

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького**

Кафедра мікробіології та вірусології

ПРОМИСЛОВА МІКРОБІОЛОГІЯ

Лабораторні заняття

Методичні вказівки

Львів – 2025

Методичні вказівки до лабораторних занять з курсу «Промислова мікробіологія» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Укладачі: Н. В. Семанюк, В. І. Семанюк, І. Б. Турко – Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2025. – 82 с.

Укладачі: Н. В. Семанюк,
В. І. Семанюк
І. Б. Турко

Рецензент доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,
доцент кафедри біотехнології та радіології О. В. Штапенко

Посібник орієнтований на допомогу у виконанні лабораторних робіт здобувачів, що вивчають дисципліну «Промислова мікробіологія». Методичні вказівки містять роботи, які дозволяють студентам оволодіти навичками роботи з мікроорганізмами, вивчити їх морфологію, культуральні, фізіологічні та біохімічні властивості для розробки та оптимізації біотехнологічних процесів і промислового виробництва.

Методичні вказівки затверджені на засіданні кафедри мікробіології та вірусології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, від 3 червня 2025 р., протокол № 14.

© Н. В. Семанюк
© В. І. Семанюк
© І. Б. Турко

Розділ 1. Морфологія, систематика і фізіології мікроорганізмів

Лабораторне заняття 1

Тема: «Мікробіологічна лабораторія. Дослідження форм мікроорганізмів»

Особливістю мікробіологічних робіт є постійний контакт працівників лабораторії з біологічно-небезпечним матеріалом: культурами патогенних мікроорганізмів, тканинами, кров'ю і виділеннями живих організмів тощо. Тому всі працівники мікробіологічної лабораторії зобов'язані дотримуватись державних санітарних правил безпеки роботи з мікроорганізмами ДСП 9.9.5.035-99 затверджених МОЗ України.

Працівники мікробіологічних лабораторій і студенти на лабораторних заняттях повинні враховувати, що мікроорганізми можуть бути шкідливими і небезпечними для здоров'я людини. Тому у мікробіологічній лабораторії та на лабораторних заняттях необхідно дотримуватися таких правил техніки безпеки:

- у лабораторії працюють тільки у спецодязі (білому халаті, шапочці або косинці);
- виходити за межі лабораторії у спецодязі, переходити без потреби і переносити культури мікроорганізмів у інші приміщення забороняється;
- необхідно сидіти лише на своєму робочому місці, тримати його у чистоті і працювати тільки сидячи;
- використані піпетки, предметні і покривні скельця, шпателі, тампони та інші засоби роботи ставлять у посудину із дезінфікуючою рідиною (1% розчин хлораміну); пінцети, бактеріологічні петлі та інші металеві предмети обпалюють у полум'ї спиртівки або газового пальника;
- використані забруднені мікробами матеріали і відпрацьовані мікробні культури знезаражують стерилізацією в автоклаві (цю роботу виконують співробітники кафедри, які мають допуск до роботи із приладами високого тиску);
- у випадку порушення цілості посуду з досліджуваною культурою мікробів, необхідно повідомити викладача, що веде заняття, і під його керівництвом ретельно знезаражити забруднене місце;

- після закінчення роботи із мікробними культурами робоче місце прибирають і під керівництвом лаборанта, відповідального за практикум або лабораторію, обробляють дезінфекційними розчинами, культури необхідні для наступних робіт ставлять у холодильник або сейф, які закривають і пломбують;

- на пробірках із культурами (штамами) пишуть дату посіву і номер культури; на пробірках з культурами, що зберігаються у лабораторії тривалий час, наклеюють етикетку з лейкопластиру з надписами або роблять надписи спеціальним чорнилом; свіжо засіяні і підписані пробірки та чашки Петрі ставлять у термостат для культивування мікробів;

- після роботи руки обробляють дезрозчином і миють з милом.

Перша долікарська допомога:

1. При пораненнях, отруєннях, опіках та інших нещасних випадках потерпілому на місці надають першу долікарську допомогу й направляють до медичної установи. При потребі викликають лікаря на місце пригоди.

2. У разі забруднення заразним матеріалом необхідно: а) відкриті ділянки шкіри обличчя, рук, інших частин тіла обробити 70% етиловим спиртом; б) слизові оболонки рота прополоскати 0,5% розчином гідрокарбонату натрію, 0,5% розчином соляної кислоти або розчином перманганату калію 1:10 000, очі промити розчином перманганату калію 1:1000 або закапати в очі 1-2 краплі 1% розчину азотнокислого срібла, в ніс закапати 1-2 краплі 1% розчину протарголу.

3. При термічних опіках уражене місце слід змочити етиловим спиртом або 3-5% розчином перманганату калію, потім змастити маззю від опіків або 3-5% розчином свіжо приготовленого таніну. При важких опіках допомога надається тільки медичним персоналом.

4. При хімічних опіках необхідно шляхом промивання видалити з шкіри речовину, яка викликала опік, і нейтралізувати дію відповідним розчином. Якщо попала кислота то її дію нейтралізують 2% розчином гідрокарбонату натрію або 1% розчином аміаку, якщо попав луг – то 1% розчином лимонної або оцтової кислот. Після цього накладають суху марлеву пов'язку.

5. При попаданні кислоти або лугу в око потрібно негайно і ретельно промити його водою, а потім 2% розчином гідрокарбонату

натрію, якщо попала кислота, або 2% розчином борної кислоти, якщо попав дуг.

6. При ураженні електричним струмом, якщо потерпілий продовжує торкатися струмопровідних частин, необхідно негайно відключити електричний струм і надати першу допомогу.

Робота 1. Методи виявлення мікроорганізмів

Мета роботи Ознайомлення студентів із основними методами виявлення мікроорганізмів.

Матеріальне забезпечення. Мікроскопи; живильні середовища; діагностикуми.

Основні відомості. У лабораторній практиці розрізняють такі основні мікробіологічні методи виявлення бактерій: бактеріоскопічний, бактеріологічний, біологічний, серологічний і алергічний.

Бактеріоскопічний метод - базується на виявленні бактерій за допомогою мікроскопа. Метод дає можливість вивчати як живих, так і вбитих мікробів. При цьому досліджують морфологію мікроорганізмів (форму, розміри, взаємне розміщення, наявність спор, капсул, рухливість) і тинкторіальні властивості (здатність фарбуватися у певний колір).

Бактеріологічний метод включає методи виявлення, культивування і виділення чистої культури бактерій з досліджуваного матеріалу на поживних середовищах та вивчення культурально-біохімічних властивостей мікроорганізмів.

Біологічний метод (біопроба) полягає в тому, що досліджуваним матеріалом заражають лабораторних тварин з метою виявлення патогенності мікроорганізмів.

Серологічний метод базується на ідентифікації бактерій у серологічних реакціях, оснований на взаємодії антиген-антитіло, виявленні у сироватці крові хворих чи перехворілих тварин специфічних антитіл.

Алергічний метод полягає у виявленні алергічної реакції, що виникає при введенні сенсibiliзованим (зараженим) тваринам алергену, який виготовляють із відповідного збудника (наприклад, реакція Манту при туберкульозі).

Проведення роботи. Ознайомтеся з приладами, обладнанням та іншими засобами, що використовуються для виявлення й ідентифікації мікроорганізмів.

У результатах дослідження запишіть, які інструменти прилади і обладнання використовуються при різних методах виявлення мікробів. У висновках вкажіть переваги та недоліки кожного із методів виявлення бактерій.

Результати роботи _____

Висновки _____

Робота 2. Будова мікроскопа і техніка бактеріоскопічного дослідження

Мета роботи. Вивчення студентами будову оптичного мікроскопа; засвоєння правил користування світловим мікроскопом; оволодіння методикою встановлення освітлення мікроскопа за Келлером.

Матеріальне забезпечення. Різні моделі біологічних мікроскопів; схема ходу променів у імерсійній та сухій системах, препарати для мікроскопії, імерсійна олія.

Основні відомості. М і к р о с к о п – прилад з певним розташуванням лінз, за допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні і тисячі разів. Мікроскоп складається з механічної і оптичної систем. У механічну систему входить: основа, коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик з регульовальними гвинтами, тубусотримач із макрогвинтом, револьвер з отворами для об'єктивів, тубус тощо. До оптичної системи

належать: об'єктиви, окуляр та освітлювальний пристрій (дзеркало або освітлювач, конденсор, ірисова діафрагма, світлофільтри).

Основною частиною мікроскопа є об'єктив, який являє собою систему лінз, вміщених у металеву оправу. Передня лінза називається фронтальною і дає відбиток об'єкта, що розглядається з хроматичною і сферичною абераціями, які знижують чіткість зображення. Явища аберації усувають розміщені вище корекційні лінзи. Розрізняють сухі та імерсійні об'єктиви. Сухим називають такий об'єктив, між фронтальною лінзою якого і об'єктом міститься повітря. При використанні імерсійного об'єктива на предметне скельце попередньо наносять краплю імерсійної олії (найчастіше кедрову), у якій показники заломлення променів світла майже ідентичні як у склі.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива, помноженому на збільшення окуляра.

Оптичні якості мікроскопа визначаються такими основними показниками: власним збільшенням, роздільною здатністю і чіткістю зображення. Власне збільшення мікроскопа залежить від фокусної відстані фронтальної лінзи.

Роздільна здатність мікроскопа – це здатність об'єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих точок. Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об'єкт можна побачити. Роздільна здатність тим більша, чим вища нумерична апертура об'єктива.

Нумерична апертура визначає здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла, яку встановлюють шляхом множення показника заломлення середовища, що міститься між об'єктивом і об'єктом, на половину твірного кута, що утворюється між двома крайніми променями, які потрапляють в об'єктив.

Чітке зображення під мікроскопом утворюється при загальному збільшенні об'єктива і окуляра, яке не перевищує нумеричну апертуру більше ніж у 500 разів.

Конденсор та ірисова діафрагма призначені для розсіяного світла, що йде від дзеркала, у пучок.

Дзеркало має плоску та вгнуту поверхні і призначене для спрямування променів на досліджуваний об'єкт. При денному світлі користуються плоскою стороною дзеркала, при штучному освітленні і відсутності конденсора – вгнутою.

Проведення роботи. Вивчення техніки мікроскопії почніть із правильного встановлення освітлення. Для цього, із тубуса виймають

окуляр і, дивлячись лівим оком прямо в об'єктив, повертають плоску поверхню дзеркала так, щоб світло сонця, відбиваючись від поверхні дзеркала, яскраво і рівномірно освітлювало все поле зору. Щоб це отримати, треба повністю підняти конденсор і опустити об'єктив (8х) на відстань 0,5–1 см від предметного столика. Потім знову вставте окуляр і починайте вивчення мазка. Під час роботи з освітлювачем кращі результати будуть при встановленні освітлення за Келлером, яка ґрунтується на одержанні різкого зображення світла (спіралі лампи) на діафрагмі конденсора та одержанні такого ж зображення ірисової діафрагми освітлювача в площині препарату.

Техніка мікроскопії. Закріплюємо на предметному столику препарат за допомогою затискачів. Налаштування чіткості зображення проводимо рухаючи об'єктив з допомогою макрогвинта лише вгору. Остаточну чіткість зображення підлаштовуємо мікрогвинтом. При роботі з імерсійною системою (збільшення 90) попередньо на предметне скло наносимо краплину імерсійної олії, в яку занурюємо об'єктив. Після закінчення мікроскопії об'єктиви необхідно протерти фланелевою серветкою.

У результатах зарисуйте хід променів у мікроскопі і вкажіть особливості руху променів при інших методах мікроскопії.

Результати роботи _____

Висновки _____

Робота 3. Дослідження форм мікроорганізмів

Мета роботи. Вивчення студентами форм і взаємного розміщення мікробних клітин; засвоєння техніки мікроскопії зафарбованих препаратів.

Матеріальне забезпечення. Постійні фарбовані препарати бактерій; мікроскоп; імерсійна олія; таблиця основних форм бактерій.

Основні відомості. Основними формами бактерій є: кулеподібні (коки), паличкоподібні і звивисті або спіралеподібні.

Серед к у л е п о д і б н и х мікроорганізмів, у залежності від розташування кокових клітин після їх поділу, розрізняють: *мікрококи* (розміщуються по одному), *диплококи* (розміщуються попарно), *тетракоки* (результат поділу клітин у двох взаємно перпендикулярних напрямках – зберігаються разом чотири коки), *стрептококи* (коки у вигляді ланцюжка), *стафілококи* (хаотично розміщені коки в одній площині, іноді утворюють скупчення у вигляді грона винограду) і *сарцини* (об'ємне скупчення коків).

П а л и ч к о п о д і б н і мікроорганізми діляться на дві групи. Одна група, яка не утворює спор називаються *бактерії*. Інша група бактерій, що утворює в несприятливих умовах стійку форму існування – спору, називають *бацилами*. Бацили, у яких діаметр спори перевищує діаметр вегетативного тіла, називаються *кlostридіями*.

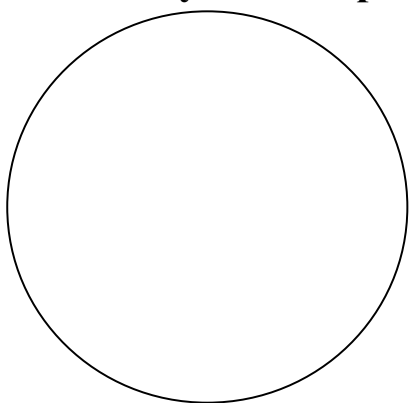
З в и в и с т і форми включають: *вібріони*, які мають один неповний завиток у вигляді коми; *спірили* – мікроорганізми з декількома великими завитками; *спірохети* – мікроорганізми з великою кількістю дрібних завитків навколо осьової нитки.

Проведення роботи. Налаштуйте освітлення мікроскопа. Далше кожен студент мікроскопує готові фарбовані препарати різних форм бактерій із використанням імерсійного об'єктива.

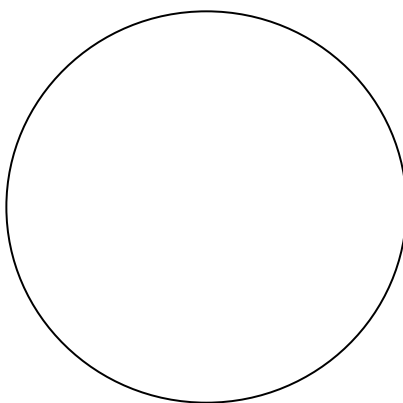
У результатах дослідіу замалюйте всі виявлені під мікроскопом форми мікроорганізмів.

У висновках вкажіть інші форми мікроорганізмів

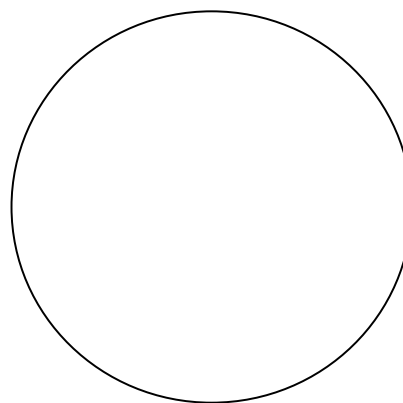
Результати роботи



Паличкоподібні



Кулясті



Звивисті

Висновки

Робота 4. Виготовлення препаратів живих мікроорганізмів

Мета роботи. Навчити студентів досліджувати мікроби у живому стані і визначати характер їх руху; оволодіти методами виготовлення препаратів „висяча крапля” і „придушена крапля”.

Матеріальне забезпечення. У штативі пробірки із 12–18-годинною культурою ґрунтових мікробів (ґрунтова бовтанка) або культури *E. coli* і молочнокислих бактерій (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*); предметні і покривні скельця; предметні скельця із лункою; вазелін; скляна паличка для нанесення вазеліну; пастерівські піпетки, таблиця розміщення джгутиків у мікробів.

Основні відомості. Рух у мікробів здійснюється за допомогою джгутиків. Швидкість і характер руху залежать від віку культури, навколишнього середовища і виду мікроба. У молодих особин рухливість виражена краще, ніж у старих. Рух припиняється із накопиченням у живильному середовищі продуктів життєдіяльності. Здатність до руху є ознакою при визначенні виду мікроба.

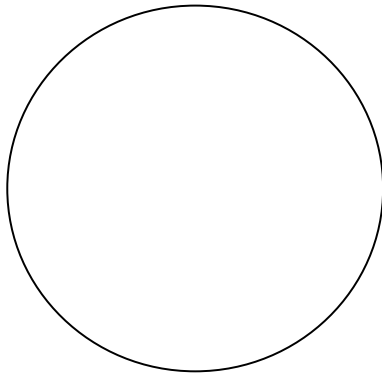
У залежності від розміщення джгутиків мікроби ділять на *монотрихи*, що мають один полярний джгутик (наприклад, мікроорганізми роду *Vibrio*); *амфітрихи*, у яких джгутики знаходяться на обох полюсах (наприклад, рід *Spirillum*); *лофотрихи*, у яких пучок джгутиків розміщений на одному з полюсів (наприклад, представники роду *Pseudomonas*); і *перитрихи*, у яких джгутики знаходяться на всій поверхні мікробної клітини (подібне розміщення джгутиків є характерним для бактерій родини *Enterobacteriaceae* і *Bacillaceae*).

Проведення роботи. Виготовлення препарату „висячої краплі”. Препарат готують на предметному склі з заглибленням (лункою). Краї лунки змащують тонким шаром вазеліну. Мікроорганізми наносять на покривне скло. Якщо вони вирощені у рідкому середовищі, то беруть краплю такої культури, якщо на щільному, то спочатку на покривне скло наносять краплю ізотонічного розчину, а потім в неї – культуру мікробів. Предметне скло акуратно опускають

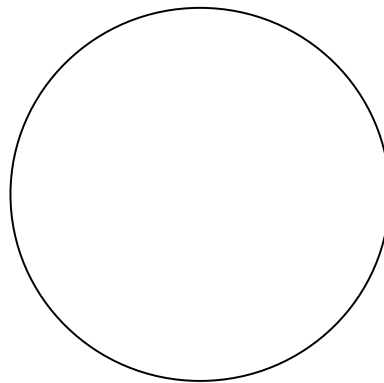
на покривне скло так, щоб крапля знаходилася по центру лунки. Препарат повертають на 180^0 і розглядають у злегка затемненому полі (діафрагму звужують), що підвищує контрастність нефарбованих форм.

Виготовлення препарату „придушеної краплі”. Препарат готують на звичайному предметному склі. Для цього на його поверхню наносять культуру мікробів, накривають покривним склом і розглядають при тих самих умовах, що і висячу. Препарати із виявленими мікробами зарисуйте. Зробіть висновки.

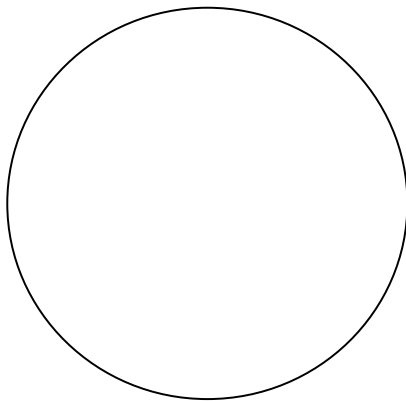
Результати роботи



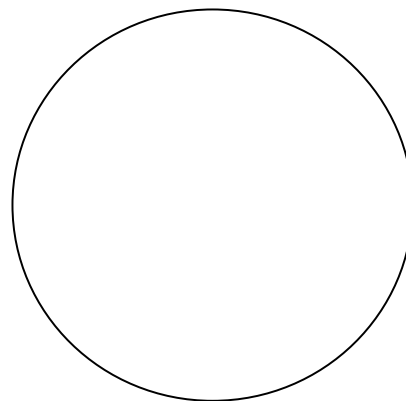
Монотрихи



Лифотрихи



Амфітрихи



Перітрихи

--

Схема виготовлення препарату “роздавлена крапля”
Висновки_____

Робота 5. Виготовлення фарбованих препаратів мікроорганізмів. Прості методи фарбування

Мета роботи. Оволодіння студентами технікою виготовлення препаратів мікроорганізмів; засвоєння простого методу фарбування мазків.

Матеріальне забезпечення. Культури мікроорганізмів на щільному і рідкому поживному середовищі, патматеріал, бакпетлі, предметні шкельця, шпатель, стерильний ізотонічний розчин NaCl або водопровідна вода у пробірках; розчини фарб – фуксин Пфейфера, метиленовий блакитний.

Основні відомості. Препарати для мікроскопії виготовляють на предметних скельцях.

Для виготовлення препарату–мазка з *рідкої мікробної культури* у ліву руку беруть пробірку з названим матеріалом, а у праву – бактеріологічну петлю (як ручку для писання), ретельно прожарюють її в полум’ї газового пальника (або спиртівки) і, не випускаючи з рук, обережно біля полум’я відкривають пробірку мізинцем правої руки, петлею відбирають краплю матеріалу і в полум’ї вогню пробірку закривають та ставлять у штатив. Вільною рукою беруть предметне скельце, наносять на його поверхню відібраний матеріал і легкими круговими рухами розтирають по склу, потім препарат висушують на повітрі, а петлю прожарюють.

Після висихання препарат фіксують (при цьому бактерії прикріплюються до скла та вбиваються (вбиті мікроби краще сприймають фарби). Для фіксації частіше користуються фізичним методом, який полягає в тому, що препарат (протилежним боком від нанесеного матеріалу) 2–3 рази проводять над полум’ям пальника.

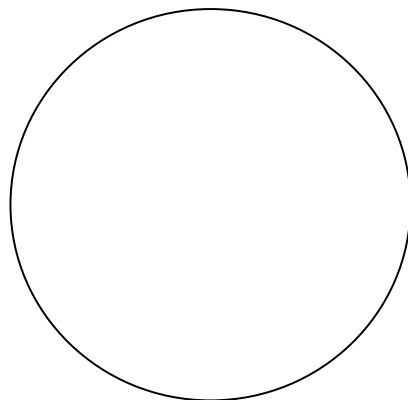
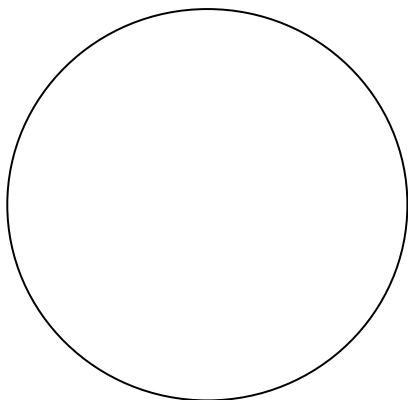
Фіксація хімічним методом полягає у використанні ефіру, етилового спирту, формаліну, суміші формалін – спирт, спирт – ефір тощо. Для фіксації висушений препарат вносять у склянку з фіксуючою рідиною (або 1–2 краплі реактиву наносять на препарат) і витримують 3–5 хв. Потім мазок промивають водою і висушують фільтрувальним папером. Для того, щоб знати місцезнаходження мазка, його з протилежного боку обводять восковим олівцем.

Для виготовлення препарату із бактеріальної культури, що виросла на *щільному середовищі*, на предметне скло попередньо наносять краплю стерильного ізотонічного розчину NaCl. Потім, профламбованою бактеріологічною петлею на вогні беруть невелику кількість мікробної культури (з пробірки або чашки Петрі) та розтирають у краплі на предметному склі на величину двохкопійної монети. Далше поступають, як описано вище.

Для виготовлення *препаратів-відбитків* із патматеріалу необхідно шпателем, розігрітим на вогні, припекти поверхню матеріалу, скальпелем зробити розріз та з глибинних тканин вирізати стерильним скальпелем невеликий кусочок і його поверхнею доторкнутися 2–3 рази до різних місць предметного скла. Далше препарат висушують, фіксують і зафарбовують.

Проведення роботи. На чистих предметних скельцях виготовляють бакпрепарати, фіксують та ставлять на скляний місток, розміщений на зливній склянці мазком до верху. На поверхню мазка наносять 3–4 краплі фарби, щоб вона покрила весь мазок. Час фарбування фуксином – 1-2 хвилини, метиленовою синькою – 3-5 хвилин. Потім фарбу зливають, препарат промивають водою, висушують фільтрувальним папером і розглядають під мікроскопом. У результатах досліду замалюйте досліджувані об'єкти. У висновках запишіть інформацію про морфологію мікроорганізмів, отриману в результаті мікроскопії.

Результати роботи



Фарбування
розчином Пфейфера
Висновки

Фарбування
метиленовою синьою

Робота 6. Фарбування бактерій за Грамом

Мета роботи. Оволодіння студентами методикою фарбування бактерій за Грамом; засвоєння суті визначення тинкторіальних властивостей мікробів

Матеріальне забезпечення. Культури мікробів на щільному поживному середовищі; стерильний ізотонічний розчин NaCl або водопровідна вода; карболовий генціанвіолет або фільтрувальні папірці, просочені розчином такого складу: генціанвіолет – 1 г, спирт 96° – 100 мл, гліцерин – 5 мл і висушених на повітрі; розчин Люголя (йоду кристалічного – 1,0; йодистого калію, як розчинника йоду – 2,0; дистильованої води – 300 мл.); розчин Пфейфера (водний розчин фуксину).

Основні відомості. Фарбування за Грамом – один з найпоширеніших у лабораторній практиці складних методів фарбування мікроорганізмів.

Сутність його полягає у здатності мікробів, які мають у складі клітинної стінки тейхоєву кислоту, утворювати нерозчинні у спирті сполуки генціанвіолету з йодом і зафарбовуватися у синьо-фіолетовий колір. Такі бактерії називаються грампозитивними. У мікробів, які не мають тейхоєвої кислоти або її дуже мало, фарбувальний комплекс генціанвіолету з йодом утворюється тимчасово і після обробки спиртом швидко розчиняється, мікробні клітини знебарвлюються і наступне дофарбовування їх здійснюється розчином Пфейфера у червоний або рожевий колір. Такі бактерії називаються грамнегативними.

Проведення роботи. На висушений і зафіксований мазок кладуть клаптик фільтрувального паперу і наносять на нього кілька крапель розчину карболового генціанвіолету. Витримують фарбу протягом 1–2 хв. Потім знімають папірець і на препарат наливають невелику кількість розчину Люголя. Розчин не зливають доти, поки

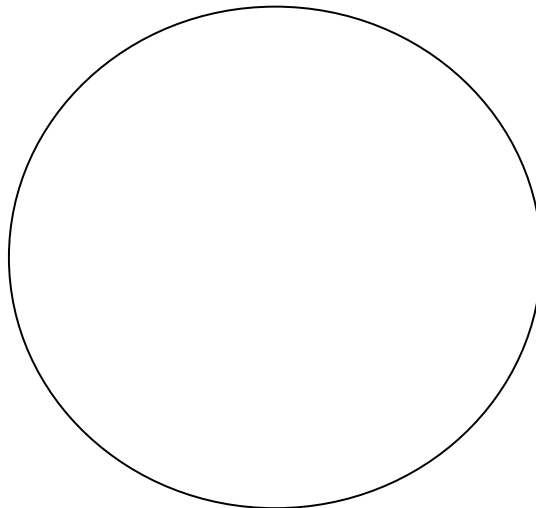
мазок не почорніє (1–2 хв). Далі зливають розчин Люголя і мазок обробляють спиртом протягом 0,5–1 хв. Після цього препарат старанно промивають дистильованою водою, дофарбовують фуксином Пфейфера (1–2 хв) і знову промивають водою і висушують на повітрі або фільтрувальним папером. Виготовлений таким способом препарат вивчають за допомогою імерсійної системи і зарисовують.

Фарбування бактерій за Грамом можна проводити і в модифікації А. Синєва. Для цього на зафіксований мазок кладуть клаптик фільтрувального паперу, заздалегідь змочений розчином генціанвіолету і добре висушеного. Зверху на папір наносять 2–3 краплі води і залишають на 2 хв. Далі техніка фарбування така, як вказано вище.

На рисунку покажіть грампозитивні і грамнегативні бактерії.

Зробіть висновки.

Результати роботи



Висновки_____

Робота 7. Фарбування кислото-спирто-лугостійких бактерій

Мета роботи. Освоєння студентами методики фарбування кислото-спирто-лугостійких мікроорганізмів.

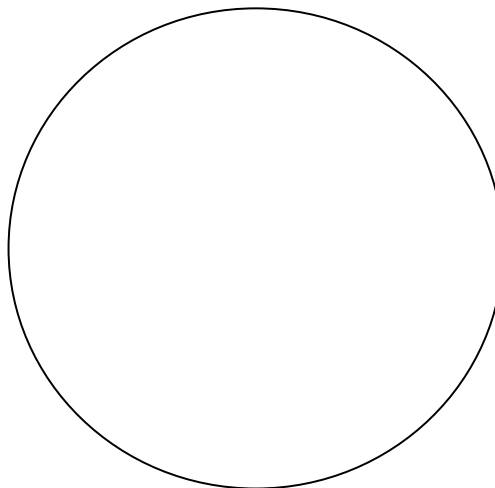
Матеріальне забезпечення. Карболовий фуксин Ціля; метиленова синька Леффлера; 3–5 % розчин сірчаної кислоти; культури мікроорганізмів на щільному поживному середовищі.

Основні відомості. Мікроби цієї групи належать до грампозитивних бактерій. Для їх диференціації використовують спеціальні методи фарбування, що базуються на різній хімічній структурі цитоплазми і клітинної стінки названих видів бактерій. В їхньому складі міститься велика кількість жиро-воскових речовин, зокрема стеаринових кислот (у тому числі фтіонової кислоти до 40%). Вказані бактерії погано сприймають фарби, однак, якщо вони зафарбувалися внаслідок дії протравлювача, то важко знебарвлюються кислотами, спиртами і лугами. Таким методом фарбування бактерій цієї групи є метод Ціль – Нільсена.

Проведення роботи. На фіксований препарат кладуть клаптик фільтрувального паперу (для попередження від осаду), на нього наливають розчин карболового фуксину Ціля. Знизу препарат підігрівають до появи парів і залишають на містку 5-7 хв, потім фарбу з папером зливають (не промиваючи) і знебарвлюють 3-5% розчином сірчаної кислоти 5–7 сек. Знебарвлений препарат добре промивають водою і додатково дофарбовують метиленовою синьою Леффлера 4–5 хв. Після цього препарат промивають водою і висушують фільтрувальним папером.

Кислотостійкі (спирто-лугостійкі) бактерії фарбуються в червоний колір (не знебарвлюються кислотою), некислотостійкі – в синій (знебарвлюються кислотою, а потім сприймають повторне фарбування). Препарат розглядають під імерсією і зарисовують.

Результати роботи



Висновки

Робота 8. Методи фарбування капсул у бактерій

Мета роботи. Освоєння студентами методики фарбування капсул у бактерій та їх мікроскопування.

Матеріальне забезпечення. Готові мазки для фарбування капсул бактерій; фіксовані мазки з крові або препарати – відбитки з тканин; метиленова синька; 2% водний розчин сафраніну, чашка Петрі, скляні палички.

Основні відомості. Капсуло–муциноподібна речовина представляє собою найчастіше високомолекулярні полісахариди – є похідною зовнішнього шару оболонки бактерій. Капсульна речовина погано фарбується, тому для виявлення використовують спеціальні методи фарбування, які базуються на явищі метакромазії.

Проведення роботи. Для фарбування фіксованих мазків із метою виявлення капсул бактерій використовуйте такі методи:

- м е т о д М і х і н а. Фіксований мазок із крові або препарат із тканини органа (печінки, селезінки, нирки) фарбують метиленовою синькою з підігріванням до появи парів, витримують 5–7 хв. Фарбу зливають, швидко промивають водою (можна не промивати), просушують фільтрувальним папером. Вегетативна клітина фарбується у синій колір, капсула у блідо–рожевий.

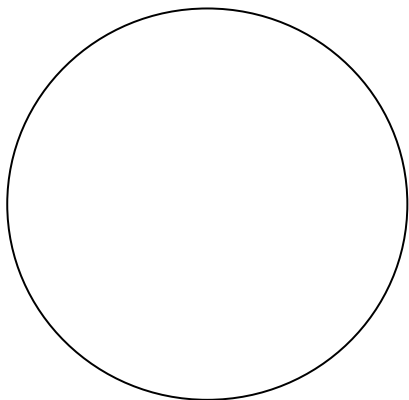
- м е т о д Р о м а н о в с ь к о г о – Г і м з и. Фіксований препарат фарбують наступним чином: у чашку Петрі на скляні або дерев'яні палички ставлять препарат відбитком (мазком) донизу, під препарат наливають фарбу, фарбують 40–50 хв. Вегетативні клітини і капсули фарбуються у такі самі кольори, що і в попередньому досліді;

- м е т о д О л ь т а. Свіжий 2% водний розчин сафраніну наливають на препарат і витримують впродовж 5–7 хв. Потім злегка промивають водою і висушують. Вегетативна клітина фарбується у цегляно-червоний колір, капсула – у жовто-оранжевий.

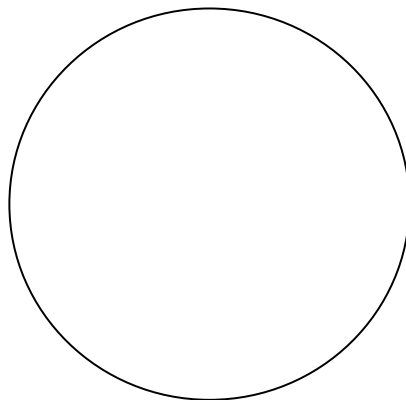
У результатах досліді зарисуйте капсулу і вегетативну мікробну клітину після їх фарбування методом Міхіна, Романовського-Гімзи або Ольта.

Зробіть висновки. У висновках вкажіть інші методи, що використовуються для виявлення капсул.

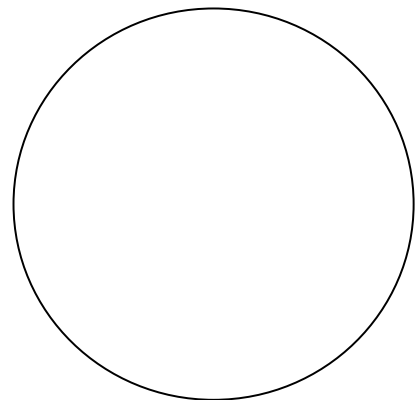
Результати роботи



Метод Ольта



Метод Міхіна



Метод
Романовського-Гімзи

Висновки _____

Робота 9. Фарбування спор у бацил

Мета роботи. Оволодіння студентами методикою фарбування спор і технікою їх мікроскопування; ознайомлення із процесом спороутворення у мікроорганізмів; вивчення назв спороутворюючих мікробів.

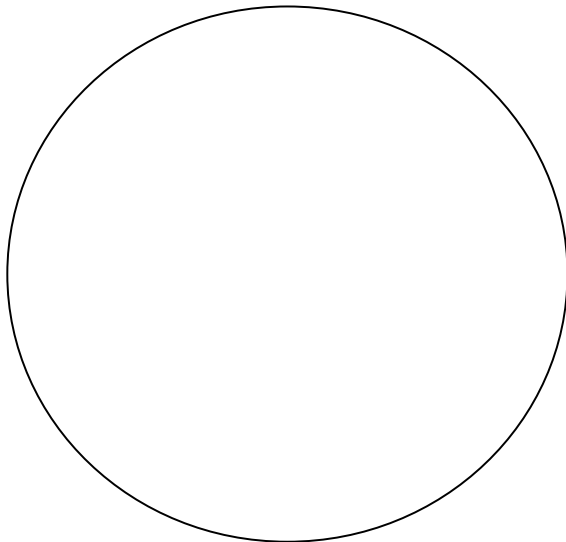
Матеріальне забезпечення. Фільтрувальний папірець, оброблений фуксином Ціля; 3% водний розчин сірчаної кислоти; метиленова синька.

Основні відомості. Спори фарбуються складним методом, оскільки вони мають щільну оболонку. При фарбуванні змінюють проникливість оболонки спор, що досягається дією на неї протравлювачів (хромової або сірчаної кислот) або розчином карболової кислоти при підігріванні. Оболонка при цьому розм'якшується і проникливість зростає. Фарби добре адсорбуються, спори не знебарвлюються при короткотривалій дії кислоти. Вегетативні мікробні клітини знебарвлюються внаслідок дії кислотою і стають видимими тільки при додатковому фарбуванні контрастною фарбою. Процес спороутворення виникає при несприятливих для мікробної клітини умовах навколишнього середовища. Найчастіше для фарбування спор використовують метод Златогорова.

Проведення роботи. М е т о д З л а т о г о р о в а. Мазок фіксують над полум'ям пальника. На його поверхню кладуть фільтрувальний папірець величиною з покривне скло, зафарбований фуксином Ціля. Папірець змочують 3 – 5 краплями води. Фарбування проводять при підігріванні на протязі 4–5 хв. Щоб мазок не висихав, під час нагрівання по краплях додають воду. Далше папірець знімають пінцетом, мазок знебарвлюють на протязі 5–10 сек. 3% водним розчином сірчаної кислоти і промивають водою. Додаткове фарбування метиленовою синькою проводять на протязі 3–5 хв. Після цього мазок промивають водою і висушують. У полі зору мікроскопа видно, що спори зафарбовуються у червоний колір, а вегетативні клітини – у синій.

У результатах досліду зарисуйте виявлені мікроби, визначте місце розташування спори у вегетативній клітині. У висновках вкажіть різницю між бацилами і клостридіями.

Результати роботи



Метод Златогорова

Висновки

Контрольні запитання

1. Яке призначення і основне обладнання мікробіологічної лабораторії?
2. Які вимоги ставляться до мікробіологічних лабораторій?
3. Які правила роботи і техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії?
4. Назвіть основні приміщення мікробіологічної лабораторії та їх призначення.
5. При яких ураженнях і яка невідкладна допомога може бути надана у мікробіологічній лабораторії?
6. Назвіть складові механічної частини мікроскопа.
7. З чого складається оптична частина мікроскопа?
8. Як вираховується загальне збільшення мікроскопа?
9. Чому у мікробіологічній практиці вивчення бактерій проводять найчастіше за допомогою імерсійних об'єктивів?
10. Чим можна замінити імерсійну олію при бактеріоскопії?
11. Яке призначення револьвера у мікроскопі?
12. Назвіть основні методи виявлення мікроорганізмів.
13. У чому сутність бактеріоскопічного методу виявлення мікроорганізмів?
14. У чому сутність бактеріологічного методу виявлення мікроорганізмів?
15. У чому сутність серологічного методу виявлення мікроорганізмів?
16. У чому сутність алергічного методу виявлення мікроорганізмів?
17. Яка будова клітин прокаріотів?
18. Назвіть паличкоподібні форми бактерій.
19. Назвіть кулясті форми бактерій.
20. Назвіть звивисті форми бактерій.
21. У чому полягає підготовка предметних і покривних скелець до роботи?
22. Назвіть етапи виготовлення мазка.
23. Як готують і мікроскопують препарат „придушена крапля”?
24. Як готують і мікроскопують препарат „висяча крапля”?
25. Назвіть фарби, що використовуються у бактеріології.
26. В чому полягає простий метод фарбування мазків?
27. Для чого проводять фіксацію мазка? Назвіть методи фіксації мазків.
28. Як висушують мазки після нанесення на них культури і після фарбування?
29. Назвіть представників бактерій, що мають джгутики.
30. У чому сутність фарбування бактерій за методом Грама? Які фарби і реактиви використовують для фарбування за Грамом?
31. Яка сутність і техніка фарбування препаратів за методом Ціль-Нільсена? Які фарби і реактиви використовують при фарбуванні цим методом?

32. Як називаються спороутворюючі бактерії (вказіть родові назви цих бактерій)?
33. Як виявити наявність спор в бактеріальних клітинах? Як проходить процес спороутворення у бацил?
34. Назвіть місця розташування спори у мікробній клітині? Яке біологічне значення спор?
35. Що являє собою капсула у бактерій і її значення?
36. Як фарбуються капсули за методом Міхіна?
37. Як фарбуються капсули за методом Ольта?

Лабораторне заняття 2

Тема: «Морфологія актиноміцетів, пліснявих грибів і дріжджів»

Робота 1. Вивчення морфології актиноміцетів

Мета заняття. Освоєння студентами техніки виготовлення препаратів актиноміцетів і вивчення їхньої морфології; ознайомлення із методикою ідентифікації актиноміцетів.

Матеріальне забезпечення. Культури або препарати актиноміцетів; препарувальні голки; скельця, мікроскопи, схема будови актиноміцетів.

Основні відомості. А к т и н о м і ц е т и – Актиноміцети (*Actinomycetales*) – це велика і морфологічно різноманітна група грампозитивних бактерій, які раніше помилково відносили до грибів через їхню здатність утворювати розгалужені нитки, що нагадують грибний міцелій. Однак, незважаючи на цю схожість, актиноміцети є прокаріотами і мають бактеріальну будову клітинної стінки, яка містить пептидоглікани, але не має хітину або целюлози. Актиноміцети дуже різноманітні за формою, яка має вигляд коків, паличок, видовжених ниток чи розгалуженого міцелію.

Характерною особливістю багатьох актиноміцетів є здатність утворювати справжній міцелій, що складається з тонких, розгалужених ниток, які називаються гіфами. Діаметр цих гіфів значно менший, ніж у грибів (близько 0,5-2 мкм). Міцелій може бути: субстратний (вегетативний): розростається всередині живильного субстрату і повітряний (репродуктивний): піднімається над поверхнею субстрату і часто несе спори.

Клітини актиноміцетів здатні до справжнього галушення, що створює мережеві структури.

Актиноміцети розмножуються простим поділом клітин: для неміцеліальних форм, фрагментацією гіф: відрив частин гіф, які потім

можуть проростати в нові колонії і утворенням спор: багато видів актиноміцетів утворюють спори (екзоспори, стрептоспори) на кінцях повітряних гіф. Спори можуть бути різної форми (гладкі, бородавчасті, колючі, зморшкуваті) та утворюватися в ланцюжках або всередині спеціальних структур (спорангіїв).

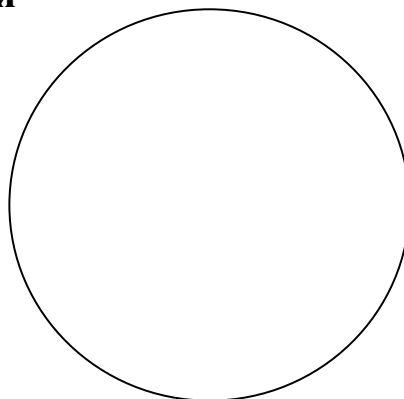
На щільних живильних середовищах актиноміцети часто утворюють щільні колонії, які можуть вrostати в середовище. Колір повітряного та субстратного міцелію, а також наявність розчинних і меланоїдних пігментів, є важливими культуральними характеристиками для їх ідентифікації.

Хоча актиноміцети є грампозитивними, їх клітинна стінка за структурою має деякі особливості, що відрізняють їх від інших грампозитивних бактерій і наближають до грамнегативних. Вона містить пептидоглікани.

У деяких актиноміцетів спостерігається диференціація, що проявляється в утворенні аміцеліарних структур, таких як: коремії: щільні переплетення гіф, агрегати клітин, «сірчані гранули» (характерні скупчення актиноміцетів у гнійному виділенні при актиномікозі), склероції (потовщені гіфи з вакуолями, заповненими ліпідами), Везикули. За фенотипічними ознаками актиноміцети можуть бути поділені на дві основні групи: нижчі актиноміцети: не утворюють спор і можуть мати як міцеліальну, так і неміцеліальну будову (коки, палички) і вищі актиноміцети: утворюють спори, зазвичай мають добре розвинений міцелій.

Проведення роботи. В и г о т о в л е н н я п р е п а р а т у. Культуру, вирощену на щільному поживному середовищі, виймають препарувальною голкою, наносять на предметне скло, накривають другим предметним склом. Щільно притискають і роз'єднують скельця вздовж поверхні, у результаті чого одержують два мазки. Культуру, вирощену на рідких поживних середовищах, наносять на предметне скло петлею. Фіксований мазок фарбують фуксином Пфейфера. Препарат мікроскопують і роблять висновки.

Результати роботи



Висновки

Робота 2. Вивчення морфології плісневих грибів

Мета роботи. Освоєння студентами техніки виготовлення препаратів плісневих грибів і вивчення морфології грибів; ознайомлення з методикою ідентифікації плісневих грибів.

Матеріальне забезпечення. Культури грибів вирощених на штучному поживному середовищі Сабуро (родів *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*); препарувальні голки, предметні і покривні скельця, мікроскопи; таблиці з морфології грибів.

Основні відомості. Гриби належать до еукаріотів, мають більш складнішу, ніж бактерії, клітинну організацію. Характерним для грибів є наявність міцелію (грибниці). Міцелій складається з галузистих ниток (гіф), які стеляться по поверхні і можуть проникати всередину субстрату. Плісневі гриби розділяють на дві групи: одноклітинні – фікоміцети (гриби з роду *Mucor*) і багатоклітинні – мікоміцети (гриби з родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*).

Ф і к о м і ц е т и мають коренеподібно-розгалужений міцелій. Розмножуються нестатевим і статевим шляхом. Від міцелію відходять особливі відгалуження – спорангієносці, на кінцях яких формуються головко подібні розширення – спорангії. У них двоконтурна оболонка, всередині якої розвиваються ендоспори. При дозріванні спорангій розривається і у навколишнє середовище виділяється велика кількість спор. Крім розмноження ендоспорами фікоміцети розмножуються фрагментацією, оідіями і хламідоспорами. Оідії – спори, що відшнуровуються від кінцевої частини міцелію у вигляді круглих клітин. Хламідоспори – вирости міцелію з потовщеною оболонкою, в середині яких містяться поживні

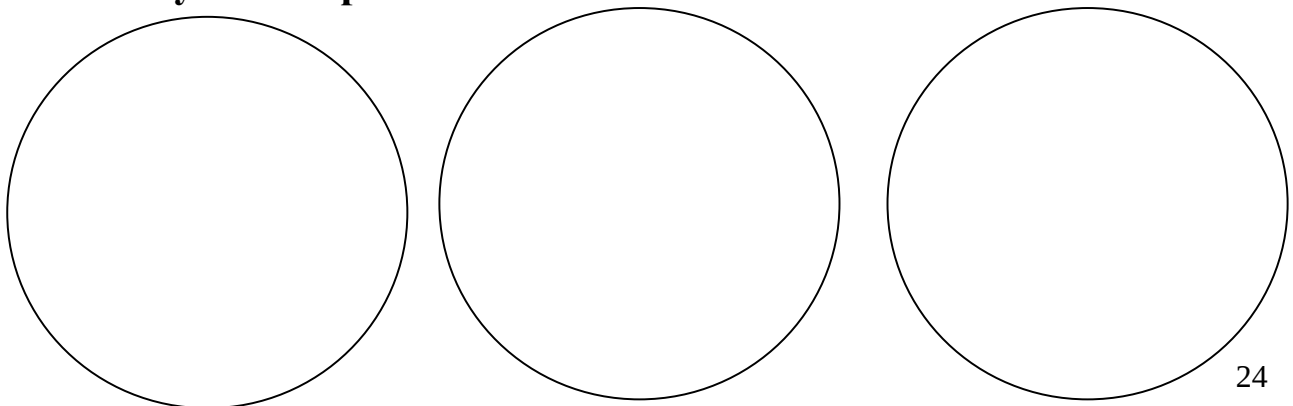
речовини. (Хламідоспори можуть бути одно- і багатоклітинні і служать для збереження виду, оскільки добре переносять несприятливі умови середовища).

М і к о м і ц е т и належать до вищих грибів, включають багато родів і видів плісень. У гіфах міцелію містяться поперечні перегородки – септи, які ділять їх на окремі клітини (септований, багатоклітинний міцелій). Гриби роду *Penicillium* мають міцелій і конідієносець септовані, органи плодоношення нагадують кисть руки. Верхня частина конідієносця галузиться, на кінцях утворюються стеригми, від яких відшнуровуються зовнішні спори – конідії. Рід *Aspergillus* має септований міцелій і одноклітинний конідієносець, на верхньому кінці якого віялоподібно розміщується ряд коротких стеригм з конідіями (ланцюжок екзоспор), що нагадує лійку (звідси назва „лійкова плісень”). Гриби роду *Fusarium* – на конідієносцях утворюють макроконідії серпоподібної або веретеноподібної форми з перетинками. Розмір та кількість перетинок (часто 3-5 перетинок) залежно від виду є важливими для ідентифікації. Утворюються вони в спородохіях (купках слизових спор) або розсіяно по міцелію. Крім цього вони утворюють мікроконідії: одноклітинні або одноперетинчасті, овальні, еліптичні або ниркоподібні спори, які значно менші за макроконідії. Можуть утворюватися в псевдоголовках (скупченнях) або в ланцюжках на коротких фіалідах. Деякі види не утворюють мікроконідій.

Проведення роботи. Морфологічні ознаки грибів вивчають у культурах, вирощених на середовищі в чашках Петрі і у виготовлених з цих культур препаратах типу „придушена крапля”; мікроскопують культури з допомогою лупи і препарати з об’єктивом 40. На предметне скло наносять водопровідну воду. Для виготовлення препарату обережно за допомогою препарувальних голок беруть невелику кількість міцелію гриба, вносять його у краплю води; на краплю кладуть покривне скло і його злегка притискають.

У результатах досліджу зарисуйте різні роди грибів.

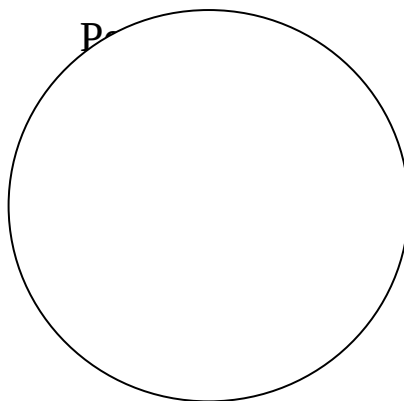
Результати роботи



Mucor

P-

Aspergillus



Fusarium

Висновки_____

Робота 3. Вивчення морфології дріжджів роду *Saccharomyces* і *Yarrowia lipolytica*

Мета роботи. Ознайомлення студентів із морфологією дріжджів; набуття навичок виготовлення препаратів спороутворюючих і неспороутворюючих дріжджів та їх мікроскопії.

Матеріальне забезпечення. Культури дріжджів, вирощені на сушловому агарі або середовищі Сабуру у чашках Петрі; суспензія дріжджів, предметні і покривні скельця, пастерівські піпетки, мікроскопи; таблиця з морфології дріжджів.

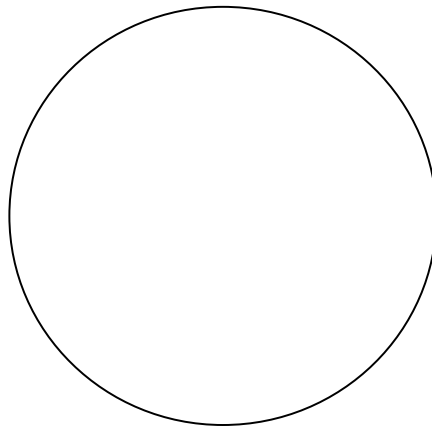
Теоретична основа. Дріжджі належать до сумчастих безміцеліальних грибів (аскоміцетів). Це одноклітинні організми круглої або овальної форми з двоконтурною оболонкою і диференційованим ядром. У гомогенній або дрібнозернистій цитоплазмі дріжджової клітини виявляють 1–2 вакуолі, а також хондріосоми (нитчасті тільця), які беруть участь в обміні речовин. Розмножуються дріжджі брунькуванням і поділом, а деякі види – спорами і статевим шляхом (копуляцією двох суміжних клітин за допомогою невеликих відростків). Спори утворюються всередині дріжджів, після чого вони стають сумками (асками). Число спор від 4 до 12. Серед дріжджів є види, які спричиняють спиртове бродіння і

використовуються при виготовленні вина, у пивоварінні, хлібопекарській і молочній промисловості. *Yarrowia lipolytica* є диморфними, тобто можуть існувати у двох різних формах: як типові овальні дріжджові клітини, так і у вигляді ниткоподібних структур, що нагадують грибний міцелій. Клітини *Yarrowia lipolytica* у дріжджовій формі зазвичай мають овальну або еліпсоїдну форму, розмножуються брунькуванням, де на материнській клітині з'являється менша дочірня клітина, яка потім відділяється. Розмір таких клітин коливається від 3 до 5 мікрометрів. Однак, залежно від умов середовища, таких як рівень рН, доступність поживних речовин або насиченість киснем, ці дріжджі можуть трансформуватися. За певних обставин вони подовжуються та утворюють псевдогіфи – подовжені клітини, що залишаються сполученими, формуючи ниткоподібні ланцюжки. У більш виражених випадках *Y. lipolytica* може розвивати справжні гіфи, розділені перегородками, що за своєю структурою нагадують міцелій цвілевих грибів. Ці гіфи також мають діаметр від 3 до 5 мікрометрів, але можуть простягатися на кілька міліметрів. На твердих живильних середовищах *Yarrowia lipolytica* формує колонії, зовнішній вигляд яких теж відображає її морфологічний диморфізм. Колонії мають гладку, блискучу, вологу поверхню та типовий білий або світло-кремовий колір. Іноді, в залежності від штаму та складу середовища, можна спостерігати легкі жовтуваті або рожеві відтінки. Деякі штами *Y. lipolytica* здатні настільки сильно розвивати гіфи, що колонії можуть частково вrostати в живильне середовище, що ускладнює їхнє видалення. Ці дріжджі є облігатними аеробами, тобто для їхнього росту необхідний кисень, і вони швидко ростуть, формуючи видимі колонії вже через 2-5 днів при температурі 25-30°C. На певних поживних середовищах, особливо тих, що містять жири, колонії можуть виділяти характерний дріжджовий або "сирний" запах, що є наслідком їхньої метаболічної активності з розщеплення ліпідів.

Проведення роботи. Краплю культури дріжджів, яку готують попередньо, наносять петлею на предметне скло. Накривають покривним склом і розглядають під імерсійною системою мікроскопа. Клітини дріжджів видно і при меншому збільшенні (x40), але для порівняння з іншими мікроорганізмами препарат краще розглядати під імерсійною системою. У цьому ж препараті слід прослідкувати за змінами положення окремих клітин дріжджів, щоб переконатися у відсутності у них активного руху (переміщення

багатьох клітин з током рідини або незначні коливальні рухи окремих клітин внаслідок броунівського руху не слід сприймати за рух дріжджів). У результатах дослідження записують етапи виготовлення препарату дріжджової культури для мікроскопії та зарисовують клітини, які брунькуються, а у спороутворюючих дріжджів – також клітини зі спорами всередині оболонки клітини. У висновках вказують, де використовуються дріжджі, галузі промисловості, значення їх для сільського господарства.

Результати роботи



Висновки

Контрольні запитання

1. Як називається наука про гриби?
2. Яка будова грибів роду *Mucor* ?
3. Яка будова грибів роду *Penicillium*?
4. Яка будова грибів роду *Aspergillus*?
5. Як готують мікроскопічний препарат плісневих грибів?
6. Назвіть плісені з одноклітинним (несептованим) міцелієм. Яка їх будова?
7. Що представляють собою актиноміцети?
8. Що є спільного у актиноміцетів з грибами?
9. Що є спільного у актиноміцетів з бактеріями?
10. Чому актиноміцети згідно сучасної класифікації відносять до бактерій?

11. Яке значення актиноміцетів у природі, життєдіяльності людини і збереженні продуктів харчування тваринного походження?
12. Чим відрізняється будова конідієносців різних плісень?
13. Які гриби розмножуються оідіями?
14. Які гриби розмножуються ендоспорами?
15. Які гриби розмножуються конідіями?
16. Як готують препарати дріжджів?
17. Які форми і будова дріжджових клітин?
18. Назвіть галузі промисловості, де використовують дріжджі.
19. Як здійснюється статеве розмноження дріжджів?
20. Що являють собою дріжджі верхового і низового бродіння та де їх використовують?

Лабораторне заняття 3

Тема: «Поживні середовища. Умови і техніка культивування мікроорганізмів. Стерилізація»

Робота 1. Виготовлення поживних середовищ для культивування мікроорганізмів

Мета роботи. Ознайомлення студентів із науковими основами виготовлення живильних середовищ та їх класифікацією; засвоєння техніки виготовлення живильних середовищ.

Матеріальне забезпечення. Компоненти для живильних середовищ: м'ясна вода, пептон, харчовий желатин, агар, молоко цільне, знежирене і гідролізоване; сухі середовища в банках: поживний агар, середовище Ендо тощо; прилади й індикатори для встановлення рН живильних середовищ (лакмусові папірці, рН-метр); вата, ватно-марлеві корки для пробірок і колб, обгортковий матеріал; пробірки і колби із живильними середовищами, що підлягають стерилізації; бікси з підготовленими до стерилізації рідкими і щільними живильними середовищами, розлитими у пробірки і колби; автоклав і апарат Коха.

Основні відомості. Живильні середовища використовують для культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах.

Живильні середовища бувають:

за консистенцією – рідкі, щільні, напіврідкі;

за походженням – природні (тваринного, рослинного походження), штучні і синтетичні середовища постійного складу;

за призначенням – а) звичайні, або прості, для вирощування більшості мікроорганізмів; б) спеціальні – для культивування мікробів, які не ростуть або погано ростуть на звичайних поживних середовищах; в) диференційно-діагностичні – використовуються для визначення родових або видових особливостей досліджуваних бактеріальних культур (цукролітичних, протеолітичних, редуційних, гемолітичних та інших властивостей). Різноманітністю спеціальних живильних середовищ є елективні або вибіркові. Склад цих середовищ забезпечує оптимальні умови для розмноження одного або декількох видів мікроорганізмів. При цьому розвиток мікроорганізмів інших видів пригнічується. г) середовища збагачення або накопичувальні – для одержання великої кількості мікроорганізмів.

Виготовлені живильні середовища повинні відповідати таким вимогам:

- містити необхідні поживні речовини (джерела азоту і вуглецю), мінеральні солі, вітаміни групи В (ростові речовини) відповідно до типу живлення мікроорганізмів, достатню кількість води, оскільки живлення мікроорганізмів здійснюється шляхом дифузії і осмосу живильних речовин, розчинених у воді;

- володіти ізотонічним для мікробних клітин осмотичним тиском;

- мати оптимальну для тої чи іншої групи мікробів концентрацію водневих іонів (рН), оскільки мікроорганізми по різному відносяться до активної кислотності середовища: для більшості мікроорганізмів (сапрофітних і патогенних) оптимальним є рН 7,2–7,6, для оцтовокислих – рН 4,0–5,0 і для молочнокислих бактерій – 6,5–6,9;

- бути стерильними;

- бажано, щоб середовище було прозорим, для спостереження за ростом мікроорганізмів (зокрема, ця властивість є необхідною умовою виготовлення рідких середовищ).

Короткий опис деяких компонентів поживних середовищ

А г а р – а г а р (агар малайський –желе) одержують із червоних морських водоростей шляхом екстракції водою при кип'ятінні. Утворювана у воді маса являє собою драглі. За складом агар-агар – складна органічна сполука, у якій переважають вуглеводи. Готовий агар-агар має жовтуватий колір і буває у вигляді шнурів, пластинок або порошку. Плавиться при температурі біля 100⁰ С, застигає при 40⁰ С. При додаванні до середовища надає йому щільності.

П е п т о н - продукт неповного розпаду білків, що проходить під дією ферментів у кислому середовищі. За складом це суміш поліпептидів і деяких амінокислот. Містить речовини необхідні для життєдіяльності більшості мікробів. Одержують пептон з рубців великої і дрібної рогатої худоби. Він легко розчиняється у воді, при нагріванні не згортається і не випадає в осад при додаванні у розчин солей.

Ж е л а т и н а – тваринний клей, який складається з білків. Одержують її шляхом виварювання хрящів, кісток і сухожилків. Зовнішньо нагадує листочки світло-коричневого кольору, без запаху і смаку. Плавиться при температурі 32 – 34 °С, застигає при 16 °С.

Проведення роботи. Для виготовлення найуживаніших живильних середовищ – м'ясо-пептонного бульйону (МПБ), м'ясо-пептонного агару (МПА), м'ясо-пептонного желатину (МПЖ) у мікробіологічній практиці насамперед треба приготувати м'ясну воду, оскільки вона є основою усіх цих середовищ.

М ' я с н а в о д а. Свіжу телятину або нежирну яловичину, звільняють її від сухожилків, фасцій і пропускають через м'ясорубку. До 0,5 кг фаршу додають 1 л води, розмішують і настоюють протягом 2 год. при температурі 37–39 °С. Одержаний настій проціджують через декілька шарів марлі і кип'ятять протягом 20–30 хв до звертання білків. Далі його фільтрують через паперовий фільтр, розливають у колби і стерилізують протягом 30 хв при температурі 120 °С та тиску 0,1 МПа. М'ясна вода і сама може бути добрим живильним середовищем для багатьох мікробів. М'ясна вода служить основою для виготовлення м'ясо-пептонного бульйону (МПБ), м'ясо-пептонного агару (МПА) і м'ясо-пептонного желатину (МПЖ).

М ' я с о – п е п т о н н и й б у л ь й о н. До 1 л м'ясної води додають 5 г NaCl, 10 г пептону і кип'ятять до повного розчинення пептону. У приготоване середовище додають насичений розчин вуглекислого натрію до слабо лужної реакції, яку визначають лакмусовим папірцем, і знову кип'ятять протягом 20–30 хв. Потім доливають воду до початкового об'єму, встановлюють рН – 7,8 і фільтрують (краще через полотняний фільтр), далі розливають у пробірки і колби та стерилізують в автоклаві 20 хв при температурі 120 °С та тиску 0,1 МПа.

М ' я с о – п е п т о н н и й а г а р. До м'ясо-пептонного бульйону додають 2–2,5% подрібненого і промитого агар-агару і, помішуючи, кип'ятять до повного його розчинення. Далі на 1 л агару

додають збитий і розмішаний у подвійній кількості холодної води білок курячого яйця для видалення завислих у рідині речовин. Потім гарячий розчин фільтрують через ватно-марлевий фільтр у спеціальній металевій лійці або гарячому автоклаві. Встановлюють рН 7,2–7,4. Середовище розливають у пробірки по 4–5 мл і стерилізують в автоклаві при тиску 0,1 МПа 15–20 хвилин. Перед використанням МПА його розплавляють у пробірках і скошують.

М'ясо – пептонний желатин. До 1 л м'ясо-пептонного бульйону додають 100 – 150 г желатину і залишають для розбухання, а потім підігрівують до повного розчинення желатину. Встановлюють слабо лужну реакцію і кип'ятять протягом 5 хв. Далі розчин охолоджують до 40–50 °С, додають розмішаний у воді білок курячого яйця і знову підігрівують. При цьому білки випадають в осад, і розчин стає прозорим. Приготоване середовище фільтрують у гарячому стані, розливають по пробірках, флаконах і стерилізують дрібно текучою парою в апараті Коха.

Спеціальні і диференційно–діагностичні середовища виготовляють за спеціальними рецептами.

Виготовлені для використання живильні середовища перевіряють на стерильність. Для цього їх ставлять у термостат при температурі 37 °С. Середовища, простерилізовані в автоклаві, витримують у термостаті 1 добу, простерилізовані текучою парою – 3 доби.

В результатах дослідів запишіть, в чому полягає підготовка живильних середовищ. У висновках вкажіть середовища, які використовуються для вирощування анаеробів, молочнокислих мікроорганізмів, кишкової палички, плісневих грибів і дріжджів.

Результати дослідів _____

Висновки _____

Робота 2. Стерилізація, її методи і засоби

Мета роботи. Ознайомлення студентів із суттю, методами, засобами і правилами стерилізації; освоєння методики стерилізації бактеріологічних петель, інструментів і лабораторного посуду.

Матеріальне забезпечення. Автоклави, апарат Коха, стерилізатор, піч Пастера, фільтри Зейтца, свічки Шамберлана, ручна помпа Комовського, водяна баня, ультрафіолетова лампа.

Основні відомості. Стерилізація (від лат. *sterilis* – неплідний), це повне знищення всяких мікроорганізмів у вегетативній і споровій формі у живильному середовищі, на посуді та інших об'єктах.

В мікробіології використовують такі методи стерилізації:

- *високотемпературна* (термічна), яка у свою чергу буває *сухою* (обпалюванням – фламбуванням; сухим жаром у печі Пастера або сушильній шафі), *вологою* (кип'ятінням; парою під тиском в автоклавах) і *дробною* (текучою парою в апараті Коха ; тиндалізація - при температурі нижче 100 °С у водяній бані);

- *механічна* - за допомогою бактеріальних фільтрів: азбестові фільтри (фільтри Зейтца); мембранні ультрафільтри; бактеріальні свічки (свічки Шамберлана);

- *ультразвукова* - за допомогою ультразвукових установок;

- *стерилізація променевою енергією*: ультрафіолетові промені; іонізуюче випромінювання;

- *хімічна* – за допомогою хімічних речовин (для стерилізації живильних середовищ та лабораторного посуду не придатна. Її частіше використовують для консервування деяких субстратів, оскільки вони у бактерицидних концентраціях паралізують ферментативну здатність бактерій.);

- *біологічна* – за допомогою бактерій-антагоністів або з використанням бактеріофагів) .

Проведення роботи. Вивчити будову автоклавів, апарату Коха, печі Пастера і приладів для фільтрування; ознайомитися з методикою і правилами стерилізації в автоклаві і печі Пастера, монтаж фільтрів Зейтца і свічки Шамберлана. У результатах досліду записують режими, за яких проводиться стерилізація живильних середовищ, лабораторного посуду і обладнання. У висновках вкажіть об'єкти, які стерилізуються тим чи іншим методом, які їхні переваги і недоліки

Результати роботи _____

Висновки

Робота 3. Посів мікроорганізмів на живильні середовища

Мета роботи. Оволодіння студентами технікою посіву мікроорганізмів на різні живильні середовища.

Матеріальне забезпечення. Посівний матеріал і живильні середовища: самоквасне кисле молоко, суспензія сиру, проби м'яса, МПБ, МПА або агар з гідролізованим молоком, пастерівські піпетки, шпателі, термостат.

Основні відомості. Матеріал, який поступає у лабораторію, реєструють у спеціальному журналі. На пробірках (чашках Петрі, колбах) пишуть номер експертизи. Одержання бактеріальних культур з патологічного матеріалу і об'єктів оточуючого середовища, а також сировини тваринного походження проводять шляхом посіву на стерильні живильні середовища обов'язково біля запаленого газового пальника (спиртівки), щоб під час посіву попередити бактеріальне забруднення із довкілля. Посів проводять петлею або пастерівською піпеткою. Техніка посіву відрізняється в залежності від консистенції середовища.

Проведення роботи. При посіві у рідкі середовища (МПБ) у лівій руці тримають пробірку у такому положенні, як при виготовленні препарату – мазка; у правій руці знаходиться петля (або піпетка) з посівним матеріалом і корок пробірки. Біля полум'я пальника петлю з краплею матеріалу (або піпетку) вносять у пробірку з середовищем, злегка занурюючи у нього. Після закривання у полум'ї пальника пробірки корком петлю фламбують, а пастерівську піпетку занурюють у банку з дезрозчином (карболовою кислотою, лізолом, формаліном тощо). Під час роботи слідкують, щоб

середовище не контактувало з корком і не вилилося. Засіяні поживні середовища ставлять у термостат.

При посіві на щільне скошене поживне середовище пробірки з посівною (пересівною) культурою і з стерильним живильним середовищем (МПА) тримають у похилому положенні (скошеною поверхнею до верху) у лівій руці, корками в бік пальника. У відкриті в полум'ї пальника пробірку з культурою (або іншим матеріалом) обережно опускають петлю і беруть невелику кількість матеріалу, який переносять у другу пробірку з стерильним середовищем. Петлю опускають до дна пробірки, злегка занурюють у конденсаційну воду і зигзагоподібними рухами петлею проводять уверх по скошеній поверхні МПА. У полум'ї пальника пробірки закривають, і посіви ставлять у термостат для культивування.

Посів у колуму стовпчик МПА або МПЖ проводять стерильною голкою з набраним на неї посівним матеріалом, якою проколюють стовпчик середовища по його центру. Голку виймають і фламбують, обпалюють кінці пробірок та закривають їх корками. Бактеріологічну голку ставлять у штатив, а пробірку – в інший штатив і поміщають у термостат.

Посів на агар у чашках Петрі проводять за допомогою бактеріологічної петлі і шпателя на застиглий у чашці агар або шляхом виливання розплавленого і охолодженого до 45 °С агару у стерильну чашку, в яку був заздалегідь внесений посівний матеріал піпеткою (техніка посіву викладена у роботі „Методи виділення чистих культур”).

У результатах дослідження записують, як здійснюють посів мікроорганізмів і яких вимог слід дотримуватися при посівах мікробів. У висновках вказують режими культивування посівів мезофілів, термофілів, психрофілів, плісневих грибів і дріжджів.

Результати роботи

Схема посіву

*на рідке
на середовище*

*на скошений
агар*

уколом

*на середовище
в чашці Петрі*

Висновки

Робота 4. Методи культивування анаеробів

Мета роботи. Ознайомлення студентів із умовами вирощування анаеробів; оволодіння технікою створення умов анаеробіозу.

Матеріальне забезпечення. Стерильні чашки Петрі; стерильні пробірки на 20 і 50 мл; стерильні піпетки; водяні бані; середовища: МПА, Кітт-Тароцці, сухий поживний агар; пірогалол; КОН; Na_2CO_3 ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; вазелін; парафін; бактеріологічні петлі.

Основні відомості. Для анаеробів необхідно знизити окисно-відновний потенціал середовища, створити умови анаеробіозу, тобто пониженого вмісту кисню у середовищі і просторі навколо нього. Це досягається використанням фізичних, хімічних і біологічних методів.

Фізичні методи. Базуються на вирощуванні мікроорганізмів у безповітряному просторі середовища, що досягається :

- 1) посівом у середовища, які містять редуційні і легко окислювальні речовини;
- 2) посівом мікроорганізмів у глибину щільних поживних середовищ;
- 3) механічним видаленням повітря з приладів, що використовуються для вирощування анаеробних мікроорганізмів;
- 4) заміна повітря у приладах, що використовуються для вирощування анаеробів, яким-небудь інертним газом.

Із редуційних речовин найчастіше використовують кусочки (приблизно 0,5 г) тваринних або рослинних тканин (печінка, мозок, нирки, селезінка, кров, картопля, вата). Ці тканини зв'язують розчинений у середовищі кисень і адсорбують бактерії. Щоб зменшити вміст кисню у поживному середовищі, його перед посівом кип'ятять 10 – 15 хв, а потім швидко охолоджують і заливають зверху невелику кількість стерильної вазелінової олії. Висота шару олії у пробірці повинна становити біля 1 см. Таким середовищем з редуційними речовинами є живильне середовище Кітт-Тароцці.

З легко окислювальних речовин використовують глюкозу, лактозу і мурашинокислий натрій.

Посів мікроорганізмів у глибину щільних середовищ проводять за методом Віньяль-Вейона, який полягає у механічному захисті посівів анаеробів від кисню повітря. Беруть скляну трубку довжиною 30 см і діаметром 3–6 мм. Один кінець трубки витягують, у капіляр у вигляді пастерівської піпетки, а з другого кінця роблять перетяжку і в широкий кінець трубки вставляють ватний корок. У пробірки з розплавленим і охолодженим до 50 °С живильним агаром засівають досліджуваний матеріал. Потім насмоктують засіяний агар у

стерильні трубки Віньяль–Вейона. Капілярний кінець трубки запаюють у полум'ї пальника і ставлять у термостат. Для виділення окремих колоній анаеробів трубку надрізають напильником або різакон для ампул на рівні колонії, дотримуючись правил асептики ломлять, а колонію захоплюють стерильною петлею і переносять у пробірку з живильним середовищем для наступного вирощування і вивчення у чистому вигляді. Видалення повітря здійснюють шляхом його механічного відкачування вакуумною помпою зі спеціальних приладів – анаеростатів, в які ставлять чашки з посівами анаеробів.

Заміну повітря індиферентним газом (азотом, воднем, аргонем, вуглекислим газом) можна проводити у анаеростатах шляхом витіснення його газом із балона.

Хімічні методи. Базуються на поглинанні кисню повітря у герметично закритому посуді (анаеростаті, ексикаторі) такими речовинами, як пірогалол або натрію гідросульфід ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Біологічні методи. Базуються на одночасному вирощуванні анаеробів з аеробами. Для цього у застиглому агарі по діаметру чашки вирізають стерильним скальпелем смужку агару шириною приблизно 1 см і одержують таким чином дві половинки агарового диску. На один бік агарової пластинки засівають аероб, наприклад, часто використовують *Serratia aureus* або *Serratia marcescens*, а на другу – анаероб. Краї чашки заклеюють пластиліном або заливають розплавленим парафіном і ставлять у термостат. При наявності сприятливих умов у чашці починають рости аероби, які активно поглинають кисень, а потім (через 3–4 доби) – анаероби. З метою зменшення повітряного простору у чашці живильне середовище наливають більш товстим шаром.

Комбіновані методи. Базуються на поєднанні фізичних, хімічних і біологічних методів створення умов анаеробіозу.

Проведення роботи. Посів анаеробів студенти здійснюють так, як і аеробів. Для вирощування анаеробів створюють умови анаеробіозу і посіви ставлять у термостат.

Після термостатування посівів (на наступному занятті) студенти вивчають морфологічні і тинкторіальні властивості мікроорганізмів, що вирости, та відмічають допущені помилки при посіві.

У результатах досліду приводять перелік методів посіву мікроорганізмів із вказанням консистенції середовищ, на які робився посів, а також методів створення умов анаеробіозу. У висновках записують назви анаеробних мікроорганізмів та їх значення.

Результати роботи _____

Висновки _____

Робота 5. Методи виділення чистої культури мікроорганізмів

Мета роботи. Ознайомлення студентів із методами виділення чистої культури мікроорганізмів; набуття навичок щодо виділення чистої культури.

Матеріальне забезпечення. Чашки Петрі, засіяні мікробами від попереднього заняття; стерильні чашки Петрі з МПА; пробірки з скошеним агаром; пробірки з МПБ (8–10 пробірок); скляні стерильні шпателі; пастерівські піпетки; водяна баня; штативи для пробірок; інструменти для зараження лабораторних тварин.

Основні відомості. *Чистою культурою* називають мікроорганізмів одного виду, що вирости на живильному середовищі. Під назвою *штам* слід розуміти культуру одного виду мікробів, виділену з конкретного джерела (з корму, ґрунту, рослин, організму тварин або людини та інших об'єктів). Під назвою *клон* слід розуміти лінію культури мікробів, які походять з однієї клітини.

Для виділення чистої культури мікробів існує декілька методів.

Метод послідовних розведень (за Пастером) полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень у стерильному рідкому середовищі. Із зростанням розведення кількість мікробів зменшується, що дає можливість ізолювати окремі мікробні клітини і виділити у чистому вигляді, шляхом пересіву на щільне живильне середовище, на якому пізніше з кожної живої клітини виростає ізольована колонія. З цих колоній отримують чисту культуру мікроорганізмів.

Метод розливу посівного матеріалу у щільному поживному середовищі (за Кохом), який розробив і ввів у бактеріологічну практику щільне живильне середовище. Метод полягає в тому, що у порожню стерильну чашку Петрі вносять стерильною піпеткою 1 або 0,1 мл досліджуваного матеріалу, після чого в чашку заливають 15–20

мл розплавленого і охолодженого до температури 45–46 °С МПА. Після ретельного перемішування посівного матеріалу з середовищем і застигання агару посіви ставлять у термостат (уверх дном) для культивування.

Мікроби у щільному середовищі розмножуються лише у тому місці, куди вони потрапили на початку. З кожної живої клітини утворюється колонія як на його поверхні середовища, так і всередині.

Метод розсіву (за Дригальським) базується на механічному розділенні мікробних клітин на поверхні ряду щільних поживних середовищ та зменшенні їх кількості шляхом послідовних пересівів, де кожна клітина фіксується на певному місці, розмножується, в результаті чого через 2–3 дні утворюються колонії, які являють собою скупчення мікробів одного виду. З цих колоній отримують чисту культуру мікроорганізмів.

Метод виділення бацил полягає у відділенні спорових форм від неспоривих (вегетативних) мікроорганізмів. Перед посівом досліджуваний матеріал прогрівають на водяній бані при температурі 80–85 °С впродовж 20–30 хв; вегетативні форми мікробів при цьому гинуть, а спори залишаються живими і проростають у наступних посівах на щільному поживному середовищі.

Метод виділення рухливих форм мікроорганізмів (за Шукевичом) полягає у внесенні краплі досліджуваної культури на дно пробірки з скошеним агаром (обов'язково у конденсаційну воду). Якщо у суміші з різними бактеріями знаходяться рухливі види мікроорганізмів (протей, збудник правцю тощо), то через 12–18 год. на поверхні агару буде відмічатися їх ріст. Пересівом із самої верхньої частини агару досягається одержання чистої культури.

Метод збагачення часто використовується для виділення чистих культур мікроорганізмів із матеріалів, що містять велику кількість супутньої мікрофлори. Для збільшення концентрації потрібного мікроба роблять посів досліджуваного матеріалу у живильне середовище, з речовинами, які стимулюють його ріст і пригнічують або затримують розмноження супутньої мікрофлори, так звані елективні середовища (бактоагар Плоскірева для сальмонел)

Метод зараження лабораторних тварин (виділення патогенних мікроорганізмів) полягає у введенні в організм сприятливої тварини досліджуваного матеріалу в результаті чого тварина гине від дії патогенних мікроорганізмів. Проводячи посіви з органів і тканин цієї

тварини отримуємо чисту культуру патогенних мікроорганізмів (сапрофітна мікрофлора гине).

Сутність *бактеріостатичного методу* полягає у вибірковій інгібуючій дії деяких речовин (барвників, кислот, антибіотиків) на ріст і розмноження мікроорганізмів (кислотостійкі мікроорганізми не чутливі до дії низьких концентрацій кислот).

Проведення роботи. Виділяємо чисту культуру мікроорганізмів методом послідовних розведень, фракційного посіву, збагачення на елективному середовищі.

Метод послідовних розведень: роблять ряд послідовних розведень досліджуваного матеріалу у стерильному МПБ: краплю посівного матеріалу вносять у пробірку з стерильним МПБ, звідки краплю суміші переносять у наступну пробірку і так далше (до 8–10 пробірок). З останніх 2-3 розведень проводять посів на щільне живильне середовище залите в чашки Петрі. Посіви термостатують. Утворені колонії мікроскопують і при однорідності культури роблять пересів на скошений агар.

Метод фракційного посіву: посів за цим методом використовується в декількох чашках Петрі (3-4) зі щільним живильним середовищем. У центр МПА першої чашки стерильною піпеткою вносять краплю матеріалу. За допомогою стерильного скляного шпателя досліджувану краплю круговими рухами розтирають по всій поверхні середовища. Під час посіву кришку чашки потрібно тримати злегка привідкритою. Після закінчення посіву з першої чашки виймають шпатель, закривають кришку і, не обпалюючи шпатель, швидко переносять його у другу чашку. В такому ж порядку повторюють операцію й у другій чашці, а потім - у третій і наступних. І лише після цього шпатель обпалюють і опускають у дезінфікуючий розчин. На чашках із посівом роблять восковим олівцем напис і ставлять їх у термостат для вирощування на 24 год. Через добу можна виділяти чисту культуру, пересіваючи ізольовані колонії на скошений агар, вивчати та перевіряти її чистоту.

У результатах дослідження зарисовують схеми виділення чистої культури, записують основні етапи одержання чистої культури. У висновках вказують на які живильні середовища пересівають ізольовані колонії гнилісних бактерій, стафілококів, бактерій групи кишкових паличок (БГКП).

Результати роботи

Робота 6. Культуральні властивості чистої культури мікроорганізмів

Матеріальне забезпечення. Чашки Петрі з чистими культурами мікробів, одержані на попередньому занятті. Таблиці: морфолого-культуральні властивості мікроорганізмів; ріст мікробів на МПЖ.

Основні відомості. *Культуральні властивості* – це характер росту мікроорганізмів на живильних середовищах. Культуральні властивості мікроорганізмів мають диференційно-діагностичне значення оскільки кожному виду властиві свої характерні ознаки росту. Культуральні властивості мікроорганізмів оцінюються в залежності від консистенції живильного середовища.

Ріст мікроорганізмів *на рідких живильних середовищах* описують за такими показниками:

- *характер росту на поверхні*: відсутній; наявність ніжної, слизової, складчастої або гладкої плівки (характер плівки); наявність пристінкового кільця, суцільність росту на поверхні середовища, колір плівки, товщина плівки;
- *колір середовища*: незмінний або пігментований (синій, червоний, жовтий, чорний тощо);
- *помутніння*: відсутнє, слабе, сильне;

- *осад*: зернистий, у вигляді кусочка вати, стан осаду при збовтуванні: в'язкий, крихкий, піднімається у вигляді "косички", "хмаринки", розчиняється.

Ріст мікроорганізмів *на щільних живильних середовищах* характеризується утворенням *колоній* – скопичення мікроорганізмів, що утворилося в результаті розмноження однієї клітини та описується за такими показниками:

- *форма*: кругла, овальна, гілляста, зірчата;
- *величина*: крапкові або росинчаті (діаметр до 1 мм), дрібні (1–2 мм), середні (2 – 4 мм), великі (більше 4 мм);
- *поверхня*: рівна, складчаста, матова, блискуча;
- *краї*: рівні, локоноподібні, посічені, зазублені, хвилясті;
- *прозорість*: прозорі, непрозорі;
- *блиск*: блискучі, матові;
- *консистенція*: м'яка, тверда, слизиста;
- *структура*: гомогенна, неоднорідна;
- *пігмент*: червоний, жовтий, синій, чорний тощо.

Ріст мікроорганізмів *на напівщільному живильному середовищі* (МПЖ) описують за такими ознаками:

- *швидкість розрідження*: швидке, повільне;
- *ріст мікробів по уколу*: у верхній частині ростуть аероби, у нижній – анаероби;
- *лінія уколу*: суцільна, у вигляді ланцюжка, пунктирна, ялинкою тощо;
- *розрідження*: суцільне, пошарове, лійкою, кратером, панчохою;
- *газоутворення*: наявність або відсутність бульбашок газу.

Проведення роботи. Наявні культури мікроорганізмів проглядаємо макроскопічно та мікроскопічно.

При макроскопічних дослідженнях (візуальних), отримані на живильних середовищах в чашках Петрі, колонії розглядають спочатку зі сторони дна чашки в проходячому світлі, далі – зі сторони кришки у відбитому світлі.

Мікроскопічне дослідження проводять з допомогою лупи або мікроскопа, використовуючи мале збільшення, в ледь затемненому полі зору.

Для дослідження відбирають ізольовані колонії. При утворенні декількох видів колоній їх обводять восковим олівцем, нумерують і вивчають кожну колонію окремо, описуючи за вказаною вище схемою.

Характер росту на рідких та напіврідких середовищах оцінюють візуально.

У результатах досліду описують культуральні властивості мікроорганізмів, заносючи їх у таблицю, яку далі використовують для визначення виду мікроорганізмів. Вказуємо основні характеристики S- , R- форм та перехідних форм мікроорганізмів. Замальовуємо типи розрідження МПЖ.

У висновках записують, до яких форм мікроорганізмів відносяться досліджувані (S-форми, R-форми, перехідні форми).

Результати роботи

Висновки

Робота 7. Біохімічні властивості мікроорганізмів

Мета роботи. Освоєння студентами методик вивчення ферментативних властивостей мікробів.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури мікроорганізмів на щільних середовищах; пробірки з середовищами Гісса - „кольоровим рядом”, МПБ, МПЖ; лакмусові папірці; фільтрувальні папірці оброблені оцтовокислим свинцем і насиченим водним розчином щавелевої кислоти; 1% розчин перекису водню; поживні середовища, що містять 5% дефібринованої крові, таблиці: біохімічні властивості мікробів.

Основні відомості. Серед біохімічних властивостей культури особливо важливе значення має визначення її ферментативних властивостей.

Цукролітичні властивості бактерій – це здатність мікроорганізмів розщеплювати з допомогою ферментів вуглеводи. Її виявляють при посіві їх на диференційно–діагностичні середовища Гісса з різними вуглеводами й індикатором. Такі середовища виготовляють шляхом додавання до пептонної води певного цукру і найчастіше індикатора Андреде, але можна використовувати бромтимолблау, лакмус тощо. Набір середовищ із

різними вуглеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, маніт, сахароза, дульцит, арабіноза, сорбіт тощо), стерильним знежиреним молоком, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синькою називають „кольоровим рядом”.

Посіви культур здійснюють за загальноприйнятою методикою бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Після інкубації у термостаті враховують результат ферментації вуглеводів: зміна кольору поживного середовища (при індикаторі Андреде – червоний колір) означає розщеплення цукру і утворення у середовищі кислих продуктів розпаду. Якщо при розщепленні даного вуглеводу, поряд із кислотою, утворюється газ, то він вловлюється маленькими пробірками, які називають „поплавками” або „газівками” (їх вносять у пробірки одночасно з живильним середовищем). Для визначення цукролітичних властивостей часто використовують напіврізкі середовища, що містять вуглеводи та індикатор ВР (суміш водного голубого з розоловою кислотою), а також щільні середовища з вуглеводами й індикатором (наприклад, агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева).

Протеолітичні властивості бактерій - це здатність мікроорганізмів розщеплювати з допомогою ферментів білки, з утворенням продуктів проміжного розпаду – поліпептидів, амінокислот. Їх виявляють посівом чистої культури мікробів у МПЖ (уколом), згорнуту сироватку крові або мозкове середовище. Пробірки з МПЖ інкубують при 18–20 °С, сироватку і мозкове середовище при 37 °С 24–48 год. Результати оцінюють за розрідженням желатини і характером росту по уколу; при посіві на згорнуту сироватку крові – за її розрідженням і утворенням навколо колонії заглиблення; при посіві на мозкове середовище – за здатністю анаеробів викликати його почорніння.

Протеоліз казеїну визначають на молочному агарі Ейкмана (до 10 мл стерильного МПА, розплавленого на водяній бані, додають 3 мл знежиреного стерильного молока, змішують і розливають у чашки Петрі). Протеоліз проявляється пептонізацією казеїну: навколо колоній утворюється чітка прозора зона, просвітлення молочного агару. При посіві у рідке молоко протеоліз також виражається просвітленням стовпчика молока, водянистим вмістом і слизистим осадом.

Ступінь протеолізу і глибину розщеплення білка у різних видів бактерій визначають за утворенням ними кінцевих продуктів розпаду

(індолу, сірководню, аміаку), які виявляють за допомогою індикаторних папірців, а саме:

- *Індол* визначають шляхом внесення під корок пробірки із засіяними на МПБ або бульйон Хотінгера бактеріями фільтрувального висушеного папірця, обробленого гарячим насиченим розчином щавлевої кислоти. При наявності індолоутворення нижня частина індикаторного папірця зафарбується у рожевий колір .

- *Сірководень* визначають шляхом внесення індикаторного папірця, обробленого 10 % розчином оцтовокислого свинцю, який при позитивній реакції чорніє.

- *Аміак* визначають шляхом внесення під корок пробірки з посівами лакмусового папірця, який при наявності аміакоутворення синіє.

Р е д у к у ю ч і в л а с т и в о с т і визначають на основі змін кольору органічної фарби (метиленава синька, малахітовий зелений, нейтральрот тощо), внесеної у живильне середовище (найчастіше у молоко). Під дією мікробних ферментів барвник відновлюється – знебарвлюється або змінює свій попередній колір. При значному доступі кисню фарба може знову окислюватися і набувати попереднього кольору.

В и з н а ч е н н я к а т а л а з и. Деякі види мікроорганізмів у процесі дихання утворюють перекис водню, який при участі ферменту каталази розпадається на воду і молекулярний кисень, тому кількість її у культурі не досягає високих концентрацій. Для визначення каталази на поверхню однодобової агарової культури наносять 1 мл 1% розчину перекису водню так, щоб поверхня культури була повністю накрита тонким шаром. При наявності каталази спостерігається виділення бульбашок кисню.

Л і п о л і т и ч н і в л а с т и в о с т і (розкладання жиру) визначають посівом на середовища з вазеліновим маслом.

В и з н а ч е н н я г е м о л і т и ч н и х в л а с т и в о с т е й. Окремі види бактерій у процесі своєї життєдіяльності продукують особливі речовини білкової природи – гемотоксини, які мають лізуючу дію на еритроцити. Для визначення гемолітичної здатності проводять посіви на поживні середовища, що містять 5% дефібринованої крові. Найчастіше використовують кров'яний МПА. При рості на кров'яному середовищі мікроорганізмів із гемолітичними властивостями, навколо колонії утворюється прозора

зона гемолізу (безколірна або зафарбована) внаслідок лізису еритроцитів. У рідких поживних середовищах при гемолізі середовище стає прозорим (червона лакова кров).

Проведення роботи. Провіряємо чистоту виділених культур мікроорганізмів (одержаних на попередньому занятті) шляхом виготовлення бакпрепаратів та фарбування їх за методом Грама. При встановленні чистоти мікробної культури їх використовують для проведення посівів на поживні середовища для вивчення ферментативних властивостей мікробів, а саме: на середовища Гіса; на МПЖ; на агар Ейкмана; на МПБ з індикаторними папірцями; на молоко з метиленовою синькою; кров'яний агар.

Колонії чистих культур мікроорганізмів досліджують на здатність утворювати каталазу.

В результатах досліду після термостатування посівів записують вивчені біохімічні властивості мікроорганізмів, зарисовують можливі види розрідження МПЖ. За результатами досліду роблять висновки.

Результати роботи _____

Висновки _____

Робота 8. Техніка відбирання проб ґрунту, води і повітря для мікробіологічного дослідження

Теоретичне обґрунтування теми. Відбирання проб ґрунту. Перед взяттям зразків слід зробити опис місцевості, в якому вказуються характер рельєфу, рослинність, клімат, наявність каналізації, відомості про вживану агротехніку і т.д. При дослідженні території площею 100 м² виділяють дві ділянки по 25 м²: одну – поблизу джерела забруднення і другу (контрольну) – далеко від можливого джерела забруднення. Зразки ґрунту відбираються в 5 місцях – з а типом конверта: 4 – по кутах ділянки і 1 – в центрі. Відібрані проби масою 200-300 г перемішують в стерильному посуді і потім беруть середній зразок, який поміщають в стерильну колбу з

ватно-марлевым корком (або пергаментний пакет). Така маса ґрунту необхідна для підтримки певної вологості в зразку при його транспортуванні і зберіганні до початку дослідження.

При відборі проб з поверхневих шарів землі спочатку знімають лопатою цільний пласт ґрунту, потім з бічної, прямовисної поверхні профламованим ножем зрізають землю завтовшки 1-1,5 см, ніж знову пропалюють і з глибини ділянки, яку зрізали набирають зразок ґрунту. Зразки з орних ґрунтів беруть на всю глибину орного шару. З глибоких шарів проби ґрунту забирають буром Некрасова, що складається з штанги з рукояткою, яка служить для обертання бура. В нижній робочій частині бура є коробка для забору ґрунту. Під час буріння порожнина коробки закрита, досягнувши наміченої відстані бур повертається у зворотний бік, порожнина відкривається і заповнюється ґрунтом. За допомогою бура можна брати проби з глибини до 3 м. Узяті проби ґрунту поміщають в стерильний посуд, підписують і забезпечують супровідним документом, в якому вказують номер зразка, місце і глибину відбору, дату відбору проби.

Обробку проби бажано проводити в день дослідження, зберігання допускається при температурі 4-5°C протягом 24 год.

Відбір, зберігання, транспортування проб води. Для відбору проб використовуються склянки і колби місткістю 0,5 л. Посуд повинен бути закритий ватно-марлевими тампонами, забезпечений паперовими ковпачками, які обв'язують ниткою або тонким шпагатом, і простерилізований в сушильній шафі при температурі 160 °C 1 год.

Для визначення якості води будь-якої ділянки водопроводу, що обслуговує окремий об'єкт водорозбірний кран заздалегідь обпалюють полум'ям тампона змоченого в спирті, кран відкривають і протягом 2 хв. спускають воду в каналізацію. Відбір проб хлорованої води проводять в банки, в які перед стерилізацією вносять 10 мг дехлоратора - сірчистокислого натрію. Паперовий, пакет або ковпачок знімають разом з корком безпосередньо перед відбором проби. Колби наповнюють з таким розрахунком, щоб при транспортуванні корок не замочувався.

Проби води із водоймищ беруть по 2-3 л кожна за допомогою батометра. Із поверхневих (на глибині 10-15 см від дзеркала води) і глибинних шарів (не менше 30-50 см від дна) воду відбирають не допускаючи її замулювання ґрунтом, так щоб проба відповідала всій масі досліджуваної води.

З ополонки проби беруть на глибині 10-15 см від нижньої поверхні льоду. Не можна проводити відбір проб з берега, а тільки на віддалі 3-4 м від берега.

Артезіанську і колодязну воду відбирають на глибині 10-15 см від поверхні води.

Джерельну воду беруть безпосередньо з струмка або з середини джерела, яке витікає.

Лід, який використовують на переробних і харчових підприємствах, відбирають одним куском вагою не менше 2 кг. У лабораторії лід обмивають стерильною водою і стерильними інструментами з глибини вирубують декілька кусочків так, щоб загальна маса була приблизно 500 г. Лід вносять у стерильний посуд і залишають при кімнатній температурі до розтавання, після чого досліджують, як воду.

Проби стічних вод також забирають в стерильні банки. Проте об'єм кожної проби може коливатися від 500 до 10 мл залежно від місця взяття (при перевірці окремих етапів очищення, після обробки, перед скиданням у водоймище) і від задач аналізу.

Транспортувати воду слід в сумках-холодильниках або в ящиках з термоізоляційною прокладкою (температура в яких повинна бути не більше 1-2°C), оберігати від різких поштовхів (щоб не замочити пробки), замерзання, дії сонячного проміння.

Дослідження води повинно бути проведене не пізніше 2 години з моменту відбору проби, лише як виняток допускається зберігання проби до 6 год. у холодильнику при температурі 4-5°C. При більш тривалому і неправильному зберіганні може відбуватися розмноження або загибель водної мікрофлори.

Відбирання, зберігання, транспортування проб повітря. Для визначення обсіювання повітря мікроорганізмами найчастіше використовують седиментаційний і аспіраційний методи.

Метод седиментації (за Кохом) – осідання мікробів на поверхню твердого живильного середовища під дією сили тяжіння. Для дослідження повітря приміщень чашки Петрі з середовищем відкривають на 5-10 хв. (для визначення загального обсіювання повітря) і на 40 хв. (для обліку кокової флори). Мікроби, що осіли з повітря, підрощують в термостаті (24 год. при температурі 37 °C) і потім при кімнатній температурі (24 год.). Про ступінь забруднення повітря судять за кількістю колоній, що вирости на живильному середовищі, потім визначають кількість мікробів в 1 м³ повітря з

розрахунку, що на площу 100 см^2 протягом 5 хв. осідають мікроби, що містяться в 10 л повітря.

Аспіраційний метод (за допомогою апарата Кротова) точніший порівняно з попереднім і використовується для дослідження як повітря приміщень, так і атмосферного повітря.

Робота 9. Визначення загального мікробного числа повітря

Обладнання, реактиви та унаочнення. Дві чашки Петрі з м'ясопептонним агаром, дві чашки Петрі з 3-5% кров'яним агаром, дві чашки Петрі з молочно-жовтково-сольовим середовищем, стерильна чашка Петрі, середовище Вільсона-Блера, апарат Кротова, термостат.

Проведення роботи. Для визначення загального бактерійного обсіювання повітря закритих приміщень використовують дві чашки Петрі з м'ясопептонним агаром і пропускають через апарат по 100 л повітря. Після підрощування посівів протягом 48 год. при температурі 37°C підраховують кількість колоній, що вирости, на обох чашках, обчислюють середнє арифметичне і роблять перерахунок на кількість мікробів в 1 м^3 повітря.

При визначенні санітарно-показових бактерій використовують дві чашки Петрі з 3-5% кров'яним агаром (визначення α - і β -гемолітичних стрептококів), а також дві чашки Петрі з молочно-жовтково-сольовим середовищем (виявлення золотистих стафілококів). При цьому через апарат пропускають по 250 л повітря. Через добу підрощування в термостаті і ще одну добу витримування при кімнатній температурі проводять макро- і мікроскопічне дослідження колоній, визначають патогенність бактерій за загальноприйнятими тестами.

Для визначення кількості плісневих грибів і дріжджів у повітрі використовують середовище Сабуро, яке витримують після посіву 3 доби при температурі $25\text{--}30^\circ\text{C}$ або 5 діб при температурі $18\text{--}20^\circ\text{C}$.

Склад мікрофлори повітря оцінюють з врахуванням анаеробів, які утворюють спори. З цією метою посів повітря в об'ємі 200-300 л проводять на чашку із залізо-сульфітним середовищем (середовище Вільсона-Блера) і заливають її 15 мл розплавленого і охолодженого до 45°C МПА для створення анаеробних умов. Після доби підрощування в термостаті підраховують кількість чорних колоній і роблять перерахунок на 1 м^3 досліджуваного повітря.

У результатах роботи підрахуйте кількість виростилих колоній. Якщо їх менш 250, повітря вважається чистим, при кількості колоній

від 250 до 500 – помірно забрудненим, і при кількості колоній більше 500 – забрудненим.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 10. Визначення загального мікробного числа ґрунту і води

Обладнання, реактиви та унаочнення. Досліджувані проби води, 8 пробірок із стерильною водою (по 9 мл), стерильні чашки Петрі і піпетки на 1 мл, розплавлений і охолоджений до 45°C МПА, термостат. Схема дослідження води.

Проведення роботи. Наважку ґрунту висипають в стерильну колбу і заливають стерильною водопровідною водою у співвідношенні 1:10. Одержану ґрунтову суспензію піддають попередній обробці, тобто струшуванню руками або на механічній мішалці протягом 10-15 хв. і подальшому відстоюванню протягом 2-3 хв. За допомогою такої обробки вдається виділити мікроорганізми з грудочок землі і з поверхні ґрунтових частинок. З першого розведення (1:10) ґрунтової суспензії готують ряд подальших 10-кратних розведень: від 1:10 до 1:1000 при дослідженні чистих ґрунтів і до 1:1000000 і більше - при дослідженні сильно забруднених ґрунтів.

Пробу води ретельно перемішують, після чого виготовляють її десятикратні розведення. В пробірку з 9 мл стерильної води вносять 1 мл досліджуваної води, що відповідає розведенню 1:10, далі беруть 1 мл з цієї пробірки в наступну з 9 мл стерильної води, одержуючи розведення 1:100 і т.д. Для приготування кожного розведення беруть окремі стерильні піпетки, вміст виливають, не торкаючись піпеткою стерильної води в пробірці.

Для кожної проби води повинен бути зроблений посів не менше ніж з двох різних розведень залежно від ступеня передбачуваного забруднення. Чисту воду централізованого водопостачання рекомендується висівати по 1 мл у дві чашки; воду

децентралізованого водопостачання /колодязі, джерела і т.д./ по 1 і 0,1 мл, воду відкритих водоймищ по 1, 0,1 і 0,01 мл.

Посів 1 мл розведення 1:10 відповідає посіву 0,1 мл досліджуваної води... і т.д.

При висіві з флаконів з пробами води знімають паперові ковпачки, виймають корки, шийки фламбують, після чого воду ретельно перемішують обережним продуванням повітря через стерильну піпетку. У засіяні чашки вливають 8-12 мл розплавленого і охолодженого до 45 °С МПА, швидко перемішують його з водою легкими похитуваннями чашки, уникаючи утворення пухирців повітря і попадання середовища на стінки чашки. Чашки ставлять на горизонтальну поверхню до повного застигання агару, потім поміщають їх в термостат дном вверху та інкубують при температурі 37 °С протягом 24 годин.

При дослідженні води відкритих водойм проби витримують у термостаті 72 години при температурі 20 °С.

Підрахунок колоній проводять за загальноприйнятим способом. Враховують тільки ті розведення, при посіві яких на чашці виросло від 30 до 300 колоній. При посіві 1 мл нерозведеної води враховують всі колонії, але їх кількість не повинна перевищувати 300. Якщо на чашці з найвищим розведенням виросло більше 300 колоній і аналіз не можна повторити, то допускається проводити підрахунок колоній за допомогою пластинки з сіткою і лупи при сильному боковому освітленні. Підраховують не менше 20 квадратів площею 1 см² кожний в різних місцях чашки, потім виводять середнє арифметичне число колоній на 1 см², величину якого множать на площу чашки.

Результат підрахунку колоній в кожній чашці виражається кількістю бактерій в 1 мл аналізованої води з врахуванням посіяного об'єму. За мікробне число приймають середнє арифметичне результатів підрахунку на двох чашках або двох різних розведень.

Загальна кількість бактерій в 1 мл води не повинна бути більшою 100.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 11. Визначення колі-титру і колі-індексу

Обладнання, реактиви та унаочнення. Приготовані розведення ґрунтової суспензії, стерильні чашки Петрі, розплавлений і охолоджений МПА, середовище Ендо, 50 мл в флаконі і по 9 мл у 4 пробірках середовища Кеслер, термостат, мембранні фільтри № 3, центрифуга.

Проведення роботи. З приготованих розведень ґрунтової суспензії роблять посіви у флакони і пробірки з рідким живильним середовищем Кеслер: 10 мл (з розведення 1:10) - в 50 мл середовища, по 1 мл з подальших розведень - в 9 мл середовища. Посіви інкубують протягом 48 год. при температурі 37°C.

Якщо в засіяних пробірках виявляється ріст у вигляді помутніння середовища або помутніння і газоутворення, слід зробити висів в чашки Петрі з середовищем Ендо або в пробірки з розоловим агаром, інкубувати 24 год. при температурі 37°C. Подальшій ідентифікації піддаються типові для ешерихій червоні або рожеві з металевим блиском колонії на середовищі Ендо, а також жовті або оранжеві колонії на розоловому середовищі. Результат досліджень виражається колі-індексом або колі-титром, тобто кількості бактерій групи кишкової палички, виявлених в 1 г ґрунту. Колі-індексом називають число кишкових паличок визначених в одиниці об'єму (маси) матеріалу, що досліджується. Колі-титром називається найменша кількість (об'єм, вага) продукту, в якому виявляється хоча б одна кишкова паличка.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Контрольні запитання

1. Назвіть сутність стерилізації і з якою метою вона використовується?
2. Назвіть методи стерилізації.
3. Що являє собою повна і неповна стерилізації і коли їх використовують?
4. Назвіть фізичні методи стерилізації.
5. Назвіть хімічні методи стерилізації.
6. Назвіть біологічні методи стерилізації.
7. Що представляє собою дезінфекція і коли її використовують?
8. У чому полягає стерилізація парою під тиском і які її переваги над іншими методами? Що таке дробна стерилізація і для чого її використовують?
9. Як здійснюється стерилізація текучою парою і коли її використовують?
10. У чому сутність тиндалізації і коли вона використовується?
11. У чому сутність стерилізації фільтруванням і для чого вона використовується?
12. Як перевіряють правильність роботи автоклаву?
13. Які вимоги ставляться до поживних середовищ?
14. Як поділяються живильні середовища за походженням? Наведіть приклади.
15. Як поділяються живильні середовища за складом? Наведіть приклади.
16. Як поділяються живильні середовища за консистенцією? Наведіть приклади.
17. Як поділяються живильні середовища за призначенням? Наведіть приклади.
18. Що таке чиста культура мікроорганізмів, штам, клон?
19. З якою метою проводять виділення чистої культури мікроорганізмів?
20. Назвіть методи виділення чистих культур мікроорганізмів.
21. З якою метою використовують метод збагачення?
22. Яка послідовність виділення чистих культур різних видів молочнокислих бактерій?
23. З якою метою вивчають властивості виділеної чистої культури?
24. Як і які морфологічні властивості мікроорганізмів вивчають і описують?
25. Назвіть етапи виділення чистої культури молочнокислих мікроорганізмів із молочних продуктів.
26. Назвіть етапи виділення чистої культури молочнокислих мікроорганізмів із поверхні рослин.
27. Як визначають цукролітичні властивості мікробів?
28. Що являє собою кольоровий ряд і з якою метою його використовують?
29. Як виявляють здатність мікроорганізмів виробляти газ?
30. Які індикатори використовують для визначення цукролітичних властивостей?
31. Як виявляють протеолітичні властивості бактерій?
32. Як визначають глибину протеолізу?
33. Як виявляють здатність мікробів утворювати індол?
34. Як виявляють здатність мікробів утворювати сірководень?
35. Як виявляють здатність мікробів утворювати аміак?
36. Як визначають редукційні властивості мікробів?
37. Як виявляють здатність бактерій утворювати каталазу?
38. Що являють собою гемотоксини? Як їх виявляють?
39. В чому проявляються культуральні властивості мікроба?
40. Як описують культуральні властивості мікробів, що вирости на МПА?
41. Як описують культуральні властивості мікробів, що вирости при посіві на рідкі поживні середовища?
42. Як описують культуральні властивості мікробів, що вирости на МПЖ при посіві уколом?

43. Для чого проводять мікробіологічне дослідження об'єктів довкілля?
44. Які санітарно-показові мікроорганізми води, повітря, ґрунту ви знаєте?
45. Для чого проводять мікробіологічне дослідження води?
46. Як здійснюють відбір проб води і за допомогою яких приладів?
47. Як визначають загальну кількість бактерій у воді?
48. На що вказує наявність кишкової палички у воді?
49. Що таке колі-титр і колі-індекс?
50. Якими методами користуються для визначення колі-титру води?
51. У чому суть методу мембранних фільтрів?
52. З яких об'єктів попадають мікроорганізми у повітря?
53. В чому сутність седиментаційний метод Коха?
54. В чому сутність фільтраційний метод дослідження повітря?
55. В чому сутність мембранний метод дослідження повітря?
56. В чому сутність аспіраційний метод дослідження повітря?
57. Як проводять відбір проб ґрунту?
58. Як проводять підготовку проб ґрунту для мікробіологічних досліджень?
59. Як визначають загальне мікробне число ґрунту?

Розділ 2. Перетворення мікроорганізмами сполук вуглецю, азоту та інших елементів

Лабораторне заняття 4

Тема: «Мікроорганізми – продуценти біоетанолу»

Робота 1. Характеристика дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Мета роботи. Ознайомити студентів з основними принципами та практичними навичками вирощування і культивування дріжджів, що використовуються у процесах ферментації.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські або пивні дріжджі) або інші штами, придатні для ферментації. Сусло-агар (тверде): Для вирощування та підтримки чистих культур, візуального спостереження за морфологією колоній. Сусло (рідке): Для вирощування дріжджів у більших обсягах та проведення ферментації. Лабораторний посуд: Чашки Петрі, пробірки, колби Ерленмейера, мірні циліндри, бактеріологічні петлі (або скляні палички), піпетки, предметні та накривні скельця. Обладнання: Автоклав (або скороварка) для стерилізації, термостат (або інкубатор) для підтримання оптимальної температури, спиртівка або газовий пальник, мікроскоп. Допоміжні матеріали: Спирт для дезінфекції, ватні тампони, плівки для герметизації.

Основні відомості. *S. cerevisiae* це найвідоміший і найширше вивчений вид дріжджів, який відіграє ключову роль у численних

біотехнологічних процесах, а також є важливим модельним організмом у біологічних дослідженнях. Клітини *S. cerevisiae* зазвичай мають овальну або еліпсоподібну форму, розміром 5-10 мікрометрів (мкм) у діаметрі. Основним способом безстатевого розмноження *S. cerevisiae* є брунькування. На відміну від багатьох інших дріжджів (наприклад, *Yarrowia lipolytica* або *Candida albicans*), *S. cerevisiae* зазвичай не утворює справжніх гіф чи виражених псевдогіф, хоча в деяких стресових умовах або у певних штамів може спостерігатися формування подовжених клітин, що нагадують псевдогіфи. На твердих живильних середовищах *S. cerevisiae* утворює білі або кремові, круглі, гладкі, блискучі, злегка випуклі, з рівними краями колонії. *S. cerevisiae* має складний життєвий цикл, що чергується між гаплоїдною (одинарний набір хромосом) та диплоїдною (подвійний набір хромосом) фазами. Гаплоїдні клітини можуть розмножуватися брунькуванням або зливатися одна з одною, утворюючи диплоїдні клітини. Диплоїдні клітини також можуть розмножуватися брунькуванням. За певних умов (наприклад, голодування за азотом), диплоїдні клітини можуть піддаватися мейозу та утворювати аскоспори (зазвичай 4 спори в аску), які є гаплоїдними. Аскоспори потім проростають у нові гаплоїдні клітини, замикаючи цикл.

S. cerevisiae є факультативними анаеробами. За наявності достатньої кількості цукру, навіть за присутності кисню переважно метаболізує глюкозу шляхом спиртового бродіння, виробляючи етанол та вуглекислий газ, а не дихання. *S. cerevisiae* ферментує різні цукри, включаючи глюкозу, фруктозу, сахарозу та мальтозу. Оптимальна температура для росту *S. cerevisiae* становить 25-30 °C. Дріжджі добре ростуть у слабокислих середовищах (оптимум рН 4,5-6,0). Потребують джерел вуглецю (цукри), азоту (амінокислоти, аміак), фосфору, сірки, а також ряду мікроелементів та вітамінів.

Проведення роботи. Для посіву на тверде середовище (сусло-агар) бактеріологічну петлю стерилізують у полум'ї пальника до розжарювання, потім охолоджують в повітрі або в стерильному середовищі. Обережно відбирають невелику кількість дріжджової маси з чистої культури. Сіють дріжджі на поверхню застиглому агару в чашці Петрі або на скошений агар у пробірці, розподіляючи їх зигзагоподібними рухами для отримання ізольованих колоній. Краї чашки Петрі герметизують (наприклад, парафіном), щоб уникнути висихання та контамінації.

Посів у рідке середовище (сусло) проводять стерильною піпеткою або охолодженою бактеріологічною петлею, якою вносять невелику кількість дріжджів у колбу з рідким суслом. Колбу маркують і закривають стерильною ватно-марлевою пробкою, що забезпечує газообмін, але запобігає забрудненню.

Усі посіви (чашки Петрі та колби з рідким середовищем) поміщають у термостат при оптимальній температурі для росту дріжджів (*S. cerevisiae* – зазвичай 25-30 °C). Колби з рідким середовищем можна періодично струшувати або використовувати шейкер для забезпечення аерації, що прискорює ріст біомаси дріжджів на початкових етапах.

Через 24-48 годин після інкубації студенти оцінюють ріст дріжджів: на твердому середовищі: розмір, форма, колір, консистенція ізолюваних колоній. Колонії *S. cerevisiae* зазвичай білі або кремові, круглі, гладкі, злегка випуклі.

У рідкому середовищі: поява помутніння, осад на дні колби, утворення піни на поверхні (ознака ферментації).

Для мікроскопії готують мазок з колонії на твердому середовищі або з осаду в рідкому середовищі. Проводять мікроскопію за допомогою світлового мікроскопа (збільшення 400х та 1000х з імерсійним маслом). Спостерігають за формою дріжджових клітин (овальні, округлі), наявністю брунькування, розміром клітин, відсутністю сторонніх мікроорганізмів (бактерій, цвілевих грибів). Оцінка ферментації (при використанні відповідних умов): у колбах з рідким суслом, якщо є гідрозатвор, можна спостерігати виділення вуглекислого газу. Через кілька днів можна оцінити зниження вмісту цукрів у середовищі та утворення етанолу (наприклад, за запахом).

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 2. Мікробіологічний контроль вирощування *Saccharomyces cerevisiae*

Мета роботи. Ознайомити студентів із створенням оптимальних умов для росту та функціонування чистої культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, а також у запобіганні забруднень сторонніми мікроорганізмами, що може негативно вплинути на кінцевий продукт ферментації.

Матеріальне забезпечення. Культури дріжджів, поживне середовище (сусло-агар, рідке сусло), стерильний лабораторний посуд (чашки Петрі, колби, пробірки), бактеріологічні петлі, піпетки, а також обладнання для стерилізації (автоклав), інкубації (термостат) та мікроскопії.

Основні відомості. Культивування дріжджів *S. cerevisiae* вимагає суворого дотримання принципів мікробіологічного контролю. Він охоплює контроль умов для росту та метаболічної активності цільової культури дріжджів, а також направлений на мінімізацію ризиків контамінації та виявлення небажаних мікроорганізмів.

У промислових масштабах проникнення сторонніх мікроорганізмів у чисту культуру *S. cerevisiae* призводить до небажаної конкуренції за поживні субстрати, що знижує продуктивність бажаної культури та ефективність ферментації. Вони можуть продукувати сполуки, які негативно впливають як на органолептичні властивості кінцевого продукту, викликати його псування і навіть утворення токсинів.

Ефективний мікробіологічний контроль базується на тотальній стерилізації всіх компонентів, що контактують з культурою, регулярному моніторингу контамінації і контролю параметрів культивування:

Проведення роботи. Через 24-72 години інкубації *S. cerevisiae* проведіть контроль росту та чистоти шляхом візуального огляду колоній у чашках Петрі і рідкої культури в колбі, а також мікроскопії мазків. При візуальному огляді росту на щільному середовищі слід звернути увагу на зовнішній вигляд колоній. Типові колонії *S. cerevisiae* мають бути білими або кремовими, круглими, гладкими, блискучими та з рівними краями. Будь-які відхилення у кольорі, формі чи текстурі (наприклад, пухнастість, нерівності, наявність чорних чи яскраво забарвлених колоній) можуть свідчити про наявність контамінації.

При візуальному огляді рідкої культури в колбі оцінюється ступінь помутніння середовища, що є ознакою росту дріжджів. Також відзначається наявність осаду на дні колби та, за умови використання гідрозатвору, інтенсивність виділення бульбашок вуглекислого газу,

що вказує на активність бродіння. Може з'явитися характерний спиртовий запах.

Для мікроскопічного контролю на чистому предметному склі готується мазок з типової колонії на агарі або з рідкої культури. Мазок розтирається у краплі води, накривається покривним склом і досліджується під мікроскопом з різними збільшеннями (x100, x400, x1000 з імерсійною олією). Виявлення типової овальної або еліпсоподібної форми клітин *S. cerevisiae*, брунькування та інших сторонніх мікроорганізмів свідчить про чистоту культури.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 3. Ідентифікація мікробіологічних забруднень під час вирощування *S. cerevisiae*

Мета роботи. Ознайомити студентів із створенням оптимальних умов для росту та функціонування чистої культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, а також у запобіганні забруднень сторонніми мікроорганізмами, що може негативно вплинути на кінцевий продукт ферментації.

Матеріальне забезпечення. Культури дріжджів, поживне середовище (сусло-агар, рідке сусло), стерильний лабораторний посуд (чашки Петрі, колби, пробірки), бактеріологічні петлі, піпетки, а також обладнання для стерилізації (автоклав), інкубації (термостат) та мікроскопії.

Основні відомості. Ефективна ідентифікація мікробіологічних забруднень під час вирощування *S. cerevisiae* дозволяє своєчасно виявити проблеми, запобігти їх поширенню та зберегти якість продукту. Найбільш поширеними забруднювачами є бактерії, дикі дріжджі і плісняві гриби.

Бактерії можуть бути грампозитивними (наприклад, молочнокислі бактерії роду *Lactobacillus*, *Pediococcus*) або

грамнегативними (наприклад, *Acetobacter*, *Enterobacteriaceae*). Вони значно менші за дріжджі (0.5-5 мкм), мають різноманітні форми (коки, палички, спірили) і можуть утворювати колонії, що відрізняються за розміром, кольором, формою та консистенцією від дріжджових. Їхній метаболізм може призводити до утворення небажаних кислот (молочна, оцтова), діоксиду сірки, або змінювати рН середовища.

Дикі дріжджі наприклад, *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* відрізняються від культурних дріжджів за морфологією клітин (наприклад, *Brettanomyces* часто утворює псевдогіфи або має "лимонну" форму), розміром, швидкістю росту, стійкістю до умов середовища (наприклад, *Zygosaccharomyces* стійкі до високих концентрацій цукру та спирту) та метаболічними продуктами, які можуть псувати смак та аромат кінцевого продукту.

Плісняві гриби утворюють міцелій. Їхні колонії на твердих середовищах мають характерний пухнастий, бархатистий або зморшкуватий вигляд, різноманітне забарвлення (зелений, чорний, білий) та часто врастають в агар. Під мікроскопом видно гіфи та спорангії.

Проведення роботи. Золотим стандартом для швидкого виявлення забруднень є мікроскопічний аналіз. Бактерії легко відрізняються від дріжджів за значно меншими розмірами та різноманітністю форм (коки, палички, спірили). Плісняві гриби виявляються за наявністю розгалужених гіф. Дикі дріжджі можуть мати іншу форму клітин (наприклад, лимоноподібні *Brettanomyces*) або утворювати псевдогіфи, що не характерно для *S. cerevisiae*. Фарбування за Грамом дозволяє диференціювати бактерії на грампозитивні та грамнегативні. Деякі бактерії можуть бути рухливими (мати джгутики).

Культуральні методи (посів на диференціальні та селективні середовища) дозволяють виділити, очистити та ідентифікувати забруднювачі. Диференціальні середовища містять індикатори або специфічні субстрати дозволяють візуально розрізняти різні види мікроорганізмів за їхнім метаболізмом (наприклад, середовища, що дозволяють розрізняти молочнокислі та оцтовокислі бактерії). Селективні середовища містять речовини, що пригнічують ріст *S. cerevisiae*, але дозволяють рости контамінантам (наприклад, середовища з антибіотиками для виявлення бактерій, або середовища з підвищеним рН, де *S. cerevisiae* росте повільніше).

Після ізоляції забруднювача, для його точної ідентифікації можуть використовуватися біохімічні тести, що визначають ферментативну активність, здатність засвоювати різні цукри, утворення специфічних метаболітів тощо.

Сучасні методи, такі як ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) або секвенування ділянок ДНК (наприклад, 16S рРНК для бактерій, ITS регіон для грибів), дозволяють швидко та високоточно ідентифікувати мікроорганізми за їхнім генетичним матеріалом, навіть за низької кількості клітин.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Контрольні запитання

1. До якого царства та відділу належать дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*?
2. Опишіть типову морфологію клітин *S. cerevisiae*, вкажіть їхній середній розмір.
3. Який основний спосіб безстатевого розмноження характерний для *S. cerevisiae*?
4. Чим відрізняється морфологія *S. cerevisiae* від *Yarrowia lipolytica* чи *Candida albicans* за умовами утворення гіф?
5. Опишіть типовий вигляд колоній *S. cerevisiae* на твердих поживних середовищах.
6. Які дві основні фази чергуються в життєвому циклі *S. cerevisiae*?
7. За яких умов диплоїдні клітини *S. cerevisiae* можуть утворювати аскоспори?
8. Як називаються дріжджі, які можуть жити та розмножуватися як за наявності, так і за відсутності кисню? До якої групи належить *S. Cerevisiae*?
9. Які основні продукти метаболізму *S. cerevisiae* за умов спиртового бродіння?
10. Назвіть щонайменше три види цукрів, які *S. cerevisiae* здатні ферментувати.
11. Вкажіть оптимальний температурний діапазон для росту *S. cerevisiae*. Який оптимальний діапазон рН для росту *S. Cerevisiae*?
12. Перерахуйте основні групи поживних речовин, необхідних для росту *S. cerevisiae*.
13. Поясніть, чому чашки Петрі після посіву перевертають догори дном під час інкубації.
14. Які негативні наслідки для продуктивності та якості кінцевого продукту може мати проникнення сторонніх мікроорганізмів у чисту культуру *S. cerevisiae*?
15. Назвіть три основні принципи, на яких базується ефективний мікробіологічний контроль культивування *S. cerevisiae*.
16. Опишіть, як візуально оцінюється чистота культури *S. cerevisiae* на щільному поживному середовищі.
17. Які візуальні ознаки росту та ферментації дріжджів можна спостерігати у рідкій культурі?

Лабораторне заняття 5

Тема: «Мікроорганізми – продуценти біогазу»

Робота 1. Культивування анаеробних мікроорганізмів – продуцентів біогазу

Мета роботи. Навчити студентів основних принципів та набутти практичних навичок з вирощування анаеробних мікроорганізмів, які відповідають за утворення біогазу, а також оптимізації умов для їхньої метаболічної активності з метою ефективного продукування метану та вуглекислого газу з органічних субстратів.

Матеріальне забезпечення. Анаеробні мікроорганізми (анаеробний мул), органічний субстрат (курячий послід, гній, рослинні рештки), анаеробні колби або біореактори (ферментери), газометр або інше обладнання для збору та вимірювання об'єму біогазу, датчики для контролю температури та pH, pH-метри, термостати, стерильні піпетки, пробірки, а також обладнання для стерилізації (автоклав).

Основні відомості. Виробництво біогазу є ключовим напрямком сучасної біоенергетики, що дозволяє отримувати відновлювану енергію з органічних відходів. Цей процес ґрунтується на анаеробному бродінні (анаеробній дигестії) – багатостадійному мікробіологічному процесі, який відбувається без доступу кисню і залучає комплексну сукупність різноманітних анаеробних мікроорганізмів. Результатом цього процесу є утворення біогазу, основні компоненти якого – метан (CH_4 , 50-75%) та вуглекислий газ (CO_2 , 25-50%), а також незначні домішки інших газів.

В анаеробному дигесторі функціонує складна мікробна спільнота, що включає різні групи мікроорганізмів. Серед гідролітичних бактерій можна виділити *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*. До ацидогенних бактерій належить широке коло факультативних та облигатних анаеробів, таких як *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*. Ацетогенні бактерії представлені *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*. А серед метаногенних архей основними є *Methanosaeta* (або *Methanosarcina* - ацетотрофи) та *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* (гідрогенотрофи).

Для успішного культивування анаеробних мікроорганізмів та оптимізації виробництва біогазу необхідно контролювати низку факторів. Температура суттєво впливає на швидкість метаболічних процесів. Розрізняють мезофільний режим (20-40°C, оптимально 35-

37°C), який є найпоширенішим, та термофільний режим (50-60°C, оптимально 55°C), що забезпечує швидший процес, але вимагає більших енерговитрат і є більш чутливим до змін.

Мікробіологічний контроль у біогазових установках включає регулярний моніторинг складу мікробної спільноти, аналіз параметрів бродіння (рН, температура, вихід газу, склад газу), а також аналіз хімічного складу субстрату та дигестату. Це дозволяє забезпечити стабільність процесу, максимізувати вихід біогазу та ефективно утилізувати органічні відходи.

Проведення роботи. Підготуйте органічний субстрат, забезпечте його вологість та, за необхідності, подрібніть для кращого доступу мікроорганізмів. Використовуючи стерильний мірний циліндр, відміряйте потрібний об'єм підготовленого субстрату та акуратно перенесіть його в анаеробну колбу. Далі додайте анаеробний інокулят який становить 10-30% від об'єму субстрату, але може бути скоригований залежно від активності самого інокуляту. Після внесення субстрату та інокуляту, обережно перемішайте вміст колби, щоб досягти гомогенності суміші і герметично закрийте анаеробну колбу за допомогою гумової пробки, яка повинна мати відвідну трубку приєднану до газометра або великого шприца для збору та подальшого вимірювання об'єму утвореного газу. Після герметизації колбу поміщають у термостат, де встановлюється та підтримується оптимальна температура для анаеробного бродіння.

Після завершення процесу бродіння або досягнення плато у виділенні газу зафіксуйте загальний об'єм отриманого біогазу. Якщо лабораторія оснащена відповідним обладнанням (наприклад, газовим хроматографом), за можливості проведіть аналіз складу біогазу, щоб визначити відсотковий вміст метану та вуглекислого газу, що дозволить оцінити якість продукowanego газу.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 2. Гідролітичні мікроорганізми – продуценти біогазу

Мета роботи: вивчити роль гідролітичних мікроорганізмів як першого етапу в процесі анаеробної дигестії (виробництва біогазу).

1. Навчити студентів методам виділення та культивування гідролітичних бактерій з біогазових субстратів.
2. Дослідити гідролітичну активність виділених культур щодо полімерних субстратів (крохмалю, целюлози, білків).
3. Оцінити важливість гідролітичних процесів для ефективності біогазового виробництва.

Матеріальне забезпечення. Анаеробний мул або дигестат; зразки органічних субстратів (гній, курячий послід, подрібнені рослинні рештки, харчові відходи). М'ясо-пептонний агар (МПА) або ТТХ-агар (триптон-соєвий агар) для аеробних/факультативних анаеробів; анаеробні середовища з додаванням цистеїну або відновників для облигатних анаеробів; МПА з 1% розчинного крохмалю для виявлення гідролітичної активності, агаризоване середовище з целюлозою (мінеральне середовище з 0,5-1% мікрокристалічної целюлози або фільтрувального паперу як єдиного джерела вуглецю); МПА з 1% желатину або 0.5% казеїну. Стерильні чашки Петрі, пробірки, колби Ерленмейера, мірні циліндри, бактеріологічні петлі, піпетки, предметні та накривні скельця. спиртівка/газовий пальник, мікроскоп. Спирт 70% для дезінфекції, ватні тампони, парафіл, реактиви для виявлення гідролізу (розчин Люголя для крохмалю; розчин трихлороцтової кислоти (ТХК) або реактив Фоліна-Чокальтеу для білків; для целюлози - візуальна оцінка просвітління або забарвлення Конго червоним, якщо целюлоза в агарі). Для анаеробних умов: Анаеробні банки з газогенераторами (газпаки), або анаеробні бокси.

Основні відомості. Процес виробництва біогазу – це багатостадійний анаеробний процес, у якому гідролітичні мікроорганізми відіграють першу та лімітуючу роль. Вони відповідають за розщеплення складних високомолекулярних органічних речовин (полімерів), що містяться в субстраті, на простіші розчинні мономери. Це важливо, оскільки тільки ці прості сполуки можуть бути надалі використані ацидогенними та метаногенними мікроорганізмами для утворення біогазу.

Основні групи гідролітичних мікроорганізмів, які зустрічаються в анаеробних дигесторах, включають: Бактерії, що розкладають вуглеводи (включаючи целюлозу та крохмаль): До них належать різні види родів *Clostridium* (облигатні анаероби, часто спороутворюючі), *Bacteroides* (облигатні анаероби), *Bacillus* (факультативні анаероби, спороутворюючі, деякі целюлозолітичні), *Cellulomonas* (аероби, специфічні целюлозолітики, але можуть бути присутні в аеробних

фазах або на поверхні субстрату), а також *Ruminococcus* та *Fibrobacter* (анаероби, спеціалізовані на целюлозі). Бактерії, що розкладають білки (протеолітичні): Багато видів *Clostridium*, *Bacillus*, а також представники *Proteus*, *Pseudomonas* (останні – переважно аероби, але їхні ферменти можуть діяти в певних зонах або на початкових стадіях). Бактерії, що розкладають ліпіди: Зазвичай це ліполітичні бактерії, що виробляють ліпази.

Ефективність гідролізу безпосередньо впливає на загальну швидкість та вихід біогазу. Недостатня гідролітична активність може призвести до "закисання" реактора через накопичення складних нерозкладених полімерів, що є ознакою порушення балансу процесу.

Проведення роботи. Візьміть 1 г (або 1 мл) анаеробного мулу/дигестату/органічного субстрату та внесіть його в 9 мл стерильного фізіологічного розчину в пробірці (розведення 10^{-1}). З цього розведення приготуйте серію подальших десятикратних розведень до 10^{-5} або 10^{-6} . Кожне розведення ретельно перемішуйте. З розведень 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (або інших, залежно від очікуваної концентрації) відберіть по 0.1 мл (стерильною піпеткою) і рівномірно розподіліть по поверхні чашок Петрі з трьома різними агаризованими середовищами: середовище з крохмалем (для виявлення амілолітиків), середовище з целюлозою (для виявлення целюлозолітиків) і середовище з білком (желатином/казеїном, для виявлення протеолітиків).

Для виділення анаеробів (*Clostridium*, *Bacteroides*) чашки Петрі з посівами помістіть в анаеробну банку з газогенератором (газпаком) або в анаеробний бокс. Для виділення аеробів/факультативних анаеробів (*Bacillus*, *Cellulomonas*) чашки Петрі інкубуйте в звичайних аеробних умовах.

Усі посіви інкубуйте в термостаті при оптимальній температурі (наприклад, 37°C для мезофілів) протягом 24-72 годин або довше, залежно від швидкості росту мікроорганізмів. Целюлозолітичні бактерії ростуть повільніше.

Для виявлення амілолітичної активності на чашки з крохмальним агаром нанесіть кілька крапель розчину Люголя (або йодного розчину). Йод забарвлює крохмаль у синьо-фіолетовий колір. Колонії, що продукують амілази, будуть оточені прозорою зоною (зоною просвітлення), де крохмаль розщепився і не забарвлюється йодом.

Для виявлення целюлозолітичної активності на чашках з целюлозним агаром шукайте колонії, оточені прозорими зонами просвітлення або розм'якшення агару. При використанні агару з Конго червоним, зони гідролізу будуть мати жовтий колір або незабарвлені.

Для виявлення протеолітичної активності на чашки з желатиновим або казеїновим агаром додати розчин ТХК, яка осаджує нерозщеплені білки, роблячи агар мутним. Зони гідролізу білка будуть виглядати як прозорі ділянки навколо колоній.

За допомогою стерильної бактеріологічної петлі з кожної чашки Петрі, де виявлено зони гідролізу, візьміть колонії з характерною активністю і зробіть їх пересів на нові чашки Петрі зі свіжим відповідним агаризованим середовищем (для отримання чистої культури). Посіви виконати методом штриха для ізольованих колоній. Інкубуйте їх в аналогічних умовах.

З ізольованих колоній чистих культур приготуйте мікроскопічні мазки. Проведіть фарбування за Грамом. Дослідіть мазки під мікроскопом (збільшення x400, x1000 з імерсійною олією): Визначте форму та розмір клітин (палички, коки). Визначте тип фарбування за Грамом (грампозитивні/грамнегативні). Шукайте наявність спор (характерно для *Clostridium*, *Bacillus*). Зверніть увагу на рухливість (якщо можливо). Спробуйте порівняти морфологію з типовими представниками *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Cellulomonas*.

У результатах дослідження зафіксуйте всі спостереження: джерело зразка (анаеробний мул, гній тощо), використані розведення та середовища для посіву, характеристики колоній на різних середовищах (розмір, форма, колір), наявність та розмір зон гідролізу (в мм), результати мікроскопії, умови інкубації.

У висновках охарактеризуйте виділені гідролітичні мікроорганізми, поясніть значення для процесу виробництва біогазу .

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Контрольні питання

1. Яке основне значення мають мікроорганізми-продуценти біогазу для сучасної біоенергетики?
2. Назвіть чотири основні стадії анаеробної дигестії (біогазового бродіння).
3. Охарактеризуйте ключову роль гідролітичних мікроорганізмів у процесі біогазового виробництва.
4. Які типи органічних полімерів розщеплюють гідролітичні бактерії? Наведіть приклади.
5. Назвіть два-три роди гідролітичних бактерій, що згадуються у темі, та вкажіть, чи є вони аеробами, факультативними чи облігатними анаеробами.
6. Які продукти утворюються на стадії гідролізу?
7. Опишіть роль ацидогенних (кислотогенних) бактерій у біогазовому процесі та які основні продукти їхньої життєдіяльності.
8. Назвіть три роди ацидогенних бактерій, які згадуються у темі.
9. Чому контроль рН є критично важливим на стадії ацидогенезу?
10. Яку функцію виконують ацетогенні бактерії в анаеробному дигесторі? Назвіть їхні основні продукти.
11. Наведіть приклади двох родів ацетогенних бактерій.
12. Поясніть концепцію синтрофії та її значення для ацетогенезу та метаногенезу.
13. Які два види синтрофних бактерій згадуються у темі, і яку роль вони відіграють?
14. Як температура впливає на культивування анаеробних мікроорганізмів-продуцентів біогазу? Назвіть два температурні режими.
15. Чому доступ кисню є абсолютно неприпустимим при культивуванні облігатних анаеробів у біогазовому реакторі?
16. Назвіть два основні компоненти біогазу та їх приблизне процентне співвідношення.
17. Яке значення має якісний інокулят для запуску та стабільної роботи біогазової установки?
18. Як співвідношення C/N (вуглець/азот) у субстраті впливає на ефективність біогазового виробництва?
19. Перерахуйте дві-три групи мікроорганізмів, які є метаногенами (навіть якщо вони не були детально розглянуті, студенти мали б знати їх роль як кінцевих продуцентів метану).
20. Наведіть три основні фактори, які можуть інгібувати активність мікроорганізмів у біогазовому реакторі.
21. До якої групи мікроорганізмів (гідролітичних, ацидогенних, ацетогенних) можна віднести представників роду *Clostridium*? Відповідь обґрунтуйте.
22. Чому бактерії роду *Bacteroides* можуть бути знайдені як на стадії гідролізу, так і на стадії ацидогенезу?
23. Опишіть повний шлях перетворення целюлози на метан, вказавши, які групи мікроорганізмів (з наведених у темі) беруть участь на кожному з етапів.

Лабораторне заняття 6

Тема: «Мікроорганізми – продуценти біодизелю»

Робота 1. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості мікроводоростей - продуцентів ліпідів

Мета роботи. Мета роботи полягає у вивченні та характеризації штамів мікроводоростей з метою ідентифікації та оптимізації умов культивування тих, що мають високу здатність до накопичення ліпідів для біотехнологічних потреб.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури, стерильний лабораторний посуд та фотобіореактори для культивування, живильні середовища, мікроскопи та фарби для вивчення морфології, а також центрифуги, спектрофотометри, хроматографи та хімічні розчинники для біохімічного аналізу ліпідів.

Основні відомості. Для культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella salina*, *Botryococcus braunii* готують поживні середовища, які включають зважування всіх компонентів згідно з обраною рецептурою середовища (BG-11, F/2). Їх готують на дистильованій або деіонізованій воді, доводяться до потрібного рН, а потім стерилізуються в автоклаві. Всі колби, пробірки та інший посуд, що контактуватиме з культурою стерилізуються автоклавуванням або в сухожаровій шафі. Інокуляцію (засів) культур проводять у стерильних умовах (в ламінарному боксі) і чистий штам мікроводоростей вноситься в підготовлене поживне середовище. Колби з культурами розміщуються у фотобіореакторах або інкубаторах зі спеціальними умовами: для освітлення необхідна інтенсивність світла 2000-5000 люкс і фотоперіод 12/12 годин світло/темрява; температура культивування 20-28°C; аерація/CO₂ - може подаватися повітря або збагачена CO₂ суміш для забезпечення вуглецю та перемішування. Регулярно вимірюється оптична густина культури за допомогою спектрофотометра на довжині хвилі 680 нм та/або проводиться підрахунок клітин у камері Горяєва. Це дозволяє побудувати криву росту.

Проведення роботи. Для проведення морфологічних досліджень готують мікроскопічні препарати. Зразки культури мікроводоростей наносять на предметне скло. За потреби додається

крапля води або гліцерину, накривається покривним склом. Препарати досліджують під світловим мікроскопом із збільшеннями 40х, 100х. Оцінюються форма та розмір клітин, наявність колоній чи поодиноких клітин, особливості хлоропластів, наявність ліпідних крапель. Для кращої візуалізації ліпідів використовують фарбування флуоресцентним барвником Nile Red або Суданом. Після фарбування досліджують під флуоресцентним мікроскопом.

Для біохімічних досліджень (аналіз ліпідів) культура мікроводоростей центрифугується для відділення клітин від культуральної рідини. Осад (біомаса) збирається і визначається суха біомаса. Для цього частина зібраної біомаси промивається дистильованою водою, переноситься у попередньо зважену пробірку або чашку, висушується в сушильній шафі до постійної ваги (при 60-80°C) і зважується. Це необхідно для розрахунку виходу ліпідів на одиницю сухої ваги.

Зібрана біомаса піддається екстрагуванню ліпідів за допомогою суміші органічних розчинників (за методом Фолча з використанням хлороформу та метанолу). Цей процес дозволяє вилучити ліпіди з клітин. Отриманий ліпідний екстракт концентрується на роторному випарнику або звичайним випаровуванням. Кількісне визначення загальних ліпідів проводять спектрофотометричним методом (наприклад, сульфофосфованілін-реакція), що дозволяє визначити загальну кількість ліпідів у зразку.

Якісний аналіз жирнокислотного складу проводять за бажанням. Для більш детального аналізу ліпідний екстракт піддається реакції трансметилування для отримання метилових ефірів жирних кислот (FAMES). Потім аналізуються за допомогою газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором (ГХ-МС) для ідентифікації та кількісного визначення окремих жирних кислот.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 2. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості ліпідопродукуючих дріжджів

Мета роботи. Мета роботи полягає у вивченні штамів дріжджів з метою ідентифікації та оптимізації умов культивування тих, що мають високу здатність до накопичення ліпідів для біотехнологічних потреб.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури, стерильний лабораторний посуд, термостати для культивування, живильні середовища, мікроскопи та фарби для вивчення морфології, центрифуги, спектрофотометри, хроматографи та хімічні реагенти для біохімічного аналізу ліпідів.

Основні відомості. Ліпідопродукуючі дріжджі, або як їх ще називають олеагінозні дріжджі є групою одноклітинних грибів, які здатні накопичувати значні кількості ліпідів у своїх клітинах, часто понад 20-25 % від своєї сухої біомаси, а деякі штами можуть досягати до 70-80 %. У зв'язку зі зростаючим попитом на ліпіди для виробництва біопалива (біодизелю), харчових добавок (Омега-3 жирних кислот) та фармацевтичних препаратів, ліпідопродукуючі дріжджі розглядаються як стійка та відновлювана альтернатива традиційним джерелам (рослинні олії, тваринні жири).

Процес накопичення ліпідів, або ліпідогенез, у дріжджів відбувається зазвичай, коли вони перебувають у стані метаболічного стресу. Найчастіше це викликано обмеженням одного з поживних елементів, таких як азот, фосфор або сірка, при одночасному надлишку джерела вуглецю, наприклад, цукру чи гліцерину. У таких умовах метаболізм дріжджів переключається з активного росту та поділу клітин на інтенсивний синтез та накопичення ліпідів, переважно у формі триацилгліцеролів (ТАГ). Ці ТАГ зберігаються у спеціалізованих ліпідних краплях всередині клітини. Важливою перевагою є те, що багато ліпідопродукуючих дріжджів здатні утилізувати різноманітні, часто дешеві та доступні субстрати, включаючи відходи сільського господарства, промисловості, а також гліцерин, який є побічним продуктом виробництва біодизелю. Це значно підвищує економічну ефективність їх культивування.

Серед найбільш вивчених та перспективних ліпідопродукуючих дріжджів виділяють такі види: *Yarrowia lipolytica*, що є одним з найуніверсальніших і найширше досліджуваних видів, здатним рости на гідрофобних субстратах (олії, жири) та накопичувати високі кількості ліпідів; *Rhodotorula toruloides*, відомий своєю здатністю до синтезу як каротиноїдів (пігментів), так і ліпідів, а також

використанням широкого спектра вуглецевих джерел; та *Lipomyces starkeyi*, який визнаний одним з найпотужніших ліпідопродуцентів, що може накопичувати ліпіди до 70-80 % сухої маси. Переваги використання ліпідопродукуючих дріжджів очевидні. Вони демонструють швидкий ріст, що дозволяє отримувати ліпіди за коротші виробничі цикли, ніж традиційні олійні культури. Їхнє культивування відбувається у контрольованих умовах ферментерів, що забезпечує незалежність від кліматичних умов та сезонності. Крім того, виробництво ліпідів дріжджами вимагає менше землі та води порівняно з рослинництвом. Дріжджі також добре піддаються генетичній модифікації для оптимізації продукції ліпідів або зміни їхнього жирнокислотного складу, а також дозволяють отримувати ліпіди високої чистоти.

Проведення роботи. Для культивування дріжджів готуються та стерилізуються різні поживні середовища, включно з базовими для активного росту дріжджів (наприклад, YPD) і спеціальними середовищами, які стимулюють накопичення ліпідів (наприклад, з високим співвідношенням вуглецю до азоту). Чисті культури ліпідопродукуючих дріжджів (отримані з колекцій або виділені) інокуються у підготовлені стерильні середовища і вирощуються в шейкер-інкубаторах або ферментерах за контрольованих умов (температура, аерація, рН, інтенсивність перемішування), що сприяють їхньому росту та, згодом, ліпідогенезу. Регулярно, протягом усього періоду культивування, відстежується ріст дріжджів.

Для морфологічних досліджень зразки дріжджової культури відбираються на різних стадіях росту та готуються для мікроскопії. За потреби можуть використовуватися фарбники. Під мікроскопом оцінюються форма та розмір клітин, наявність псевдогіфів, брунькування, а також особливості розташування клітин. Кількісне визначення загальних ліпідів проводять як у попередній роботі.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 3. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості бактерій - продуцентів ліпідів

Мета роботи. Мета роботи полягає у вивченні штамів бактерій з метою ідентифікації та оптимізації умов культивування тих, що мають високу здатність до накопичення ліпідів для біотехнологічних потреб.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури, стерильний лабораторний посуд, термостати для культивування, живильні середовища, мікроскопи та фарби для вивчення морфології, центрифуги, хроматографи та хімічні реагенти для біохімічного аналізу ліпідів.

Основні відомості. Ліпідопродукуючі дріжджі або олеагінозні дріжджі є одноклітинними грибами, які здатні накопичувати значні кількості ліпідів у своїх клітинах, часто понад 20-25 % від своєї сухої біомаси, а деякі штами можуть досягати до 70-80 %. У зв'язку зі зростаючим попитом на ліпіди для виробництва біопалива (біодизелю), харчових добавок (Омега-3 жирних кислот) та фармацевтичних препаратів, ліпідопродукуючі дріжджі розглядаються як стійка та відновлювана альтернатива традиційним джерелам (рослинні олії, тваринні жири).

Процес накопичення ліпідів, або ліпідогенез, у дріжджів відбувається коли вони перебувають у стані метаболічного стресу внаслідок обмеження одного з таких поживних елементів як азот, фосфор або сірка, при одночасному надлишку джерела вуглецю, наприклад, цукру чи гліцерину. У таких умовах метаболізм дріжджів переключається з активного росту та поділу клітин на інтенсивний синтез і накопичення ліпідів, переважно у формі триацилгліцеролів (ТАГ), які зберігаються у спеціалізованих ліпідних краплях всередині клітини. Ліпідопродукуючі дріжджі здатні утилізувати різноманітні субстрати, включаючи відходи сільського господарства, промисловості, а також гліцерин, який є побічним продуктом виробництва біодизелю.

Найбільш вивченими ліпідопродукуючими дріжджіями є *Yarrowia lipolytica*, що здатний рости на гідрофобних субстратах (олії, жири) та накопичувати високі кількості ліпідів, *Rhodotorula toruloides*, відомий своєю здатністю до синтезу як каротиноїдів (пігментів), так і ліпідів, а також використанням широкого спектра вуглецевих джерел і *Lipomyces starkeyi*, який визнаний одним з найпотужніших ліпідопродуцентів, що може накопичувати ліпіди до 70-80 % сухої маси.

Проведення роботи. Для морфологічних досліджень дріжджів відберіть зразки з ростового середовища YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) і оптимізованого середовища для ліпідогенезу. Виготовте мазки і за потреби можна використати фарбники. Під мікроскопом оцінюються форма та розмір клітин, наявність псевдогіфів, брунькування, а також особливості розташування клітин. Кількісне визначення загальних ліпідів проводять як у попередній роботі.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Контрольні питання

1. Яке основне значення мають мікроорганізми-продуценти ліпідів для виробництва біодизелю?
2. Назвіть щонайменше три групи мікроорганізмів, здатних до накопичення ліпідів.
3. Чому мікроводорості вважаються перспективним джерелом ліпідів для біодизелю? Назвіть дві їхні ключові переваги.
4. Наведіть три приклади видів мікроводоростей (з тих, що вказані в темі), які є активними продуцентами ліпідів.
5. Який основний тип ліпідів накопичують мікроорганізми, і в якій формі вони зберігаються в клітині?
6. Поясніть, що таке олеагінозні дріжджі. Назвіть два види таких дріжджів, згаданих у темі.
7. Які умови культивування (відносно джерела вуглецю та азоту) зазвичай індукують максимальне накопичення ліпідів у дріжджів?
8. Опишіть роль олійних грибів у виробництві ліпідів. Наведіть один приклад роду олійного гриба.
9. Назвіть два види бактерій-продуцентів ліпідів та вкажіть, чим вони відрізняються від дріжджів за типом клітини.
10. Які морфологічні властивості мікроорганізмів-продуцентів ліпідів є важливими для вивчення? Назвіть щонайменше дві.
11. Які параметри вивчаються при дослідженні культуральних властивостей ліпідопродукуючих мікроорганізмів?
12. Яким чином спектрофотометрично можна оцінити ріст культури мікроводоростей або дріжджів?

13. Опишіть основні етапи біохімічного аналізу ліпідів після завершення культивування.
14. Назвіть щонайменше один метод екстракції ліпідів з мікробної біомаси.
15. Яким методом аналізу можна визначити жирнокислотний склад накопичених ліпідів?
16. Чому співвідношення вуглецю до азоту (C/N) у живильному середовищі є критично важливим для ліпідогенезу?
17. Які методи індикації та ідентифікації використовуються для підтвердження чистоти культури та визначення видової приналежності ліпідопродукуючого мікроорганізму?
18. Як можна візуалізувати ліпідні включення всередині клітин мікроорганізмів під мікроскопом? Назвіть барвник.
19. Поясніть, чому суха маса біомаси є важливим показником при вивченні ліпідопродукуючих мікроорганізмів.
20. Які потенційні недоліки використання мікроорганізмів для виробництва біодизелю порівняно з традиційними олійними культурами?

Лабораторне заняття 7

Тема: «Мікробіологічний контроль виробництв біопалива»

Робота 1. Мікробіологічний аналіз чистоти середовища та обладнання

Мета роботи. Метою роботи є визначення наявності та кількості небажаних мікроорганізмів у поживних середовищах та на поверхнях обладнання, що використовується в мікробіологічних або біотехнологічних процесах, з метою запобігання контамінації та забезпечення стерильності/чистоти виробництва.

Матеріальне забезпечення. Стерильні поживні середовища для культивування мікроорганізмів, стерильний лабораторний посуд (чашки Петрі, пробірки, піпетки), обладнання для стерилізації (автоклав, сухожарова шафа), інкубатор, мікроскоп, а також засоби для відбору проб (стерильні тампони, змиви) та антисептики.

Основні відомості. Мікробіологічний аналіз чистоти середовища та обладнання є важливою частиною санітарно-гігієнічного контролю на підприємствах, де існує ризик мікробного забруднення. Його метою є виявлення наявності та кількості мікроорганізмів, які можуть потрапити в продукт чи стати джерелом інфекції. Аналіз починається з визначення точок, найбільш ймовірно схильних до мікробного забруднення. До них відносять поверхні

обладнання, робочі столи, дверні ручки, інструменти, а також повітря у приміщенні та руки персоналу. У цих місцях проводиться відбір проб різними методами. Найчастіше використовують метод змивів — стерильний тампон, змочений у фізіологічному розчині, проводять по контрольованій ділянці поверхні, після чого його переносять у поживне середовище. Для рівних поверхонь також застосовується метод відбитків - чашку Петрі з твердим поживним середовищем притискають до досліджуваної поверхні на кілька секунд.

Контроль повітря здійснюється або пасивно, коли відкриті чашки з поживним середовищем залишають у приміщенні на певний час, або активно - за допомогою спеціального обладнання, що втягує повітря, осаджує мікроорганізми на поживне середовище.

Після відбору проб їх інкубують у термостаті при відповідній температурі протягом 1–5 діб, залежно від типу мікроорганізмів. Після інкубації проводиться підрахунок колоній мікроорганізмів, які виросли, і їхня ідентифікація. Оцінюється загальна кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на одиницю площі або об'єму повітря.

Отримані результати порівнюють з установленими нормами. Якщо рівень забруднення перевищує допустимі межі, це може свідчити про порушення санітарного режиму, недостатню ефективність прибирання або погані умови зберігання. У таких випадках вживаються коригувальні заходи - повторна дезінфекція, додаткове навчання персоналу, перегляд санітарних інструкцій.

Усі результати аналізу документуються у спеціальному журналі або протоколі з зазначенням місць відбору проб, дати, методів дослідження, виявлених мікроорганізмів та подальших дій. Такий підхід дозволяє системно контролювати мікробіологічну чистоту та знижує ризик забруднення продукції або інфекційного ураження персоналу.

Проведення роботи. Проведіть дослідження змивів з поверхонь обладнання, робочих столів, дверних ручок, інструментів, а також повітря у приміщенні та руки персоналу. Отримані результати порівняйте з установленими нормами.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 2. Моніторинг життєздатності та активності мікроорганізмів-продуцентів

Мета роботи. Моніторинг життєздатності та активності мікроорганізмів-продуцентів здійснюється з метою забезпечення стабільної продуктивності, контролю якості та запобігання втратам біологічної активності в процесі біотехнологічного виробництва.

Матеріальне забезпечення. Поживні середовища, спектрофотометр (для вимірювання OD_{600}), мікроскоп, барвники, тест-набори або реактиви для виявлення метаболітів, інкубатори.

Основні відомості. Мікроорганізми-продуценти - це штами мікроорганізмів (бактерії, гриби, актиноміцети, дріжджі), які використовуються в біотехнології для промислового виробництва: біогазу, етанолу, антибіотиків (*Penicillium*, *Streptomyces*), ферментів (*Bacillus*, *Aspergillus*), амінокислот, органічних кислот (наприклад, лимонна кислота від *Aspergillus niger*), вітамінів та ін.

Життєздатністю мікроорганізмів є їх здатністю до збереження метаболічної активності, розмноження (утворення колоній), синтезу продуктів.

Основними методами оцінки життєздатності є: підрахунок колонієутворюючих одиниць (КУО) на живильному середовищі, мікроскопія (живі/мертві клітини – наприклад, забарвлення трипановим синім), оптична густина (OD_{600}) – непрямий метод оцінки росту біомаси в культуральній рідині і метаболічні тести – наприклад, активність дегідрогеназ (тест з ТТС – трифенілтетразолій хлоридом).

Активність визначається кількістю цільового продукту, що синтезується в одиницю часу. Вона залежить від типу живильного середовища, умов культивування (рН, температура, аерація) і віку культури. До методів визначення активності належать біохімічні аналізи продукту (титрування, спектрофотометрія, хроматографія), ферментативна активність (наприклад, активність амілази, протеази) і біотести – ефект продукту на інші організми.

Проведення роботи. Оцініть життєздатність мікроорганізмів шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) на живильному середовищі. Ознайомтеся з проведенням тонкошарової хроматографії для визначення активності цільового продукту.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 3. Контроль мікробіологічної стабільності біопалива під час зберігання

Мета роботи. Ознайомлення з методами контролю мікробіологічної стабільності біопалива під час його зберігання, вивчення впливу мікроорганізмів на якість біопалива, а також набуття практичних навичок у виявленні та кількісному визначенні мікробного забруднення.

Матеріальне забезпечення. Зразки біопалива для дослідження, поживні середовища (живильний агар, Сабуро, середовище для анаеробів).

Основні відомості. Біопаливо (зокрема біодизель) є органічним паливом, виготовленим з рослинної або тваринної сировини. Через високий вміст кисневих сполук і гігроскопічність біопаливо є схильним до мікробіологічного забруднення під час зберігання. Розвиток мікроорганізмів у паливі або у водній фазі, що може утворюватися при конденсації, призводить до утворення біоплівки та осаду, зміни фізико-хімічних властивостей палива, корозії ємностей та паливної системи і зниження ефективності використання палива.

Найпоширенішими мікроорганізмами, що забруднюють біопаливо, є бактерії (наприклад, *Pseudomonas*, *Bacillus*), дріжджі та плісняві гриби (*Aspergillus*, *Penicillium*). Для виявлення їхньої наявності використовуються стандартні мікробіологічні методи: посів на поживні середовища, інкубація та підрахунок колонієутворюючих одиниць (КУО).

Проведення роботи. Оцініть життєздатність бактерії (наприклад, *Pseudomonas*, *Bacillus*), шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) на живильному середовищі, а також дріжджів та пліснявих грибів (*Aspergillus*, *Penicillium*)

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

Робота 4. Мікробіологічний контроль відходів виробництва біопалива (біослому)

Мета роботи. Ознайомлення з методами мікробіологічного контролю відходів виробництва біопалива, зокрема біослому; набуття практичних навичок у виявленні, підрахунку та ідентифікації мікроорганізмів, які можуть впливати на подальше використання або утилізацію біослому.

Матеріальне забезпечення. Зразки біосліму, поживні середовища (МПА, Сабуро, Ендо, Чапека), фізіологічний розчин, чашки Петрі, стерильні петлі, піпетки, термостат, автоклав, ламінарна шафа або спиртівка, мікроскоп, захисні рукавички.

Основні відомості. Біослім - це залишкові речовини (відходи), що утворюються після виробництва біопалива, переважно біогазу або біодизеля. Залежно від технології виробництва та сировини, біослім може містити органічні залишки (білки, клітковину, жири), мікроелементи, залишки мікроорганізмів і сполуки, що можуть бути токсичними або біологічно активними.

Через вміст органіки, біослім є потенційним середовищем для розвитку різноманітних мікроорганізмів (бактерій, грибів, патогенів). Мікробіологічний контроль таких відходів є важливим для оцінки санітарного стану біосліму, визначення можливостей подальшого використання (наприклад, як добриво), запобігання поширенню патогенних або умовно-патогенних мікроорганізмів і контролю біобезпеки під час зберігання чи транспортування.

Проведення роботи. Отримані зразки біосліму з відповідного виробничого процесу за потреби – провести гомогенізацію або розведення зразка фізіологічним розчином.

Здійснити посів зразків на відповідні поживні середовища: для бактерій: м'ясо-пептонний агар (МПА), ендо, Сабуро;, для грибів: середовище Чапека, Сабуро, для виявлення кишкових паличок – середовище ЕМБ або МакКонкі.

Зразки інкубують за температур: 30–37 °С для бактерій і 25–28 °С для грибів і цвілей. Тривалість інкубації – 24–72 години залежно від типу мікроорганізмів.

Оцініть мікробний ріст шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1 г/мл зразка;

Проведіть візуальну оцінку морфології колоній (форма, колір, структура) і попередню ідентифікацію мікроорганізмів.

Одержані дані внесіть у результати і зробіть висновок.

Результати досліджень: _____

Висновки: _____

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

а) основна:

1. Pradeep Verma. Industrial Microbiology and Biotechnology (2022) <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-16-5214-1>
2. Загальна мікробіологія / В. І. Семанюк, І. Б. Турко, Р. А. Пеленьо, Н. В. Семанюк. Львів: ЛНУВМтаБТ імені С. З. Ґжицького, 2015. 108 с.
3. Мікробіологія. Том 1: підручник / Сергійчук М. Г., Сківка Л. М., Сергійчук Т. М. та ін. Київ : ФОП Маслаков, 2020. 500 с.
4. Мікробіологія. Том 2 : підручник / Сергійчук М. Г., Сківка Л. М., Сергійчук Т. М. та ін. Київ : ФОП Маслаков, 2020. 348 с.
5. Овсяннікова, Т. О., & Посохов, Є. О. (2021). Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу" Промислова мікробіологія та санітарія". Харків : Планета – Прінт, 2021. 72 с.

б) додаткова

1. Кот С. П., Кириченко В. А., Мельник В. О. Мікробіологія. Методичні рекомендації. Миколаїв, 2017. 94 с.
2. Практикум з мікробіології: метод. реком. для студентів 2 курсу денного відділення біологічного факультету / уклад. О. І. Віннікова, П 69 І. М. Раєвська. 4-те вид., доп. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. 66 с.
3. Роль анаеробних мікроорганізмів у трансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо [Текст] : дис... канд. с.-г. наук: 03.00.07 / Ястремська Лариса Сергіївна ; НАН України, Ін-т мікробіології й вірусології ім. Д. К. Заболотного, Нац. авіац. ун-т. - К., 2008. 176 арк.
4. Chaemchuen, S., Zhou, K., & Verpoort, F. (2016). From biogas to biofuel: materials used for biogas cleaning to biomethane. *ChemBioEng Reviews*, 3(6), 250-265.
5. Chaturvedi, V., Goswami, R. K., & Verma, P. (2020). Genetic engineering for enhancement of biofuel production in microalgae. *Biorefineries: a step towards renewable and clean energy*, 539-559.

Зміст

Розділ 1. Морфологія, систематика і фізіології мікроорганізмів	3
Лабораторне заняття 1. Мікробіологічна лабораторія. Дослідження форм мікроорганізмів	3
Робота 1. Методи виявлення мікроорганізмів	5
Робота 2. Будова мікроскопа і техніка бактеріоскопічного дослідження ...	6
Робота 3. Дослідження форм мікроорганізмів	8
Робота 4. Виготовлення препаратів живих мікроорганізмів	10
Робота 5. Виготовлення фарбованих препаратів мікроорганізмів. Прості методи фарбування	12
Робота 6. Фарбування бактерій за Грамом	14
Робота 7. Фарбування кислото-спирто-лугостійких бактерій	15
Робота 9. Фарбування спор у бацил	18
Лабораторне заняття 2. Морфологія актиноміцетів, пліснявих грибів і дріжджів	21
Робота 1. Вивчення морфології актиноміцетів	21
Робота 2. Вивчення морфології плісневих грибів	23
Робота 3. Вивчення морфології дріжджів роду <i>Saccharomyces</i> і <i>Yarrowia lipolytica</i>	25
Лабораторне заняття 3. Поживні середовища. Умови і техніка культивування мікроорганізмів. Стерилізація	28
Робота 1. Виготовлення поживних середовищ для культивування мікроорганізмів	28
Робота 2. Стерилізація, її методи і засоби	31
Робота 3. Посів мікроорганізмів на живильні середовища	33
Робота 4. Методи культивування анаеробів	35
Робота 5. Методи виділення чистої культури мікроорганізмів	37
Робота 6. Культуральні властивості чистої культури мікроорганізмів	41
Робота 7. Біохімічні властивості мікроорганізмів	43
Робота 8. Техніка відбирання проб ґрунту, води і повітря для мікробіологічного дослідження	46
Робота 9. Визначення загального мікробного числа повітря	48
Робота 10. Визначення загального мікробного числа ґрунту і води	50
Робота 11. Визначення колі-титру і колі-індексу	51
Розділ 2. Перетворення мікроорганізмами сполук вуглецю, азоту та інших елементів	54
Лабораторне заняття 4. Мікроорганізми – продуценти біостанолу	54
Робота 1. Характеристика дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Робота 2. Мікробіологічний контроль вирощування <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
Робота 3. Ідентифікація мікробіологічних забруднень під час вирощування <i>S. cerevisiae</i>	58
Лабораторне заняття 5. Мікроорганізми – продуценти біогазу	61
Робота 1. Культивування анаеробних мікроорганізмів – продуцентів біогазу	61
Робота 2. Гідролітичні мікроорганізми – продуценти біогазу	63

Лабораторне заняття 6. Мікроорганізми – продуценти біодизелю	67
Робота 1. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості мікроводоростей - продуцентів ліпідів	67
Робота 2. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості ліпідопродукуючих дріжджів	69
Робота 3. Морфологічні, культуральні і біохімічні властивості бактерій - продуцентів ліпідів	71
Лабораторне заняття 7. Мікробіологічний контроль виробництв біопалива	73
Робота 1. Мікробіологічний аналіз чистоти середовища та обладнання	73
Робота 2. Моніторинг життєздатності та активності мікроорганізмів- продуцентів	75
Робота 3. Контроль мікробіологічної стабільності біопалива під час зберігання	76
Робота 4. Мікробіологічний контроль відходів виробництва біопалива (біослому)	77
Рекомендована література	78