

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кафедра біотехнології та хімії

**ЗАВДАННЯ
ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТЬ
з «Комплексної навчальної практики І»
блоку «Біологія клітин і тканин»**

*для здобувачів вищої освіти денної форми навчання
спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія*



ПОЛТАВА

2023 – 2024н.р.

Розробник: Крикунова В. Ю. – професор кафедри біотехнології та хімії,
к.х.н., доцент

Робочий зошит з «Комплексної навчальної практики I» блоку «*Біологія клітин і тканин*» розглянуто та схвалено на засіданні кафедри біотехнології та хімії

Протокол від « 31» серпня 2023 року № 1

1. Загальні правила техніки безпеки в лабораторії на заняттях з біотехнологчних дисциплін

1. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами і обсіменіння мікроорганізмами.
2. Кожен повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці. Перехід на інше місце без дозволу викладача не допускається.
3. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не захаращувати його посудом і побічними речами.
4. Студентам забороняється працювати в лабораторії без присутності викладача або лаборанта, а також у невстановлений час без дозволу викладача.
5. До виконання кожної лабораторної роботи можна приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки і дозволу викладача.
6. Приступаючи до роботи, необхідно: усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання; перевірити відповідність взятих речовин тим речовинам, які вказані в методиці роботи.
7. Досвід необхідно проводити в точній відповідності з його описом в методичних вказівках, особливо дотримуватися черговості додавання реактивів.
8. Для виконання досвіду користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом; для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетки, бюретки, мензурку, мірний циліндр або мірний стакан); не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у тару, щоб не зіпсувати реактив.
9. Якщо в ході досвіду потрібно нагрівання реакційної суміші, треба слідувати передбаченим методичним вказівкам способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці або на газовому пальнику та ін.. Сильно летючі горючі речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.
10. Пролиті на підлогу і стіл хімічні речовини знешкоджують і прибирають під керівництвом лаборанта (викладача) у відповідності з правилами.
11. При роботі в лабораторії слід дотримуватися таких вимог: виконувати роботу потрібно акуратно, сумлінно, уважно, економно, бути спостережливим, раціонально і правильно використовувати час, відведений для роботи.
12. По закінченні роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню робочого лабораторного столу, закрити водопровідні крани, вимкнути електричні прилади.

Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з кислотами і лугами

1. Кислоти і луги в більшості відносяться до речовин підвищеного класу небезпеки і здатні викликати хімічні опіки та отруєння. Тому необхідно уважно стежити за тим, щоб реактиви не потрапляли на обличчя, руки та одяг.
2. Не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами і лугами, а наливати їх тільки у відведеному для цього місці.
3. Розливати концентровану азотну, сірчану і соляну кислоти слід тільки при включеній вентиляції у витяжній шафі.
4. Забороняється набирати кислоти і луги в піпетку ротом. Для цього слід застосовувати гумову грушу і інше обладнання для відбору проб.
5. Для приготування розчинів сірчаної, азотної та інших кислот необхідно їх доливати до води тонким струменем при безперервному перемішуванні, а не навпаки. Приливати воду в кислоту забороняється!
6. Розчиняти тверді луги слід шляхом повільного додавання їх невеликими шматочками до води при безперервному перемішуванні. Шматочки лугу потрібно брати тільки щипцями.
7. При змішуванні речовин, яке супроводжується виділенням тепла, необхідно користуватися термостійким товстостінним скляним або фарфоровим посудом.

8. Розлиті кислоти або лугу необхідно негайно засипати піском, нейтралізувати, і тільки після цього проводити прибирання.

9. При попаданні на шкіру або одяг кислоти, треба змити її великою кількістю води, а потім 3-5% розчином питної соди або розведеним розчином аміаку.

10. При попаданні на шкіру або одяг лугу, після змивання її великою кількістю води, потрібно провести обробку 2-3% розчином борної, лимонної або оцтової кислоти.

11. Речовини, фільтри, папір, використані при роботі, слід викидати в спеціальний відро, концентровані розчини кислот і лугів також зливати в спеціальний посуд.

Правила техніки безпеки в лабораторії з легкозаймистими і горючими рідинами (ЛЗР та ГР)

1. Всі роботи з ЛЗР і ГР повинні здійснюватися у витяжній шафі при включеній вентиляції, відключених газових проводках і електронагрівальних приладів.

2. Забороняється нагрівати на водяних банях речовини, які можуть вступати між собою в реакцію, що супроводжується вибухом або виділенням парів і газів.

3. При випадковому проливанні ЛЗР (сірковуглець, бензин, діетиловий ефір та ін), а також при втратах горючих газів необхідно негайно відключити всі джерела відкритого вогню, електронагрівальні прилади.

4. Посудини, в яких проводилися роботи з ЛЗР та ГР, після закінчення досліджень повинні бути негайно звільнені від решти рідини і промиті.

5. Досвіди з отруйними речовинами та речовинами, які мають сильно виражений запах, можна проводити тільки у витяжній шафі.

6. При гасінні бензину, спирту, ефіру, користуватися піском, яким слід засипати на спалахнуло полум'я.

7. При розпізнаванні газу по запаху, що виділяється, нюхати газ тільки на певній відстані, направляючи його струмінь рухом руки від судини до себе.

Правила техніки безпеки в лабораторії з побутовим газом, спиртівкою і сухим паливом

1. У зв'язку з небезпекою вибуху газоповітряної суміші, застосування побутового газу для нагріву в лабораторіях допускається в крайніх випадках, коли відсутні електронагрівальні прилади.

2. Перед запалюванням спиртівки потрібно переконатися, що корпус її виправлений, гніт випущений на потрібну висоту і розгорнутий, а горловина і держак гніта сухі.

3. Запалену спиртівку не переносити з місця на місце; не можна запалювати одну спиртівку від іншої.

4. Гасити спиртівку треба накриваючи полум'я ковпачком. Задувати полум'я забороняється.

5. У спиртівки використовується тільки етиловий спирт; користуватися бензином або іншими горючими рідинами забороняється.

6. Брикети (таблетки) сухого пального іноді можуть використовуватися для нагріву. Запалювати їх слід на керамічних пластинках, гасити - ковпачками для спиртівки або керамічними тиглями. Брикети, які не догоріли, після гасіння треба прибрати в витяжну шафу.

7. Нагрівання реакційних сумішей в пробірках і інших скляних посудинах потрібно проводити обережно, попередньо насухо витерти зовнішні стінки судини і, не допускаючи розбризкування суміші з посудини. Горловина посудини повинна бути спрямована в бік, як від себе, так і від тих, хто працює поруч. Пробірку слід тримати під нахилом. Не можна нахилитися над рідиною, яка нагрівається, тому що іноді вона може википати з посудини. При нагріванні пробірки над спиртівкою необхідно використовувати спеціальний тримач для пробірок.

8. При виникненні пожежі, насамперед треба вимкнути усі нагрівальні прилади, потім гасити полум'я. Його не можна задувати. Якщо горять органічні речовини, не слід заливати полум'я водою. Використовуйте пісок, пожежні ковдри, вогнегасники (краще вуглекислотні).

9. При незначних опіках (гарячими предметами, речовинами або паром) місце опіку необхідно обробити спиртом або міцним розчином перманганату калію, а при більш тяжких опіках слід негайно звернутися до лікаря.

Правила техніки безпеки в лабораторії з хімічної посудом

1. Основним травмуючим фактором, який пов'язаний з використанням скляного посуду, апаратів і приладів, є гострі осколки скла, що здатні викликати порізи тіла працюючого, а також опіки рук при необережному поводженні з нагрітими до високої температури частинами скляного посуду.

2. Розмішувати реакційну суміш в посудині скляною паличкою або шпателем треба обережно, не допускаючи розлому судини. Тримати посудину при цьому необхідно за її горловину.

3. Переносючи посудини з гарячою рідиною, треба тримати їх двома руками: однією - за дно, інший - за горловину, використовуючи при цьому рушник (щоб уникнути опіків кистей і пальців рук).

4. При закриванні товстостінної посуду пробкою слід тримати її за верхню частину горловини. Нагрітий посуд не можна закривати притертою пробкою поки він не охолоне.

5. У дослідах з нагріванням необхідно користуватися посудом, який має відповідне маркування.

6. У разі порізу склом потрібно спочатку уважно оглянути рану і витягти з неї осколки скла, якщо вони є, а потім обмити поранене місце 2% розчином перманганату калію, змастити йодом і зав'язати бинтом або заклеїти лейкопластиром.

Правила техніки безпеки в лабораторії з електрообладнанням та електроприладами

1. Хімічні лабораторії (включаючи біохімічні та мікробіологічні) згідно зі ступенем небезпеки ураження електричним струмом відносяться до приміщень з підвищеною або особливою небезпекою, яка обумовлена можливістю впливу на електрообладнання хімічно активних середовищ.

2. Усі роботи, пов'язані із застосуванням електроприладів повинні проходити під наглядом викладача (лаборанта).

3. При роботі з водяною лазнею не можна пробувати ступінь нагріву води рукою.

4. При несправності в роботі електроприладу (наприклад, підсвічування в мікроскопі) необхідно звернутися до викладача. Лагодити самостійно прилади забороняється.

5. При ураженні електричним струмом, якщо потерпілий залишається в зіткненні з струмоведучими частинами, необхідно негайно вимкнути струм за допомогою пускача або вивернути охоронну пробку або перерубати струмопровідний провід ізольованим інструментом. До постраждалого, поки він знаходиться під струмом, не можна торкатися незахищеними руками (без гумових рукавичок). Якщо потерпілий втратив свідомість, після вимикання струму потрібно негайно, не чекаючи лікаря, робити штучне дихання.

Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з реактивами

1. Якщо до роботи не дано вказівок щодо дозування реактивів, то брати їх для проведення дослідів необхідно в можливо меншій кількості (економія матеріалів і часу, який витрачається на досвід).

2. Надлишок реактиву можна висипати і вилити назад в посудину, з якої він був узятий.

3. Після витрачання реактиву банку або склянку необхідно відразу закрити пробкою і поставити на місце.

4. Сухі реактиви брати з допомогою лопаток, пластмасових або металевих шпатель. Шпатель повинен бути завжди сухим і чистим. Після використання слід його ретельно обтерти.

5. Коли реактив відбирається піпеткою, ні в якому разі не можна тій же піпеткою, не вимивши її, брати реактив з іншої ємності.

6. При наливанні реактивів не можна нахилитися над посудиною, запобігаючи потрапляння бризок на обличчя або одяг.

7. Не можна тримати банку або склянку з реактивом, яку потрібно відкрити, тримаючи в руках, її треба поставити на лабораторний стіл і тільки після цього відкривати.

Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з біоб'єктами

1. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять.

2. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

3. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.

4. Для забезпечення стерильності роботу з мікроорганізмами краще проводити в спеціальних скляних або полускляних камерах-боксах, які бувають різних розмірів. У боксах вмонтовані ультрафіолетові бактерицидні лампи, що знищують мікроорганізми.

5. Необхідно стежити за тим, щоб дріжджова маса не забруднювала руки, стіл і навколишні предмети. Ватні пробки, що закривають судини з мікроорганізмами, не повинні своєю внутрішньою частиною стикатися зі столом або руками. Пролиту дріжджову суспензію не обходимо знешкодити з використанням дезінфікуючих засобів (спирт і т.п.).

6. Бактеріальна петля після пересіву мікроорганізмів повинна бути прожарити над полум'ям і поставлена в спеціальний штатив. Вся робоча лабораторний посуд, що містить живі мікроорганізми, після роботи повинна піддатися термічній обробці в автоклаві.

7. При випадковому потраплянні біологічного матеріалу (особливо мікроорганізмів) на стіл, руки, потрібно провести обробку дезінфекційним розчином (наприклад, хлораміном).

8. Після роботи необхідно ретельно вимити руки з використанням дезінфекційних засобів (детергентів).

Заходи першої допомоги при отруєннях неорганічними та органічними речовинами:

Азотною кислотою. Свіже повітря, спокій, тепло. Вдихання кисню. Сульфадимезин чи іншої сульфаніламідний препарат (2 г), аскорбінова кислота (0,5 г), кодеїн (0,015 г). Штучне дихання. Консультація лікаря.

Сірчаною кислотою. Свіже повітря. Промити верхні дихальні шляхи 2% розчином питної соди. У ніс - 2-3 краплі 2% розчину ефедрину. Тепле молоко з содою, кодеїн (0,015 г) або дионин (0,01 г). При попаданні в органи травлення змастити слизову рота 2% розчином дикаїну. Промивання шлунка великою кількістю води. Всередину прийняти: столову ложку оксиду магнію на склянку води кожні 5 хвилин, ячний білок, молоко, крохмальний клейстер, шматочки вершкового несоленого масла, шматочки льоду. Не можна викликати блювоту і застосовувати карбонати. Консультація лікаря.

Лугами. Вдихання теплої водяної пари (у воду додати трохи лимонної кислоти). Всередину - тепле молоко з медом, кодеїн (0,015 г) або дионин (0,01 г). Гірчичники. При попаданні в органи травлення змастити слизові оболонки рота і горла 1% розчином новокаїну. Всередину - по столовій ложці 1% розчину лимонної кислоти кожні 3-5 хвилин, крохмальний клейстер з додаванням лимонної або оцтової кислоти, 2-3 столові ложки рослинної олії, шматочки льоду. Консультація лікаря.

Ефіром, хлороформом, спиртом. Свіже повітря. Всередину 0,03 г фенаміну або 0,1 г коразол, або 30 крапель кордіаміну, або 0,5 г камфори. Штучне дихання і вдихання кисню.

По завершенні роботи необхідно привести в порядок робоче місце. Не дозволяється кидати в раковини папір, вату, скло від розбитої хімічного посуду. Двері лабораторії тримають зачиненими.

ТЕМА 1.

Техніка мікроскопіювання у світловому полі. Методи стерилізації. Принципи таксономії та класифікації мікроорганізмів Особливості будови прокариот і еукаріот.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1. Структура та обладнання лабораторії з біотехнологічних дисциплін. Методи проведення мікроскопії рослинних клітин живих та постійних препаратів. Порівняти особливості будови клітин прокариот і еукаріот.

Мета заняття: Ознайомитися з правилами роботи в біотехнологічній лабораторії, з особливостями підготовки приміщення, обладнання і лабораторного посуду до роботи з препаратами. Розгляд структури та обладнання біотехнологічної лабораторії та укомплектовування спеціальних приміщень; сформувати навички щодо уміння проведення мікроскопії живих та постійних препаратів

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметові та накривні скельця; *Посуд*, який використовують при роботі з культурою ізольованих тканин можна розділити на три групи, фільтрувальний папір, негігроскопічна вата, марля, ватні пробки, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби, целофан, пергаментний папір, нейлонова тканина різної щільності, рослинний матеріал, постійні препарати для мікроскопії.

1. Посуд для приготування і зберігання живильних середовищ.

Бутлі з темного скла на 20, 10 і 5 л з нижнім тубусом і без нього;
Колби Ерленмєєра на 5, 3, 2, 1, 0,5 л і 250 мл; Колби плоскодонні на 5, 3, 2 л;
Колби мірні на 3, 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25 мл; Циліндри мірні на 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25, 10, 5 мл;
Стакани хімічні на 1, 0,5 л, 350, 250, 200, 100 мл;
Піпетки Мора на 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 мл; Піпетки градуйовані на 10, 5, 2, 1, 0,5 мл;
Мікропіпетки градуйовані (0,1-0,5 мл); Скляні палички різних розмірів; Скляні лійки різних розмірів.

2. Посуд для вирощування ізольованих тканин.

Бутлі на 20, 10, 5, 3, 2, 1 л для глибинного культивування тканин і клітинних суспензій; Колби Ерленмєєра широкогорлі на 1, 0,5 л, 250, 100 мл;
Пробірки біологічні розміром 23x200 мл, 23x150 мл, 40x150 мл;
Чашки Петрі (високі і низькі різного розміру, скляні і разові пластикові);
Скельця предметні без ямки і з ямкою; Скельця покривні тонкі 24x24 мм;

3. Посуд, який використовується при пересаджуванні тканин.

Чашки Петрі низькі з діаметром 10 см. Автоклав для стерилізації інструментів.

Інструменти для ізолювання і висаджування ізольованих тканин: пінцети анатомічні різних розмірів (20, 25 і 30 см); скальпелі анатомічні ланцетовидні, очні, черевні; ножиці; пробкові свердла різного діаметра; голки анатомічні; спиртівки.

Об'єкт дослідження: обладнання лабораторії, рослинний матеріал, постійні препарати для мікроскопії.

Питання поточного контролю:

1. Механічні частини мікроскопа: будова, призначення.
2. Оптичні частини мікроскопа: будова, призначення.
3. Освітлювальний апарат мікроскопа: будова дзеркала і конденсора.
4. Основні властивості лінз мікроскопа. Види аберації.
5. Види об'єктивів і окуляра, їх особливості.
6. Визначення збільшення і роздільної здатності мікроскопа.
7. Основні правила мікроскопування гістологічних препаратів.
8. Принцип дії і призначення ультрафіолетового, люмінесцентного, і електронного мікроскопів.
9. Які мікроорганізми проводять у живому або фіксованому (забарвленому) стані.

10. Які їх розміри, форми, структура, рухливість, характер розмноження, відношення клітин до різноманітних подразників (хімічних, фізичних і т.д.).

Теоретичний зміст теми Основне призначення посуду

Правильно підібраний посуд в лабораторії забезпечує успіх наукової діяльності. За призначенням посуд ділиться на три групи:

- **Мірний.** На його стінках нанесений малюнок з значеннями в мілілітрах або грамах. Використовують такий посуд при звичайній температурі, коли не потрібно нагрівати вміст посудини.
- **Немірний.** Він виробляється з високоміцного матеріалу, оскільки повинен витримувати великі температури.
- **Спеціальний.** Ці хімічні прилади (колби, ексикатори і так далі) потрібні для проведення певних дослідів.

Класифікація за видами

Класифікація хімічного посуду за видами і формою охоплює наступні прилади:

- **Воронка.** Вони служать для переливання невеликої кількості рідини і мають діаметр від 35 до 300 мм. Як правило, стінки воронки гладкі, але в деяких випадках зустрічаються рифлені екземпляри. Для зручності роботи їх ставлять в спеціальний тримач або в поглиблення штатива.
- **Колба.** Вони можуть бути круглодонні (з високоміцного скла для стійкості до високої температури) або грушоподібні, звані колбами К'ельдала. Це термостійкі вироби, що використовуються для визначення кількості азоту. Ще є колби, які необхідні для дистиляції.
- **Пробірка.** Ці судини потрібні для проведення всіляких експертиз, аналізів і взяття проб. Зазвичай вони скляні, але можуть виготовлятися і з якісного пластику. Щоб вони могли стійко стояти на столі, використовується пробіркотримач.
- **Чаша.** Їх застосовують для збору і виведення штамів мікроорганізмів, збереження їх частинок і травлення. Найвідомішим видом є чаша Петрі.
- **Мірний посуд.** До таких приладів відносяться всілякі піпетки, мензурки і циліндри, що мають на поверхні ділильні маркування. Виготовляються зі скла і рідко використовуються для контакту з високою температурою.



- **Прилади для зважування.** Такі стаканчики можуть бути низькими і високими. Їх використовують для дотримання пропорцій при змішуванні.
- **Холодильник.** Застосовуються для зберігання овін, їх перегонки
- **Прилади для зважування.** Такі стаканчики можуть бути низькими і високими. Їх використовують для дотримання пропорцій при змішуванні.
- **Холодильник.** Застосовуються для зберігання овін, їх перегонки або конденсації.



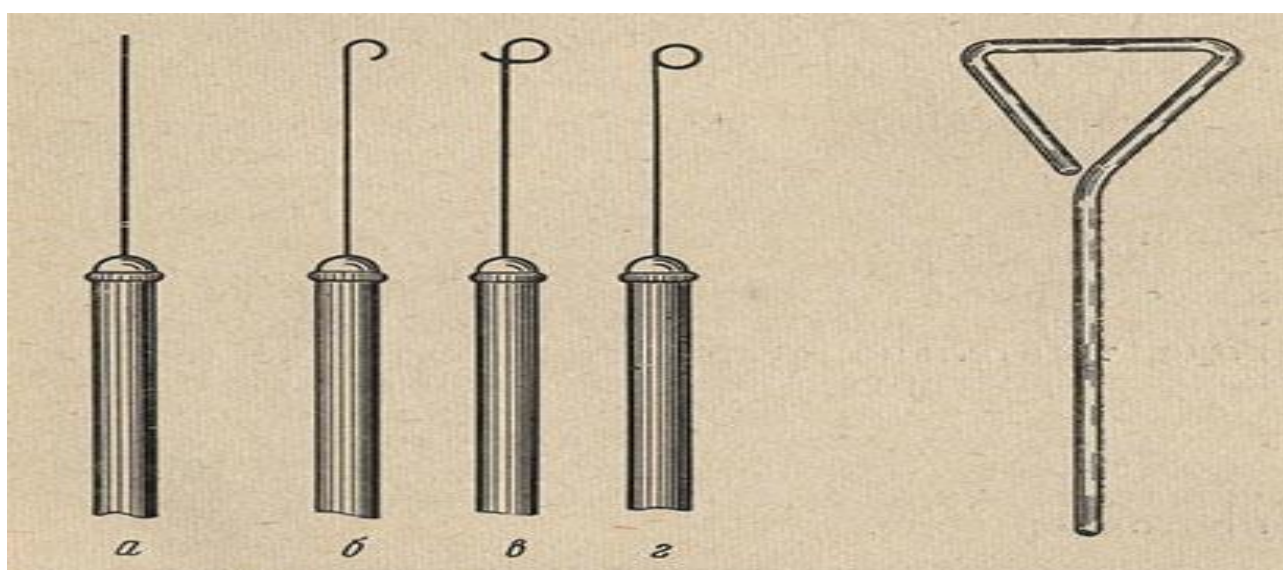


Рис.1. а - платинова голка, б, в – платинова петля не правильно. Шпатель. виготовлена; г – правильно виготовлена петля

Основні правила роботи в асептичних умовах.

Всі роботи в операційній кімнаті проводяться в спеціальному одязі (халат, косинка або чеpecь, ватно-марлева пов'язка, бахили). Одяг повинен бути стерильним, тому його попередньо автоклавують.

Перед роботою руки ретельно мийуть з милом у теплій воді. У боксі під час роботи руки періодично стерилізують 70%-ним етанолом. У процесі роботи зі стерильними культурами неприпустимо відкривати двері операційної кімнати

1. *Кімната для миття посуду*: мийниці з гарячою та холодною водою; дистиллятор; бідистиллятор; шафи для зберігання посуду; витяжна шафа для роботи з кислотами. Оснащена декількома раковинами із кислотостійкого матеріалу з гарячою та холодною водою і стелажми для сушіння посуду. В зв'язку з великою кількістю скляного посуду, який використовується в роботі, мийку роблять глибокою і широкою, зручною для роботи декількох чоловік. Над мийкою встановлюють дистиллятор.



2. *Кімната для приготування живильних середовищ і аналізу результатів* забезпечена технічними, аналітичними, торзійними вагами, рН - метром, бідистиллятором, електроплитками, водяними банями, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, полицями для розміщення хімічних реактивів, приладів тощо.

3. *Приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду, матеріалів* оснащено горизонтальними або вертикальними автоклавами, сушильними шафами з режимом.

Рис.2 Автоклав роботи 160-180°C, дистиллятором, столами та полицями для розміщення простерилізованих предметів і, по можливості, стерилізатором.

5. *Операційна (асептична) кімната* забезпечена **ламінар-боксами** і використовується для проведення стерильних робіт. Основна вимога, яка ставиться до неї – можливість легко забезпечити асептичні умови. **Ламінар-бокс** – це невелика камера, в яку повітря подається під тиском через спеціальні стерилізуючі фільтри. Надлишковий тиск, який створюється в середині робочого об'єму камери, перешкоджає попаданню в неї неочищеного повітря.

6. *Світлова культуральна кімната* використовується для культивування ізолюваних тканин рослин та рослин-регенерантів. В цій кімнаті автоматично регулюється і підтримуються на постійному рівні освітленість, температура 25-26°C, вологість повітря 70-80%, 14-годинний фотоперіод, кондиційоване повітря. Кімната оснащена стелажми, які зручно розміщуються ярусами (один над другим).

7. *Центрифужна кімната* оснащена міні- та ультрацентрифугами для виділення білків і нуклеїнових кислот.

8. *Темнова культуральна кімната* з кондиційованим повітрям, температурою 25-26°C, відносною вологістю повітря 70-80%, оснащена установками ротаційного та шейкерного типу. Використовується для вирощування калюсних культур та клітинних суспензій.

9 *Кліматичні камери стелажі з лампами; система клімат-контролю.*

10. *Лабораторне приміщення* оснащують обладнанням, необхідним для біохімічних, гісто – і цитологічних та інших досліджень, пов'язаних з основними роботами по вирощуванню рослинних тканин



Рис. 3. Світлова культуральна кімната

На стелажах встановлюють штативи з пробірками і культуральні колби таким чином, щоб вони не затіняли одна другу (рис.2). Джерела світла повинні забезпечувати спектр, сприйнятливий для протікання в рослинах основних біологічних процесів (400-700 нм), а інтенсивність випромінювання - бути в межах 1000-10000 лк.

Світлова мікроскопія. Будова світлового мікроскопа Стандартний світловий мікроскоп (рис. 4)



складається з двох основних частин – оптичної і механічної. До складу оптичної частини послідовно (відповідно до ходу світлових променів) входять освітлювальна система, об'єктив та окуляр. Освітлювальна система, у свою чергу, складається із дзеркальця з плоскою та ввігнутою поверхнями (перша використовується, коли джерело променів міститься далеко, а друга, – коли джерело розташоване близько від мікроскопа), конденсора з апертурною діафрагмою та оправы для світлофільтра. Функція освітлювальної системи – збирання, фокусування світлових променів, що необхідно для мікроскопічного аналізу.

Зазвичай при роботі з мікроскопом конденсор піднімають угору (за допомогою гвинта, що розташований знизу та збоку від столика мікроскопа). Діафрагму відкривають

Правила користування світловим мікроскопом:

1. Поставити мікроскоп дзеркальцем ос

Рис.4.Стандартний світловий мікроскоп.

вітлювальної системи від себе, а окуляром – до себе (у випадку, коли мікроскоп не оснащений стаціонарною освітлювальною системою). 2. Видалити пил з оптичних поверхонь за допомогою спеціально призначеної м'якої тканини. 3. Перевести в робоче положення об'єктив малого збільшення ($\times 8$) так, щоб він був розташований по центру отвору предметного столика (об'єктив фіксується зачіпкою револьверної системи). За допомогою відповідного гвинта перевести конденсор у верхнє положення та максимально відкрити діафрагму. 4. Наблизивши око до окуляра, за допомогою освітлювального дзеркальця відрегулювати освітлення поля зору (у випадку, коли мікроскоп не оснащено стаціонарною освітлювальною системою). У деяких випадках використання, наприклад матового білого чи блакитного світлофільтрів, дозволяє покращити якість отриманого зображення. 5. Покласти препарат на предметний столик так, щоб аналізована частина була розташована над отвором столика. Покривне скельце має бути зверху. 6. Рухами мікрогвинта спробувати знайти чітке зображення мікроскопічного об'єкта, сфокусувавши на ньому оптичну систему мікроскопа. 7. Якщо препарат потрібно проаналізувати детальніше, то слід плавно, не змінюючи положення тубуса, перевести револьверну систему на об'єктив $\times 40$. При фокусуванні необхідно пам'ятати, що відстань між лінзою об'єктива та препаратом за малого ($\times 8$) збільшення становить ~ 10 мм, великого ($\times 40$) – менше 1 мм. 8. Обережно, спостерігаючи збоку, плавними рухами макрогвинта встановити приблизний фокус, а, спостерігаючи в окуляр, за допомогою мікрогвинта остаточно сфокусувати зображення об'єкта. За різких поворотів макрогвинта можна роздавити скляний препарат об'єктивом і пошкодити сам об'єктив

9. Для вивчення препарату за найбільшого збільшення на поверхню покривного скельця на місці зрізу нанести краплю імерсійного масла, повернути револьвер (спочатку піднявши тубус) так, щоб проти отвору в предметному столику став об'єктив $\times 90$. Потім його опустити настільки, щоб фронтальна лінза занурилась у масло і, обертаючи мікрометричний гвинт, визначити його оптимальне положення для досягнення чіткого зображення. 10. Після вивчення препарату, повертаючи револьвер, перевести мікроскоп на мале збільшення, і тільки після цього зняти препарат.

Принципи таксономії та класифікації мікроорганізмів.

Усі мікроорганізми об'єднані трьома загальними ознаками: » мають надзвичайно малі розміри (від десятих часток до десятків, іноді сотень мікрометрів); » більшість мікроорганізмів — одноклітинні; зустрічаються і багатоклітинні мікроорганізми, але диференціація клітин у них відсутня або слабо виражена; » малі розміри мікробів визначають специфічні, подібні для всіх мікроорганізмів методи дослідження і техніку культивування. На сьогодні мікроорганізми (бактерії, гриби, найпростіші, віруси та ін.) систематизовані за їх подібністю, відмінностями і взаємовідносинами між собою. **Систематика** (грец.

systematicos — упорядкований) — розподіл мікроорганізмів у відповідності з їхнім походженням і біологічною подібністю. **Систематика** включає три розділи: класифікацію, таксономію та ідентифікацію мікроорганізмів.

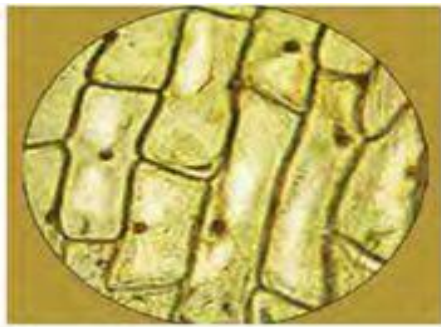
Класифікація (лат. classis — група) — розподіл (об'єднання) мікроорганізмів відповідно до їх подібних генотипічних і фенотипічних ознак за різними класифікаційними одиницями — **таксонами**. **Таксономія** (від грец. taxis — розташування по порядку і nomos — закон) — принципи розподілу (класифікації) мікроорганізмів відповідно до їхньої ієрархії. В основу таксономії мікроорганізмів покладені їх морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні властивості. **Таксон** — група мікроорганізмів, об'єднаних за певними властивостями в рамках тієї чи іншої таксономічної категорії.

Ідентифікація (лат. identifico — ототожнення) — встановлення приналежності досліджуваного організму до того чи іншого таксону. Для класифікації мікроорганізмів застосовують їх фенотипічні і генотипічні характеристики.

До фенотипічних належать такі особливості мікроорганізмів: морфологічні (форма, розмір, структура, рухливість і типи руху, здатність до утворення спор та ін.), тинкторіальні (відношення до різних барвників), культуральні (характер росту на поживних середовищах), біохімічні (здатність ферментувати різні субстрати, активність ферментних систем і особливостей обміну речовин), антигенні (розпізнаються за здатністю макроорганізму виробляти антитіла та інші форми імунної відповіді, виявляються в імунологічних реакціях), фізіологічні (види і механізми живлення, дихання та ін.), чутливість до антибіотиків та інших лікарських препаратів, бактеріофагів, фаготипування. Генотипічні характеристики: вивчення генетичних властивостей мікроорганізмів (ступінь гомології ДНК, РНК). Відповідно, існують два принципово різних підходи до класифікації мікроорганізмів: морфологічний (фенотипічний) і порівняно новий — молекулярно-генетичний. Морфологічна класифікація враховує сукупність морфологічних ознак і особливостей метаболізму мікроорганізмів. При класифікації, зокрема бактерій, спираються на вказівки «Керівництва Берджи з систематики бактерій» («Bergey's Manual of Systematic Bacteriology») і користуються визначником Берджи. Молекулярно-генетична класифікація ґрунтується на виявленні родинних зв'язків між мікроорганізмами шляхом аналізу структури нуклеїнових кислот, при цьому філогенетичними маркерами служать 16s-rРНК. При цьому нуклеотидні послідовності вивчених організмів дослідники спрямовують у всесвітній комп'ютерний генетичний банк, дані якого призначені для проведення порівняння з послідовностями кожного нового виділеного організму. Даний принцип був запропонований Карлом Везе (1977), відповідно до чого була побудована **трьохдоменна біологічна класифікація клітинних організмів**, яку зображують у вигляді філогенетичного дерева. Сучасна ієрархічна класифікація мікроорганізмів включає такі таксономічні одиниці: домен (domain) — царство (regnum) — відділ (phylum) — клас (classis) — порядок (ordo) — родина (familia) — рід (genus) — вид (species). Домен (англ. domain, лат. regio) — найвищий таксон (ранг) мікроорганізмів, який включає царства, відділи, класи тощо.

Залежно від особливостей будови мікроорганізми розділені на неклітинні (доклітинні) форми і клітинні форми. Неклітинні форми об'єднані в окреме царство — Віра і включають власне віруси, віроїди і пріони. Клітинні форми розділені на три домени: • «**Bacteria**» — **прокаріоти** (справжні бактерії або еубактерії); • «**Archaea**» — **предкові прокаріоти (стара назва археобактерії)**; • «**Eukarya**» — **еукаріоти (гриби і найпростіші)**. Представники кожного з трьох доменів мають свої особливості, завдяки яким вони займають певні екологічні ніші і виконують конкретні функції. Так, багато бактерій, поряд із грибами, розкладають органічні рештки, а також викликають різні захворювання. Археї пристосувалися до різних екстремальних умов місцепроживання (високої температури, підвищення кислотності або лужності, вмісту сірки і т. ін.). Крім того, вони використовують величезну кількість усіляких джерел енергії. **Еукаріотичні клітини** більш складно організовані і пластичні, що дозволило їм об'єднуватися у високоорганізовані клітинні утворення, що стало початком багатоклітинних організмів. Таким чином, до прокаріотів належать археї (стародавні прокаріоти) і еубактерії (справжні бактерії). У свою чергу, до еубактерій належать два відділи: фотобактерії і скотобактерії. До фотобактерій належать тільки сапрофітні (нехвороботворні) форми — ціанобактерії, або синьо-зелені водорості, до скотобактерій — безліч патогенних (хвороботворних) видів бактерій, які і вивчає медична мікробіологія. Скотобактерії, у свою чергу, поділяються на три класи. До **класу Bacteria** належать власне бактерії, спірохети і актиноміцети. Клас Rickettsiae об'єднує облигатних внутрішньоклітинних паразитів — рикетсій і хламідій. Клас Mollicutes складають скотобактерії, що не мають клітинної стінки — мікоплазми. Гриби і найпростіші належать до еукаріотів (домен Eukarya), при цьому гриби складають самостійне царство Fungi (гриби), а найпростіші належать до підцарства Protozoa (найпростіші) у складі царства Animalia (тварини). Основною таксономічною одиницею в мікробіології є вид (species) **Вид мікроорганізму** — це сукупність особин одного генотипу (з 70% рівнем гомології ДНК),

що володіють яскраво вираженою фенотипічною схожістю. Споріднені види об'єднуються у роди, роди в родини і т. д.



Клітина – це структурно упорядкована елементарна жива система, обмежена активною оболонкою, диференційована на цитоплазму і ядро, яка лежить в основі будови, життєдіяльності, функції та розвитку рослинних та тваринних організмів:

— клітина — основна структурно-функціональна і генетична одиниця живих організмів, найменша одиниця живого;

— клітини всіх одноклітинних і багатоклітинних організмів схожі за будовою, хімічним складом і найважливішими виявами процесів життєдіяльності;

кожна нова клітина утворюється в результаті поділу

Рис.5. Клітина шкірки цибулі в полі зору світлового

мікроскопу

— початкової (материнської) клітини;

— клітини багатоклітинних організмів спеціалізовані: вони виконують різні функції і утворюють тканини.

Користуючись рис.6 та додатковою літературою порівняти будову клітини прокаріот та еукаріот, дані внести до таблиці 1.

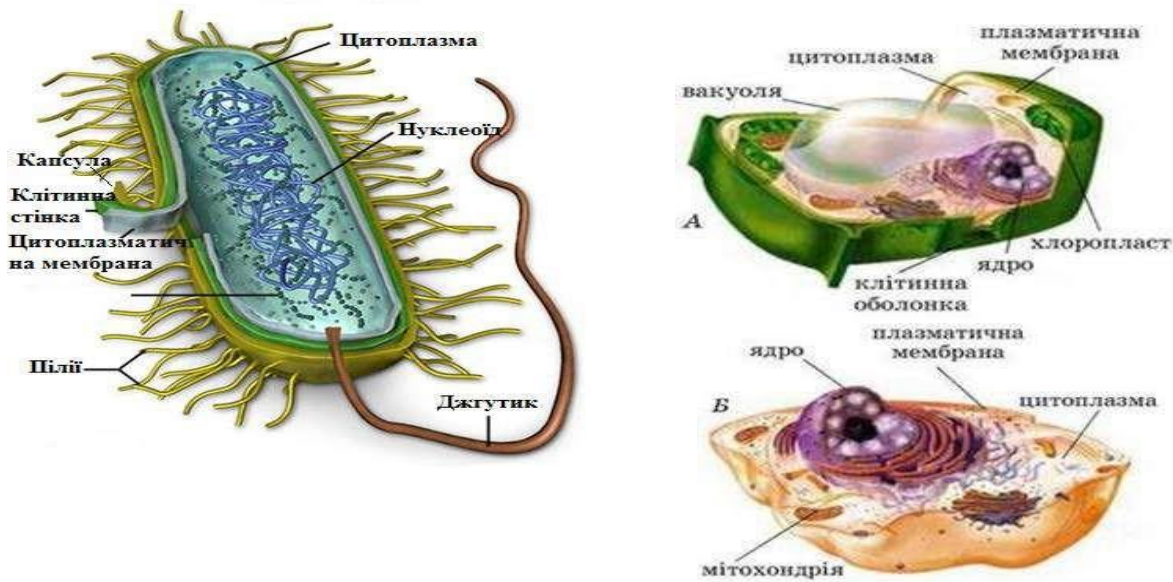


Рис. 6. Схема будови клітин прокаріот (1) та еукаріот (2-А,В).

Практичне завдання :Розгляд тимчасового незабарвленого препарату клітини луски цибулі, ціанобактерії під світловим мікроскопом Розрізати цибулину, розсунути соковиті луски та зняти з однієї з них шкірочку. Шматочок шкірочки перенести у краплю води на предметне скло й накрити покривним скельцем. За малого збільшення добре видно довгасті клітини з чітко окресленими межами; за великого – можна побачити товсту оболонку, цитоплазму, яка у вигляді вузького пристінного шару вистилає внутрішню поверхню клітинної оболонки, а також дрібну зернистість в окремих ділянках цитоплазми.

При забарвленні препарату барвником метиленовим синім або за дії яких небудь подразників у клітині стає добре помітним ядро, що лежить біля одного з кінців клітини або в передній частині коло однієї зі стінок клітини. Ядро має овальну або округлу форму. На такому препараті зручно спостерігати явище плазмолізу – відділення цитоплазми від оболонки.

Ціанобактерії (лат. Cyanobacteria) (від грец. κυανος — «блакитний» і βακτήριον — «паличка») — тип бактерій, що отримують необхідну енергію через фотосинтез. Одноклітинні, колоніальні та нитчасті без'ядерні організми, які здатні до фотосинтезу та використання атмосферного азоту,



відносять до ціанобактерій. У них, як і в бактерій, відсутні: сформоване ядро, більшість органел клітини тощо. Вони мають зелені та сині пігменти, завдяки яким відбувається

Рис.7. Ціанобактерії фотосинтез. За типом живлення більшість ціанобактерій є автотрофами. Деякі ціанобактерії здатні фіксувати й використовувати для утворення власних речовин азот із повітря. Розмножуються поділом клітин навпіл.

Виконання практичної частини

Практичне завдання: Ознайомитись зі структурою, обладнанням та складом і видом посуду у лабораторії. Розглянути будову світлового мікроскопу. Провести порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот. Розглянути клітину шкірки цибулі та крохмальних зерен в полі зору світлового мікроскопу.

Табл.1. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот:

№ п/п	Органели	Прокариоти	Еукаріоти	
			Рослини	Тварини
1.	Клітинна стінка			
2.	Цитоплазм.мембрана			
3.	Нуклеоїд			
4.	Ядро			
5.	Вакуолі			
6.	Мітохондрії			
7.	Хлоропласти			
8.	Рибосоми			
9.	ЕПС			
10.	Комплекс Гольджі			
11.	Клітинний центр			
12.	Лізосоми			
13.	Пероксисоми			
14.	Пілії/війки			
15.	Джгутики			

Висновки _____

Техніка мікроскопіювання у світлому полі

Оволодіння навичками приготування мікроскопічних препаратів та технікою мікроскопії найзручніше проводити на прикладі великих об'єктів, найкращими з яких є зерна крохмалю.

Вивчення крохмальних зерен харчової сировини. Крохмаль є найпоширенішим видом запасних поживних речовин рослин, що утворюється в результаті фотосинтезу. У клітинах він утворює зерна, особливо багаті їм клітини насіння і підземних видозмінених пагонів (бульб, цибулин, кореневищ). У різних рослин форма, будова і розміри крохмальних зерен (картопляного, кукурудзяного, рисового тощо) різні.

Крохмальні зерна мають овальну, сферичну форму або форму багатокутників, розмір яких коливається від 2 до 150 мкм. Зерно картопляного крохмалю, наприклад, має розмір від 10 до 150 мкм; пшеничного – від 30 до 50 мкм; кукурудзяного – від 20 до 30 мкм; рисового – від 5 до 10 мкм. Отже, найбільші зерна у картопляного крохмалю, найдрібніші – у рисового. Характерна форма крохмальних зерен дає можливість розрізнити їх під мікроскопом, що використовується при виявленні одного виду крохмалю в іншому. Таким чином, форма, розмір і структура крохмальних зерен специфічні для кожного виду рослин. Ця обставина використовується під час аналізу складу борошна і крохмалю, що використовуються в промислових цілях

Висновок. На основі мікроскопії замалювати у зошиті приклад представників еукаріот та прокаріот.

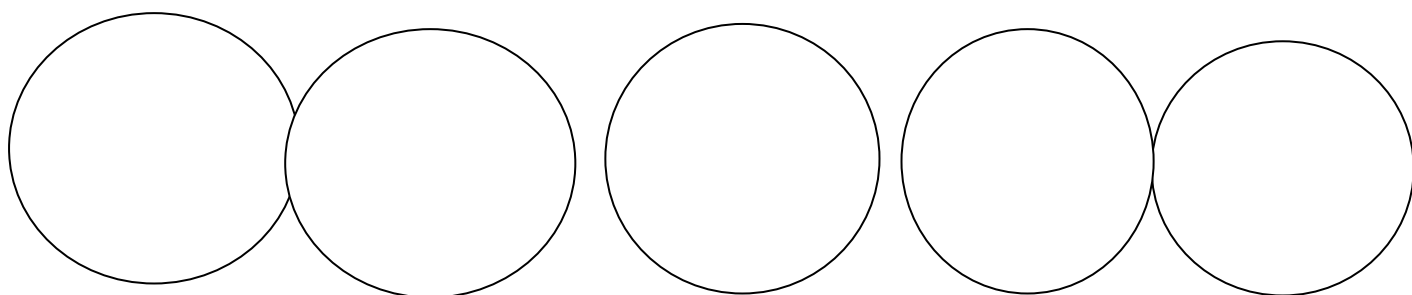


Рис. 8. Зерна крохмалю під мікроскопом: 1 – пшеничного, 2 – картопляного, 3 – житнього; 4 – кукурудзяного; 5 – рисового

Підпис викладача _____

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2. Методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильного середовища та рослинного матеріалу

Мета роботи: Ознайомитись з методами стерилізації як один з найважливіших прийомів у біотехнологічній практиці та з якою метою проводять стерилізацію рослинного живильного середовища.

Матеріали та обладнання: ламінар-бокс, пінцети, розчин стерилізатора. ; 0,5-5% гіпохлорит натрію NaClO; 9% гіпохлорит кальцію Ca(ClO)₂; хлорамін, комерційний препарат "Білизна".

2. Ртутні препарати: 0,2-0,5% розчин сулеми HgCl₂, діюцид, фапосепт.

3. 5-20% розчин перекису водню H₂O₂.

4. 1% бромна вода Br₂.

5. 0,5-2% азотнокисле срібло AgNO₃.

Об'єкт дослідження: насіння, листки, корені

Теоретичний зміст теми

Стерилізація приміщення:

1. Підлогу кімнати миють водою з будь-яким миючим засобом.
2. Проводять стерилізацію кімнати ультрафіолетовим опроміненням, використовуючи лампи ПРК-7 (потужність 1000 Вт) або ПРК-4 (потужність 500 Вт) протягом 1,5-2 годин, в залежності від потужності ламп. Працювати в кімнаті можна тільки через 2 години після виключення ламп.

Стерилізація ламінар-боксу:

Ламінар-боксы, як правило, обладнані УФ лампами, які можна залишати на ніч ввімкнутими для стерилізації внутрішньої поверхні. Безпосередньо перед роботою в ламінар-боксі його робочу поверхню протирають 96% етиловим спиртом.

Стерилізацію рук:

Проводять за допомогою 96% етилового спирту після попередньо їх миття мильним розчином.

Стерилізація інструментів:

Ножиці, ланцети, пінцети, голки прожарюють в сушильній шафі протягом 2-3 годин при температурі 160-180°C. Перед роботою інструменти стерилізують 96% спиртом, обпалюють над полум'ям спиртівки, після чого кладуть на підставку для охолодження. Використовують стерильні інструменти тільки для однієї маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів, стерилізацію їх повторюють в полум'ї спиртівки.

Стерилізація посуду.

Обов'язковою умовою успішного культивування рослинних тканин є чисто вимитий стерильний посуд. Існує два методи миття посуду кислотний і лужний. Самим поширеним і надійним методом підготовки скляного посуду, особливо нового, є кислотний – замочування посуду на 4-6 год. у хромовій суміші (розчин біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$) в концентрованій сірчаній кислоті). Потім посуд багаторазово промивають теплою проточною водою і ретельно ополіскують два рази дистильованою і один раз бідистильованою водою. Використаний посуд звільняють від залишків.

Стерилізація допоміжних матеріалів:

Вату, марлю, ватні та силіконові пробки, целофан, папір, фольгу стерилізують автоклавуванням протягом 25 хв. при 1-1,2 атм.

Стерилізація живильних середовищ.

Тверді (агаризовані) і рідкі середовища автоклавують в пробірках, колбах або іншому скляному посуді. Час стерилізації залежить від об'єму середовища (табл.1).

Складові живильних середовищ, що розкладаються чи коагулюють під час автоклавування (амінокислоти та їх аналоги, ферменти, антибіотики, мутагени) стерилізують механічним методом – через бактерицидні фільтри. Скляні фільтри після їх використання промивають концентрованою сірчаною кислотою і декілька разів проточною водопровідною та дистильованою водою.

Таблиця 2.

Режим автоклавування живильних середовищ Об'єму середовища, мл	Час стерилізації (121°C, 1 атм) хв
20-50	15
75	20
150-500	25
1000	30
2000	40

Виконання практичної частини

Для цього використовують різні стерилізуючі речовини (стериліанти), які не проникають у тканину і легко змиваються водою.

Враховуючи, що в природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, їх спор, бактерій, рослинний матеріал попередньо занурюють в 70% етиловий спирт: насіння на 2-3 хв., листки, корені на 0,5-1 хв.

Час стерилізації визначається експериментально і залежить від вибраної стерилізуючої речовини та об'єкту, який підлягає процесу стерилізації. Для видалення із тканин стерилізуючої речовини, проводять промивання експлантату чотири рази з періодом експозиції 15 хвилин. При порушенні такого режиму

відбувається отруєння культури, що призводить до заторможення ростових процесів або повної загибелі рослин.

Стерилізація рослинного матеріалу:

Одержання стерильного (асептичного) рослинного матеріалу - складне завдання, тому що необхідно нейтралізувати мікрофлору, не пошкодивши при цьому рослинну тканину. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини (стериліанти), які не проникають у тканину і легко змиваються водою.

Враховуючи, що в природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, їх спор, бактерій, рослинний матеріал попередньо занурюють в 70% етиловий спирт: насіння на 2-3 хв., листки, корені на 0,5-1 хв.

Для подальшої стерилізації використовують такі препарати:

1. Препарати з активним хлором; 0,5-5% гіпохлорит натрію NaClO ; 9% гіпохлорит кальцію Ca(ClO)_2 ; хлорамін, комерційний препарат "Білизна".
3. 5-20% розчин перекису водню H_2O_2 .
4. 1% бромна вода Br_2 .
5. 0,5-2% азотнокисле срібло AgNO_3 .

Час стерилізації визначається експериментально і залежить від вибраної стерилізуючої речовини та об'єкту, який підлягає процесу стерилізації. Для видалення із тканин стерилізуючої речовини, проводять промивання експлантату чотири рази з періодом експозиції 15 хвилин. При порушенні такого режиму відбувається отруєння культури, що призводить до заторможення ростових процесів або повної загибелі рослин.

Перед відкриванням колби чи пробірки зі стерильним живильним середовищем, їх протирають ватою, змоченою в 96% етиловому спирті, а горловину посудини обпалюють над полум'ям спиртівки. При висадженні експлантатів колбу треба тримати під кутом поблизу полум'я спиртівки. Після закінчення посадки ковпачок із фольги або ватну пробку обпалюють над полум'ям спиртівки і швидко закривають колбу чи пробірку.

Контрольні питання

1. Стерилізація – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці
2. З якою метою проводять стерилізацію живильних середовищ, посуду, інструментів.
3. Що таке термічна стерилізація.
4. Пастеризація як одноразовий короткочасний прогрів матеріалу при певних температурах.
5. Стерилізація сухим жаром.
6. Стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування).
7. Хімічна стерилізація.
8. Стерилізація ультрафіолетовими променями
9. Стерилізація фільтруванням

Розділення рослинного матеріалу на фрагменти (експланти) зручно проводити в низьких чашках Петрі, на стерильних салфетках із фільтрованого паперу.

Спостереження та висновок щодо методів стерилізації та стерилізації рослинного матеріалу: пагони берези, геранії

Підпис викладача

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 3. Стерилізація насіння для отримання стерильних проростків

Мета заняття: Ознайомитись з методами стерилізації живильного рослинного середовища на прикладі насіння сої та зерен пшениці

Матеріали та обладнання: ламінар-бокс, пінцети, розчин стерилізатора ("Білизна"), насіння сої, стерильні: фільтрувальний папір, дистильована вода, лабораторний посуд (чашки Петрі, стакани хімічні), живильні середовища, 70% розчин етанолу.

Об'єкт дослідження: стерилізації живильного рослинного середовища на прикладі насіння сої та зерен пшениці.

Практичне завдання: отримання стерильних проростків сої та зерен пшениці

Виконання практичної частини

1. Готують розчин стерилізатора у співвідношенні: 1 частина "Білизни" і 3 частини стерильної дистильованої води.
2. Насіння сої поміщають в марлевий мішок, попередньо промивши його мильним розчином.
3. Роботу проводять в ламінар-боксі. Соеві боби занурюють в 70% розчин етанолу на 1-2 хв, а потім насіння переносять у склянку із стерилізатором і залишають на 15-20 хвилин. Три рази по 10 хвилин промивають стерильною дистильованою водою, обсушують на фільтрувальному папері і розміщують в чашки Петрі на попередньо простерилізоване в автоклаві живильне середовище.
4. Чашки Петрі закривають і поміщають в термостат для пророщування насіння і отримання стерильних проростків (регульована температура +23 - 25°C, абсолютна темрява) Через 3-4 доби перевіряють чистоту посіву. Результати досліджень заносять в табл.1.

Таблиця 1

Насіння	Концент-рація розчину "Білиз"	Трива-лість сте-рилізації (хв)	Загальна кіль-к насіння	Кількість інфіковано-го насіння через 7 штук, %	Схожість насін-штук, %	Ефективність стерилізації (%)
Насіння сої						

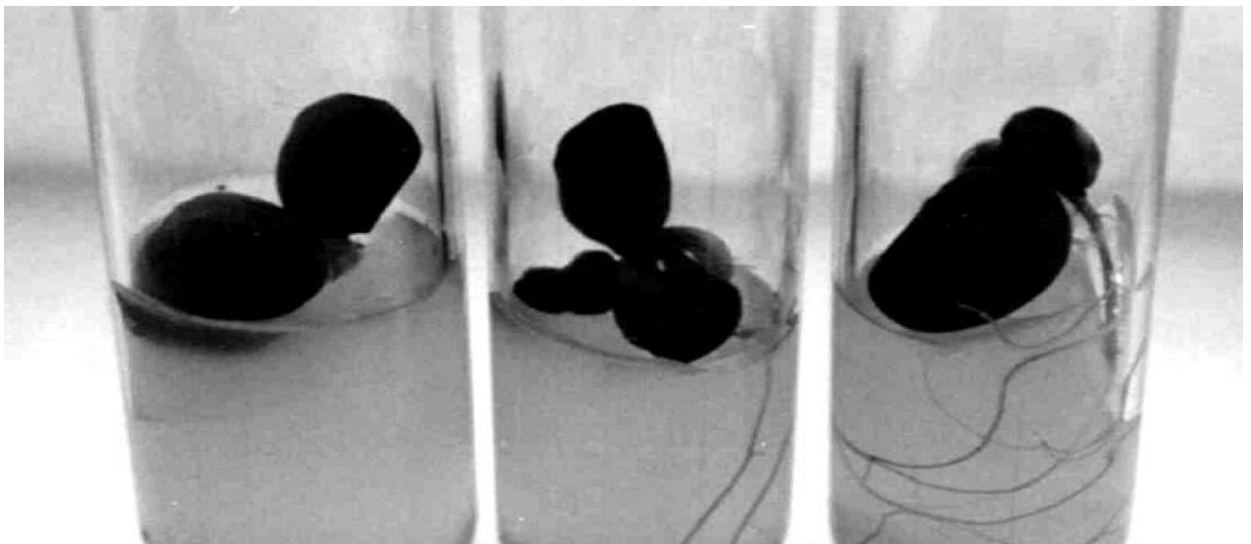


Рис.1. Сім'ядольні листки сої, отримані в культурі *in vitro*

Насіння	Концент-рація розчину "Білизни"	Трива-лість стерилізації (хв)	Загальна кіль-кість насіння	Кількість інфіковано-го насіння через 7 діб штук, %	Схожіст ь насіння штук, %	Ефективніст ь стерилізації (%)
Насіння пшениці						

Контрольні питання:

1. Що являє собою розчин стерилізатора
2. Пояснити роботу в ламінар-боксі.

3. Стерилізація приміщення.
4. Стерилізація ламінар-боксу.
5. Стерилізація інструментів.
6. Стерилізація посуду.
7. Стерилізація живильних середовищ

Висновок. замалювати у зошиті розглянуті сім'ядольні листки сої, та проростки пшениці, отримані в культурі *in vitro*

Підпис викладача

ТЕМА 2. Методи мікроскопічних досліджень мікроорганізмів. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів з різноманітними харчовими потребами. Основні методи фарбування мікроорганізмів.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1. Ознайомлення з методикою приготування барвників і барвних розчинів

Мета заняття: ознайомитись із барвниками і методами приготування їх розчинів

Матеріали та обладнання: штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному живильному середовищі, спиртівка або газова горілка, бактеріологічна петля, предметні скельця, покривні скельця, набір барвників, мікроскоп, серветка, кедрове масло, пінцет, кювета з містком (або кристалізатор з містком), емність з водою, пісочний годинник, олівець для скла (склограф), фільтрувальний папір. Набір готових розчинів барвників: а) основний і кислий фуксин; б) генціанвіолет; в) метиленовий синій; г) сафранін; д) малахітова і діамантова зелень. Спирт – ефір. Метиловий спирт. Таблиці: кокові форми мікробів.

Об'єкт дослідження: барвники, мікробіологічні препарати

Виконання практичної частини

Для вивчення форми мікробної клітини і деяких її структур препарат (мазок) із матеріалу, що містить мікроб, якого вивчають на даний момент, як правило, зафарбовують. Більшість мікробів досить швидко і добре зафарбовуються розчинами анілінових барвників. За хімічними властивостями барвники поділяють на основні і кислі. Хромофором (тобто іоном, який надає забарвлення) основних барвників є катіон, а кислих – аніон.

До основних барвників належать:

1. Червоні: нейтральний червоний;– фуксин основний;– сафранін;– тіонін;– піронін;– гематоксилін.–
2. Сині: – метиленовий синій. 3. Фіолетові: – кристалічний фіолетовий; – метиленовий фіолетовий. 4. Зелені: – малахітовий зелений; – метиленовий зелений. Основні барвники, як правило, легко зв'язуються із ядерними (кислими) компонентами клітин. До кислих барвників належать: 1. Червоні і рожеві: – фуксин кислий; – еозин; – еритрозин. 2. Жовті: – пікринова кислота; – конго; – флуоресцеїн. 3. Чорні: – нігрозин. Кислі барвники інтенсивніше забарвлюють основні компоненти клітин.

Приготування робочих розчинів барвників

Перш ніж приготувати робочі розчини барвників, які призначені для забарвлення мікробів, часто заздалегідь готують насичені спиртові розчини із сухих барвників. Для цього фарбу заливають 96%-ним спиртом у співвідношенні 1:10. При такому співвідношенні спирт насичується барвником 14 (та частина барвника, яка не розчинилась, залишається в осаді). З метою економії рекомендують на 100 мл етанолу брати такі кількості барвників: *метиленового синього – 7,0 г; генціанвіолету – 4,8 г; основного фуксину 8,1 г.*

Для кращого насичення спиртові розчини поміщають в термостат і витримують до повного розчинення барвників. Із насичених спиртових розчинів в міру необхідності готують водні робочі розчини.

Карболовий фуксин (фуксин Циля) а) беруть 100 мл насиченого спиртового розчину основного фуксину і 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Другий розчин, постійно помішуючи, поступово доливають до першого (НЕ НАВПАКИ!!). Після змішування готовий розчин фільтрують через паперовий фільтр і зберігають в склянці із темного скла і добре закупореній; б) 1 г основного кристалічного фуксину, 5 г кристалічного фенолу, декілька крапель гліцерину, 10 мл 96% етанолу, 100 мл дистильованої води. Фуксин і фенол ретельно розтирають в ступці, додаючи по краплях гліцерин.

Після цього, постійно помішуючи, по краплині додають етанол, поступово збільшуючи порції етанолу; після додавання цієї порції етанолу починають доливати воду і перемішують. Розчин в ступці, який отримали, витримують 48 год у термостаті при 37°C до повного розчинення фуксину. Лише після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр. Ця фарба дуже стійка і може зберігатися тривалий час. Фарбу використовують для роботи із мікроорганізмами, які важко зафарбовуються (спорові форми, кислостійкі бактерії).

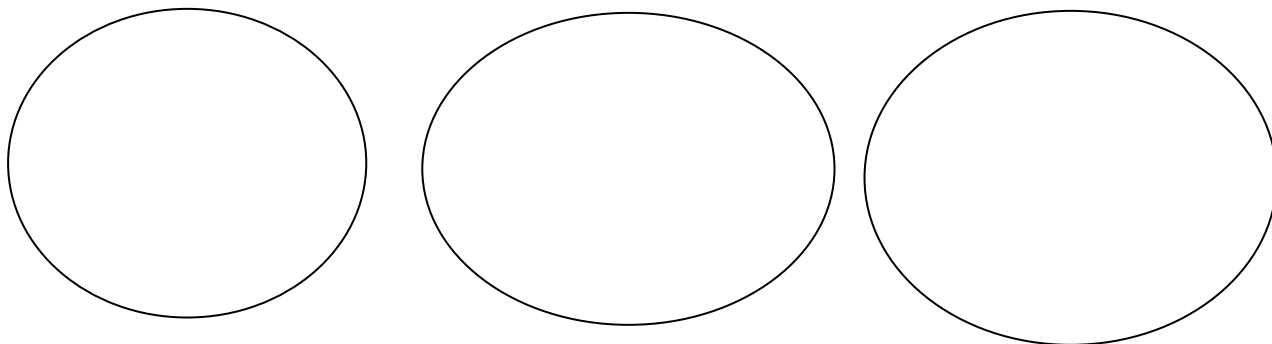
Фуксин Пфейффера Готують із карболового фуксину Циля методом розведення дистильованою водою у співвідношенні 1:10. Розчин нестійкий, під час зберігання знебарвлюється. Саме з цієї причини розчини такого типу готують безпосередньо перед використанням у невеликих кількостях. Метиленовий синій До 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього додають 100 мл дистильованої води та 1 мл 1%-го водного розчину КОН або NaOH. Розчин цього барвника може зберігатися довго; після певної витримки у часі цей розчин фарбує навіть більш ефективно, ніж свіжо виготовлений. Карболовий генціанвіолет До 10 мл насиченого спиртового розчину барвника додають 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Розчин витримують протягом 2–3 днів у термостаті.

Насичений спиртовий розчин метиленової синьки. Метиленової синьки 10 г. Етанол 96° 100 мл. Із даного розчину готують лужну метиленову синьку за Леффлером, яку дуже широко використовують для простого методу забарвлення.

Метиленова синька за Леффлером. Спиртовий розчин метиленової синьки 30 мл. Гідроксид натрію або калію 1 % 1 мл. Дистильована вода 100 мл

Розчин Люголя. Цей розчин не є справжнім барвником. Основна складова його частина – кристалічний йод. Розчин використовується для забарвлення клітин за Грамом. Для приготування розчину 1 г I₂ і 2 г KI розчиняють у 300 мл дистильованої води. Йод погано розчиняється у воді, тому спочатку необхідно розчинити йодистий калій у 5–10 мл води, потім додати кристалічний йод, розчинити його в розчині йодистого калію і лише після цього долити ту дистильовану воду, що залишилась, тобто довести об'єм до 300 мл. Отриманий розчин фільтрують і зберігають у темних (коричневе скло) пляшечках у прохолодному місці. Перевірка якості готових фарб. Розчини фарб, як правило, фільтрують через паперові фільтри. Щоб переконатися, що після фільтрації в розчині немає нерозчинених частинок фарби, декілька крапель цього розчину наливають на предметне скельце. Через 2–3 хв фарбу змивають водою, скло просушують фільтрувальним папером і проглядають під імерсійним об'єктивом.

Висновок: розглянуті препарати замалювати у зошиті.



Підпис викладача _____

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2. Методи мікроскопічних досліджень мікроорганізмів **Приготування бактеріальних препаратів та мазків**

Мета заняття: ознайомитись з методикою приготування бактеріальних препаратів та мазків.

Матеріали та обладнання: штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному живильному середовищі, спиртівка або газова горілка, бактеріологічна петля, предметні скельця, покривні скельця, набір барвників, мікроскоп, серветка, кедрове масло, пінцет, кювета з містком (або кристалізатор з містком), ємність з водою, пісочний годинник, олівець для скла (склограф), фільтрувальний папір. Набір готових розчинів барвників: а) основний і кислий фуксин; б) генціанвіолет; в) метиленовий синій; г) сафранін; д) малахітова і діамантова зелень

Таблиці: кокові форми мікробів.

Об'єкт дослідження: барвники, мікробіологічні препарати

Теоретичний зміст теми

Мікробна клітина – складна жива система, характеризується високим ступенем впорядкованості складових її структур. Кожна структура виконує певне життєве призначення. Взаємодія структур забезпечує існування клітини, її цілісність.

Для вивчення внутрішньої будови клітин застосовують спеціальні методи забарвлення (цитохімічні методи дослідження). Багато з цих методів переслідують діагностичні цілі. За формою клітини мікроорганізми не дуже різноманітні, і в ряді випадків, щоб встановити приналежність мікроба до того чи іншого роду й виду, необхідно провести спеціальне забарвлення тієї чи іншої структури (або речовини, накопичувальної в клітині).

Морфологічні та цитологічні особливості мікроорганізмів можна вивчати, використовуючи різні методи мікроскопії, а також застосовуючи методи диференційного забарвлення. Існує ряд прийомів, які лежать в основі більшості спеціальних методів дослідження морфології й цитології бактеріальних клітин.

Препарати готують, як правило, на предметних скельцях, товщина яких не повинна перевищувати 1,2...1,4 мм. Використання предметних скельць більшої товщини не дозволяє повністю використати числову апертуру системи мікроскопа.

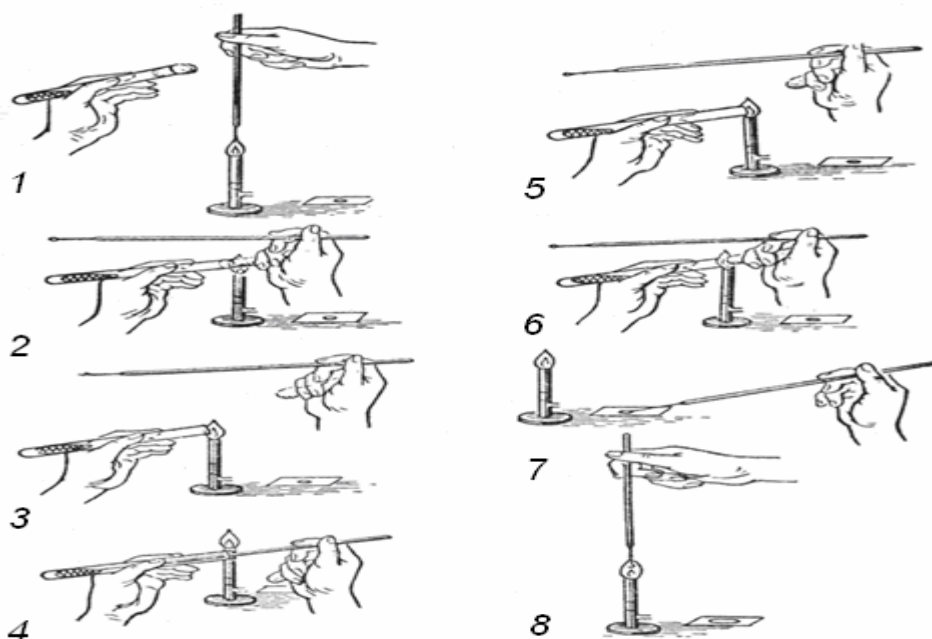
При роботі з покривними скельцями, їх товщина не повинна перевищувати 0,15...0,17 мм. Більш товсті скельця погіршують якість зображення. В мікробіологічній практиці використовують препарати «роздавлена крапля», «висяча крапля», препарат «відбиток» та препарати фіксованих забарвлених клітин. Фіксування дає можливість перервати життєві процеси в об'єкті, зберігши незмінною його структуру. У результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще профарбовуються. Виготовлення *фіксованих* забарвлених препаратів клітин включає ряд послідовних етапів:

1. **Приготування мазка.** На чисте предметне скло, знежирене милом або спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером (знежирення скельць здійснюють удалині від пальників), наносять краплю дистильованої води. Фламованою (прожареної в полум'ї пальника) бактеріологічною петлею чи голкою з пробірки з культурою, тримаючи її в лівій руці в горизонтальному положенні поблизу пальника, беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю. Отриману суспензію рівномірно розтирають петлею на площі 2...4 см². Мазок повинен бути тоненьким, рівномірним за товщиною, овальним за формою. Висушування мазка.

2. Мазок висушують за кімнатної температури на повітрі або у теплому повітрі над запаленою спиртівкою, не допускаючи перегрівання. Фіксація мазка передбачає декілька моментів: убити (знешкодити) клітини мікроорганізмів; забезпечити краще прилипання клітин до скла; зробити мазок більш сприйнятливими до барвників.

3. Найбільш розповсюдженим методом фіксації є термічна обробка. З цією метою препарат

тричі проводять через полум'я пальника, тримаючи скло мазком вгору. Мазок не треба перегрівати, оскільки при цьому відбуваються грубі зміни клітинних структур, а інколи їх



морфології. Для вивчення тонкої будови клітини використовують фіксацію хімічними рідинами.

Рис. 1. Схема послідовності відбору проби та виготовлення мікроскопічного препарату

Виконання практичної частини

Практичне завдання. 1. Приготувати фіксовані препарати *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* тощо (приготовлених з кисломолочних продуктів). Фіксовані мазки зафарбувати метиленовим синім (3 хв.), промити, просушити, розглянути з імерсією ($\times 90$).

2. Розглянути капсули бактерій *Leuconostoc mezenteroides* або *Azotobacter chroococcum* у показових препаратах.

Препарат-мазок для зафарбовування готується у декілька етапів: 1. Виготовлення препарату. 2. Висушування мазка. 3. Фіксація мазка. 4. Зафарбовування мазка. Для виготовлення препарату використовують предметні скельця – тонкі 26 мм із відшліфованими боками та покривні скельця товщиною 0,15–0,17 мм і 24 мм. \times 20 мм.

Скельця повинні бути чистими, знежиреними і завчасно підготовленими. Якщо скельце добре знежирене, то крапля води рівномірно розтікається на його поверхні, не утворюючи випуклих ділянок.

Методи очищення скельця. 1. Якщо скельце було у вжитку, то його витримують у концентрованій H_2SO_4 протягом 1–2 год, потім промивають водою, кип'ятять у 2%-му розчині соди (Na_2CO_3) або мильній воді, ретельно ополіскують водою і протирають м'якою чистою тканиною. 16 2. Предметні і покривні скельця обробляють гарячим (80–90°C) 10%-ним розчином NaOH або KOH протягом 5–10 хв, потім ополіскують водою, переносять в 96%-ний етанол і зберігають у ньому до використання. 3. Нові скельця промивають у воді, потім у суміші спирту з ефіром (1:1). Оброблені предметні скельця зберігають у банці з притертим корком у сухому вигляді, в спирті або спиртово-ефірній суміші.

Покривні скельця обробляють спиртом, витирають чистою тканиною і зберігають у коробці або бюксі. Чисті скельця беруть лише пінцетом, оскільки пальці залишають на них жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчиннику, їх перед використанням висушують фільтрувальним папером і трішки обпалюють на полум'ї горілки чи спиртівки. Під час тривалого використання скельця втрачають прозорість і стають непридатними. Виготовлення препарату мазка. Препарат-мазок готують за допомогою бактеріологічних петель або пастерівських піпеток. Бактеріологічну петлю готують із платинового або ніхромового дроту довжиною 5–7 см і товщиною 0,5 мм із привареною до нього скляною ручкою або вставляють у металеву ручку – петлетримач. Такий дріт легко стерилізується на полум'ї і швидко охолоджується. Для виготовлення препарату-мазка культуру мікроба, яка досліджується, обережно розподіляють рівномірним тонким шаром на предметному скельці.

Підготовка предметних скельць Препарати готують на предметних скельцях, які повинні мати товщину не більше 1,2 – 1,4мм. Застосування товстіших скельць не дозволяє одержати різке зображення країв діафрагми освітлювача в площині препарата, так як воно попадає в товщу скла, що порушує фокусування конденсора і різко знижує чіткість зображення. Для бактеріологічних досліджень необхідно використовувати чисті, добре знежирені скельця. Нові скельця промивають водою, витирають насухо і зберігають у склянках із спиртом або спиртом-ефіром (порівну). Скельця, що використовувалися, витримують 1 – 2 години в концентрованій сірчаній кислоті або сірчано-хромовій суміші, а потім промивають водою, кип'ячать в мильній воді, промивають водою, ополіскують дистильованою водою, висушують в сушильній шафі.

Скельця із рідин дістають пінцетом. Перед використанням їх, проводять через полум'я вогню. При роботі скельця беруть тільки з боків. **Приготування мазків.** Мазок готують на предметному склі із допомогою бактеріологічної петлі або пастерівської піпетки. Бактеріологічну петлю виготовляють із платиного дроту завдовжки 50 – 90 мм, вставляють у спеціальний тримач з рукояткою.

Вищезгадані інструменти в роботі тримають трьома пальцями – як олівець. Робочі частини – петлю або голку – перед взяттям матеріалу обпалюють у полум'ї вогню у вертикальному положенні. Мазки виготовляють із культур мікробів, тканин, крові, і т.д. При виготовленні мазків із мікробних культур беруть у ліву руку пробірку з культурами так, щоб дно її було назвни, а корок, що її закриває, був усередині.

Пробірку фіксують у долоні під кутом 45⁰, притискуючи її великим пальцем. В праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і фламбірують її в полум'ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискують ватний корок до долоні, виймають його з пробірки і тримають так під час послідуєчих маніпуляцій. Відкритий край пробірки обпалюють над полум'ям вогню і після цього вводять в пробірку стерильну петлю, охолоджують і набирають невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату. Горлишко пробірки після взяття матеріалу знову обпалюють в полум'ї спиртівки, потім обпалюють ватний корок і закривають ним пробірку.

Взятий таким чином матеріал наносять на предметне скельце і рівномірно розподіляють по поверхні тонким шаром у вигляді мазка, а петлю знову розжарюють. Щоб отримати мазок менш густий, спочатку готують суспензію культури на запасному склі, а з неї готують мазок.

Якщо мазок готується із культур, що вирости, на щільних живильних середовищах, то попередньо на центр предметного скельця наносять краплю води або фізрозчину, петлею вносять дослідний матеріал і розподіляють його на предметному склі так, щоб отримати рівномірний мазок площею 1-1,5 см². Якщо дослідний матеріал рідина, то попередньо краплю води або фізрозчину не наносять. Мазок висушують на повітрі або ж в струмені теплого повітря над полум'ям спиртівки і фіксують. Мазки повинні бути тонкими, висушеними на повітрі і зафіксованими.

При приготуванні мазків із дуже дрібних колоній, їх беруть нікельованою голкою злегка зігнутою на кінці. Кінчиком голки обережно забирають з центра колонії бактерійну масу і суспендують у фізрозчині, а потім з неї петлею роблять мазок. Для фіксації бактерійних клітин на поверхні предметного скла останнє протягом 3-5 сек. декілька разів проводять крізь полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале нагрівання скла недопустимо, так як при цьому настає деформація бактерій. Фіксація мазків хімічним способом.

1. Приготувати фіксовані препарати *Lactobacterium delbruckii* (приготовлених з кисломолочних продуктів). Фіксовані мазки зафарбувати метиленовим синім (3 хв.), промити, просушити, розглянути з імерсією (×90).

Молочнокислі бактерії *Lactobacterium delbruckii* – довжина 2...7 мкм, товщина 0,5...0,8 мкм. Зустрічаються поодинокі чи короткими ланцюжками. Нерухомі, грампозитивні, гомоферментативні (основним і майже єдиним продуктом метаболізму яких є молочна кислота). Оптимальна температура розвитку 45...50°C.

Їх застосовують як компонент хлібних заквасок, у виробництві молочної кислоти. Широко використовуються в харчовій промисловості й інші **Електронна мікроскопія *Lactobacterium delbruckii***

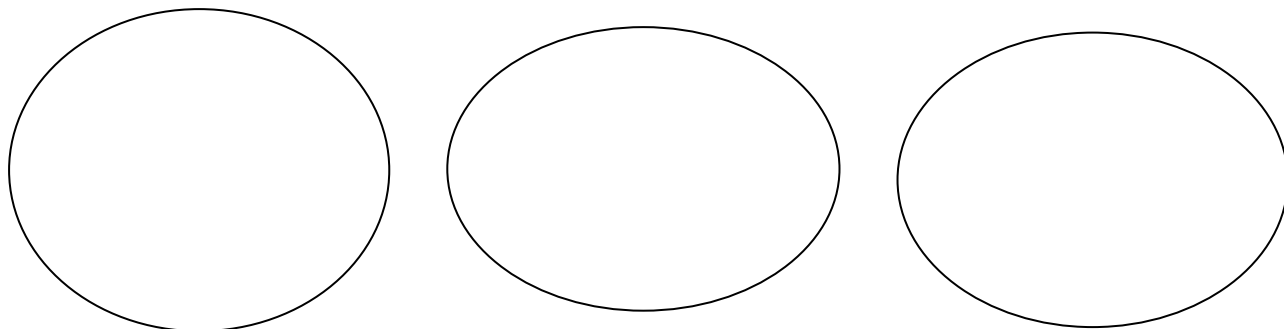
види гомоферментативних молочнокислих бактерій: *Lactobacterium casei* (для готування сиру), *L. plantarum* (силосування і квашення), *L. bulgaricum* і *L. acidophilum*

Контрольні питання :

1. Як обробляють предметні і покривні скельця?

2. Виготовлення мазка для фарбування.
3. Як підготувати бактеріологічну петлю?
4. Із яких етапів складається процес виготовлення мазка?
5. З якою метою і як фіксують мазки?

Висновок: розглянуті препарати замалювати у зошиті.



Підпис викладача _____

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 3. Ознайомитись з методикою простого та складного методу фарбування мазків

Мета заняття: Ознайомитись з простим методом фарбування мазків Приготувати, зафарбувати, провести мікроскопію і замалювати препарати із різних культур

Матеріали та обладнання: штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному і рідкому живильному середовищі, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарбників, змивні чашки, предметні скельця, олівці або чорнила по склу, анатомічні пінцети, спиртівки, мікроскопи,; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; кедрова олія; набір реактивів для фарбування за Грамом (водний фуксин, розчин Люголя, спирт 960, генціан-віолет); фільтрувальний папір, промивалки; стерильна вода; предметні скельця, спиртівки, імерсійна олія.

Об'єкт дослідження: мікробіологічні препарати

Теоретичний зміст теми

Розрізняють прості і складні методи фарбування. Фарбування простим методом полягає в тому, що препарат фарбують однією фарбою: водним фуксином (1-2 хв.), метиленою синькою (3-5 хв.) та інші.

В основі фарбування лежить фізико-хімічний процес, при якому проходить адсорбція фарби мікробною клітиною. Комплекс із мікроба і фарб є досить стійким і не піддається вимиванню водою. Чим вище концентрація фарби, тим вище швидкість адсорбції. Після фарбування залишки фарби змивають і мазок висушують фільтрувальним папером. При неповному висушуванні залишки вологи з імерсійною олією утворюють непрозору емульсію, яка погіршує зображення. Простим методом бактерії фарбуються в один колір рівномірно, і інколи появляється зернистість, а також метахромазія (розчеплення тону кольору). Цей метод розробив Кристіан Грам у 1884 р. Серед складних методів фарбування він є найбільш універсальним. Він має важливе диференціально-діагностичне значення, оскільки допомагає визначати таксономічне положення тих чіинших бактерій. Особливості забарвлення за методом Грама дозволяють поділити всі мікроорганізми на дві групи: грампозитивні та грамнегативні, хоча в практиці трапляються випадки, коли одні й ті ж бактерії характеризують як грамваріабельні. Принцип методу

полягає в тому, що клітини грампозитивних мікробів здатні утворювати міцну сполуку з генціанвіолетом та йодом, яка не вимивається з бактерій спиртом, отже, вони забарвлюються в темно-фіолетовий колір. У грамнегативних бактерій цей комплекс вимивається спиртом, тому вони потім забарвлюються фуксином у червоний колір.

Неоднакове відношення мікроорганізмів до фарбування за Грамом пов'язано з розбіжностями в структурі і хімічному складі клітинної стінки бактерій.

У *грампозитивних* бактерій клітинна стінка складається з пептидоглікану муреїну (60...90%), розташованого у кілька шарів; білку (близько 1%) і ліпідів (близько 1%); товщина її складає 15...80 нм. Виявлено полімери особливого типу – тейхоеві кислоти, ковалентно зв'язані з пептидогліканом. Великий вміст пептидоглікану і особливість його розташування у вигляді комірок забезпечує при фарбуванні за Грамом утворення комплексу з генціановим фіолетовим і йодом. Утворений комплекс є стійким до спирту, унаслідок чого бактерії забарвлені в синьо-фіолетовий колір.

Товщина клітинної стінки *грамнегативних* бактерій 10...15 нм, але структура її значно складніша, ніж у грампозитивних. Основу її складають орієнтовані внутрішні ліпіди (10...20%), що з розташованими на поверхні полісахаридами утворюють ліпополісахаридний шар. На поверхні клітинної стінки мозаїчно розташовані білки і полісахариди. Пептидоглікан являє собою один шар товщиною всього 2...3 нм (близько 5...10%), лежить під ліпополісахаридним шаром і щільно покриває протопласт. Через великий вміст ліпідів і тонкий, не комірчастий моношар мурену клітинна стінка грамнегативних бактерій при фарбуванні за Грамом утворює з генціановим фіолетовим і йодом комплекс, що руйнується при обробці спиртом, унаслідок чого клітини знебарвлюються.

До грампозитивних мікроорганізмів належать коки, бацили (спороутворювальні палички), актиноміцети, мікобактерії, клостридіальні бактерії (у молодому віці).

До грамнегативних мікроорганізмів належать: бактерії (аспорогенні палички, наприклад *E.coli*), спірили, сальмонели, псевдомонади, азотобактер, вібріони.

Існують грамваріабельні мікроорганізми, відношення яких до фарбування за Грамом змінюється на певних етапах їх життєвого циклу. Оскільки здатність клітин забарвлюватися за Грамом залежить від віку культури, для фарбування за Грамом використовують клітини молодого культури, найчастіше однієї доби.

Грампозитивні мікроби забарвлюються в темно-фіолетовий, майже чорний колір, грамнегативні – в рожево-червоний. Довідка. Кулясті форми мікробів (коки) в основному фарбуються за Грамом позитивно, звивисті – негативно. Серед паличкоподібних форм мікробів зустрічаються як грам позитивні, так і грам негативні (палички, які утворюють спори, зафарбовуються, як правило, позитивно

Виконання практичної частини

А. Метод звичайного зафарбовування. Для зафарбовування використовують, як правило, який-небудь розчин для забарвлення, найчастіше – фуксин Пфейффера або метиленовий синій. Методика зафарбовування: на фіксований препарат піпеткою наносять декілька крапель забарвлюючого розчину так, щоб покрити всю поверхню мазка: фуксин Пфейффера на 1–2 хв, метиленовий синій – на 3–5 хв. Після цього фарбу змивають водою, а мазок просушують між листами фільтрувального паперу або на повітрі.

Б. Складні методи зафарбовування. Ці методи використовують з метою діагностики, для виявлення відмінних структур мікробів у тих випадках, коли мікроби не зафарбовуються простим методом.

Техніка фарбування бактерій за Грамом.

Для фарбування за Грамом студенти готують мазок із суміші мікробів (*Vac. megaterium* і *E. coli*) або прокислого тива (плівка на поверхні тива – оцтовокислі бактерії, внизу розміщуються дріжджі). На склі культуру змішують, мазок висушують, фіксують і фарбують за Грамом. Кишечна паличка і оцтовокислі бактерії – грамнегативні; капуста бацила і дріжджі – грампозитивні.

1. На знежирене спиртом чи ацетоном предметне скло нанести три тонких мазки різних культур мікроорганізмів (два з них з відомим наперед відношенням до *фарбування за Грамом*). Мазки висушити, зафіксувати над полум'ям.

2. Препарат накрити смужкою фільтрувального паперу, змоченого 1% спиртовим розчином генціану фіолетового. Нанести на нього кілька крапель води. Витримати препарат під барвником 2 хв.

3. Зняти смужку фільтрувального паперу пінцетом і, не промиваючи препарат, залити його розчином Люголя (J2 в KJ) до повного почорніння. Скло у цьому та інших випадках краще тримати в нахиленому положенні.
4. Препарат, не промиваючи водою, занурюють у склянку з 96% етиловим спиртом на 30-60 сек. Увага! Слід ретельно дотримуватись вказаного часу, оскільки при недостатній витримці препарату у розчиннику грамнегативні бактерії можуть продемонструвати позитивний ефект, і навпаки – при збільшенні часу обробки етиловим спиртом – барвник може бути вимитий із грампозитивних бактерій.
5. Промити препарат водою і знебарвлені мазки зафарбувати додатково водним розчином фуксину (2 хв). Фарбу злити, ретельно промити препарат водою і висушити.
6. Розглянути постійний препарат в імерсійній системі мікроскопа.



Рис.1 Препарати бактерій, зафарбовані за Грамом:

а – грам(+) бактерії, б – грам (-) бактерії; в – фіолетові грам(+)та рожеві грам (-) бактерії, зафарбовані у спільному мазку.

Фарбування капсул

Найчастіше для виявлення капсул застосовують спосіб негативного контрастування за допомогою рідкої туші (рис. 2).

1. Негативне контрастування можна комбінувати з прижиттєвим фарбуванням клітин. Для цього краплю досліджуваної суспензії бактерій поміщають у краплю розведеного розчину фуксину, потім змішують із краплею туші, накривають покривним склом і мікроскопіюють із сухим об'єктивом.
 2. Краплю бактеріальної суспензії вносять у краплю карболового фуксину і залишають на 3...5 хв. Додають 1 краплю туші і витримують хвилину. Потім готують мазок, висушують на повітрі і мікроскопіюють з імерсією.
3. У поле зору загальний фон чорний, бактеріальні клітини – червоні, а капсули – безбарвні.

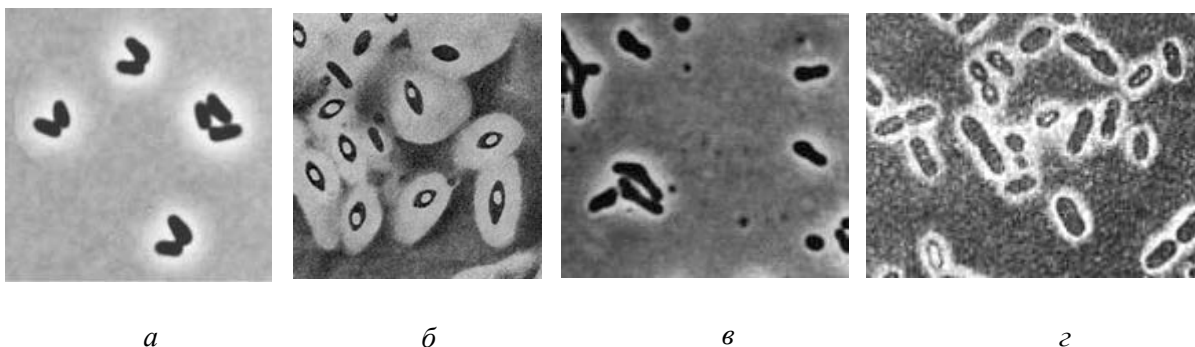


Рис. 2. Негативне контрастування капсульних форм бактерій: а – роду *Corynebacterium*, б – роду *Clostridium*, в – роду *Arthrobacter*, з – роду *Azotobacter*

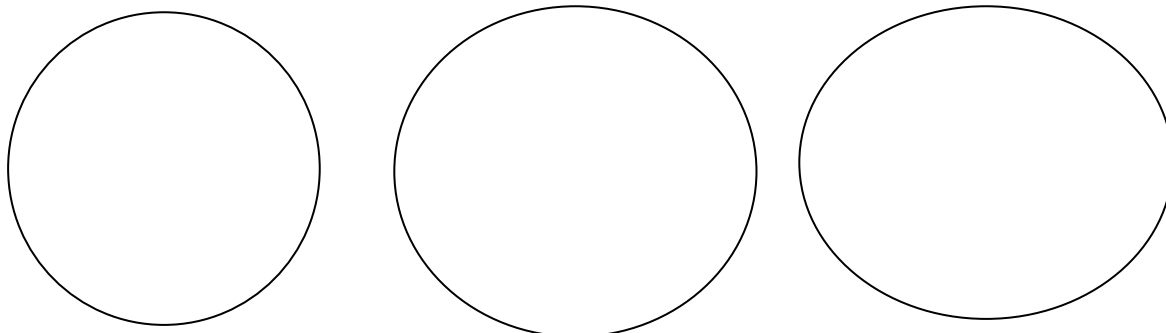
Контрольні питання:

1. Які фарби використовуються в мікробіологічній практиці?
2. Структура, хімічний склад та функції клітинної стінки бактерій.
3. Методика фарбування мікробів за Грамом.
4. Чим відрізняються прості та складні методи фарбування бактерій?
5. Які методи існують для фарбування органел бактеріальної клітини: клітинної оболонки,

цитоплазми, нуклеоїду, включень, спор, капсул, джгутиків?

6. У чому полягає відмінність між грам(+) та грам(-) бактеріями?

Висновок: розглянуті препарати простим та складним методом фарбування, замалювати у зошиті.



Підпис викладача _____

ДАТА _____

ЗАНЯТТЯ 4. Приготування маточних розчинів для середовища Мурасіге і Скуга

Мета заняття: Приготувати маточні розчини мікро-, макросолей, вітамінів, регуляторів росту, Fe-хелату та живильні середовища Мурасіге-Скуга, для подальшого культивування на них ізольованих тканин, клітин та органів рослин.

Матеріали та обладнання: NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, спирт, 1N HCl і 1N KOH, ваги, магнітний змішувач, плитка, лопатки (шпателі), лабораторний посуд - стакан або колба об'ємом 1 л, мірні циліндри 500 мл, 100 мл, мірні піпетки - 5 мл, 1 мл, пляшки з темного скла - 1 л, 100 мл, 50 мл, 25 мл. Для розчинів макросолей і вітамінів бажано стерильний посуд

Об'єкт дослідження: живильне середовище Мурасіге і Скуга

Виконання практичної частини

Живильне середовище - основний фактор успішного культивування ізольованих органів, тканин і клітин рослин. Середовища по консистенції бувають тверді або агаризовані і рідкі в залежності від мети досліджень. Для приготування твердих живильних середовищ використовують агар-агар – полісахарид, який отримують із морських водоростей.

Таблиця 1. Склад деяких живильних середовищ (концентрація речовин в г/л)

Компоненти	Мурасіге-Скуга (МС)	Гамборга	Уайта	Міллера
Макросолі:	1650	-	-	10000

NH ₄ NO ₃				
KNO ₃	1900	2500	80	10000
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	150	-	-
MgSO ₄ •7H ₂ O	370	250	360	350
KH ₂ PO ₄	170	-	-	3000
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	-	150	16,5	-
(NH) ₃ SO ₄	-	134	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	200	3470
KCl	-	65		650
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
Мікросолі: H ₃ BC	6,2	3,0	1,5	16,0
MnSO ₄ •4H ₂ O	22,3	10,0	4,5	44,0
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,025	0,025	-	-
ZnSO ₄ •7H ₂ O	8,6	2,0	1,5	15,0
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,25	0,25	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,8
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,025	0,025	-	-
FeSO ₄ •7H ₂ O	28	28	28	17,8
Na ₂ EDTO•2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,2
Вітаміни: B1	0,1	10	0,1	-
B6	0,5	1,0		0,1
PP	0,5	1,0		0,5
Сахароза	30000	20000		20000
Агар	0,8 %	0,8 %		0,8 %
pH	5,6-5,8	5,5	5,6-5,8	5,6-5,8

Желатинові середовища непридатні для культури тканин, оскільки желатина є токсичною для рослинних тканин. Основними компонентами живильних середовищ є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), джерело вуглеводневого живлення (зазвичай сахароза або глюкоза), вітаміни і регулятори росту. Іноді до живильних середовищ включають комплексні органічні добавки (гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, кокосове молоко, ендосперм кукурудзи, екстракти із різних органів рослин тощо). Живильні середовища готують на дистильованій або бідистильованій воді.

Середовище Мурасіге і Скуга – найбільш універсальне і багатоцільове середовище, яке сприйнятливим для рослинних клітин багатьох видів рослин.

Дає позитивні результати при калусоутворенні та підтриманні неорганізованого калусного росту клітин і викликає індукцію морфогенезу у більшості дводольних видів рослин.

Середовище Гамборга і Евеленга (середовище В-5) - використовується при культивуванні клітин і тканин бобових рослин і злаків.

Середовище Уайта – слугує для укорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації.

Середовище Нічей та китайські середовища – рекомендують для індукції андрогенезу в культурі пиляків, а також для індукції морфогенезу у злаків.

Середовище Као і Михайлюка – для культивування одиничних (або з малою густиною висіву) ізольованих протопластів і клітин.

Виконання практичної частини

1. Приготувати розчини макро- і мікросолей.

Маточні розчини макросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні, а маточні розчини мікроелементів – у концентраціях у 100 разів більших.

Макро МС - 1 л розчину солей; по 100 мл розчину солей на 1 л середовища.

NH ₄ NO ₃	16,5 г
KNO ₃	19,0 г
CaCl ₂	3,3 г
Mg SO ₄ •7H ₂ O	4,2 г
KH ₂ PO ₄	1,7 г

Мікро МС - 100 мл розчину солей; по 1 мл розчину солей на 1 л середовища.

H ₃ BO ₃	620 мг
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23 г
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	860 мг
KI	83 мг <i>розчиняти окремо</i>
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 мг <i>розчиняти окремо</i>
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 мг
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5 мг

2. Приготувати розчин Fe-хелат.

100 мл розчину; по 5 мл на 1 л середовища.

FeSO₄·7H₂O 557 мг

Na₂EDTA·2H₂O 745 мг

Наважки розчинити окремо у бідистиляті, злити і довести до кипіння.

3. Приготувати розчини фітогормонів: 2,4-Д і кінетин.

Розчини фітогормонів готують таким чином: цитокиніни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють у невеликій кількості 1N розчину луку або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) - у краплі етанолу, підігріваять і додають відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді.

Концентрація 1 мг/мл.

4. Приготувати розчини вітамінів В₁, В₆ і РР. Розчиняти у бідистильованій воді.

Для приготування 1 л середовища Мурасиге і Скуга (МС) необхідно взяти:

1. Макро МС 100 мл
2. Мікро МС 1 мл
3. Fe-хелат 5 мл
4. В₁ 1 мг
5. В₆ 1 мг
6. РР 0,5 мг
7. мезо-інозит 100 мг
8. сахароза 30 г (3%)
9. агар 7 г

1. Для приготування 1 л середовища МС колбу або стакан (1 л) помістити на магнітний змішувач, налити 250-300 мл бідистиляту і додати точно відмірену кількість розчинів макро- і мікросолей, Fe-хелат, вітамінів і фітогормонів, якщо останні входять до складу середовища.

2. Зважити потрібну кількість мезо-інозиту, сахарози і органічних добавок, якщо вони входять до складу середовища. Кожну наважку розчинити у окремій порції бідистильованої води.

3. Довести рН до 5,6-5,8 за допомогою 1N КОН або 1N НСІ.

4. Наважку агару помістити у термостійку колбу або стакан, залити холодною бідистильованою водою (300-400 мл), залишити на 20 хв. для набухання і нагріти, постійно помішуючи до повного розчинення агару.

При приготуванні рідкого середовища агар не додається.

5. Додати розчинений агар до розчину 1 і довести до потрібного об'єму бідистильованою водою. Розчин і воду підігріти.

6. Розлити тепле середовище у колби або пробірки і закрити ватними пробками або фольгою.

У колби наливаємо середовище до 1/2-2/3 об'єму.

7. Простерилізувати середовище в автоклаві при тиску 0,8-1 атм (температура 115-120⁰С) 20-25 хв залежно від об'єму (табл. 2).

Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві варто повільно зменшувати тиск в апараті і відкривати кришку тільки після того, як внутрішній тиск буде дорівнювати зовнішньому (на манометрі стрілка буде на 0). Інакше, через різку зміну тиску може статися змочування середовищем пробок і навіть їх виштовхування.

Схема приготування живильного середовища:

1. Наважку агару переносять в термостійку склянку, заливають половинним об'ємом (від об'єму середовища) бідистильованої або дистильованої води, залишають для набухання на 20 хвилин і нагрівають на електроплитці до 80-100⁰С.

2. В мірний циліндр наливають 100-150 мл бідистильованої або дистильованої води, додають точно відмірену кількість розчинів макро- і мікроелементів, вітамінів, сахарозу та інші складові частини середовища.

3. Додають раніше приготовлений розчин агар-агару.
4. Середовище доводять до потрібного об'єму бідистилятом (дистилятом)
5. Доводять рН середовища до потрібного значення, використовуючи розчин 1N KOH.
6. Розливають тепле середовище у колби Ерленмейєра або біологічні пробірки до 1/2-2/3 об'єму, закривають фольгою або ватними пробками.
7. Середовища стерилізують автоклавуванням протягом 20-25 хв. при тиску 1 атм.
8. При використанні термолабільних компонентів, їх стерилізують фільтруванням через мембранні фільтри (холодна стерилізація).

Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві треба повільно зменшувати тиск в апараті і відкривати кришку тільки після того, як внутрішній тиск буде дорівнювати зовнішньому (на манометрі стрілка буде на 0). Інакше, через різку зміну тиску може статися змочування середовищем пробок і навіть їх виштовхування.

Контрольні питання:

1. Що таке живильне середовище
 2. Види живильних середовищ
 3. Хімічний склад живильних середовищ.
 4. Використання живильного середовища *Мурасиге і Скуга*.
- Перевага живильного середовища *Мурасиге і Скуга*

Висновок:

Підпис викладача

ТЕМА 3. Морфологічні та культуральні ознаки бактерій. Класифікація бактерій за морфологічними ознаками. Правила роботи з культурами мікроорганізмів.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1 Ознайомлення з морфологією та культуральними ознаками бактерій

Мета заняття: ознайомитись з будовою бактеріальної клітини, класифікацією та культуральними ознаками бактерій, опанувати методи мікроскопічних досліджень мікроорганізмів, зокрема приготування фіксованих препаратів та препаратів живих клітин.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покрівні скельця; бактеріологічні петлі; спиртівки; крапельниці з дистильованою водою; фільтрувальний папір; імерсійна олія; набір барвників, досліджувані мікробні культури.

Теоретичний зміст теми

Більшість бактерій – одноклітинні істоти кулястої, паличкоподібної чи звивистої форми, що розмножуються поперечним поділом клітини в більшості випадків на дві рівні частини. Як правило, поділ відбувається шляхом утворення перегородки. У багатьох бактерій клітини після поділу розходяться, у деяких – залишаються разом. Деякі бактерії розмножуються перешнуровуванням, рідко брунькуванням. Серед бактерій є невелика кількість нитчастих форм.

Всі структурні елементи бактеріальної клітини поділяються на *постійні* (цитоплазматична мембрана, рибосоми, нуклеоїд, цитоплазма, деякою мірою, клітинна стінка, запасні поживні речовини) та *тимчасові* або *необов'язкові* (джгутик, пілі, капсула, плазміда, різновиди мембран (фотосинтетичні, азотофіксувальні, мезосоми тощо) (рис. 1).

Класифікація кокових бактерій за морфологічними ознаками

Коки мають форму кулі, діаметр якого коливається від 1 до 2,5 мкм. Під впливом різних факторів середовища коки можуть набувати овальну, сплюснену чи еліптичну форму. За взаємним розташуванням клітин, що залежить від способу поділу, їх підрозділяють на групи.

1. Монококи або мікрококи (рід *Micrococcus*) – поодинокі коки (рис. 9а).
2. Диплококи (рід *Diplococcus*) – коки, що поділяються в одній площині й утворюють пари клітин, більшість їх – патогенні (рис. 9б).
3. Стрептококи (рід *Streptococcus*) – поділяються також в одній площині, але клітини не відокремлюються одна від одної і утворюють ланцюжки (рис. 9д).
4. Тетракоки – поділяються в двох взаємно перпендикулярних площинах і утворюють групи з чотирьох клітин (рис. 9в).
5. Сарцини (рід *Sarcina*) – поділяються в трьох взаємно перпендикулярних площинах і утворюють скупчення (пакети) кубічної форми (рис. 9г).
6. Стафілококи (рід *Staphylococcus*) – поділяються безладно в декількох площинах, утворюють скупчення, що нагадують за формою гроно винограду (рис. 9е).

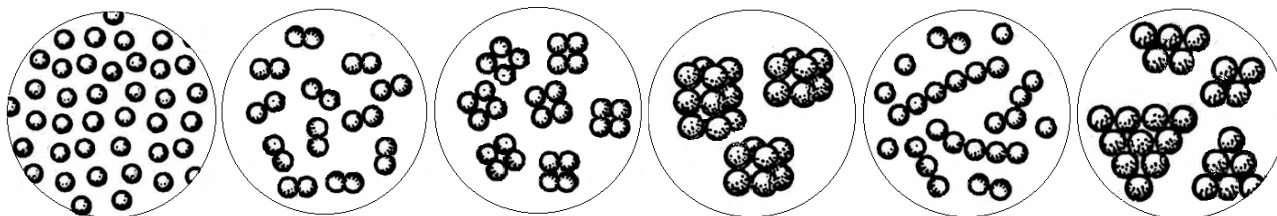


Рис. 1 Форми кокових бактерій:

а – мікрококи, б – диплококи, в – тетракоки, г – сарцини, д – стрептококи, е – стафілококи.

Коки в основному нерухливі, не утворюють спор, грампозитивні.

До *культуральних* (макроморфологічних) особливостей відносять характер росту мікроорганізмів на рідких та твердих поживних середовищах. На поверхні щільного поживного середовища мікроорганізми можуть рости у вигляді окремих колоній, суцільно за штрихом та газonom. *Колонія* – це ізольоване скупчення клітин одного виду, які вирости, як правило, з однієї клітини. Залежної від того, де розвинулись клітини розрізняють: поверхневі, глибинні та донні колонії. Колонії, що розвинулись на поверхні відрізняються великою різноманітністю.

У процесі їх опису враховують наступні ознаки:

- форму колоній – кругла, амебоподібна, неправильна, ризоїдна тощо;
- розмір (діаметр) колонії, який вимірюють у мм;
- поверхню колонії – гладенька, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, із концентричними кільцями тощо;
- профіль колонії – плоский, випуклий, кратероподібний, конусоподібний тощо;
- блискучість та прозорість – колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора;
- колір колонії – незабарвлені (колонії брудно-білого кольору відносять до незабарвлених) або пігментовані: білі, жовті, золотисті, оранжеві, бузкові, червоні, чорні. Особливо звертають увагу на виділення пігменту у середовище.
- край колонії – рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчастий та інші; структуру колонії – однорідна, дрібно- або великозернисті, волокнисті та інші. Край та структуру колонії визначають за допомогою лупи; консистенцію колонії визначають під час торкання до її поверхні петлею. Колонія може легко відокремлюватися від середовища або вrostати в агаризоване середовище, бутитвердою, м'якою, слизуватою, тягучою, крихкою. Розміри та деякі інші особливості колоній мікроорганізмів змінюються

віком, залежать від складу середовища та температури вирощування, тому, при описанні колонії, вказують ці критерії.

Ріст у рідкому поживному середовищі більш одноманітний і супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки або осаду. При цьому відмічають ступінь помутніння (слабка, помірна або сильна), особливості плівки (тонка, щільна або рихла, гладенька або складчаста), а при утворенні осаду вказують – бідний він чи суттєвий, щільний, рихлий, слизоподібний або пластівцевий

Мікрококи або **монококи** (рис. 1а) є стійкими мікроорганізмами, добре розвиваються у широкому діапазоні температур (22...40°C) за найрізноманітніших умов: у молочних продуктах, у ґрунті, пилу, розсолах, морській воді і багатьох не занадто кислих харчових продуктах. Більшість є сапрофітами. Майже усі види на твердих середовищах утворюють колонії маслянистої консистенції, забарвлені у білий чи жовтий колір. Зустрічаються також різні відтінки від червоного до жовтогарячого.

Мікрококи в природі зустрічаються у вигляді поодиноких клітин (*Micrococcus agilis*).

Диплококи – подвійні коки (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Azotobacter chroococum*).

Тетракоки – угруповання чотирьох коків (*Tetracoccus casei*, *Tetracoccus mycodermitis*, *Pediococcus acidilactici*).

Стрептококи – бактерії, які внаслідок поділу клітин у одній площині утворюють різної довжини ланцюжки (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus mutans*).

Стафілококи – скупчення коків у вигляді грон винограду (*Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*).

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

Всі коки за винятком *Streptococcus lactis* зручно мікроскопіювати за допомогою фіксованих та забарвлених фуксином препаратів.

Найрізноманітнішою та найчисельнішою групою бактерій є **паличкоподібні (циліндричні)** форми. Їх поділяють на дві групи: бактерії – нездатні до спороутворення палички (*Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*, *Acetobacter aceti*) і бацили – палички, які утворюють ендоспори (*Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tetani*).

Бактерії та бацили можуть утворювати угруповання клітин у вигляді диплобактерій (диплобацил) та стрептобактерій (стрептобацил) – **нитчасті форми**. У деяких бактерій ланцюжки однакових клітин можуть бути вкриті спільною оболонкою (піхвою) і утворювати трихом (*Thiotryx 20 nivea*, *nivea*, *Beggiatoa alba*, *Beggiatoa gigantea*). Нитчасті форми розповсюджені в намулах, ґрунті і водоймах, особливо з високим вмістом заліза. У водоймах найчастіше зустрічається залізобактерії роду *Leptothrix*, які окислюють закисні форми заліза в окисні. При цьому накопичується гідроксид заліза, який надає бактеріям жовтувато-бурого забарвлення.

Beggiatoa alba, *Beggiatoa gigantea*). Нитчасті форми розповсюджені в намулах, ґрунті і водоймах, особливо з високим вмістом заліза. У водоймах найчастіше зустрічається залізобактерії роду *Leptothrix*, які окислюють закисні форми заліза в окисні. При цьому накопичується гідроксид заліза, який надає бактеріям жовтувато-бурого забарвлення.

Виконання практичної частини

Виготовлення фіксованих забарвлених препаратів клітин включає ряд послідовних етапів:

1. Приготування мазка. На чисте предметне скло, знежирене милом або спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером (знежирення скелець здійснюють удалині від пальників), наносять краплю дистильованої води. Фламованою (прожареною в полум'ї пальника) бактеріологічною петлею чи голкою з пробірки з культурою, тримаючи її в лівій руці в горизонтальному положенні поблизу пальника, беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю. Отриману суспензію рівномірно розтирають петлею на площі 2...4 см². Мазок повинен бути тоньким, рівномірним за товщиною, овальним за формою.

2. Висушування мазка. Мазок висушують за кімнатної температури на повітрі або у теплом повітрі над запаленою спиртівкою, не допускаючи перегрівання.

3. Фіксація мазка передбачає декілька моментів: убити (знешкодити) клітини мікроорганізмів; забезпечити краще прилипання клітин до скла; зробити мазок більш сприйнятливим до барвників. Найбільш розповсюдженим методом фіксації є термічна обробка. З цією метою препарат тричі проводять через полум'я пальника, тримаючи скло мазком вгору. Мазок не треба перегрівати, оскільки при цьому відбуваються грубі зміни клітинних структур, а інколи їх морфології. Для вивчення тонкої

будови клітини використовують фіксацію хімічними рідинами.

Фарбування. Розрізняють прості й диференційні методи забарвлення мікробних клітин. При простому фарбуванні забарвлюється вся клітина, добре видно її форма й розміри. Методи диференційного фарбування передбачають виявлення деяких клітинних структур (запасні речовини, включення, спори...). Для простого фарбування використовують якийсь один барвник (генціановий фіолетовий, метиленовий синій, фуксин). Для цього фіксований препарат кладуть на паралельні скляні рейки (місток) над кристалізатором (кюветою) і заливають препарат фарбою на 0,5...3 хв. (рис. 2). Після закінчення фарбування препарат промивають водою до тих пір, поки вода не стане безкольоровою. Потім препарат висушують на повітрі, наносять на мазок краплю імерсійної рідини і мікроскопіюють. Після розгляду препаратів фронтальну лінзу об'єктива необхідно протерти.

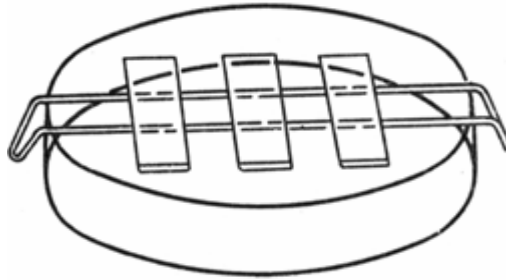


Рис. 2. Місток з паралельними рейками для фарбування препарату.

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» бактерій: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*. Мікроорганізми розглянути у живому вигляді.

2. Приготувати фіксовані препарати *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* тощо (приготовлених з кисломолочних продуктів). Фіксовані мазки зафарбувати метиленовим синім (3 хв.), промити, просушити, розглянути з імерсією (□90).

3. Розглянути капсули бактерій *Leuconostoc mezenteroides* або *Azotobacter chroococcum* у показових препаратах.

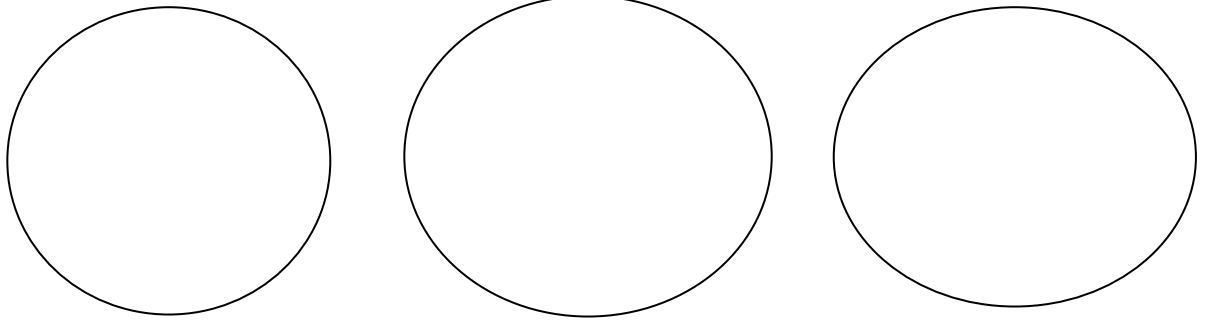
1. Висновок до роботи представити у вигляді таблиці морфологічних ознак та практичного значення розглянутих на лабораторному занятті бактерій:

Рід та в бактері	Форм кліти	Розміри, μ	Характер з'єднаннякл	Забарвлення Грамом	Наявність капсул	Рухл -віст	Практич значенн

Контрольні питання

1. Дайте характеристику будови бактеріальної клітини. Назвіть постійні та тимчасові (необов'язкові) частини клітини. Охарактеризуйте особливості їх хімічного складу та виконувані функції.
2. Наведіть класифікацію кокових бактерій за морфологічними ознаками. Дайте характеристику різних морфологічних груп кокових бактерій. Наведіть приклади практичного використання кокових бактерій.
3. Назвіть послідовність операцій з відбору проби та виготовлення мікроскопічного препарату клітин мікроорганізмів. Які вимоги при цьому повинні дотримуватися?
4. Зазначте порядок операцій приготування фіксованого мікроскопічного препарату «мазок».
5. Поясніть термін «культуральні» або «макроморфологічні» особливості мікроорганізму.
6. Які ознаки враховують у процесі опису колоній мікроорганізмів?

Замалювати приклад постійних препаратів кокових бактерій *Micrococcus agilis*



Висновок:

_____ Підпис викладача _____

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2. Морфологічні та культуральні ознаки паличкоподібних бактерій і актиноміцетів

Мета заняття: ознайомитись з класифікацією та культуральними ознаками паличкоподібних бактерій та актиноміцетів, опанувати методи мікроскопічних досліджень мікроорганізмів, зокрема приготування препаратів «відбиток» та

«висяча крапля».

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покрівні скельця; предметні скельця з лунками для приготування препарату «висяча крапля», бактеріологічні петлі; скальпелі, спиртівки; крапельниці з дистильованою водою; фільтрувальний папір; імерсійна олія; набір барвників, досліджувані мікробні культури.

Теоретичний зміст теми

Класифікація паличкоподібних бактерій за морфологічними ознаками

Паличкоподібні бактерії являють собою циліндричні клітини, довжина яких у середньому 2...6 мкм, іноді 10...12 мкм. Довжина клітин того самого виду варіює залежно від віку культури й умов вирощування: складу середовища, рН, інтенсивності аерації, температури й інших факторів. Ширина клітин є більш стійкою ознакою і коливається у межах 0,5...1 мкм.

Палички можуть бути з'єднані попарно чи в ланцюжки та поділяються на дві групи:

- 1) Аспорогенні палички (*Bacterium*) – не утворюють спор, їх називають просто бактеріями.
- 2) Спорогенні палички (*Bacillus* та *Clostridium*) – утворюють спори. Тіспорогенні палички, що живуть в аеробних умовах і утворюють спори, діаметр яких менший за поперечник клітини, називають *бацилами* (рис. 1. *a*, *б*). Спорогенні анаеробні палички, які утворюють спори, діаметр яких більший за поперечник клітини, називають *кlostридіями* (рис. 1 *в* – *е*). Спора може розміщуватися у центрі клітини (рис. 1 *a*, *в*), термінально – у кінці (рис. 18 *б*, *д*, *е*) та субтермінально – ближче до кінця клітини (рис. 1 *г*).



Рис. 1. Розміщення ендоспор у бактеріальній клітині: центрально: *a* – *Bacillus megatherium*, *в* – *Clostridium butyricum*; термінально: *б* – *B. thuringiensis*, *д* – *C. polymyxa*; *е* – *C. tetani*; субтермінально: *г* – *Clostridium botulinum*

Бактеріальні спори утворюються за несприятливих умов існування (висушуванні, дефіциті поживних речовин та ін.). Спора має підвищену стійкість, оскільки має міцну багаточарову оболонку, дипіколінат кальцію, який зумовлює термостійкість, низький вміст води та повільні процеси метаболізму. За сприятливих умов спори проростають, проходячи три послідовні стадії: активацію, ініціацію, проростання. Всередині бактеріальної клітини утворюється лише одна спора (ендоспора). Утворення спор сприяє збереженню виду і не являється способом розмноження, на відміну від спор грибів.

Бактеріальні спори утворюються за несприятливих умов існування (висушуванні, дефіциті поживних речовин та ін.). Спора має підвищену стійкість, оскільки має міцну багаточарову оболонку, дипіколінат кальцію, який зумовлює термостійкість, низький вміст води та повільні процеси метаболізму. За сприятливих умов спори проростають, проходячи три послідовні стадії: активацію, ініціацію, проростання. Всередині бактеріальної клітини утворюється лише одна спора (ендоспора). Утворення спор сприяє збереженню виду і не являється способом розмноження, на відміну від спор грибів.

Аспорогенні палички

Молочнокислі бактерії *Lactobacterium delbruckii* – довжина 2...7 мкм, товщина 0,5...0,8 мкм. Зустрічаються поодинокі чи короткими ланцюжками. Нерухомі, грампозитивні, гомоферментативні (основним і майже єдиним продуктом метаболізму яких є молочна кислота). Оптимальна температура розвитку 45...50°C. Їх застосовують як компонент хлібних.

До бактерій належить велика група мікроорганізмів, клітини яких здатні гілкуватися, це *актиноміцети* (у прямому перекладі з лат. «променисті гриби»). Нитчастим формам і актиноміцетам властиві більш складні способи розмноження, ніж іншим бактеріям. Як і всі бактерії, актиноміцети містять у складі клітинної стінки пептидоглікан муреїн, не мають диференційованого ядра, ширина клітин (0,5...1,5 мкм) подібна з бактеріальними. Подібність із грибами виявляється в здатності клітин гілкуватися у вигляді міцелію й утворювати на кінцях гіф спори, що є для ряду родів актиноміцетів основним способом розмноження.

Нижчі форми **актиноміцетів** — проактиноміцети і корінеформні бактерії включають такі роди як *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* та ін. Це одноклітинні форми, у яких спостерігається тенденція до утворення міцелію чи клітин з мінливою неправильною формою у молодих культурах. З віком клітини більшості видів розпадаються на кокоподібні або овальні форми. Плеоморфізм (морфологічне різноманіття) характерний для усіх видів, розмноження відбувається шляхом поділу клітин, фрагментації міцелію чи утворення спор.

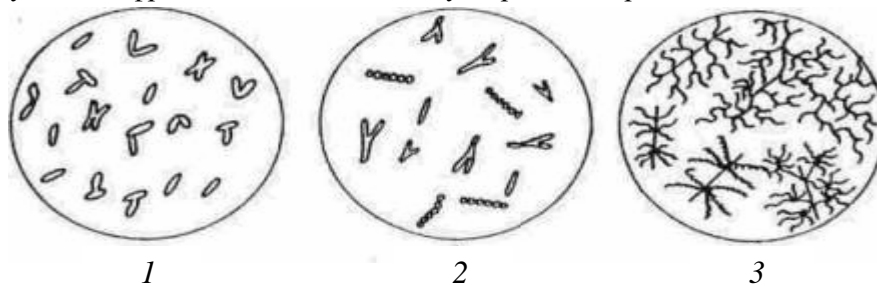


Рис. 2. Актиноміцети: 1 - корінебактерії; 2 - мікобактерії; 3 - стрептоміцети

Справжні актиноміцети або еуактиноміцети поєднуються в кілька родів. Один з них – рід *Streptomyces*. Ці мікроорганізми утворюють сильно розгалужений міцелій, що не має поперечних перегородок, він частково вростає в поживне середовище, утворює щільний субстратний міцелій, що важко відокремлюється бактеріологічною петлею. Над поверхнею субстрату утворюється повітряний міцелій. Є особливі повітряні гіфи (спорофори), від яких відшнуровуються спори, що служать для поширення виду. Будова цих спорофор (прямі, хвилясті, спіральні, зібрані в пучки, мутовчасті тощо) служить однією з систематичних ознак стрептоміцетів. Спори стрептоміцетів чутливі до нагрівання, однак у сухому стані можуть тривалий час зберігати життєздатність. Міцелій у справжніх актиноміцетів зберігається протягом усього життєвого циклу, розчленовування з віком на коки і палички не спостерігається. Більшість стрептоміцетів утворює пігменти, що забарвлюють колонії в різні кольори, часто пігменти виділяються в середовище.

Практичне застосування актиноміцетів. Багато видів роду *Corynebacterium* є продуцентами амінокислот. Більшість стрептоміцетів продукує біологічно активні речовини з антибіотичними властивостями, деякі з цих речовин знайшли застосування в медицині: стрептоміцин (*Streptomyces griseus*), новоміцини (*Streptomyces fradiae*), канаміцин (*Streptomyces kanamyceticus*) тетрацикліни (*Streptomyces aureofaciens*), гентаміцин (*Micromonospora purpurea*), еритроміцин (*Saccharopolispora erythraea*) тощо.

Мікроскопічні дослідження актиноміцетів. Культури стрептоміцетів, вирощені на поживному середовищі на чашках Петрі, вивчають безпосередньо на чашці за малого збільшення (об'єктив 8×), встановлюючи відкриту чашку на предметний столик бінокулярного мікроскопу. При цьому можна бачити, що гіфи міцелію частково вростають в субстрат, частково стеляться по поверхні і піднімаються над нею. Проглядаються спорофори із спорами. Для вивчення типу спороутворення, форми і розміру спор готують препарат «відбиток».

Виконання практичної частини

Приготування мікроскопічного препарату «відбиток»

З агаризованого середовища, на якому вирости суцільним газonom (або окремими колоніями) мікроорганізми, вирізають невеличкий кубик і переносять його на предметне скло так, щоб поверхня з мікроорганізмами була зверху. Потім до газону легенько прижимають покривне (або предметне) скло, яке знімають так, щоб не зрушити його у бік. Отриманий препарат поміщають відбитком униз у краплю води або барвника метиленового синього на предметне скло і розглядають.

Приготування мікроскопічного препарату «вісяча крапля»

Краплю суспензії мікроорганізмів петлею наносять на покривне скло (рис. 28), зверху притискають спеціальне предметне скло з лункою у центрі і перевертають. Крапля повинна вільно висіти над лункою, не торкаючись її країв. Краї лунки попередньо змазують вазеліном – крапля герметизована у вологій камері, що дозволяє тривале спостереження за об'єктом.

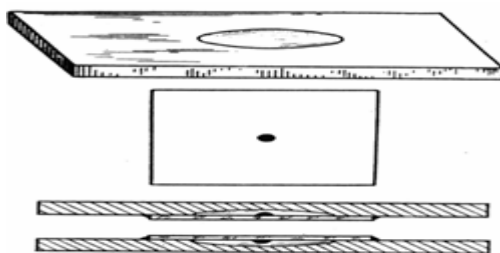


Рис. 3. Виготовлення препарату «вісяча крапля»

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» паличкоподібних бактерій та бацил: *Bacillus subtilis- mesentericum*, *Escherichia coli*, використовуючи прижиттєве (вітальне) фарбування, розглянути (□40, □90) і замалювати.
2. Приготувати препарат «вісяча крапля» клостридій *Clostridium butyricum* в живому вигляді, розглянути (□40, □90) і замалювати, відзначити рухливість мікроорганізмів.
3. Приготувати препарат «відбиток» актиноміцетів *Actynomyces aureofaciens*.

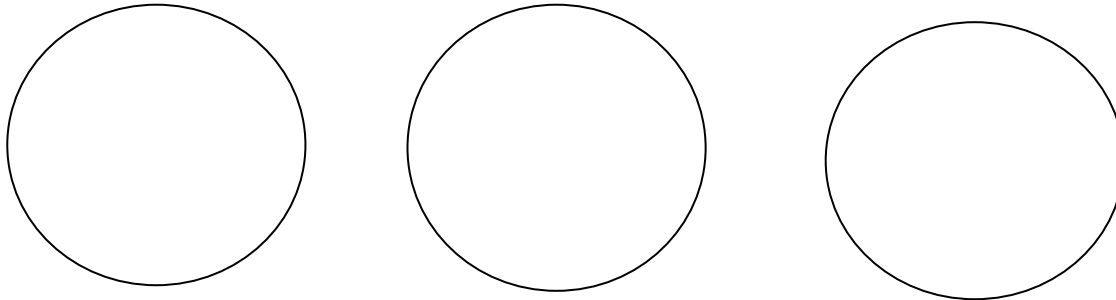
Висновок до роботи представити у вигляді таблиці морфологічних ознак та практичного значення розглянутих на лабораторному занятті бактерій:

Рід та вид бактерії	Форма клі	Розміри, мк	Характер з'єднанн клітин	Забарвлен за Грамом	Наявність капсул	Рухли-ві	Практичн значен

Контрольні питання

1. На які групи поділяються паличкоподібні бактерії за морфологічними ознаками?

2. Наведіть особливості морфології та зазначте практичне значення бактерій: *Lactobacillus acidophylus*, *Bacillus subtilis-mesentericus*, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*, *Corynebacterium sp.*
3. Які типи рухливості бактерій відомі?
4. Охарактеризуйте джгутики бактерій: їх будову, розміри, розташування.
5. Дайте характеристику актиноміцетів як особливої групи бактерій.
6. Для чого в мікробіологічній практиці використовують препарати «висяча крапля» та «відбиток»? Як приготувати ці препарати?



Висновок:

_____ Підпис викладача _____

ТЕМА 4 . Морфологічні та культуральні властивості міцеліальних грибів
Морфологія живих та фіксованих препаратів цвільових та дріжджових грибів.
Мікроскопічні дослідження представника роду *Mucor*.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1 Ознайомлення з морфологією та культуральними ознаками цвільових та дріжджових грибів.

Мета заняття: ознайомитись з будовою мікроміцетів, опанувати методи мікроскопічних досліджень мікроскопічних грибів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покрівні скельця; мікробіологічні голки; спиртівки; крапельниці з дистильованою водою; фільтрувальний папір; досліджувані мікробні культури, засоби захисту органів дихання (маски).

Теоретичний зміст теми

Будова міцеліальних грибів

Гриби – це еукаріотичні організми, не мають хлорофілу, гетеротрофи.

Серед грибів зустрічаються одноклітинні, нитчасті та міцеліальні форми.

Більшість грибів – ценоцитні організми з вегетативною структурою, яка має назву *міцелій*. Міцелій складається з багатоядерної маси цитоплазми, що наповнює сильно розгалужену систему твердих трубочок приблизно однакової товщини (~5...15 мкм та більше) – *гіфів*. Як правило міцелій утворюється

шляхом проростання і розростання одиночної репродуктивної клітини – спори. Грибна спора проростає у вигляді довгої нитки – гіфа, що росте, багаторазово гілкується й утворює цілу систему ниток, тобто міцелій. Ріст грибів здійснюється за рахунок кінчиків гіф і може продовжуватися доти, доки вистачає поживних речовин.

Міцелій *нижчих грибів* – є несептованим (не має поперечних перетинок); міцелій *вищих грибів* є септованим (має перетинки або перетяжки). Гриби можуть розмножуватися вегетативним, безстатевим і статевим шляхом. Гриби поширені в природі повсюдно. Спори грибів виявляються в будь-яких екосистемах, техногенних потоках і продуктах. Найбільша кількість грибів зустрічається в ґрунті. Вони беруть активну участь у біогеохімічному циклі перетворень вуглецю та інших біогенних елементів у природі і належать як до зимогенної, так і до автохтонної мікрофлори.

Серед великої розмаїтості грибів, що пристосувалися до життя в ґрунті, є невелика група водних грибів, а також досить велика група паразитичних грибів, що викликають захворювання людини, тварин і рослин (мікози).

Гриби здатні виділяти у зовнішнє середовище ферменти й абсорбційним шляхом поглинають поживні речовини, продукти ферментативного гідролізу природних біополімерів та інших розчинних речовин. Такий тип живлення визначає положення ґрунтових грибів як найбільшу екологічну групу, що бере участь у мінералізації органічних речовин у екосистемах.

Морфологія цвільових грибів

Гриби відносяться до еукаріотів. Їх тіло складається із міцелію чи грибниці – сплетення тонких галузистих гіфів, за допомогою яких гриби прикріплюються до субстрату.

Зигоміцети – нижчі гриби, мають добре розвинений галузистий одноклітинний міцелій. Розмножуються як статевим шляхом, так і безстатевим, тобто за допомогою спор (рис. 1). Представник класу – мукор (*Mucor mucedo*,



Mucor plumbeus) розвивається у вигляді білого чи сірого нальоту на продуктах рослинного походження.

Рис.1 Представник класу – мукор (*Mucor mucedo*, розглянутий під мікроскопом)

Міцелій мукових грибів пронизує субстрат і частково стелиться по його поверхні. Догори від нього відходять особливі повітряні гіфи – спорангієносці, на кінцях яких утворюються спорагії. Спорагії відокремлюються від спорангієносців перетинкою, і в них безстатевим шляхом утворюються чисельні спорангіоспори – ендоспори

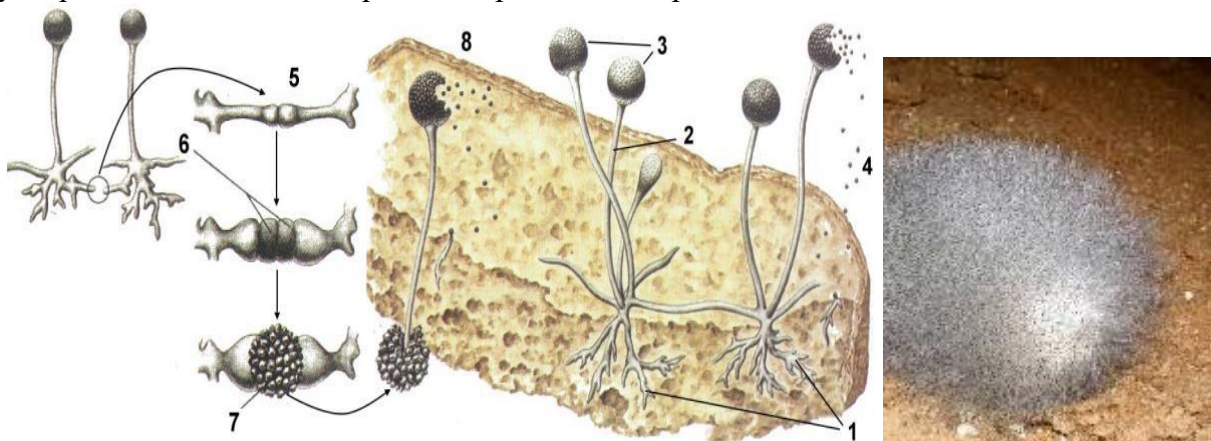


Рис.2. Мукор: А – схема розмноження, Б – зовнішній вигляд

1 – міцелій гриба; 2 – спорангієносці; 3 – спорагії; 4 – спори безстатевого спороношення; 5 – утворення гаметангіїв; 6 – відокремлення гаметангії мукора; 7 – багатоядерна зигота; 8 – спори статевого спороношення

Аскоміцети (сумчасті гриби) гриби з багатоклітинним або членистим міцелієм, які утворюють спори в сумках – асках. Вони включають представників еуаскоміцетів (справжні аскоміцети), у яких

сумки зі спорами утворюються в результаті статевого процесу на поверхні або всередині плодових тіл, сформованих переплетенням гіфів міцелію і геміаскоміцетів, у яких плодові тіла відсутні. До геміаскоміцетів відносяться більшість дріжджів, зокрема пекарські (рис. 3).

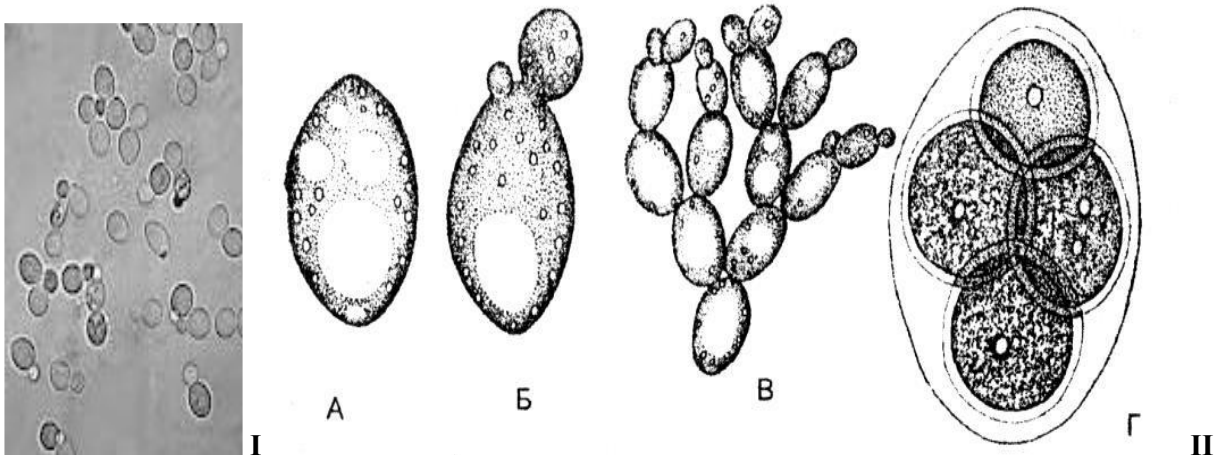


Рис. 3. Дріжджові гриби *Saccharomyces cerevisiae*: I – фото під мікроскопом, II – схематичне зображення. А – вегетативна клітина; Б – клітина, що брунькується; В – псевдоміцелій; Г – аск з аскоспорами

Еуаскоміцети включають два важливих роди ґрунтових грибів *Penicillium* і *Aspergillus* (*Penicilium chrysogenum*, *Aspergillus niger*). Пеніцили і аспергіли мають добре розвинений багатоклітинний міцелій. Розмножуються конідіальними спорами (конідіоспорами) (рис.4). Зустрічаються у вигляді нальоту блакитного, зеленого, сірого, рідше інших кольорів на продуктах рослинного походження. Поширені у верхніх шарах ґрунту.

Несправжні гриби мають багатоклітинний міцелій, але у них немає статевого процесу і досконалої стадії спороношення. Розмножуються безстатевим шляхом за допомогою конідій чи вегетативно – ділянками гіфів. У природі широко розповсюджені представники родів *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Зустрічаються на рослинних рештках, плодах, насінні і в ґрунті

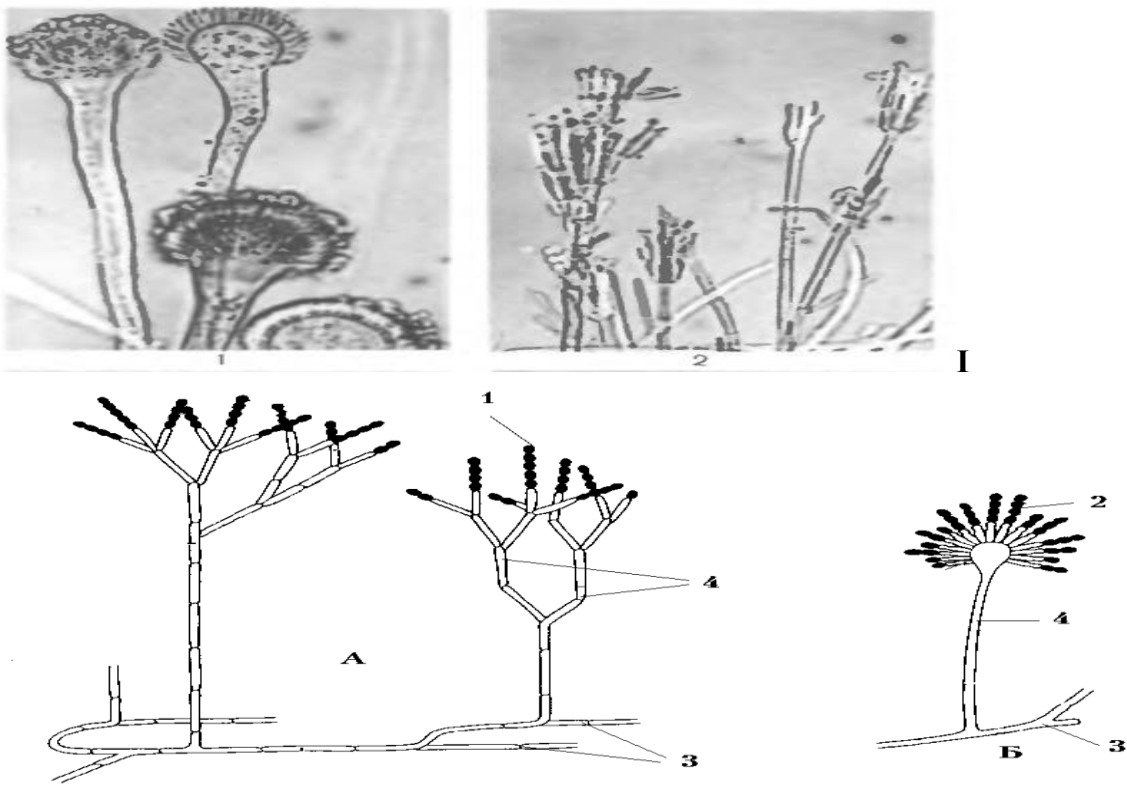


Рис. 4. Еуаскоміцети: I – фото під мікроскопом (1 – аспергил, 2 - пеніцил); II – схематичне зображення (А – пеніцил, Б – аспергил). 1 – конідії у вигляді китиці, 2- ланцюжки конідій, 3 – міцелій, 4 –

конідиєносці

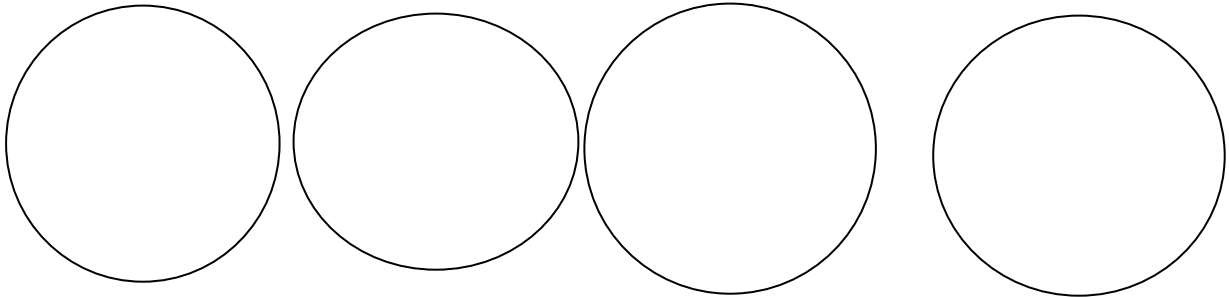
Виконання практичної частини

Виготовити і розглянути під мікроскопом препарат представника роду *Mucor*.

1. Для розгляду слід обережно взяти препарувальною голкою найбільшу кількість міцелію і другою голкою зняти його на сухе предметне скло.
2. Препарат спочатку розглядають без покривного скла при малому збільшенні мікроскопа. Видно спорангієносці і круглі темні кульки на їх кінцях – спорангії. Переважно вони вкриті тонкими кришталіками оксалату кальцію.
3. Потім на поверхню препарату наносять краплю води, накривають його покривним склом. Оболонка спорангію при цьому руйнується і спори вивільнюються.
4. Препарат розглядають послідовно при малих і великих збільшеннях

Контрольні питання:

1. Пояснити будову гриба
2. Будова *зигоміцети*
3. Будова міцелію мукових грибів
4. Будова спорангії
5. Будова *аскоміцети*.
6. Будова бактерій паличкоподібної форми (циліндричні)
7. Будова бактерій нитчастої форми



Висновок. На основі отриманої інформації замалювати у зошиті розглянуту будову цвільового гриба представника роду *Mucor* під мікроскопом

____ Підпис викладача _____

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2. Розглянути морфологію пекарських дріжджів

Мета заняття: ознайомитися з виготовленням живого препарату “роздушена крапля” та з виготовленням фіксованого забарвленого препарату пекарських дріжджів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметові та накривні скельця; бактеріологічні петлі; скляні палички; пальники; препарувальні голки; кедрова олія; культури мікроскопічних грибів, барвники: метиленовий синій та фуксин нейтральний.

Об’єкт дослідження: культури пекарських дріжджів.

Виконання практичної частини

1) Виготовлення живого препарату “роздушена крапля”

Цей метод використовують для виявлення рухливості клітин, спостереження за розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо. У цьому випадку можна проводити “вітальне” (прижиттєве)

фарбування. Можливі барвники – метиленовий синій, нейтральний червоний (0,001-0,0001%). Характерною ознакою живих клітин є те, що барвники не зафарбовують внутрішній вміст клітини.

Практичне завдання: Розглянути морфологію пекарських дріжджів.

готують мазки з культур на щільному і рідкому середовищі, проводять фарбування фіксованих мазків простими методами. Усі препарати замальовуються

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.

2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.

3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.

4. Розглянути препарат при збільшенні 40×. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на покривне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

2) Виготовлення фіксованого забарвленого препарату

Фіксація це обробка мікроорганізмів, яка дає можливість швидко припинити перебіг життєвих процесів, зберігаючи при цьому тонку структуру клітини. Внаслідок фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще фарбуються. Фіксація є обов'язковою при роботі з патогенними мікробами (для безпеки).

Виконання практичної частини : Розглянути морфологію забарвлених метиленовим синім та фуксином препаратів пекарських дріжджів.

1. Чисте знежирене предметне скло провести через верхню частину полум'я пальника.

2. На середину скла за допомогою скляної палички нанести краплю води.

3. Профламованою петлею чи піпеткою внести в неї досліджувану культуру мікроорганізмів і розподілити рівномірно на площі 1-4 см².

4. Препарат висушити, тримаючи скло високо над полум'ям.

5. Зафіксувати препарат, тобто вбити мікроорганізми і забезпечити їх прилипання до поверхні скла. Для цього скло з препаратом провести тричі через верхню частину полум'я пальника (термічна фіксація). Можна фіксувати висушені на повітрі препарати, обробляючи їх метиловим чи етиловим спиртом, сумішшю Нікіфорова, ацетоном (хімічна фіксація).

6. Фіксований препарат залити кількома краплями барвника (фуксин, метиловий синій). Розподілити барвник по всій поверхні мазка. Фарбувати препарат фуксином протягом 1-2 хв, метиленовою синькою – 3-5 хв. Потім фарбу злити, препарат добре промити дистильованою водою.

7. Скло з країв протерти серветкою, препарат висушити. Нанести на сухий препарат краплю кедрової олії чи гліцерину і розглядати препарат під мікроскопом (об'єктив 90х).

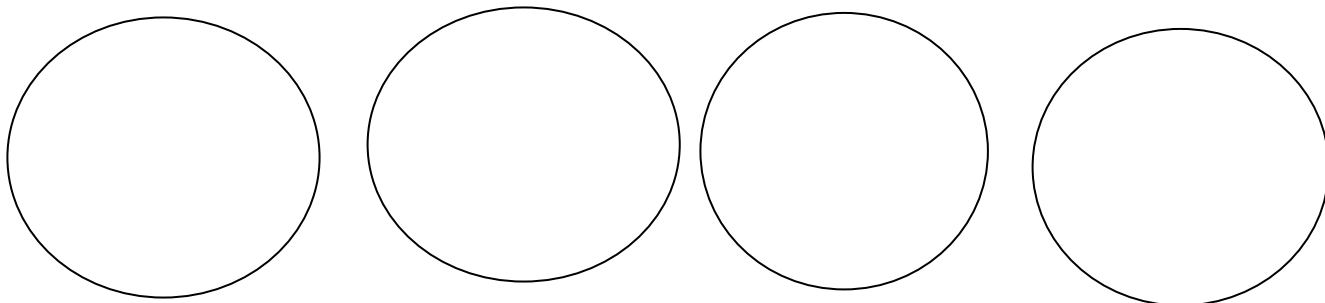
Контрольні питання:

1. Що таке живий препарат пекарських дріжджів?

2. Які барвники використовуються?

3. Як виготовляється фіксований забарвлений препарат?

4. Термічна фіксація забарвленого препарату.



Висновок: розглянуті препарати замальовати у зошиті.

Підпис _____ викладача _____

ТЕМА 5. Особливості морфології рослинних і тваринних клітин. Ультраструктура та методи мікроскопічних і мікрохімічних досліджень клітин рослин і тварин.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1 Ознайомитись з ультраструктурою та методами мікроскопічних і мікрохімічних досліджень клітин рослин та тварин, що належать до різних тканин.

Мета роботи: ознайомитись з ультраструктурою рослинних та тваринних клітин, що належать до різних тканин; засвоїти поняття про клітинну інженерію; опанувати методи мікроскопічних та мікрохімічних досліджень клітин рослин та тварин.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покрівні скельця; крапельниці з дистильованою водою; скальпелі; 1 %-й розчин хлорного заліза, 1 %-вий розчин йоду у йодистому калію; 66,5 %-ва сірчана кислота; 1-й розчин (1 частина солянокислого фенілгідразину і 10 частин гліцерину); 2-й розчин (1 частина оцтовокислого натрію і 10 частин гліцерину); насичений водний розчин їдкого калію, постійні мікропрепарати: "Точка росту", "Кінчик кореня цибулі (*Allium cepa*)"

Об'єкт дослідження фіксовані та постійні препарати тваринних клітин у т.ч. клітин крові кренеплід моркви, цибуля, зелене листя.

**Теоретичний зміст теми
Ультраструктура рослинної клітини**

Тонка структура клітини, яка виявляється за допомогою електронної мікроскопії, має назву ультраструктура. На рис. 1 представлено ультраструктуру узагальненої рослинної клітини.

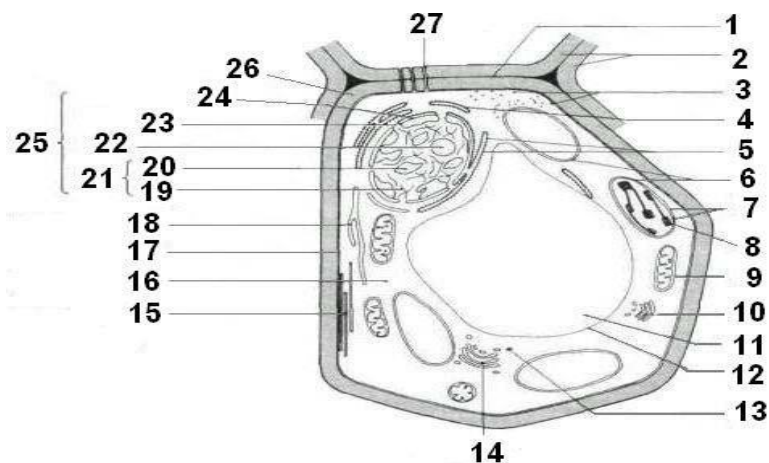


Рис. 1. Ультраструктура узагальненої рослинної клітини, виявлена за допомогою електронного мікроскопа:

1 – серединна пластинка; 2 – клітинні стінки сусідніх клітин; 3 – вільні рибосоми; 4 – гранульований ендоплазматичний ретикулум; 5 – рибосоми, зв'язані з ендоплазматичним ретикулумом; 6 – хлоропласти; 7 – оболонка хлоропласта (дві мембрани); 8 – грана; 9 – мітохондрія; 10 – апарат Гольджі; 11 – клітинний сік; 12 – тонопласт; 13 – пухирець Гольджі; 14 – апарат Гольджі; 15 – мікротрубочки (часто по периферії клітини); 16 – цитоплазма; 17 – плазматична мембрана; 18 – гладенький ендоплазматичний ретикулум; 19 – еухроматин; 20 – гетерохроматин; 21 – хроматин; 22 – ядерце; 23 – ядерна пора; 24 – ядерна оболонка; 25 – ядро; 26 – клітинна стінка; 27 – плазмодесма.

Рослинні тканини

Багатоклітинні рослини еволюціонували з одноклітинних організмів, клітини яких після поділу залишалися разом, утворюючи колонію. Спочатку всі клітини були ідентичними, але подальша еволюція породила диференціювання. У першу чергу диференціювалися соматичні клітини (тобто клітини тіла) і статеві клітини. Далі диференціювання ускладнювалося – виникало усе більше різних клітинних типів. Врешті решт диференціація клітин призвела до виникнення тканин.

Тканина – це філогенетична структура клітин і міжклітинної речовини, яка характеризується певними морфофункціональними властивостями, високою спеціалізацією, властивою лише цьому виду тканин. Кожна тканина складається з клітин певних форми і розмірів. Органічна морфофункціональна цілісність організму досягається лише в разі взаємодії **усіх тканин**.

Рослинні тканини можна розділити на дві групи: прості, що складаються з клітин одного типу (паренхіма, коленхіма, склеренхіма) та складні, що складаються з клітин кількох типів (**ксилема, флоема**). Залежно від виконуваної функції виділяють такі основні типи рослинних тканин: твірна, провідна, механічна, покривна, основна.

Твірні тканини (меристеми). Твірна тканина або меристема – це недиференційована рослинна тканина, клітини якої здатні багаторазово ділитися. Виниклі з меристем клітини диференціюються й дають початок всім тканинам і органам рослин.

Клітини меристеми мають малодиференційований протопласт і слабо оформлені дрібні вакуолі. Пластиди зазвичай перебувають у стадії пропластид. Відкладення запасних речовин в клітинах, що активно діляться, не відбувається. Клітини меристематичної тканини розташовуються близько й не мають міжклітинників. Однак різні меристеми сильно відрізняються за формою й розмірами складових їхніх клітин. Так, апікальна меристема побудована паренхімними клітинами, а прокамбій і камбій – прозенхімними.

Класифікація меристем

1. За тривалістю існування.

Довгоживучі – ініціальні клітини або ініціалі, здатні ділитися невизначене число раз. Короткоживучі це клітини меристеми, що є похідними ініціалей. Вони діляться обмежене число раз і перетворюються на постійні тканини.

2. За походженням.

Первинна меристема з'являється на самому початку росту проростків із клітин зародку (промеристема), і зберігається в конусі наростання стебла й кінчику кореня. Вона являє собою недиференційовану тканину, всі клітини якої необмежено діляться. Промеристема утворює більш диференційовані меристематичні тканини: протодерму, прокамбій і основну меристему. Пізніше з них утворюються постійні первинні тканини: покривна, провідна й основна паренхіма.

Своєрідну первинну твірну тканину являє собою перицикл – зовнішній шар прокамбію. Беручи участь у формуванні постійних тканин і камбію, перицикл водночас є коренерідним шаром, оскільки в ньому закладаються бічні корені.

Вторинні меристеми виникають з первинної меристеми (наприклад, камбій із прокамбію) або з будь-якої постійної тканини (наприклад, фелоген - в епідермі або первинній корі). За рахунок діяльності вторинних меристем зазвичай здійснюється ріст органа в товщину.

Клітини меристем рослин нині активно використовують у клітинній інженерії.

Клітинна інженерія – це галузь біотехнології, в якій застосовуються методи штучного виділення клітин з організму і перенесення їх на поживні середовища, де ці клітини в стерильних умовах продовжують жити і розмножуватись. Такі клітинні культури можуть продукувати цінні речовини, як і цілісний організм.

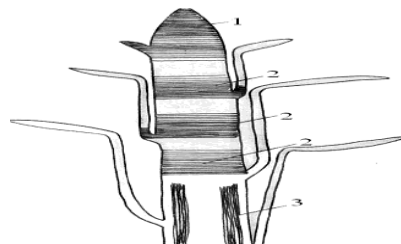


Рис. 2. Схема розподілу різних меристем у стеблі: 1 - верхівкова (апикальна), 2 - вставна (інтеркалярна), 3 - бічна (латеральна).

Дослідження клітин меристеми рослин

Вивчення верхівкової апікальної меристеми. Вивчення зовнішньої будови верхівкової бруньки елодеї канадської (*Elodea canadensis*) зручно проводити на постійному мікропрепараті "Точка росту". Для цього необхідно знайти: конус наростання, первинні горбки (зачатки листів), примордії (зародкові листи), вторинні горбки (зачатки бічних пагонів). Зробити рисунок (рис. 2).

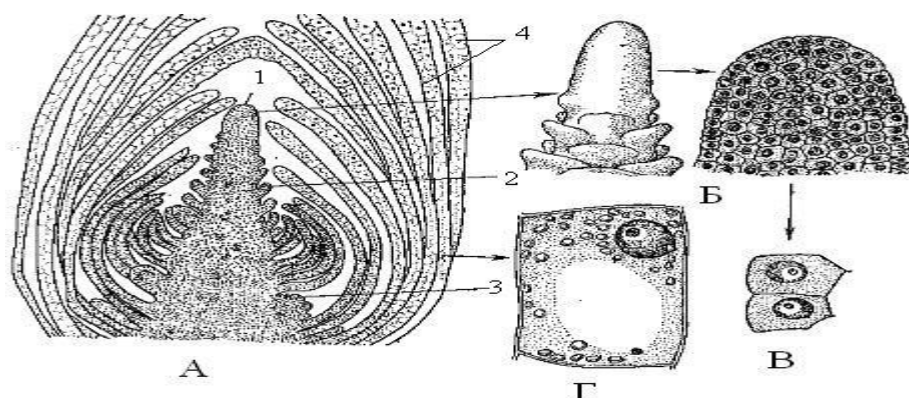


Рис. 3. Апікальна меристема у верхівковій бруньці пагону елодеї (*Elodea canadensis*): А – поздовжній розріз; Б – конус наростання (зовнішній вигляд і розріз); В – клітина первинної меристеми; Г – клітина з листа, що сформувався.

1 – конус наростання, 2 – первинний горбок, 3 – вторинний горбок (горбок пазушної бруньки), 4 – примордії (зародкові листки).

Потім можна вивчити будову конусу наростання за умови більшого збільшення (40×). Розглянути паренхімні клітини конусу. У центрі клітини перебуває велике темно зафарбоване ядро. Межі клітин розрізняються важко, оскільки стінки тонкі й прозорі, а густа цитоплазма зафарбована досить інтенсивно. Потім перемістити препарат і розглянути клітини, розташовані нижче. Відзначити, що в міру віддалення від конуса наростання вміст клітин стає світлішим, у цитоплазмі з'являються вакуолі, а розміри клітин явно збільшуються.

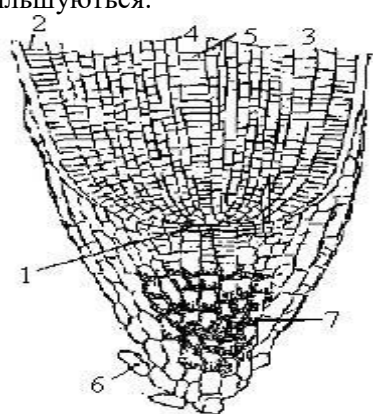


Рис.4. Апікальна меристема в кінчику кореня:

1 – каліптроген, 2 – дерматоген, 3 – периблема, 4 – плерома, 5 – ряд клітин, з яких утворюється стела, 6 – скинуті чехликом клітини, 7 – колумела.

Стінки клітин тепер видні чітко. Розмір ядер майже незмінюється, тому ядро займає відносно меншу частину клітини. Таке перетворення меристеми на спеціалізовану тканину особливо добре виражено в більших листах, що прикривають конус наростання.

Замалювати анатомічну будову бруньки елодеї канадської, позначивши конус наростання, первинні й вторинні горбки, примордії.

Вивчення апікальної меристеми кореня. Розглянути апікальну меристему кореня зручно на постійному мікропрепараті "Кінчик кореня цибулі (*Allium cepa*)". Необхідно звернути увагу на будову клітин, що перебувають під кореневим чехликом і на відстані від нього (зона розтягання).

Виконання практичної частини

Послідовність роботи. За умови малого збільшення мікроскопу (8×) у центральній частині розрізу бруньки знайти подовжений конус наростання з верхівкою округлої форми. Над конусом наростання видимий як би купол, утворений зародковими листами (примордії), що йдуть від основи бруньки. Пересуваючи поступово препарат, простежити виникнення й ріст цих листів. На деякій відстані від конуса наростання на поверхні стебла з'являються горбки. Це наймолодші зачатки листів. Нижче по стеблу горбки більші й більше витягнуті – усе більше набувають форму листів. Над основою (у пазусі) деяких листів є ще по одному горбку (вторинні горбки), з яких надалі утворяться пазушні бруньки, вони дають початок бічним гілкам.

Замалювати анатомічну будову бруньки елодеї канадської, позначивши конус наростання, первинні й вторинні горбки, примордії.

Спочатку за малого збільшення (8×) необхідно розглянути кінчик кореня в плані. Вивчення препарату почати з кореневого чехлика, що прикриває ніжні клітини меристеми. Чехлик складається з живих тонкостінних клітин, які постійно оновлюються. Тому, на препараті можна побачити скинуті чехликом клітини. Потім розглянути центральну частину чехлика – *колумелу*. У клітинах колумели (більш темні клітини) міститься багато крохмальних зерен.

Потім можна докладно вивчити *меристему кореня*, що розташована під корневим чехликом у зоні розподілу й становить усього близько 1 мм. У цій зоні добре видимі межі між *перифлемою* і *плеромою*. Плерома диференціюється в осьовий циліндр, перифлема – у первинну кору, дерматоген – у ризодерму. Ще зберігаючи характер меристеми, клітини цих відділів уже розрізняються за величиною й взаємним розташуванням. Ініціали зазвичай розташовуються шарами. У тілі кореня внутрішній ярус ініціалей породжує клітини плероми, інший ярус – клітини перифлеми і її дерматогену, що її охоплює. Корневий чехлик утворюється в результаті роботи каліптрогена. Замалювати апікальну меристему в кінчику кореня й зробити позначення (рис.4).

Морфологія та функції клітин крові

Одним з напрямів фармацевтичної біотехнології є одержання біотехнологічних препаратів крові – лікувальних засобів, отримані із крові. Кров (*sanguis*) є особливим різновидом тканин організму, це рідка тканина, що циркулює у системі замкнених трубок-судин. Кров виконує низку життєво важливих функцій:

- *захисну* – полягає у забезпеченні гуморального та клітинного імунітету;
 - *дихальну* – перенесення кисню з легенів до інших органів і видалення вуглекислого газу;
 - *трофічну* – перенесення поживних речовин;
 - *екскреторну* – виведення шлаків;
 - *гуморальну* – транспорт гормонів та інших біологічно активних речовин;
 - *гомеостатичну* – разом з нервовою і ендокринною системами кров бере участь в підтриманні гомеостазу – постійності внутрішнього середовища організму, в тому числі імунного гомеостазу.
- Всі клітини крові (*hemocytі*) розвиваються із спільної стовбурової клітини. Кровотворні стовбурові клітини містяться в кістковому мозку

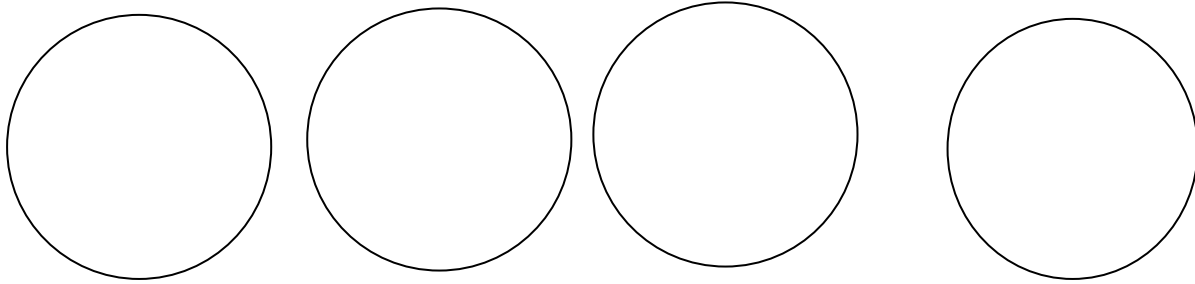
Кровотворні стовбурові клітини формують 4 ряди клітин крові.

1. еритроїдний – звідки походять еритроцити;
2. мегакаріоцитарний – походять тромбоцити;
3. мієлоїдний – походять макрофаги, моноцити, гранулоцити;
4. лімфоїдний – походять лімфоцити.

Практичне завдання : Приготувати препарати “роздавлена крапля” рослинних об'єктів і розглянути із збільшенням 8× і 40×. Здійснити мікрохімічний аналіз будови рослинних клітин. Вивчити гістологічну будову кінчика кореня (рис.4).

Розглянути фіксований препарат клітин тканини тваринного походження і препарат клітин крові. Відтворити на рисунку особливості тваринних клітин.

Замалювати розглянуті препарати під мікроскопом



Контрольні запитання

1. Назвіть складові ультраструктури рослинних клітин, особливості їх будови та виконувані функції.
2. Які рослинні тканини існують?
3. Зазначте особливості будови та функціонування твірної тканини рослин (меристеми).
4. Яким чином і з якою метою проводять мікрохімічний аналіз будови рослинних клітин?
5. Назвіть складові ультраструктури тваринних клітин, особливості їх будови та виконувані функції. Порівняйте з ультраструктурою рослинної клітини.
6. Які тваринні тканини існують? Які особливості мають м'язова та жирова тканини?
7. Назвіть життєво важливі функції крові.
8. Охарактеризуйте морфологічні особливості формених елементів крові.
9. Що таке клітинна інженерія? Наведіть приклади використання клітинної інженерії для одержання цінних біотехнологічних продуктів.

Висновок:

_____ Підпис викладача

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2. Мікрохімічний аналіз рослинних клітин

Мета роботи: ознайомитись з мікрохімічним аналізом рослинних клітин; опанувати методами мікрохімічних досліджень клітин рослин та тварин.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; предметні та покрівні скельця; крапельниці з дистильованою водою; скальпелі; 1 %-й розчин хлорного заліза, 1 %-вий розчин йоду у йодистому калію; 66,5 %-ва сірчана кислота; 1-й розчин (1 частина солянокислого фенілгідразину і 10 частин гліцерину); 2-й розчин (1 частина оцтовокислого натрію і 10 частин гліцерину); насичений водний розчин їдкого калію, постійні мікропрепарати: "Точка росту", "Кінчик кореня цибулі (*Allium cepa*)",

Об'єкт дослідження фіксовані та постійні препарати тваринних клітин у т.ч. клітин крові кренеплід моркви, цибуля, зелене листя

Виконання практичної частини

Мікрохімічний аналіз рослинних клітин

Гістохімічні (мікрохімічні) реакції – це реакції, за допомогою яких можна виявити ті або інші сполуки безпосередньо в клітинах або структурах, де вони локалізуються. Методи мікроскопічної хімії дуже чутливі. Кількість досліджуваної речовини, що бере участь у мікрохімічній реакції, визначається в мікрограмах (мкг). Методи мікрохімії характеризуються високою чутливістю, специфічністю, локальністю. Такі мікрохімічні реакції використовують, наприклад, для аналізу якості лікарської рослинної сировини.

Мікрохімічні реакції проводять зазвичай одночасно з мікроскопічним аналізом, спостерігаючи результати під мікроскопом. Для проведення досліджень з мікрохімії потрібно підготувати дуже тонкий зріз тканини, потім розмістити його на предметному склі, після чого провести, мікрохімічні аналіза методиками, що наводяться:

- на ефірні й жирні олії – з розчином Судан III;
- на здеревілі лігніфіковані елементи з розчином флороглюцину й 25%-вим розчином сірчаної кислоти або концентрованої хлороводородної кислоти.
- На кору дуба (порошок) проводять реакцію з залізоамонійними квасцями й результат реакції вивчають під мікроскопом.

Дубильні речовини

Дубильні речовини у великій кількості виявлені у дводольних рослин, в однодольних вони відсутні. Містяться в корі ялини, сосни, верби, дуба та інших рослин. Колір, аромат і смак чаю в основному пов'язані з комплексом дубильних речовин чайного листа. Встановлено, що дубильні речовини захищають рослини від проникнення в них фітопатогенних мікроорганізмів.

Для виявлення дубильних речовин із соковитих частин рослин вичавлюють 1...2 краплі соку на предметне скло й наносять 1 краплю 1-го % розчину хлорного заліза. Поява зеленого та чорного фарбування свідчить про наявність дубильних речовин.

Реакція на целюлозу Клітинна стінка містить дуже важливий компонент — полісахарид — целюлозу, для виявлення якої використовують ряд мікрохімічних методів. Одним з них є метод спільного вилування йоду з сірчаною кислотою, що призводить до посиніння целюлози у клітинній оболонці

Для проведення реакції використовують 1 %-ний розчин йоду у йодистому калію, яким насичують препарат протягом 10 хвилин. Потім препарат, що накривають покривним склом, обробляють 66,5 %-ною сірчаною кислотою. Оболонка починає синіти тим інтенсивніше, чим більше целюлози міститься у ній.

Суть цієї реакції полягає в тому, що сірчана кислота у процесі розчинення целюлози перетворює її на так звані амілоїди, молекули яких асоційовані вже не в тій мірі, як у целюлозі. Целюлоза за своїми властивостями починає наближатися до агрегатів крохмальних молекул, чим і зумовлюється характерне забарвлення.

Озонова реакція на наявність цукру

Цукор (моно- і дисахариди) в життєдіяльності клітини займає провідне місце наряду з білками. В живій клітині він міститься у вигляді розчину. У висушеному стані він може мати вигляд кристалів. З метою якісного визначення наявності вуглеводів використовують два розчини, які зберігають окремо і змішують безпосередньо на предметному склі, де розміщений об'єкт дослідження.

1-й розчин: одна частина солянокислого фенілгідразину і 10 частин гліцерину.

2-й розчин: одна частина оцтовокислого натрію і 10 частин гліцерину.

Після приготування на предметному склі суміші реактивів туди вносять об'єкт дослідження і накривають покривним склом. Препарат роздивляються під мікроскопом. В результаті реакції утворюється озон жовтого кольору. Озон кристалізується у вигляді кульок, зірок або голок, зібраних у пучки і снопи, але може утворюватись і аморфний осад.

Під час слабкого підігрівання препарату швидкість, виникнення кристалів зростає, проте при цьому не можна розрізнити фруктозу, декстрозу і сахарозу.

Реакція на хлорофіл

Шматок зеленого листа (тканини) обробляють насиченим водним розчином їдкового калію (рослинна тканина до цього не повинна змочуватись водою). Під дією лугу хлорофіл набуває жовто-бурого кольору, а через 15...30 хв. знову стає зеленим. Прискорити цю реакцію можна нагріванням предметного скла на спиртівці до кипіння або додаванням до препарату води. Ця реакція може бути застосована як для свіжих об'єктів, так і для гербарійних зразків.

ТЕМА 6. Принцип методу виділення з природних джерел різних фізіологічних груп бактерій. Роль накопичувальної культури збудників маслянокислого бродіння у процесах життєдіяльності. Ферментативна активність клітин.

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 1. *Встановлення принципу методу виділення з природних джерел у селективних умовах різних фізіологічних груп бактерій. Роль накопичувальної культури збудників маслянокислого бродіння у процесах життєдіяльності.*

Мета заняття: ознайомитись з методикою виділення з природних джерел в селективних умовах різні фізіологічні групи бактерій

Матеріали та обладнання: колби; пробірки; газовивідні трубки; водяна баня; термостат; предметні та покривні скельця; мікроскопи; фільтрувальний папір; лушпиння картоплі; CaCO₃; 96% етиловий спирт; концентрована сірчана кислота; 5% розчин хлориду заліза (III).

Об'єкт дослідження: культури бактерій і дріжджів.

Теоретичний зміст теми

Накопичувальними називають культури, в яких переважають представники однієї групи або одного виду мікроорганізмів. Метод накопичувальних культур введений у практику мікробіологічних досліджень С.М. Виноградським і М. Беєринком. Суть його полягає у створенні селективних тобто вибіркових умов, які забезпечують переважно розвиток потрібних мікроорганізмів із змішаних популяцій. При створенні селективних умов необхідно знати фізіологічні особливості мікроорганізмів, які мають бути накопиченими.

Селективні умови створюють найчастіше, підбираючи відповідні середовища. Наприклад, на середовищі, яке не містить азоту, переважно розвиваються азотфіксатори або олігонітрофіли. Накопичувальні культури автотрофних організмів одержують на середовищах, в яких єдиним джерелом вуглецю є вуглекислота. При створенні селективних умов необхідно враховувати неоднакове відношення різних мікроорганізмів до аерації, температури, рН середовища та ін. Через складність культивування не всі мікроорганізми виділено в чисту культуру, тому їх досліджують в накопичувальних культурах (багато видів ціанобактерій, сіркобактерій).

Бродіння – ферментативне розщеплення вуглецьвмісних сполук в анаеробних умовах, яке супроводжується утворенням АТФ. Усі основні типи бродіння починаються гліколітичним розщепленням вуглеводів і проходять однаково до утворення піривиноградної кислоти та НАДН. Для регенерації останнього мікроорганізми відновлюють піруват або інші сполуки. Внаслідок цього в середовище виділяються різні відновлені продукти: спирти (етиловий, бутиловий тощо). За характером основного продукту, який утворюється при бродінні розрізняють бродіння спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропіоновокисле, ацетонове тощо.

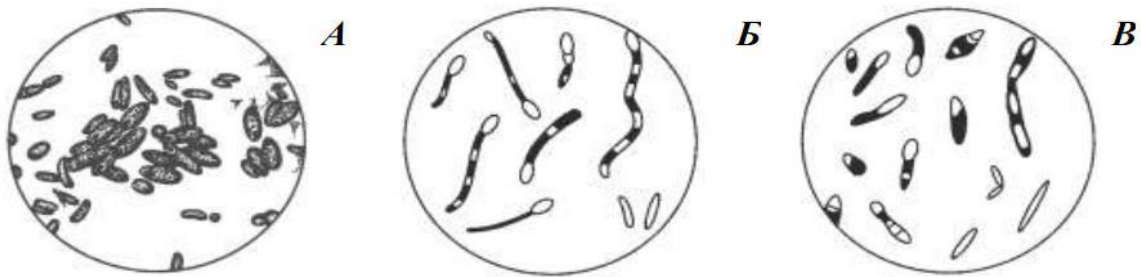
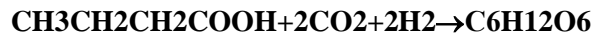


Рис. 1. Збудники маслянокислого бродіння: А – *Clostridium pasteurianum*; Б – *Clostridium pectinivorum*; В – *Clostridium felsinerum*.

Процеси бродіння широко використовують у практичній діяльності людини: для випікання хліба, у виробництві пива, вина, квашенні овочів, силосуванні кормів, у виробництві кисломолочних продуктів, твердих сирів тощо. Збудниками маслянокислого бродіння є бактерії роду *Clostridium*, широко розповсюджені в ґрунті, гної, забруднених водоймах, на поверхні рослин, у молоці та інших субстратах (рис.1).

Маслянокислі бактерії – облігатноанаеробні палички, грампозитивні, спороносні майже нерухомі. Енергію для процесів життєдіяльності отримують за рахунок збродження моно- і дисахаридів, декстринів, крохмалю, органічних кислот і спиртів. Як джерело азоту маслянокислі бактерії використовують різні азотисті сполуки (пептон, амінокислоти, аміачні солі), а деякі навіть здатні фіксувати молекулярний азот. Оптимальний розвиток бактерій відбувається при значеннях рН 7,0-7,4 і С.

Маслянокисле бродіння (бродиння глюкози, крохмалю) при температурі 35° здійснюється за рівнянням:



Крім масляної кислоти під час бродіння в значних кількостях утворюється оцтова кислота, а при рН 5,5 – бутанол, ацетон, ізопропанол.

Виконання практичне завдання :

1. Виготовлення накопичувальної культури маслянокислих бактерій

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

1. Подрібнити нечищену сиру картоплю.
2. Пробірку заповнити шматочками сирової картоплі на 1/3.
3. Для нейтралізації середовища додати невелику кількість крейдового порошку.
4. Суміш залити водопровідною водою, перемішати, закрити пробкою.
5. Пробірки пастеризувати на водяній бані при 80°С протягом 20 хв.
6. Після пастеризації пробірки поставити у термостат при температурі 30°С на кілька днів.

2. Виготовлення препаратів «роздавлена крапля» і «висяча крапля»

Дані типи препаратів використовують для спостереження за живими бактеріями, в тому числі, рухомими. Для виготовлення таких препаратів використовують знежирені предметні та покривні скельця, а також предметні скельця з лунками.

Метод «роздавленої краплі»

1. На предметне скло за допомогою піпетки нанести невелику краплю рідини, яка містить бактерії, у даному випадку – бродильну рідину з клостридіями.
2. До краплі додати розчин Люголя та накрити покривним скельцем так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Залишки рідини видалити фільтрувальним папером.
3. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини жовтувато-зеленуватого кольору.
4. Зробити схематичний малюнок.

Метод «висячої краплі»

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

2. По кутам покривного скла за допомогою препарувальної голки нанести невелику кількість вазеліну.
3. Покривне скло накрити предметним склом із лункою та легко натиснути на нього. Предметне скло з приклеєним до нього покривним обережно перевертають покривним склом угору. У разі правильного виготовлення препарату крапля не торкається стінок лунки, а завдяки силі поверхневого натягнення тримається на покривному склі та вільно провисає у лунці предметного скла.
4. Препарат мікроскопіювати під об'єктивом 40х. У полі зору – рухомі паличкоподібні клітини.

Спостереження капсули. Дослідження капсули *Bacillus mesentericus*

1. На фіксований мазок культури *Bacillus mesentericus* нанести достатню кількість фуксину Циля та прогріти над полум'ям пальника не доводячи барвник до кипіння.
2. Препарат ретельно промити водою тільки після охолодження скла.
3. Препарат висушити при кімнатній температурі та мікроскопіювати з імерсійною системою.
4. Під мікроскопом на темному полі знайти паличкоподібні клітини. Незабарвлений шар навколо клітин – капсульна речовина, яка затримує барвник.

Контрольні питання :

1. Чим відрізняється закваска для звичайного кислого молока від закваски болгарського кислого молока?
2. За якими показниками контролюють якість рідких і сухих заквасок?
3. Які кисломолочні продукти готують із використанням у заквасках мезофільних молочнокислих бактерій?
4. Чим відрізняються ацидофільні кисломолочні продукти від інших кисломолочних продуктів.

Виконання практичної частини: Замалюйте препарат культури маслянокислих бактерій. З. Привести якісні реакції на масляну кислоту. Зробити схематичні малюнки.

Висновок:

_____ Підпис викладача

ДАТА: _____

ЗАНЯТТЯ 2 . Вивчення ферментативної активності клітин

Мета роботи: ознайомитись з особливостями будови та функціонування ферментів як біологічних каталізаторів; опанувати методи визначення та аналізу ферментативних активностей клітин.

Матеріали та обладнання: крапельниці з дистильованою водою; водяна баня; скальпелі; свіжий 3%-й розчин перексиду водню, Крім того на кожну бригаду: 7 чистих сухих пробірок, пінцет, тканини рослин (2 шматочки сирого та 1 шматочок вареної картоплі) та тварин (2 шматочки сирого та 1 шматочок вареного м'яса чи риби), пісок, ступка, товкачик.

Об'єкт дослідження: ферментативна активність перексиду водню на клітини рослин і тварин

Теоретичний зміст теми

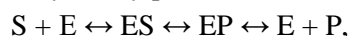
Ферменти – біологічні каталізатори

Ферменти – це біологічні каталізатори. Всі ферменти – білки, синтезовані живими клітинами. За участі ферментів прискорюються у тисячі разів численні біохімічні реакції.

Ферменти мають такі властивості: всі вони глобулярні білки; прискорюють реакцію, але самі у цій реакції не витрачаються; досить мала кількість ферменту викликає претворення великої кількості субстрату; активність ферменту залежить від рН середовища, температури, тиску, від концентрації субстрату та самого ферменту; дія ферментів вибіркова, тобто один фермент майже

завжди каталізує тільки одну реакцію. Ферменти, діючи як каталізатори, зменшують енергію активації, необхідну для початку реакції.

Речовина, перетворення якої каталізує фермент, має назву *субстрат*. Кожному ферменту відповідає свій власний субстрат. З'єднуючись з субстратом, фермент утворює фермент-субстратний (ензим-субстратний) комплекс (ES), імовірність перебігу реакції у якому значно зростає. Після закінчення реакції фермент вивільняється і знову може вступати у реакцію:



де S – субстрат; E – фермент; ES – фермент-субстратний комплекс; EP – комплекс фермент-продукт; P – продукт (продукти).

Швидкість ферментативної реакції – кількість перетвореного субстрату або кількість продукту, утвореного за одиницю часу.

У більшості випадків цілісний фермент (*холофермент*) складається з білкової частини (*апофермента*) і небілкового компонента (*кофактора*). Якщо кофактор міцно пов'язаний з апоферментом, то він називається *простетичною групою*. Якщо ж зв'язок слабкий, то кофактор називається *коензим*, або *кофермент*.

Всі ферменти несуть *активний центр* – певну ділянку, що і є власно каталізатором. У ряді випадків конформація (третинна структура) поліпептиду така, що активний центр «закритий» і не розпізнає свій субстрат. У таких ферментів є *алостеричний центр*, здатний взаємодіяти з певними речовинами – *алостеричними ефекторами*.

Ефектори діляться на *інгібітори* й *активатори*. Взаємодія алостеричного центру з інгібіторами змінює конформацію поліпептиду так, що активний центр «закривається». Взаємодія алостеричного центру з активаторами, навпаки, «відкриває» активний центр.

Алостеричні ефектори можуть з'являтися в клітинах у результаті хімічних, фотохімічних і термохімічних реакцій. Часто інгібітором служить продукт реакції, яка каталізується даним ферментом (у цьому випадку спостерігається негативний зворотний зв'язок).

Вплив факторів на активність ферментів

Активність ферменту змінюється залежно від рН, температури, а також від концентрацій як ферменту, так і самого субстрату.

Вплив температури на активність ферментів. З підвищенням температури прискорюється рух молекул, внаслідок чого у молекул субстрату і ферменту є більше шансів на зіткнення і перебіг реакції. Температура, що забезпечує максимальну активність ферменту, має назву *оптимальної орт*.

швидкість реакції знижується, оскільки відбувається руйнування вторинної і третинної структур білків, тобто інактивація ферменту.

Вплив рН на активність ферментів. При постійній температурі ферментативні реакції проходять найефективніше у вузьких межах рН. Оптимальне значення рН ферментативної реакції – те значення рН, при якому реакція відбувається з максимальною швидкістю. Зі зниженням рН збільшується концентрація іонів водню у середовищі, що веде до руйнування іонних зв'язків, що беруть участь у підтриманні просторової структури молекули ферменту. При різких змінах рН молекула ферменту може денатуруватися.

Вплив концентрації ферменту на швидкість ферментативної реакції. За високої концентрації субстрату та сталих інших факторів (рН, t°) швидкість реакції пропорційна концентрації ферменту. Ферментативні реакції відбуваються за умови, коли концентрація ферменту набагато нижча за концентрацію субстрату і тому з підвищенням концентрації ферменту швидкість реакції також зростає.

Вплив концентрації субстрату на швидкість ферментативної реакції. Для певної концентрації ферменту швидкість реакції збільшується зі збільшенням концентрації субстрату, оскільки збільшується вірогідність контакту між ними. Але настає момент, коли збільшення концентрації субстрату вже не веде до збільшення швидкості реакції, оскільки всі активні центри ферменту зайняті.

Виконання практичної частини

1. Порівняти активність дії ферментів пероксидазно-каталазного комплексу в живих та мертвих клітинах тканин рослин та тварин.
2. Для проведення досліду пронумерувати пробірки від №1 до №7. В пробірку №1 внести трохи піску.

3. Подрібнити в ступці шматочок сирій картоплі з піском.
4. Перенести подрібнену суміш до пробірки №2. Подрібнити в ступці шматочок сирого м'яса з піском.
5. Перенести подрібнену суміш до пробірки №3.
6. Внести в пробірку №4 – шматочок сирій картоплі, в пробірку №5 – шматочок вареної картоплі, в пробірку №6 – шматочок сирого м'яса, в пробірку №7 – шматочок вареного м'яса.
7. Додати в кожну пробірку по декілька крапель 3%-го розчину перексиду водню.
8. Провести спостереження за тим, що буде відбуватися в кожній з пробірок.
9. Розпочати роботу із дослідження фаз мітозу в рослинних клітинах.

Опрацювання результатів

1. Теоретичні відомості: поняття про фермент та ферментативну реакцію; властивості ферментів; вплив факторів на активність ферментів.

2. Практична частина – порівняти ферментативну активність рослинної та тваринної тканин за різного оброблення; результати порівняння за системою:

«-» активність не спостерігається; «+» - активність слабка; «++» - активність помірна; «+++» - активність висока занести до таблиці:

	Рослинна тканина			Тваринна тканина		
	Без обробки	Після обробки		Без обробки	Після обробки	
		термічно	механічно		термічно	механічно
Активність фермента						

Контрольні запитання

1. Що таке фермент?
2. Якими властивостями характеризуються ферменти?
3. Як відбувається ферментативна реакція?
4. Які фактори впливають на перебіг ферментативних реакцій?
5. Що таке швидкість ферментативної реакції?

У висновку до роботи необхідно пояснити причини явищ, які спостерігались: з чим пов'язано збільшення або зменшення ферментативної активності клітин за умови різної обробки; як це пов'язано з властивостями ферментів.

Висновок: _____

_____ Підпис викладача

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Біологія: довідник для абітурієнтів та учнів загальноосвітніх навчальних закладів: навчально-методичний посібник / О. А. Біда, С. І. Дерій, Л. М. Ілюха, Л. І. Прокопенко [та ін.]. – 3-тє вид., переробл. та доповн. – К.: Література ЛТД, 2013. 672 с.
2. Новак В.П., Бичков Ю.П., Пилипенко М.Ю. Цитологія, гістологія, ембріологія: підручник (2-е вид., змін. і доп.) / За заг. ред. В.П. Новака. К.: Дакор, 2008. – 512 с.
3. Польський Б.Т. Основи біології: Різноманітність життя на доорганізмених рівнях: навчальний посібник / Б.М. Польський, В.М. Торяник. – Суми: Університетська книга, 2009. 288 с.
4. Сало Т.О. Загальна біологія: Навчальний посібник. / Т. О. Сало. Х.: Гімназія; Країна мрій, 2002. 196 с.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник / А.В. Сиволоб – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.
6. Хімія: довідник для абітурієнтів та учнів загальноосвітніх навчальних закладів: навчально-методичний посібник / М. В. Гриньова, Н. І. Шиян, Ю. В. Самусенко [та ін.]. К.: Літера ЛТД, 2013. 464 с.

