головною частиною мікроскопа є об'єктиви – сухі об'єктиви ( $\times 8$ ,  $\times 9$ ,  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ), імерсійні об'єктиви ( $\times 90$ ) – за збільшень від 600 до 1350 разів залежно від збільшення окуляра –  $7\times$ ,  $8\times$ ,  $9\times$ ,  $10\times$ ,  $15\times$  (рис. 1.8–1.9).

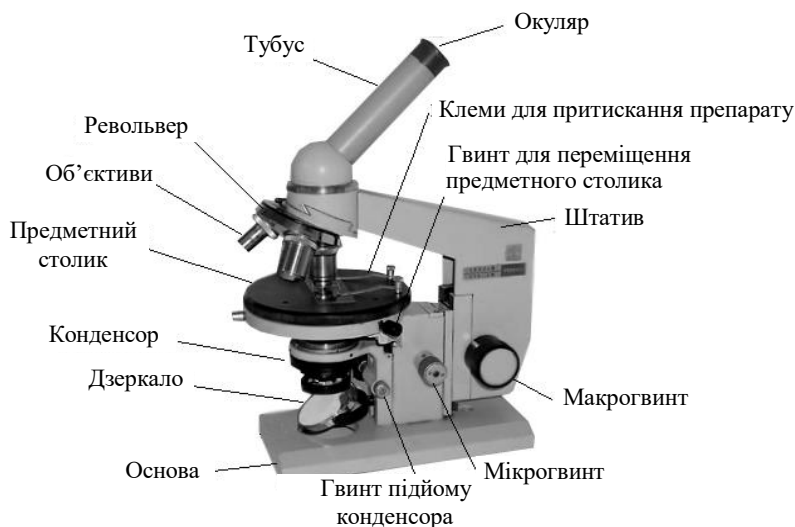


Рис. 1.7. Мікроскоп монокулярний «Біолам С-11»



Рис. 1.8. Типи об'єктивів: 1 – сухий об'єктив; 2 – «ВИ» – водна імерсія, білий обідок; 3 – «МИ» – олійна імерсія, чорний обідок

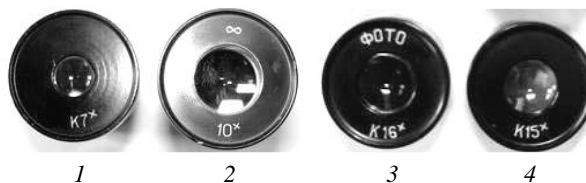


Рис. 1.9. Типи окулярів: 1 і 4 – компенсаційний окуляр; 2 – окуляр Гюйгенса; 3 – компенсаційний фотоокуляр

2. Поставте мікроскоп у зручну для роботи позицію, протріть лінзи окуляра й об'єктива м'якою серветкою.

3. Підніміть конденсор у максимальне верхнє положення, щоб прикрити ірисову діафрагму (якщо дослідний препарат незабарвлений). Поставте у робоче положення об'єктив  $\times 8$ .

4. Залиште конденсор у максимальному верхньому положенні для роботи з об'єктивами  $\times 8$ ,  $\times 40$  та  $\times 90$ . Освітлення регулюйте ірисовою діафрагмою.

5. Працюючи з об'єктивом  $\times 40$ , спочатку знайдіть зображення об'єкта, користуючись об'єктивом  $\times 8$ . Потім, не піднімаючи тубус мікроскопа, переведіть у робоче положення об'єктив  $\times 40$ , трохи відкрийте діафрагму та знайдіть зображення об'єкта, користуючись макро- і мікрогвинтами. Працюючи з об'єктивом  $\times 90$ , ірисову діафрагму відкрийте повністю.

6. Предметне скло з досліджуваним препаратом покладіть на столик мікроскопа та затисніть його клемами. Крапніть на препарат краплю імерсійної олії.

7. Дивлячись збоку, обережно з допомогою макрогвинта опустіть тубус мікроскопа так, щоб лінза об'єктива занурилася в імерсійну рідину та ледь доторкнулась до поверхні скла. Показник заломлення цих олій близький до показника заломлення скла, завдяки чому всі промені потрапляють в об'єктив і забезпечують кращу видимість мікроорганізмів.

8. Дивлячись в окуляр, повільно підійміть тубус з допомогою макро- і мікрогвинтів, поки в полі зору не з'явиться зображення досліджуваного об'єкта.

9. Після завершення роботи підніміть тубус і серветкою зніміть імерсійну олію з лінзи об'єктива  $\times 90$ . Переведіть мікроскоп на мале збільшення  $\times 8$ .

10. Опустіть конденсор, закрийте діафрагму, опустіть тубус. Поставте мікроскоп у шафу.  
 11. Розглянутий препарат замалюйте в табл. 1.1 зі збільшенням мікроскопа, за якого проводилися дослідження.

**Дайте відповіді на питання:**

1. У яких одиницях вимірюється розмір клітин мікроорганізмів? \_\_\_\_\_  
 2. Як формується зображення у світловому мікроскопі? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. Який принцип будови світлових мікроскопів? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4. Яке збільшення можна одержати, якщо користуватись:  
 а) об'єктивом  $\times 20$  і окуляром  $\times 40$ , \_\_\_\_\_  
 б) об'єктивом  $\times 8$  і окуляром  $\times 10$ , \_\_\_\_\_  
 с) об'єктивом  $\times 15$  і окуляром  $\times 90$ ? \_\_\_\_\_

5. Для чого використовують фіксовані або пофарбовані препарати у мікроскопії?  
 \_\_\_\_\_
6. Чому необхідно користуватись олією для розглядання препарату з об'єктивом  $\times 90$ ?  
 \_\_\_\_\_

7. Чим можна регулювати освітлення в мікроскопі? \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_

Висновок до завдання 1.2	

**Загальні висновки**

У результаті виконання лабораторної роботи \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Дата виконання лабораторної роботи \_\_\_\_\_

Дата захисту лабораторної роботи \_\_\_\_\_

Кількість балів за допуск до лабораторної роботи \_\_\_\_\_ Підпис \_\_\_\_\_

Кількість балів за захист лабораторної роботи \_\_\_\_\_ Підпис \_\_\_\_\_

## Тема 2. СПОСОБИ ЗАБАРВЛЕННЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ РОЗМІРІВ

### Питання для допуску до виконання лабораторної роботи

1. Назвіть поверхневі структури клітинної стінки бактерій.
2. Які функції виконують поверхневі клітинні структури?
3. Які функції виконує клітинна стінка?
4. Охарактеризуйте будову клітинної стінки грампозитивних бактерій.
5. Охарактеризуйте будову клітинної стінки грамнегативних бактерій.
6. Назвіть відмінності у будові та складі клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних бактерій.
7. Який компонент клітинної стінки є обов'язковим для грампозитивних і грамнегативних бактерій?
8. Охарактеризуйте складові гетерополімеру пептидоглікану.
9. Охарактеризуйте будову зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Які функції вона виконує?
10. Як діє на бактеріальні клітини лізоцим і пеніцилін?
11. Що таке протопласти та сфероласти?
12. Які особливості притаманні клітинним стінкам архей?
13. Які існують незвичайні клітинні стінки прокаріотів?
14. Які методи забарвлення мікроорганізмів Ви знаєте?
15. Які методи забарвлення мікроорганізмів називають складними? Для чого їх використовують?
16. Які методи забарвлення використовують для ідентифікації мікроорганізмів?
17. У чому сутність методу фарбування бактерій за Грамом? Які фактори впливають на його результат?
18. Яка послідовність дій під час фарбування клітин цим методом?
19. Які модифікації методу фарбування за Грамом існують?
20. За допомогою яких пристроїв визначають розміри клітин мікроорганізмів?

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

**Література:** [2–5]; [7–11].

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2

#### Завдання 2.1. Методи диференціювання клітин грампозитивних та грамнегативних бактерій

**Матеріали та обладнання:** мікробіологічний комплекс (ЛР 1); набір барвників: генціанвіолет, водний розчин фуксину, метиленовий синій (1:40), розчин Люголю; спирт 96 об. %; добові культури мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*.

#### Порядок виконання роботи

##### Дослід 2.1.1. Забарвлення за Грамом

Забарвлення за Грамом відбувається у чотири етапи (рис. 2.1).

1. Приготуйте фіксований мазок досліджуваної культури мікроорганізмів та пофарбуйте його генціанвіолетом протягом 1–2 хв, надлишок барвника злийте.
2. І не промиваючи водою, – обробіть розчином Люголю протягом 1–2 хв до почорніння та потім промийте препарат водою.
3. Занурте мазок у склянку з 70 об. % етиловим спиртом на 10–30 с. Знебарвлення вважають закінченим, коли краплі, що стікають із мазка, зрівняються за кольором зі спиртом у склянці. Потім промийте препарат водою (під час мікроскопування таких препаратів грамнегативні бактерії безбарвні).
4. Проведіть дофарбування препарату фуксином 1–2 хв, промийте водою, підсушіть. Результати фарбування досліджених культур запишіть у табл. 2.1.

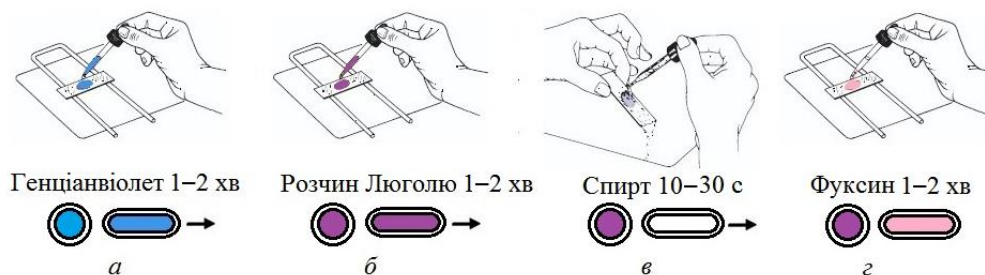


Рис. 2.1. Етапи фарбування клітин за Грамом

Таблиця 2.1

**Забарвлення клітин за Грамом та Грезерсоном**

Унесений барвник, реактив	Колір клітин/стан біомаси, обробленої КОН	
	Грам <sup>+</sup>	Грам <sup>-</sup>
Генцианвіолет		
Розчин Люголю		
Спирт 96 %		
Фуксин		
3 %-й розчин КОН		

5. Розгляньте під мікроскопом з імерсією. Результати замалюйте в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

**Морфологія досліджених клітин, забарвлених за Грамом (збільшення  $\times 90$ )**

Назва бактерій _____ (латинською мовою)	Назва бактерій _____ (латинською мовою)
Грамприналежність: _____ Форма клітин: _____ Розташування клітин: _____	Грамприналежність: _____ Форма клітин: _____ Розташування клітин: _____

**Дослід 2.1.2. Визначення грамприналежності бактерій експрес-методом Грезерсона**

1. Приготуйте чисте предметне скло та нанесіть на нього дві краплі 3 %-го розчину КОН. У першу краплю внесіть бактеріологічною петлею контрольну грампозитивну (Гр<sup>+</sup>) культуру, а в другу – контрольну грамнегативну (Гр<sup>-</sup>) культуру.

2. Ретельно перемішайте Гр<sup>+</sup> культуру в першій краплі з розчином КОН, через 5–10 с повільно підніміть бактеріологічну петлю і переконайтеся, що в'язкість краплі не змінилася, тобто слиз не утворився і реакція негативна.

3. Ретельно перемішайте Гр<sup>-</sup> культуру в іншій краплі з розчином КОН і через 5–10 с повільно підніміть бактеріологічну петлю на висоту 2–3 см. Утворення слизу свідчить про те, що КОН руйнує

бактеріальну клітинну стінку, і ДНК вивільняється (утворюється слиз), тобто культура є грам-негативною.

4. Результати дії розчину КОН на клітини занесіть до табл. 2.1.

**Дайте відповіді на питання:**

1. Яка відмінність між простим і складним фарбуванням? \_\_\_\_\_

2. Яка назва фарбника/реагенту під час забарвлення за Грамом, який використовують:

- a) першим \_\_\_\_\_
- b) для основного забарвлення \_\_\_\_\_
- c) для знебарвлення \_\_\_\_\_
- d) для контрасту \_\_\_\_\_

3. Який етап є найбільш важливим під час забарвлення за Грамом? Поясніть \_\_\_\_\_

4. Що мають на увазі під терміном «грамваріабельність»? \_\_\_\_\_

5. Чому бактерії поділяють на грампозитивні та грамнегативні? Поясніть \_\_\_\_\_

6. Яка частина бактеріальної клітини (клітинна стінка або протопласт) відіграє найбільш важливу роль у визначенні грамприналежності організму? \_\_\_\_\_

7. Яка будова клітинної стінки у  $G_r^+$  бактерій? \_\_\_\_\_

8. Чим відрізняється будова клітинної стінки  $G_r^-$  від  $G_r^+$ ? \_\_\_\_\_

9. Після трьох етапів забарвлення препарату за Грамом у модифікації Синьова у мікроорганізмів у мазку не видно жодних бактерій. Як вони забарвляться за Грамом після четвертого етапу?

10. Яке забарвлення мають клітини під час фарбування за Грамом після:

- a) занурення їх у спирт, \_\_\_\_\_
- b) забарвлення фуксином, \_\_\_\_\_
- c) оброблення Люголем? \_\_\_\_\_

Висновок до завдання 2.1	

### **Завдання 2.2. Визначення розмірів клітин мікроорганізмів**

**Матеріали та обладнання:** мікробіологічний комплекс (ЛР 1), окуляр-мікромметр, фарбник генціанвіолет, набір пробірок з культурами *Escherihia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **Порядок виконання роботи**

1. Приготуйте препарати, пофарбовані генціанвіолетом.
2. Визначте розміри клітин з допомогою окуляра-мікромметра МОВ–1-15х.
3. Вставте окуляр-мікромметр МОВ–1-15х на тубус мікроскопа і закріпіть гвинтом. Окуляр-мікромметр складається з компенсаційного окуляра з діоптрійним наведенням у межах  $\pm 5$  діоптрій і лічильного механізму. У площині окуляра розташовані нерухома шкала з поділками від 0 до 8 мм та



рухомі – індекс у вигляді біштриха та перехрестя (рис. 2.3). Унаслідок обертання гвинта перехрестя та біштрих переміщуються в полі зору окуляра відносно нерухомої шкали. Крок гвинта дорівнює 1 мм. Нерухома шкала призначена для відліку повних обертів барабана гвинта, тобто цілих міліметрів переміщення перехрестя. Рухомий відліковий барабан МОВ-1-15Х поділений на 100 частин. Поворот барабана на одну поділку відповідає переміщенню перехрестя на 0,01 мм. Таким чином, шкала барабана призначена для відліку сотих часток міліметра. Повний відлік за шкалами МОВ-1-15х складатиметься з відліку за нерухомою шкалою і відліку за барабаном.

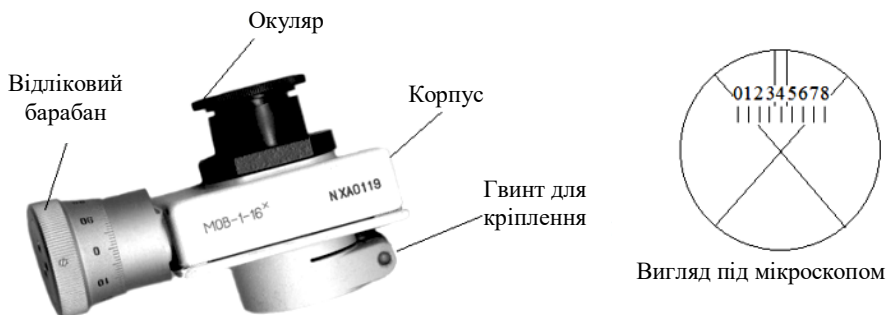


Рис. 2.3. Окуляр-мікрометр

4. Розташуйте препарат на предметному столику мікроскопа, наведіть різкість і, дивлячись в окуляр, обертайте барабан підводячи центр перехрестя до сполучення з краєм зображення досліджуваного об'єкта. Відзначте перший відлік за шкалою барабану (наприклад,  $I = 5,85$  мм).

5. Потім оберніть барабан, перемістіть перехрестя до сполучення з другим краєм об'єкта (барабан обертайте у той самий бік) і зробіть другий відлік (наприклад,  $II = 5,0$  мм).

6. Величину досліджуваного об'єкта визначте за формулою у мікрометрах (мкм):

$$R = \frac{R_2 - R_1}{\beta} \cdot 10^3,$$

де  $R$  – величина досліджуваного об'єкта, мкм;  $R_2 - R_1$  – різниця двох підрахунків, мм;  $\beta$  – збільшення об'єктива мікроскопа.

*Приклад.* Біштрих розташований між поділками «5» та «6» нерухомої шкали в полі зору, а індекс барабана знаходиться навпроти ділення «35» шкали барабана. Біштрих не дійшов до поділки «6», тобто відлік буде – 5 мм. Якщо ціна поділки шкали барабана дорівнює 0,01 мм, то відлік за барабаном дорівнює:  $0,01 \cdot 35 = 0,35$  мм. Повний відлік за шкалами дорівнює:  $5 + 0,35 = 5,35$  мм. Потім ділимо на збільшення об'єктива та множимо на  $10^3$  мкм ( $1 \text{ мм} = 10^3 \text{ мкм}$ ). Тобто розмір об'єкта дорівнює  $0,01 \cdot 10^3$ , поділене на збільшення об'єктива (мкм).

7. Результати визначених розмірів клітин запишіть до табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Розміри досліджених мікроорганізмів

№ з/п	Назва мікроорганізмів (латинською мовою)	Розміри клітин, мкм
1		
2		
3		
4		

Дайте відповіді на питання:

1. У яких з досліджених бактерій розміри:

а) найбільші? \_\_\_\_\_

б) найменші? \_\_\_\_\_

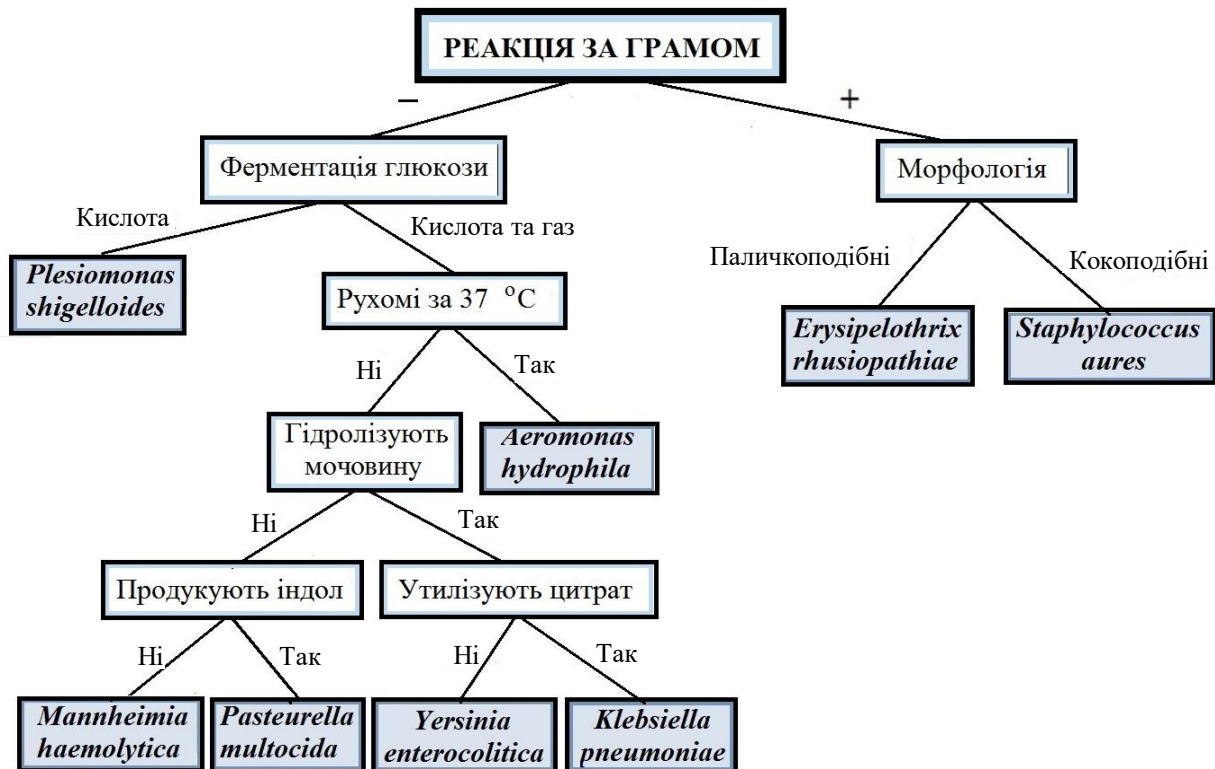
2. Які досліджені мікроорганізми паличкоподібні (назва латиною)? \_\_\_\_\_

3. Як вимірюють розміри мікроорганізмів окуляр-мікрометром? Поясніть \_\_\_\_\_

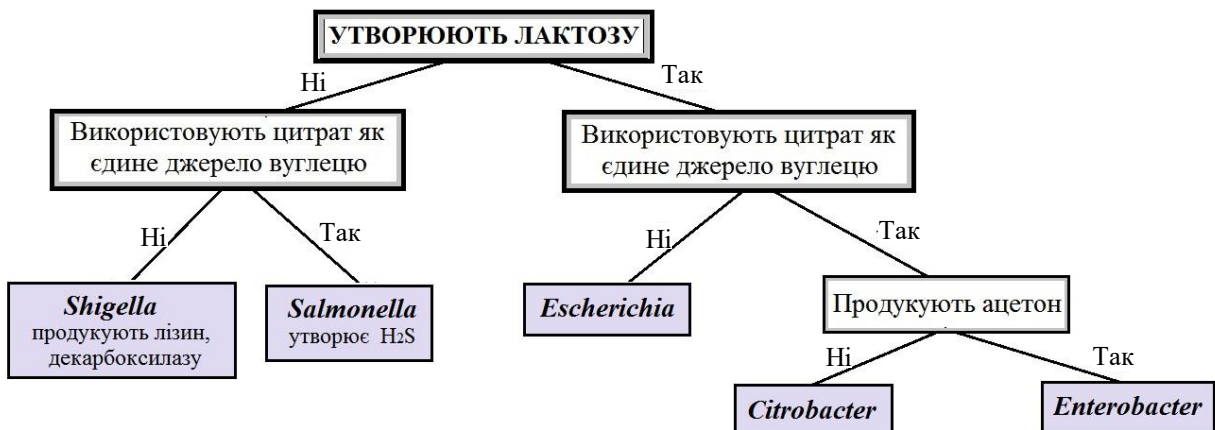


## ІДЕНТИФІКАЦІЯ НЕВІДОМИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

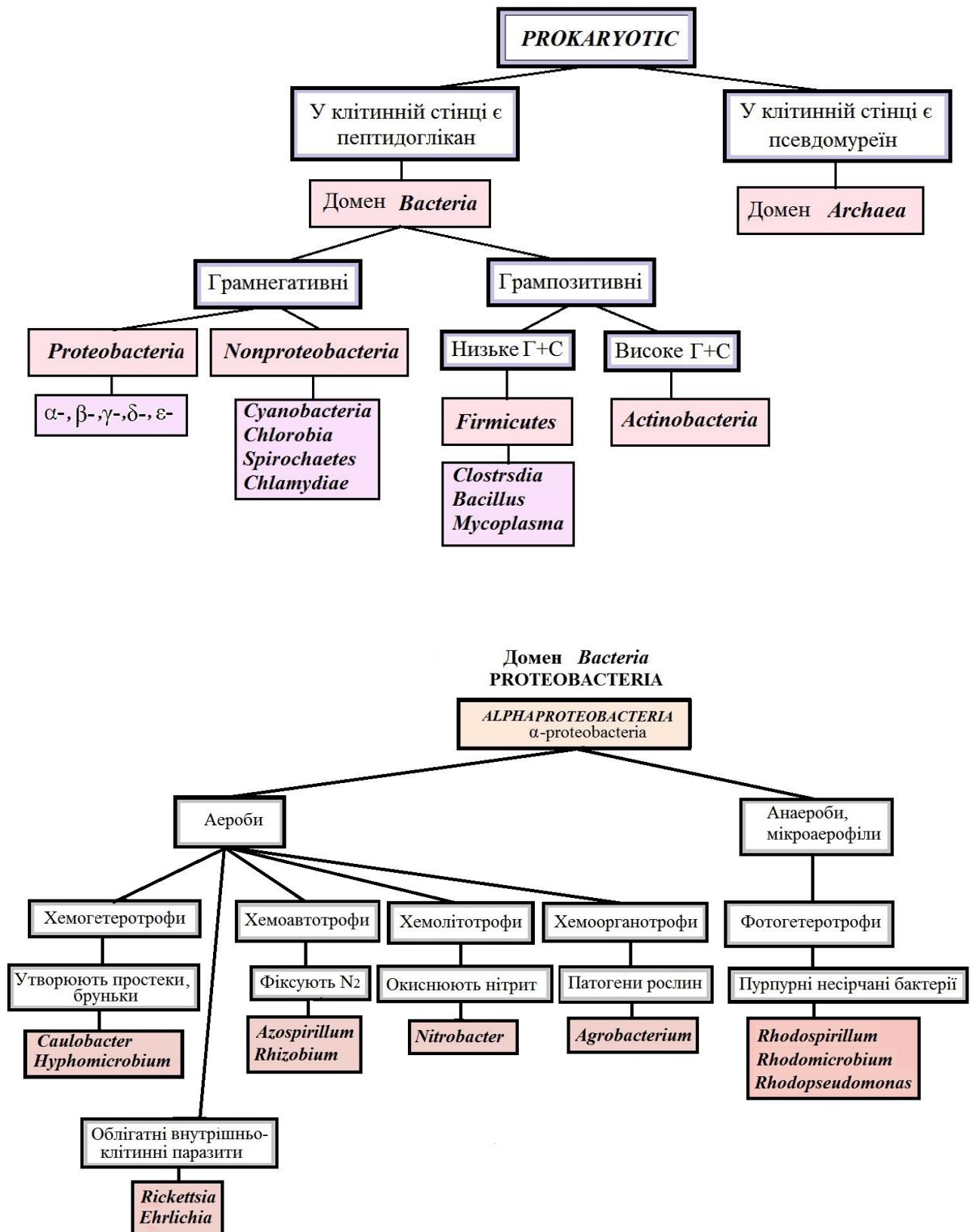
- За морфологічними характеристиками
- За диференціальним фарбуванням
- За біохімічними тестами



## ДИХОТОМІЧНІ КЛЮЧІ



## ПРОКАРІОТИ



## ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.....	4
Модуль I. СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ.....	7
Тема 1. Методи приготування препаратів мікроорганізмів та їх мікроскопічне дослідження... <i>Лабораторна робота 1</i> .....	7
Тема 2. Способи забарвлення мікроорганізмів та визначення їх розмірів.....	13
<i>Лабораторна робота 2</i> .....	13
Тема 3. Будова та морфологія бактеріальної клітини. Виявлення клітинних включень, спор, капсул.....	18
<i>Лабораторна робота 3</i> .....	18
Тема 4. Будова та морфологія грибів і актиноміцетів.....	28
<i>Лабораторна робота 4</i> .....	28
Питання до модульного контролю 1.....	35
Модуль II. РІСТ І ЖИВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	36
Тема 5. Приготування поживних середовищ та правила роботи з культурами мікроорганізмів.....	36
<i>Лабораторна робота 5</i> .....	36
Тема 6. Отримання накопичувальних (елективних) культур.....	47
<i>Лабораторна робота 6</i> .....	47
Тема 7. Виділення чистих культур мікроорганізмів.....	56
<i>Лабораторна робота 7</i> .....	56
Тема 8. Методи вивчення фізіолого-біохімічних ознак бактерій.....	64
<i>Лабораторна робота 8</i> .....	64
Тема 9. Принципи ідентифікації мікроорганізмів.....	72
<i>Лабораторна робота 9</i> .....	72
Питання до модульного контролю 2.....	72
Модуль III. МЕТАБОЛІЗМ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	78
Тема 10. Спиртове бродіння.....	78
<i>Лабораторна робота 10</i> .....	78
Тема 11. Молочнокисле бродіння.....	84
<i>Лабораторна робота 11</i> .....	84
Тема 12. Маслянокисле бродіння.....	89
<i>Лабораторна робота 12</i> .....	89
Тема 13. Методи визначення кількості клітин мікроорганізмів.....	93
<i>Лабораторна робота 13</i> .....	93
Тема 14. Вплив фізичних та хімічних факторів на ріст мікроорганізмів.....	103
<i>Лабораторна робота 14</i> .....	103
Питання до модульного контролю 3.....	110
Модуль IV. МІКРООРГАНІЗМИ І НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ.....	111
Тема 15. Дослідження мікрофлори води та повітря.....	111
<i>Лабораторна робота 15</i> .....	111
Тема 16. Дослідження мікрофлори ґрунту.....	116
<i>Лабораторна робота 16</i> .....	116
Тема 17. Вивчення антагонізму в мікроорганізмів.....	124
<i>Лабораторна робота 17</i> .....	124
Питання до модульного контролю 4.....	132
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	133
ДОДАТКИ.....	134

*Навчальне видання*

**ЛАБОРАТОРНИЙ ЗОШИТ  
ІЗ ЗАГАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ  
І ВІРУСОЛОГІЇ**

для студентів напрямку підготовки  
6.051401 «Біотехнологія»

Укладач ЯСТРЕМСЬКА Лариса Сергіївна

Редактор *З. О. Остап'юк*  
Технічний редактор *А. І. Лавринович*  
Коректор *О. О. Крусь*  
Комп'ютерна верстка *Н. В. Черної*

Підп. до друку 28.04.2017. Формат 60x84/8. Папір офс.  
Офс. друк. Ум. друк. арк. 16,74. Обл.-вид. арк. 18,0.  
Тираж 100 прим. Замовлення № 60-1.

Видавець і виготівник  
Національний авіаційний університет  
03680. Київ-58, проспект Космонавта Комарова, 1.

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру ДК № 977 від 05.07.2002