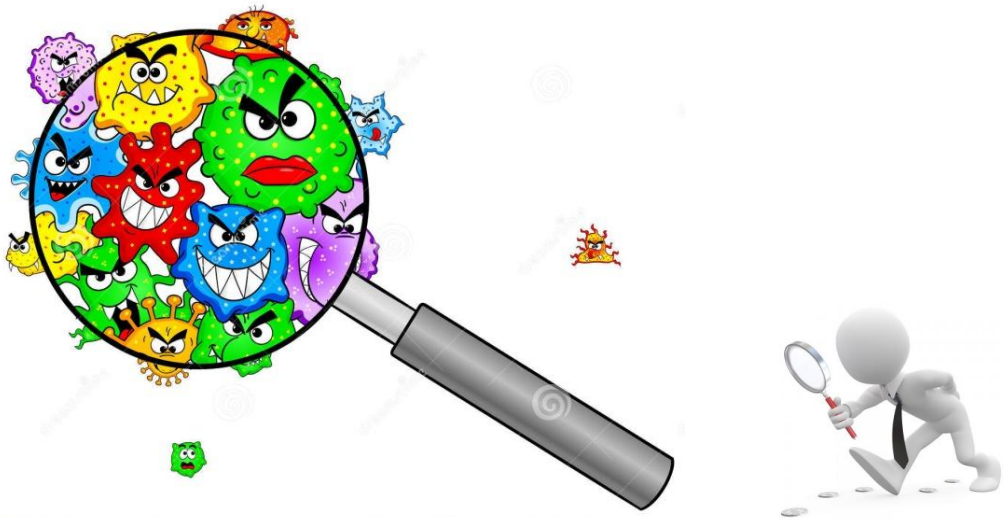
Прикладна мікробіологія та ензимологія

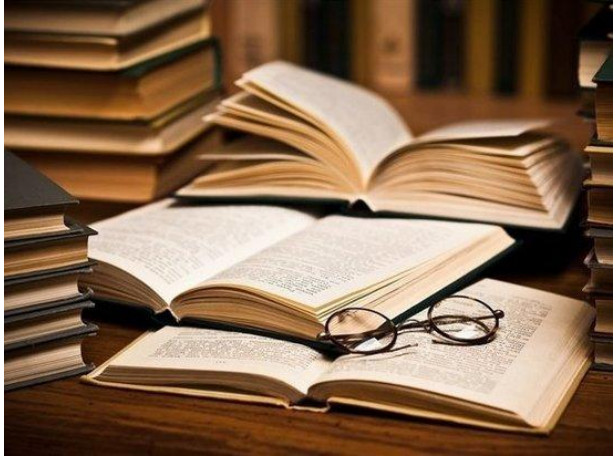
Лектор: доц. Хрокало Людмила Анатоліївна

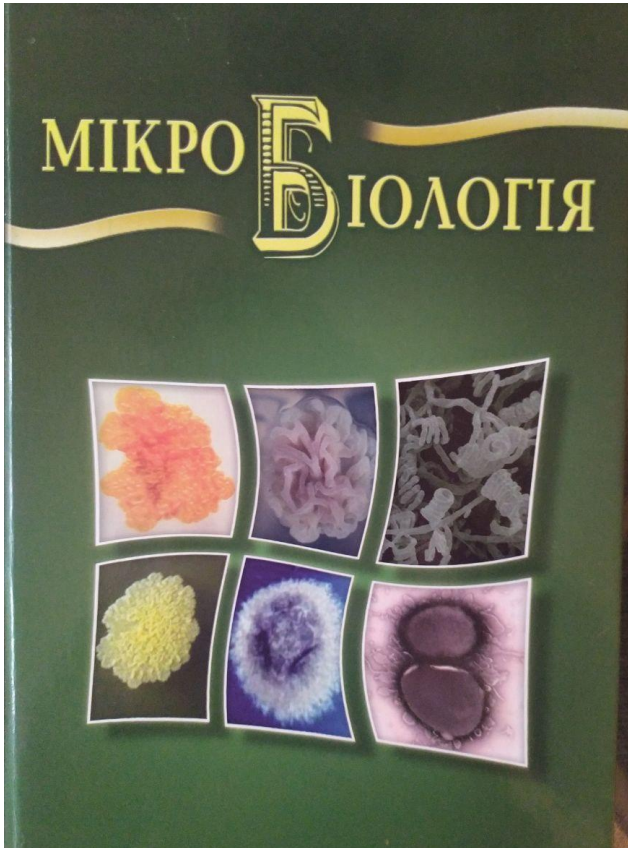
Лекція 1.

Мікробіологія як наука. Мікробіологічні процеси в хімічних технологіях. Методи дослідження мікроорганізмів: мікроскопія, культивування

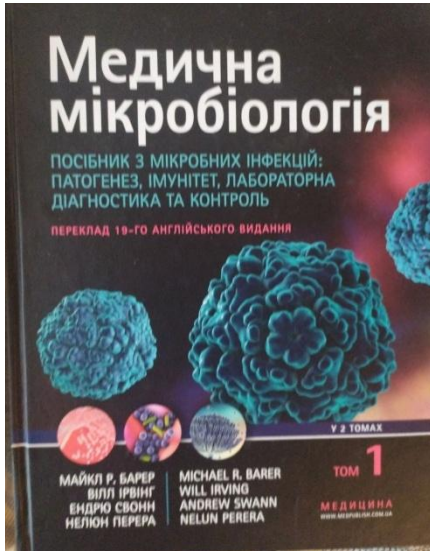


Мікробіологія: підручник / М. Г. Сергійчук, В.К. Позур, Т.М. Фурзікова та ін. – Київ: ВПЦ „Київський університет”, 2008. – 541 с.





Медична мікробіологія: Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль / М. Баррер, В. Ірвінг, Е. Свонн, Н. Перера (пер. з англ.). Київ «Медицина» 2020. Т 1. 433 с.



Фонетика латинської мови

У наші дні латинська мова – це своєрідний будівельний матеріал, з якого творяться нові терміни. Адже жодна галузь науки не може обійтися без знання основ термінології, що формується на базі латинської мови.

A a — а	*Nn* — ен
Bb — бе	*Oo* — о
Cc — це	*Pp* — пе
Dd — де	*Qq* — ку
Ee — е	*Rr* — ер
Ff — еф	*Ss* — ес
Gg — же (ге)	*Tt* — те
Hh — аш (ха)	*Uu* — у
Ii — і	*Vv* — ве
Jj — йот	*Ww* — дубль-ве
Kk — ка	*Xx* — ікс
Ll — ель	*Yy* — ігрек
Mm — ем	*Zz* — зет

У сучасній біологічній термінології використовується новолатинський алфавіт, що складається з 25 літер

- 6 голосних: **a, e, i, o, u, y.** Буква **i** може вимовлятися як укр. [і] або [й]:
- 18 приголосних: **b, c, d, f, g, h, k, l, m, n, p, q, r, s, t, v, x, z.** Буква **c** може вимовлятися як укр. [к] або [ц]

У латинській мові є чотири **дифтонги**, тобто сполучення двох голосних, які вимовляються як один склад, один звук: **ae, oe, au, eu.**

Сполучення **ae, oe** вимовляються як **[е]: vértebrae** [вертебре], **foetus** [фетус].

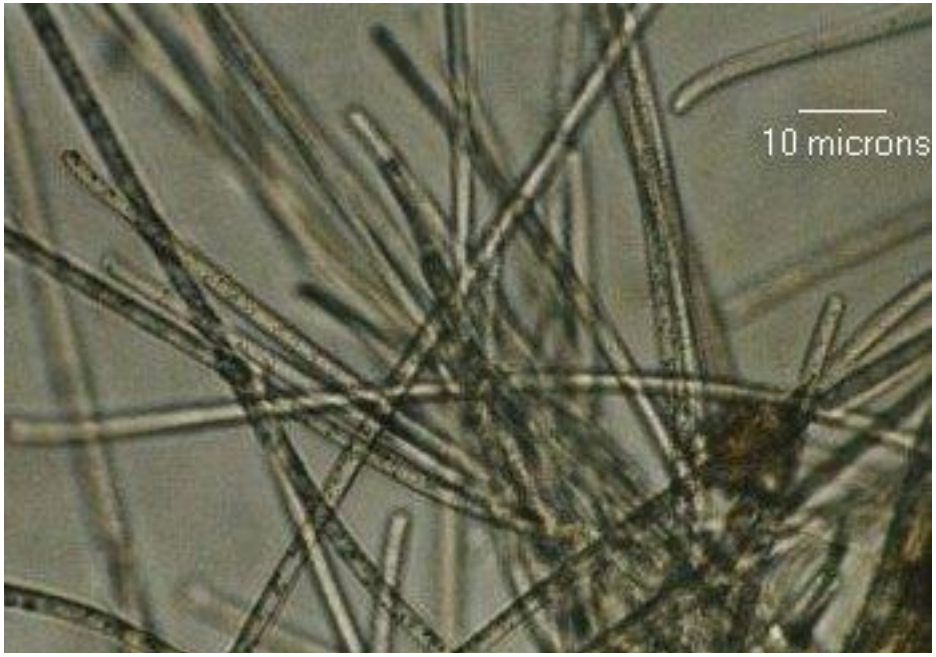
Au вимовляється як **[ав]** : **auris** (авріс).

Eu вимовляється як **[ев]: pneumonia** (пнеумонія).

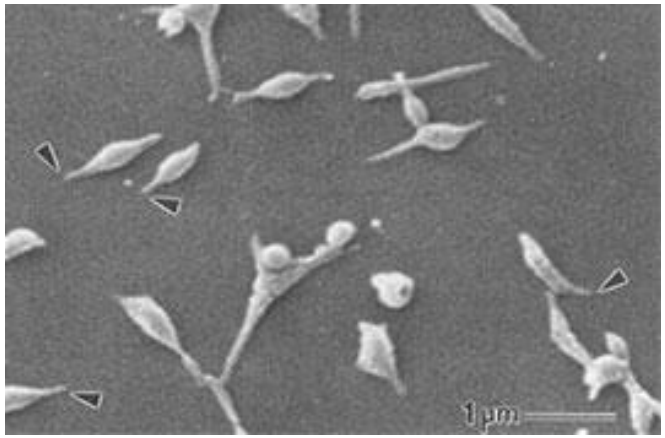
http://graecolatini.bsu.by/htm-different/latin-translit.htm

Об'єктами мікробіології є:
прокаріоти – бактерії і археї
еукаріоти – найпростіші, мікроскопічні водорості, нижчі гриби.

Варіабельність розмірів клітин бактерій



Клітини нитчастої сіркобактерії
Beggiatoa alba



Клітини *Mycoplasma pneumoniae*

Практичне значення

- мікроорганізми беруть участь у глобальному колобігу біогенних елементів. Наступні процеси були б неможливі без них: фіксація атмосферного азоту, мінералізація органічних речовин;

- на життєдіяльності мікроорганізмів засновані виробництва: хлібопекарство, пивоваріння, виноробство, отримання молочнокислих продуктів, виробництво деяких антибіотиків тощо

- мікроорганізми використовують для очищення навколишнього середовища від різноманітних природних і антропогенних забруднень

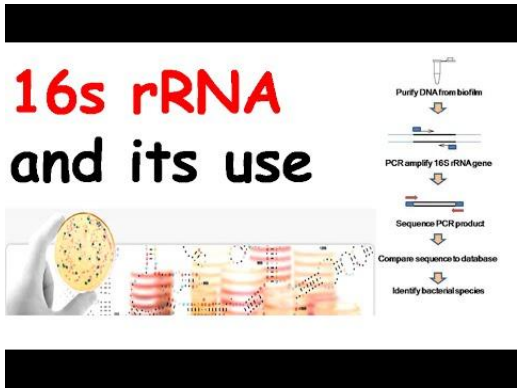
- багато мікроорганізмів є збудниками захворювань людини, тварин, рослин, а також викликають псування продуктів харчування і різних промислових матеріалів;

- мікробні угруповання слугують модельними системами для біотехнології і генної інженерії.

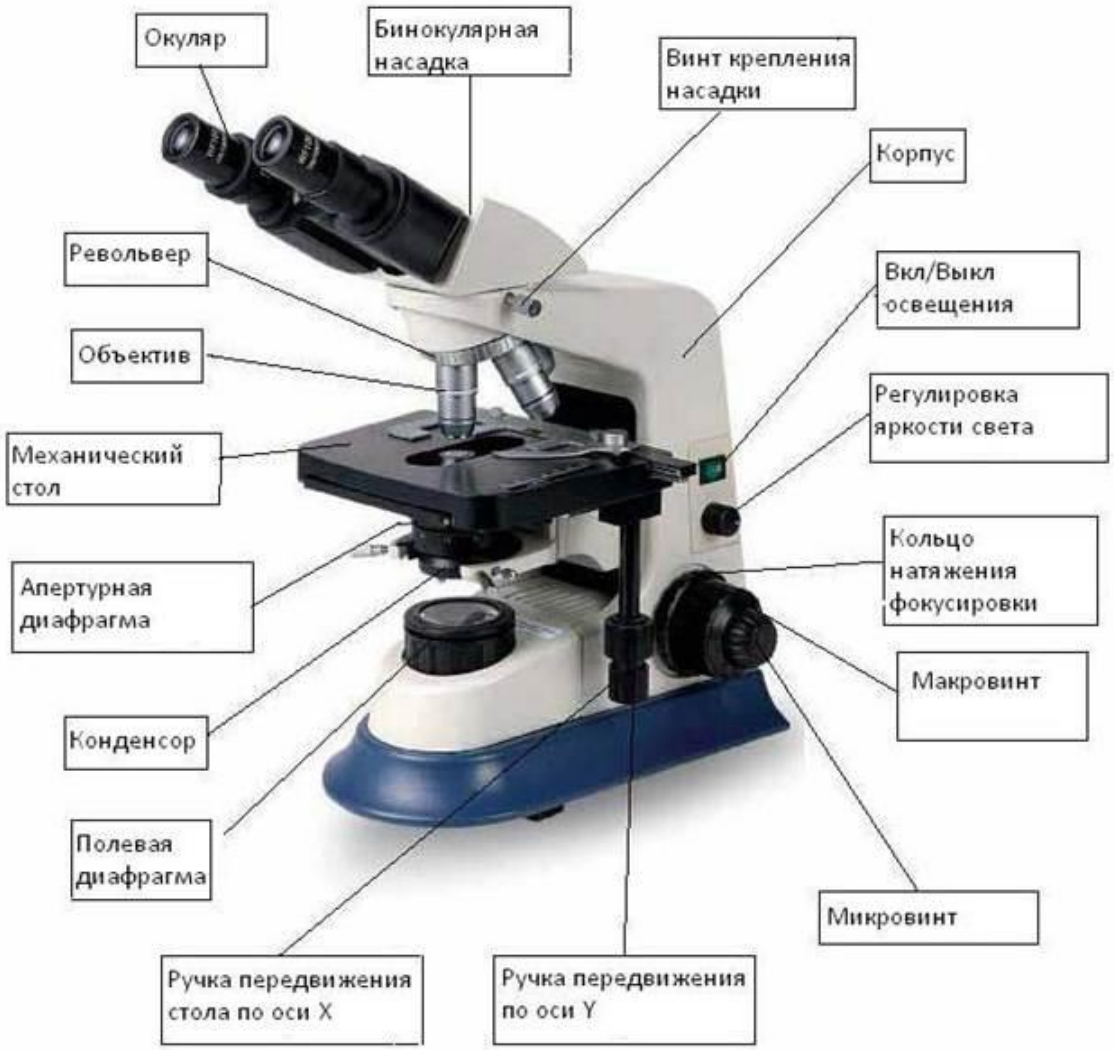
Розділи *прикладної* мікробіології*: промислова, сільськогосподарська, медична мікробіологія* і її частина *санітарна мікробіологія* (що вивчає мікрофлору води, повітря, ґрунту, харчових продуктів та здійснює їх санітарний контроль), *ветеринарна* мікробіологія.

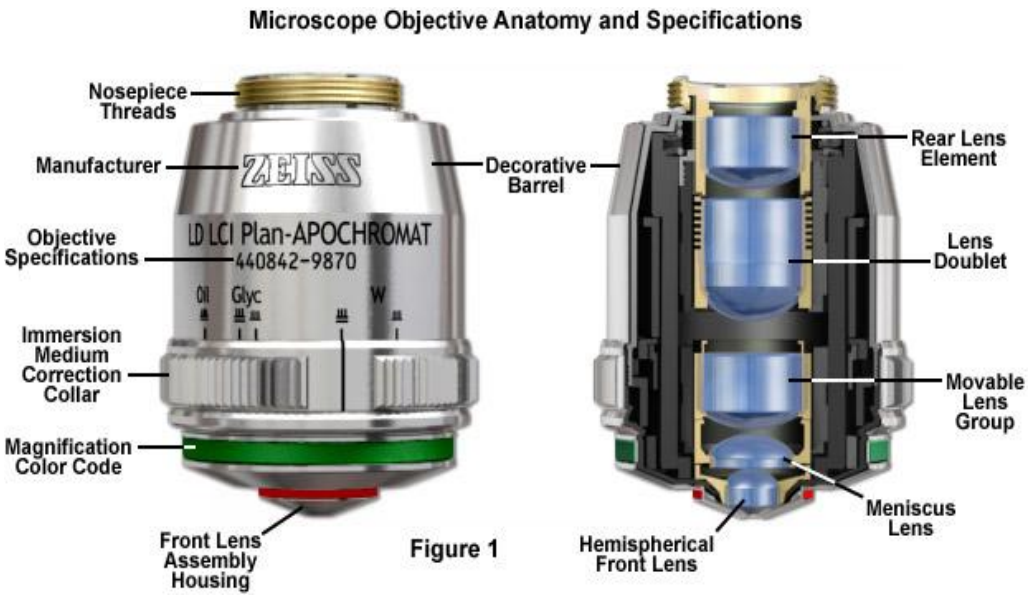
Вірусологія – наука про віруси, неклітинні форми життя. Займається проблемами розмаїття вірусів, їх класифікацією та вивченням вірусних інфекцій.

Світ мікроорганізмів в усьому його розмаїтті ще далеко не пізнаний. Дані, отримані за допомогою методів молекулярної біології (ампліфікація, розділення і секвенс генів, що кодують І6S рРНК) дозволяють стверджувати, що людина здатна культивувати менше 1% всіх мікроорганізмів, що живуть на Землі.



Світловий мікроскоп

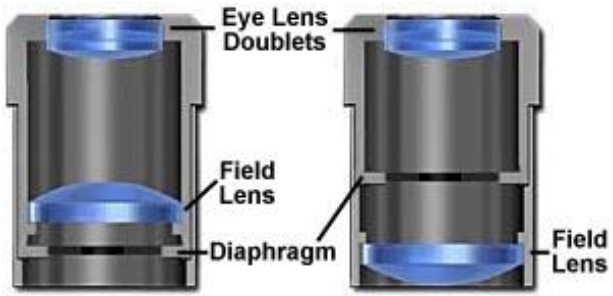




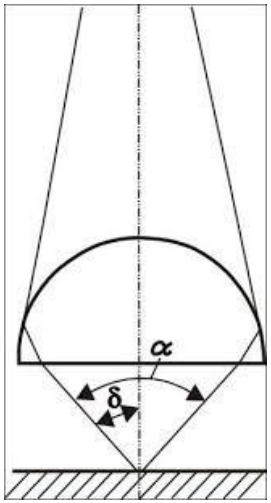
Апертура (А) *- добуток показника заломлення середовища на синус половини апертурного кута при вершині конуса світлового потоку, який проходить через об'єкт*

A = n·sin α / 2

об' єктив



окуляр



Апертурний кут

Збільшення та роздільна здатність мікроскопа

Роздільна здатність мікроскопа (**R**) **-** найменша відстань між двома точками, за якою вони спостерігаються окремо (не зливаються).

$$R = \frac{1{,}22\lambda}{A_1 + A_2}$$

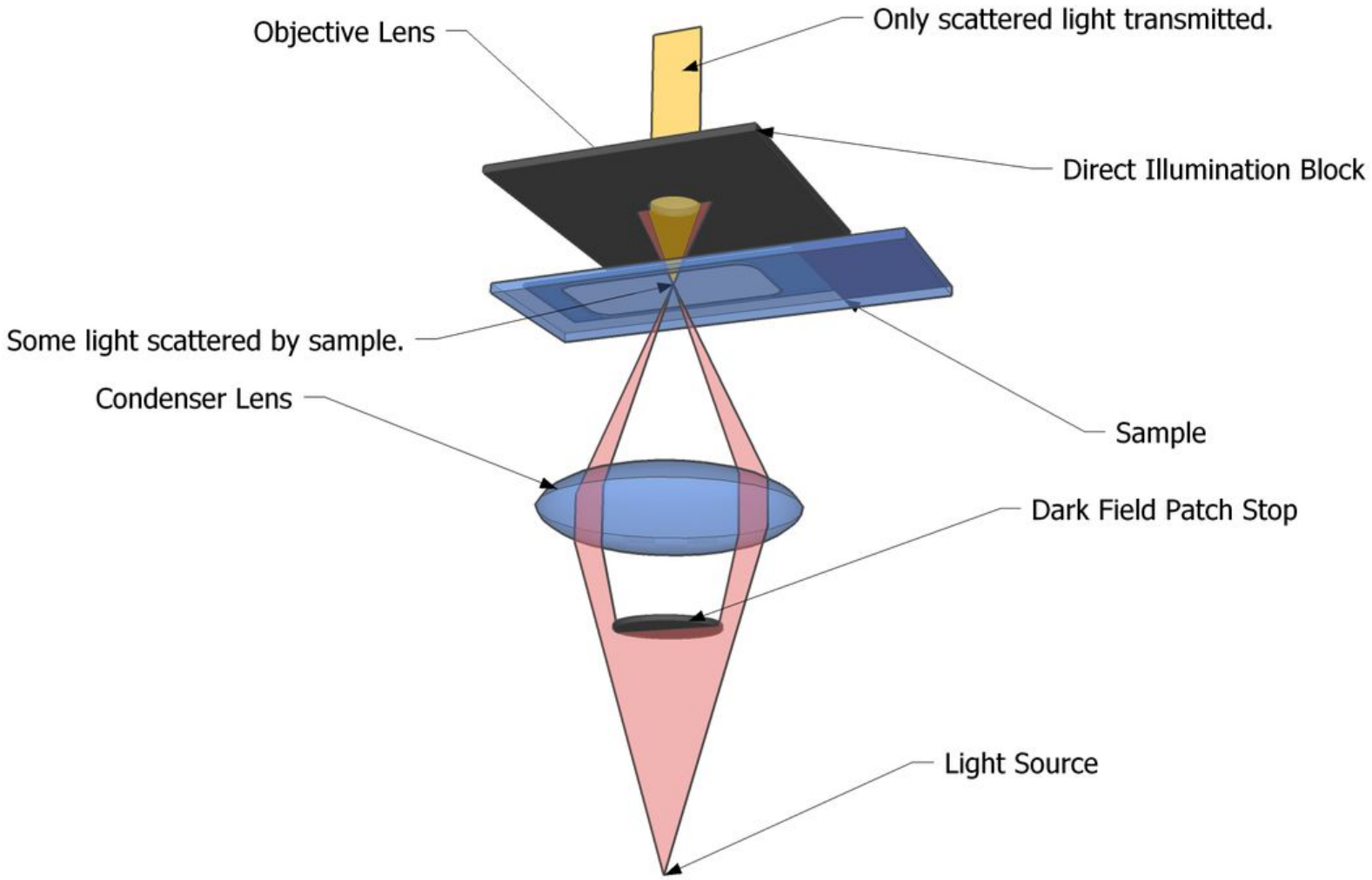
λ - довжина хвилі світла, A_1 - апертура об'єктива A_2 - апертура системи освітлення (конденсора). Довжина хвилі видимого спектру 0,4-0,7 мкм (середня 0,55 мкм). Ультрафіолетові промені мають довжину хвилі меншу за 0,4 мкм .

Чим менше значення R тим краще

Загальне збільшення мікроскопа (V) визначають як добуток збільшення об'єктиву на збільшення окуляру

$$V = V_{об} \times V_{ок}$$

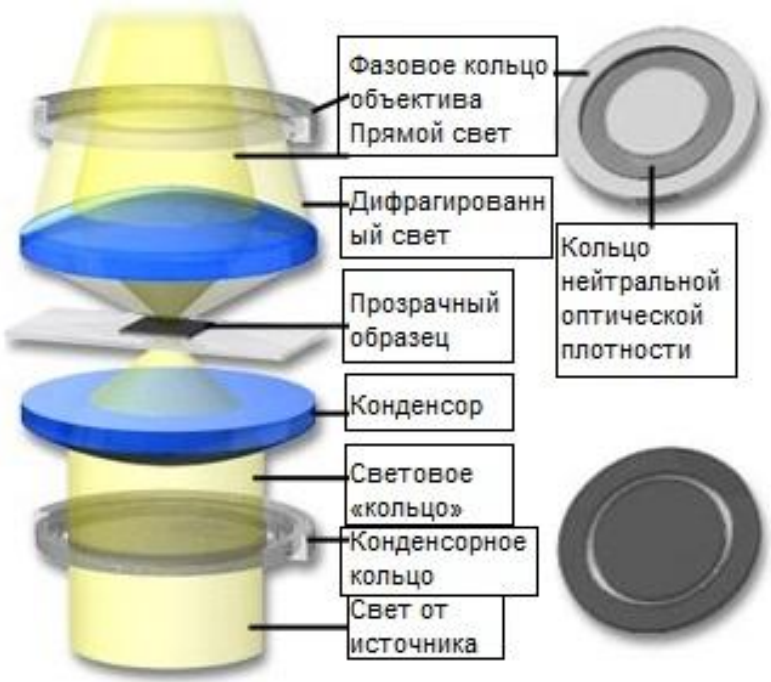
Мікроскопія у темному полі

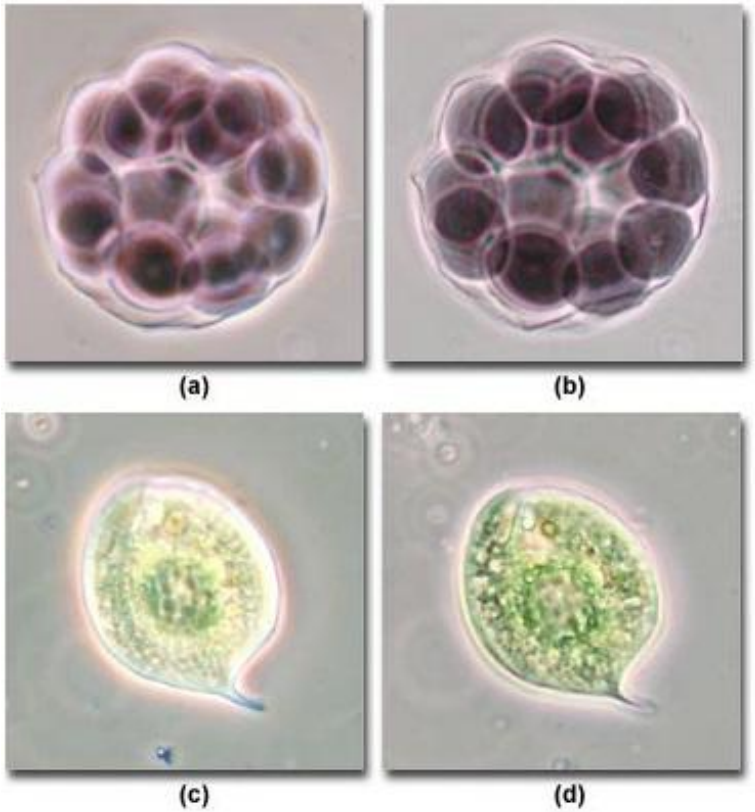


В основі іншого типу світлового мікроскопу - **УЛЬТРАМІКРОСКОПУ (МІКРОСКОПІЇ В ТЕМНОМУ ПОЛІ**) лежить принцип потужного бічного освітлення в темному просторі *(типу променя світла в кінотеатрі - конусу Тиндаля)* Завдяки такому освітленню на темному фоні препарату чітко видно яскраво освітлені контури об'єкту. Роздільна здатність при цьому покращується на один і більше порядків (0,06-0,02 мкм).

Для мікроскопії в темному полі використовують спеціальні конденсори які мають затемнену центральну частину. Косі промені, відбиті конденсором, потрапляючи на частинки в препараті, заломлюються і утворюють хвилі дифрагованого світла. Коли такі хвилі потрапляють в об'єктив, ми бачимо на темному фоні частинки які яскраво світяться. Для досліджень в темному полі готують препарат «роздавлена крапля» при чому виготовлений препарат має бути якомога тоншим: товщина предметного скла має бути не більше 1,1 мм, а покривного 0,17 мм. Мікроскопію в темному полі застосовують для дослідження **живих** дрібних та неконтрастних живих об' єктів, наприклад збудників лептоспірозу. Проте в темному полі неможливо дослідити форму клітин їх внутрішню будову. Однак можна чітко побачити рух об'єкта, який виглядає як світла точка на темному фоні.

Фазово-контрастна мікроскопія



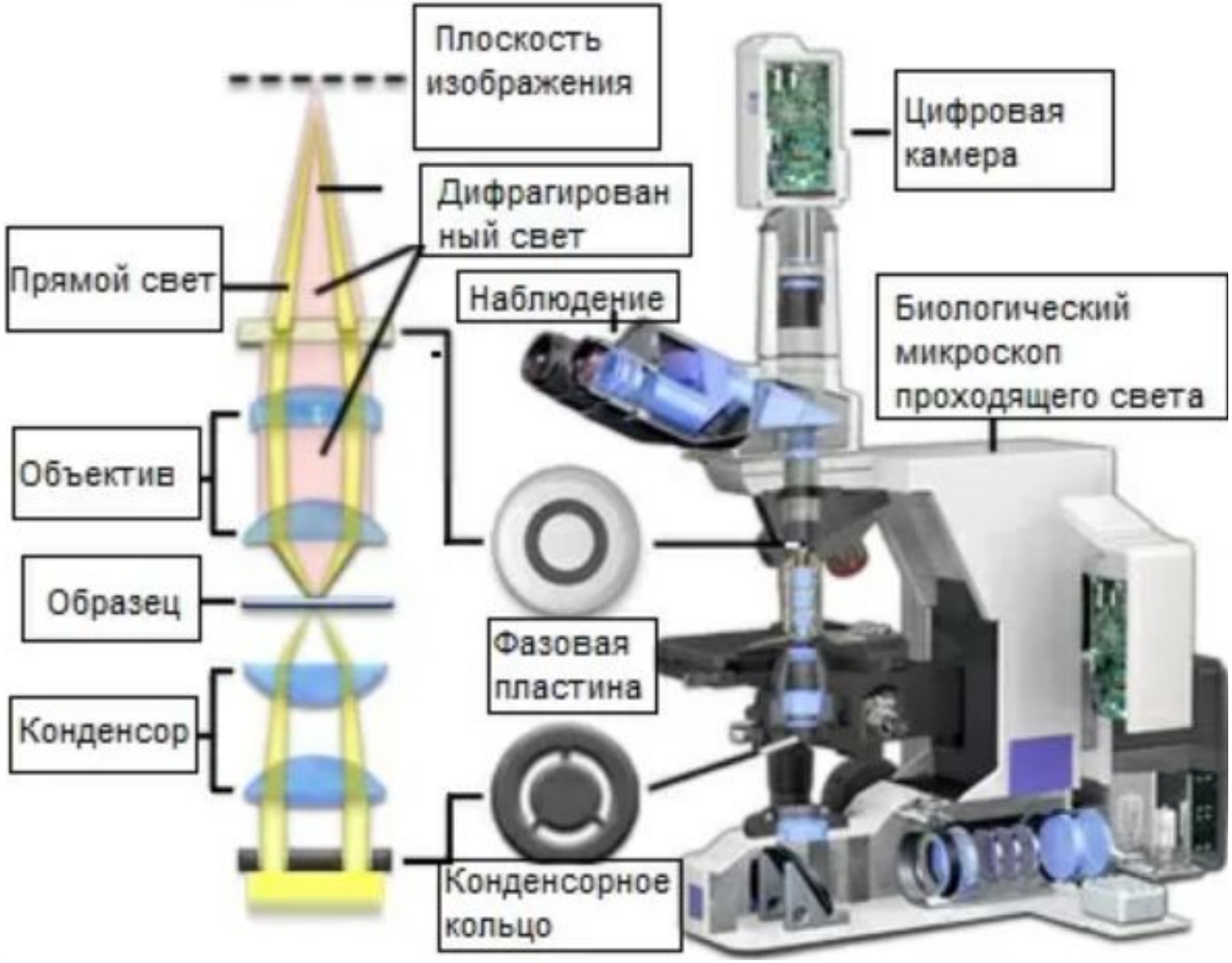


Фазово-контрастну мікроскопію використовують для вивчення внутрішніх структур живих прозорих не кольорових об’єктів. Різні показники заломлення світла між різними внутрішньоклітинними структурами стають більш помітними. Здійснюють за допомогою світлового мікроскопу і спеціального пристрою: фазово-контрастного конденсора з кільцевими діафрагмами (*кругла пластинка з щілиною у вигляді кільця*) і фазової пластинки у формі кільця (пластинку отримують за допомогою напилення диску солями металів .

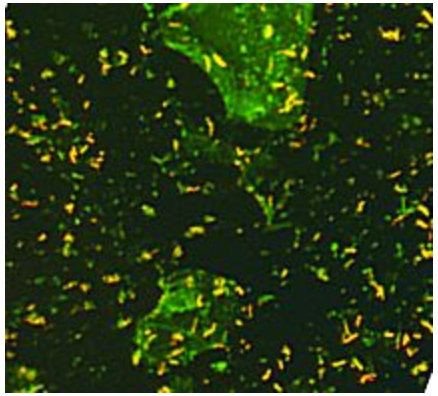
Через кільцеву діафрагму в об’єктив потрапляє кільце світла, при чому промінь, який проходить через прозорий об’єкт розпадається на два промені: прямий і заломлений. Прямий промінь фокусується на кільці фазової пластинки, а заломлений як би «обходить» її. Оскільки шляхи променів різні - то виникає **різниця фаз**, яка зростає за рахунок фазової пластинки. Тобто фазові зміни переходять в амплітудні коливання хвиль і можуть сприйматися оком людини.

- Метод не змінює роздільну здатність мікроскопу, але дозволяє розглядати тонкі структури живих клітин мікроорганізмів, вивчати стадії їх розвитку, процес поділу, відрізняти спори від колоній клітин тощо.

Будова та принцип роботи фазово-контрастного мікроскопу



Люмінесцентна мікроскопія



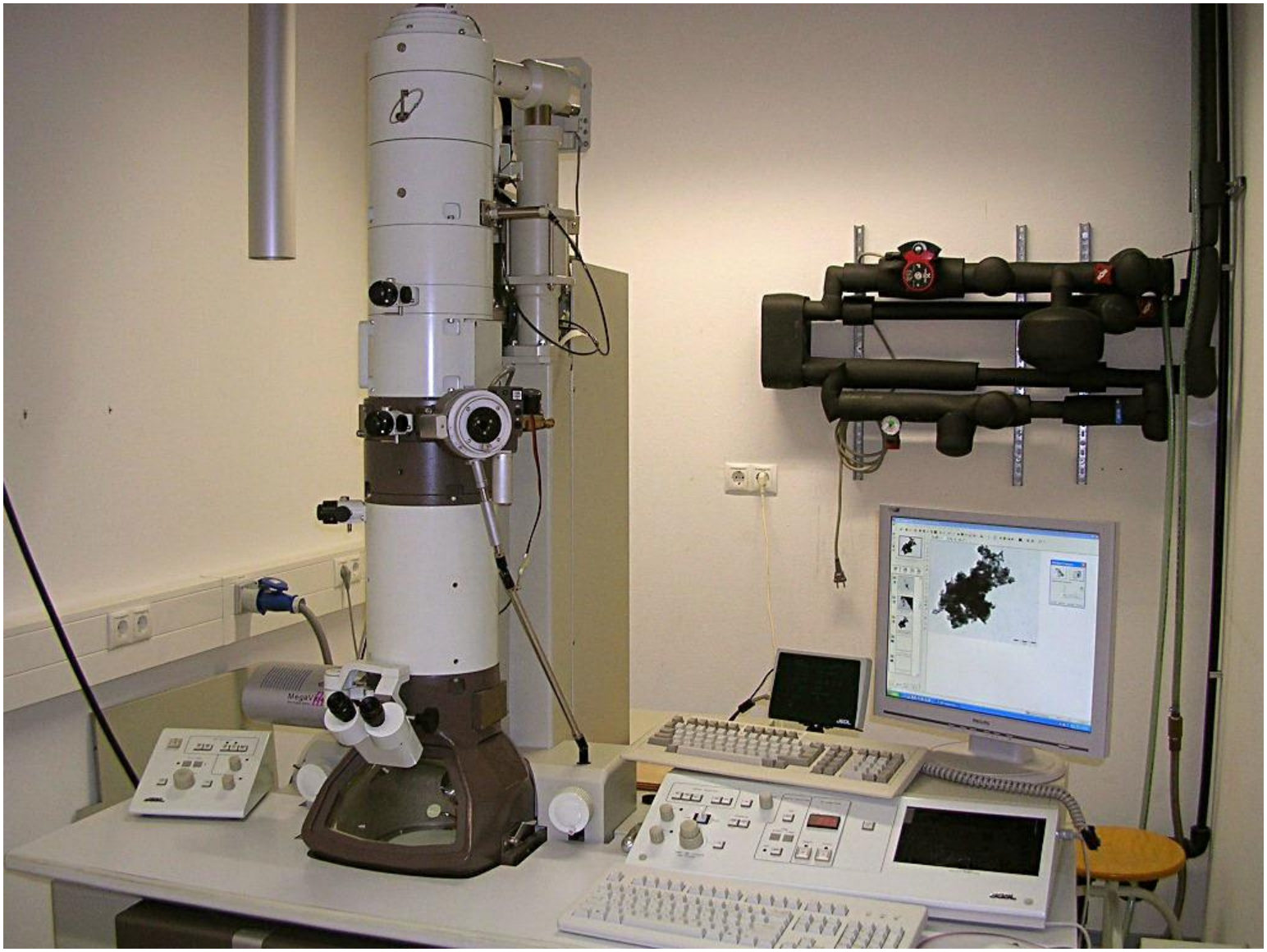
Mycobacterium tuberculosis
- паличка Коха

вторинна флюоресценція

Люмінесцентну мікроскопію використовують для живих і фіксованих клітин, метод дозволяє проводити кількісні дослідження. Має кращу роздільну здатність ніж інші види світлової мікроскопії (*менша λ див. формулу*), високу чіткість зображення. Дозволяє відрізнити живі клітини від мертвих за характером світіння.

- Зображення в такому мікроскопі виникає за рахунок світіння збуджених систем в результаті опромінення УФ променями та короткими хвилями видимого спектру **λ = 300-460 нм**. Люмінесцентний мікроскоп обладнаний меркурієво-кварцевим (або кварцево-галогенним) джерелом світла, системою кварцевих лінз і спеціальних світлофільтрів для захисту очей від УФ випромінювання.
- Природа світіння наступна: частинка об'єкту поглинає квант світла, одержує енергію і починає світитися тому, що повертаючись у вихідний стан, віддає енергію у вигляді світла з довжиною хвилі, яка більша за довжину хвилі збуджуючого випромінювання. При феномені люмінесценції проходить певний проміжок часу між поглинанням збуджуючої енергії і її випроміненням у вигляді світіння. *Якщо проміжок перевищує 10^{-4} с то явище називають* ***фосфоресценція,*** *якщо менше 10^{-4} с то -* ***флюоресценція***

Електронний мікроскоп

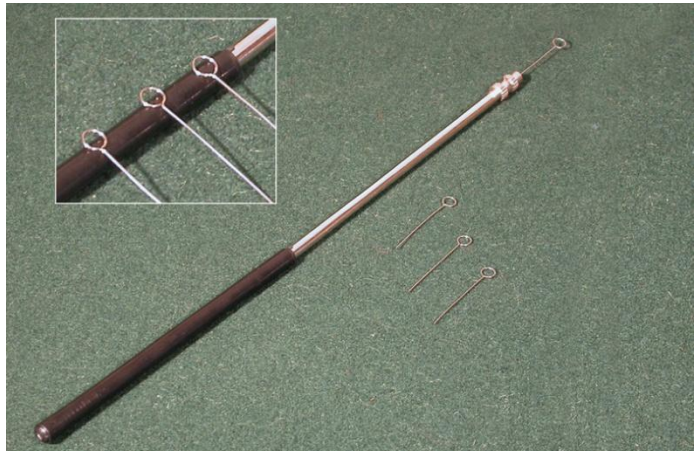


- В **електронній мікроскопії** замість світлових променів використовують пучок електронів з **λ = 0,04 нм**, що в 10^4 раз менша λ видимого світла. Зображення виводять на монітор, тому чутливість рецепторів сітківки людського ока не обмежує сприйняття об’єкта. Так, роздільна здатність і корисне збільшення у електронного мікроскопа на кілька порядків краще.

- **Трансмісійний (просвічувальний) мікроскоп** Transmission electron microscope (TEM). Шлях електронів подібний до шляху променів у світловому мікроскопі. Пучок електронів, який проходить у вакуумі від джерела (вольфрамової гармати) проходить через ряд електромагнітних лінз. Конденсорна лінза збирає пучок електронів на препараті, а декілька збільшувальних лінз створюють зображення, яке проєктується на екран. Досліджують ультратонкі зрізи товщиною до 100 нм

- **Сканнувальний (растровий) мікроскоп** Scanning electron microscope (SEM) дозволяє отримати тривимірне зображення поверхні об’єктів, які вкривають шаром металу (золото, платина) або карбону. Пучок електронів який потрапляє на поверхню такого об’єкту вибиває електрони з напилення, які реєструються на екрані електронно-променевої трубки. Контраст зображення зумовлений тим, що кількість відбитих об’єктом вторинних електронів пропорційна куту між електронним пучком і поверхнею об’єкта.

Мікробіологічний посуд та матеріали



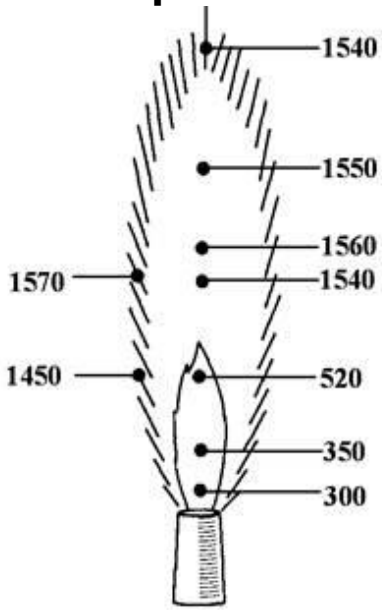
Методи досягнення асептичних умов в мікробіологічній лабораторії

Стерилізація:

- ***Термічна*** (кип’ятіння, пастерізація, прожарювання в полумї пальника стерилізація парою під тиском)
- ***Сухим*** жаром
- ***Хімічна***
- ***УФ променями***
- ***Фільтрування*** через бактеріальні фільтри

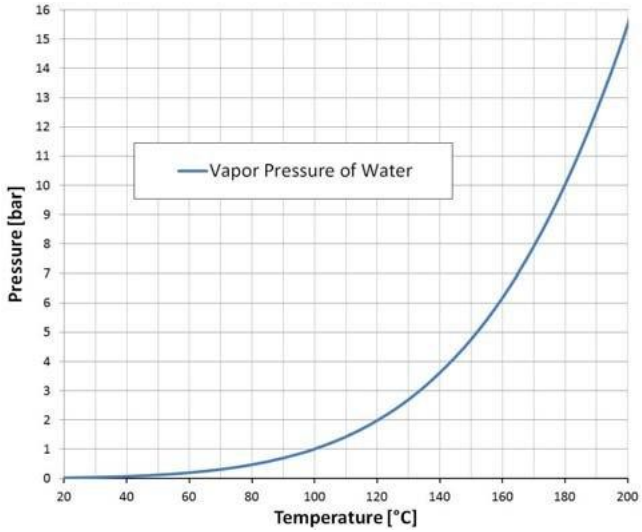
Прожарювання у полум’ї пальника

Спиртівка



Температура полум'я пальника

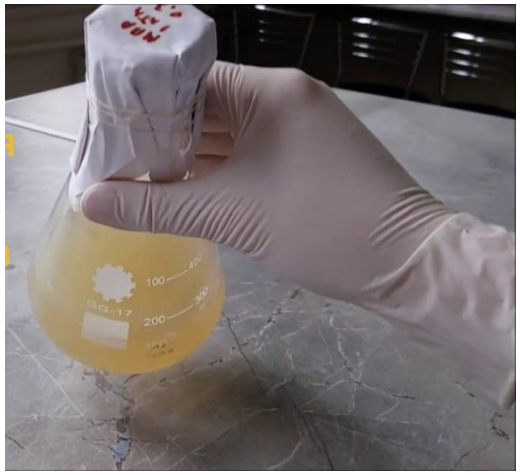
Стерилізація насиченою парою під тиском



Величина тиску в атмосферах	Показання манометра автоклава, техн. атм.	Температура, ^{0}C
1,00	0	100
1,25	0,25	107
1,50	0,50	112
2,00	1,00	121
2,50	1,50	127
3,00	2,00	134

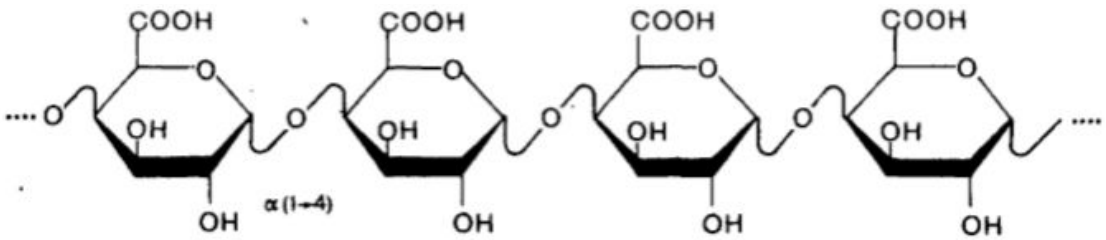
Класифікація поживних середовищ

Консистенція				Склад та походження			Призначення		
								Спеціального призначення	
Рідкі	Напіврідкі	Щільні	Сипучі	Натуральні	Синтетичні	Напівсинтетичні	*Загального призначення*	Елективні	Диференційно-діагностичні



Ущільнюючі компоненти для твердих середовищ

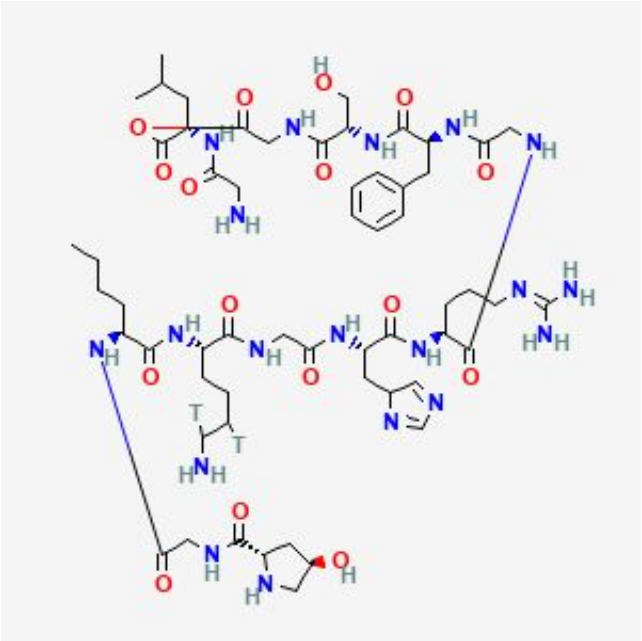
Агар – група складних полісахаридів, до складу входять агарози і агаропектини. Агар одержують із червоних морських водоростей. Він зручний тим, що більшість мікроорганізмів не використовують його в якості субстрату для росту. Для одержання твердого середовища застосовують 2 % агар-агару. У воді такий розчин утворює гель, який твердіє за 40 ºС. На таких середовищах можна культивувати мезо- та термофільних мікроорганізмів.

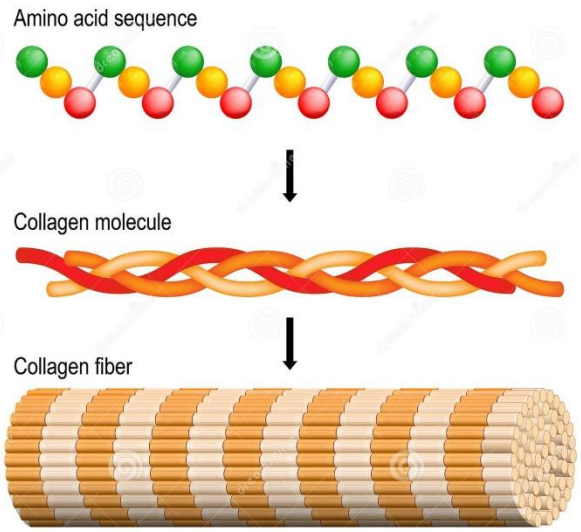


Полігалактуронова (пектова) кислота

Ущільнюючі компоненти для твердих середовищ

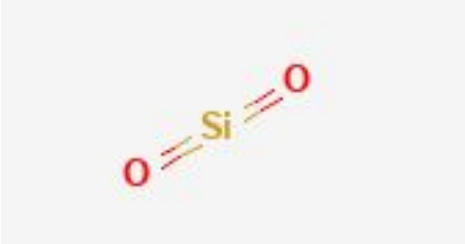
Желатина – екстракт, отриманий із субстратів, багатих на колаген (білок кісток, хрящів, сухожиль). Утворений желатиною гель плавиться за температури 25 ºС, яка нижче температури інкубації багатьох мікроорганізмів (30-37ºС). Желатина розріджується протеолітичними ферментами, які мікроорганізмами виділяються в середовище. Ці властивості желатини обмежують її застосування в якості ущільнюючої речовини.

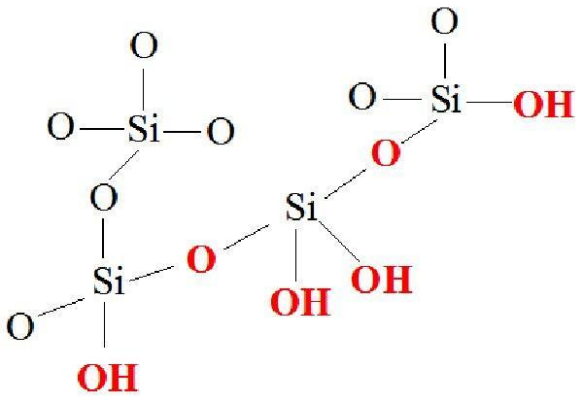




Ущільнюючі компоненти для твердих середовищ

Силікагель використовують як тверду основу для синтетичних середовищ, які не містять органічних речовин



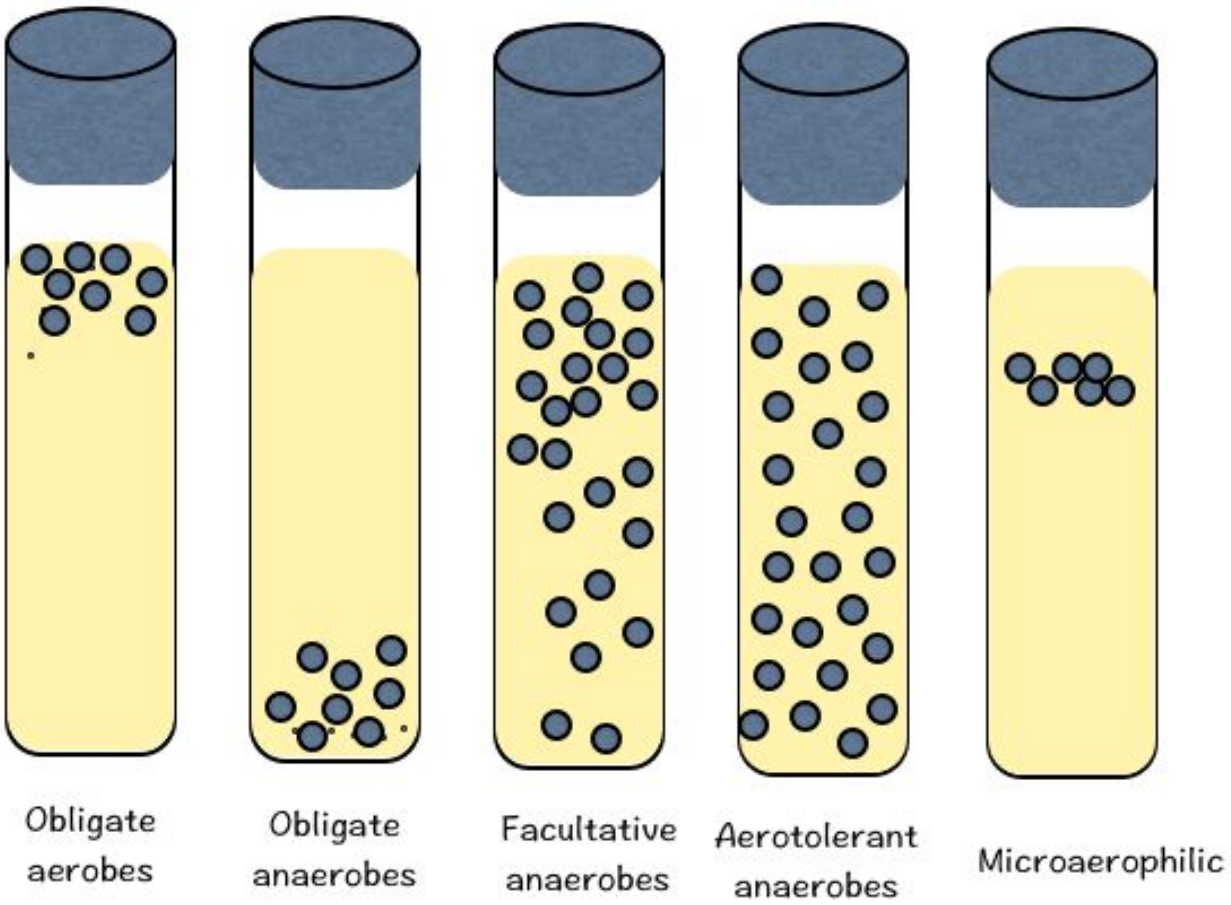


Культури мікроорганізмів

Вирощування мікроорганізмів на поживних середовищах називається *культивуванням,* а культивування за певної температури – *інкубуванням.*

- ***Чисті культури*** – нащадки однієї клітини (клон). Чиста культура характеризується однорідністю клітин і колоній.
- ***Змішані культури*** – нащадки клітин декількох видів. Природні популяції являють собою суміш різних видів мікроорганізмів. Можуть бути одержані штучно шляхом поєднання кількох різних чистих культур.
- ***Накопичувальні культури*** – культури, в яких переважають представники однієї групи мікроорганізмів. Для накопичення потрібні умови, за яких мікроорганізм долає конкуренцію із іншими. Підбираючи чинники (джерела енергії, вуглецю, азоту, освітленість, температуру, pH), створюють умови і інокулюють середовище природною популяцією, наприклад з ґрунту. Найбільш пристосований до такого середовища мікроорганізм зростає і витісняє всі інші.

Аеробне культивування



Анаеробне культивування

анаеростат

контейнер

пробірки

герметичний бокс