

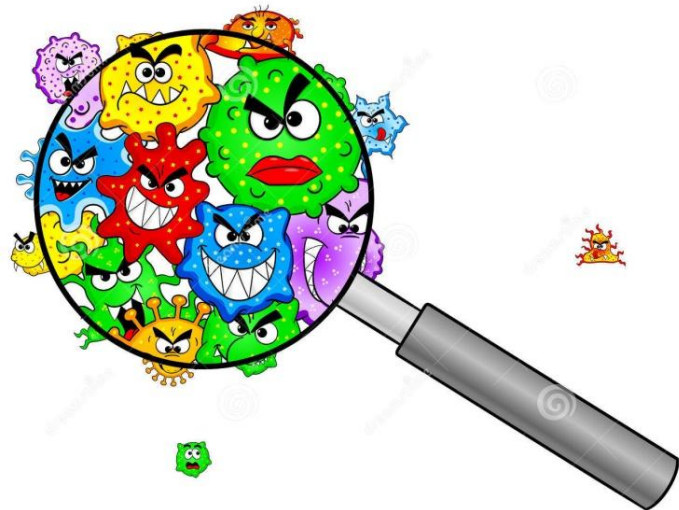
Прикладна мікробіологія та ензимологія

Лектор: доц. Хрокало Людмила Анатоліївна

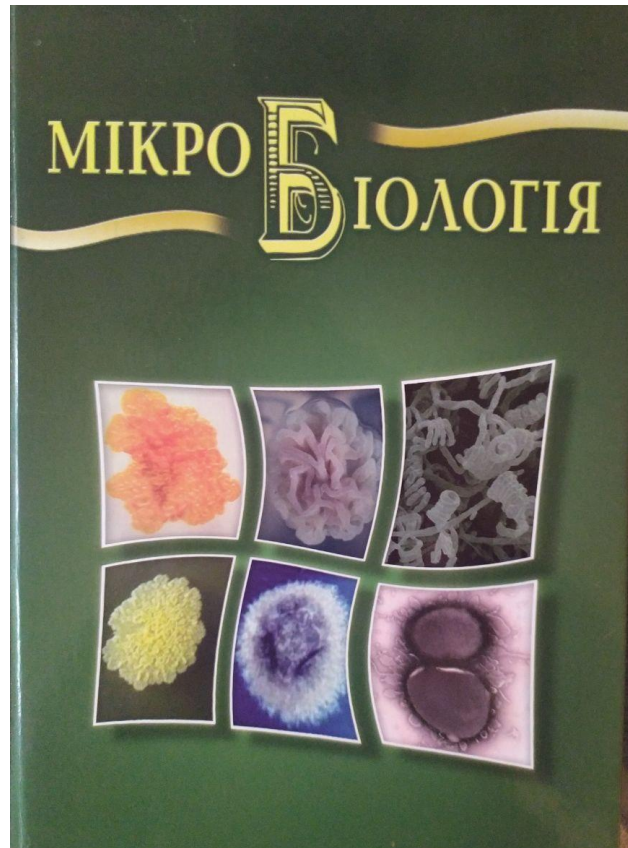
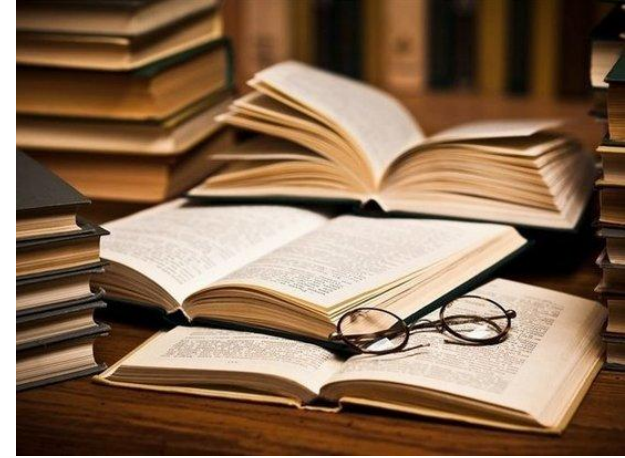


## Лекція 1.

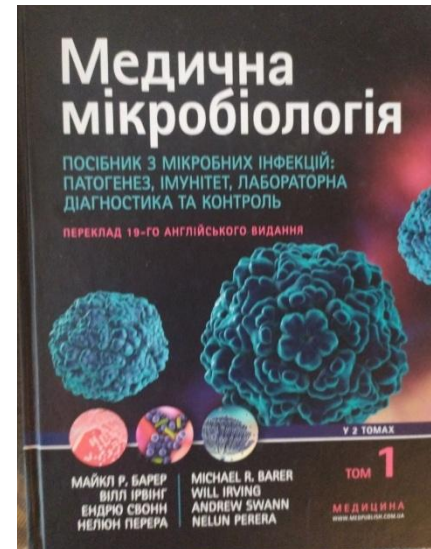
**Мікробіологія як наука. Мікробіологічні процеси в хімічних технологіях. Методи дослідження мікроорганізмів: мікроскопія, культивування**



**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 створюються нові терміни. Адже жодна галузь науки не може обійтися без знання основ термінології, що формується на базі латинської мови.

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

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

- 6 голосних: а, е, і, о, у, у. Буква **i** може вимовлятися як укр. [i] 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 [e]: **vértebrae** [вертебре], **foetus** [фетус].

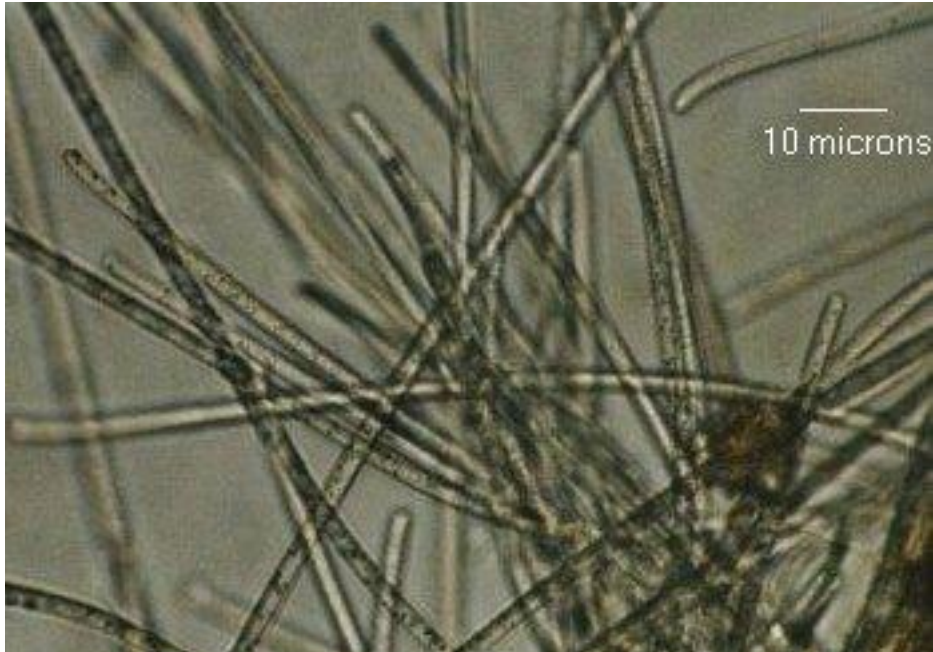
**Au** вимовляється як [ав] : **auris** (авріс).

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

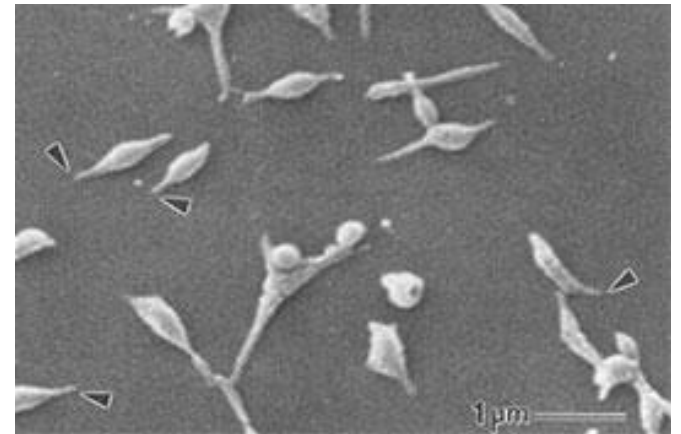
<http://graecolatini.bsu.by/htm-different/latin-translit.htm>

**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

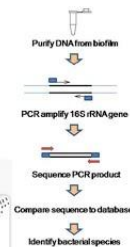
- мікроорганізми беруть участь у глобальному коlobігу біогенних елементів. Наступні процеси були б неможливі без них: фіксація атмосферного азоту, мінералізація органічних речовин;
- на життєдіяльності мікроорганізмів засновані виробництва: хлібопекарство, пивоваріння, виноробство, отримання молочнокислих 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.

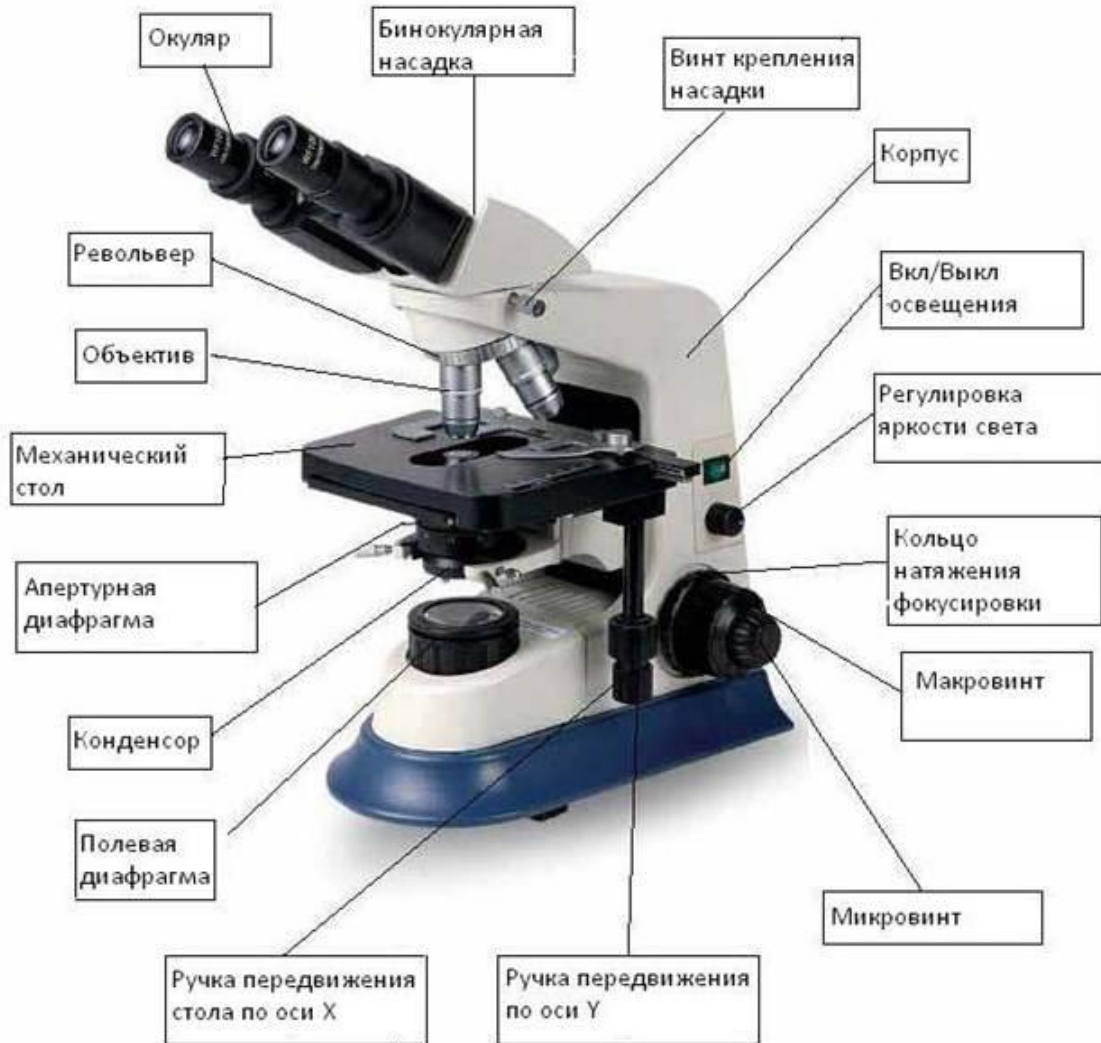
**Вірусологія** – наука про віруси, неклітинні форми життя. Займається проблемами розмаїття вірусів, їх класифікацією та вивченням вірусних інфекцій.

*Світ мікроорганізмів в усьому його розмаїтті ще далеко не пізнаний. Дані, отримані за допомогою методів молекулярної біології (ампліфікація, розділення і секвенс генів, що кодують 16S рРНК) дозволяють стверджувати, що людина здатна культивувати менше 1% всіх мікроорганізмів, що живуть на Землі.*

## 16s rRNA and its use



# Світловий мікроскоп



### Microscope Objective Anatomy and Specifications

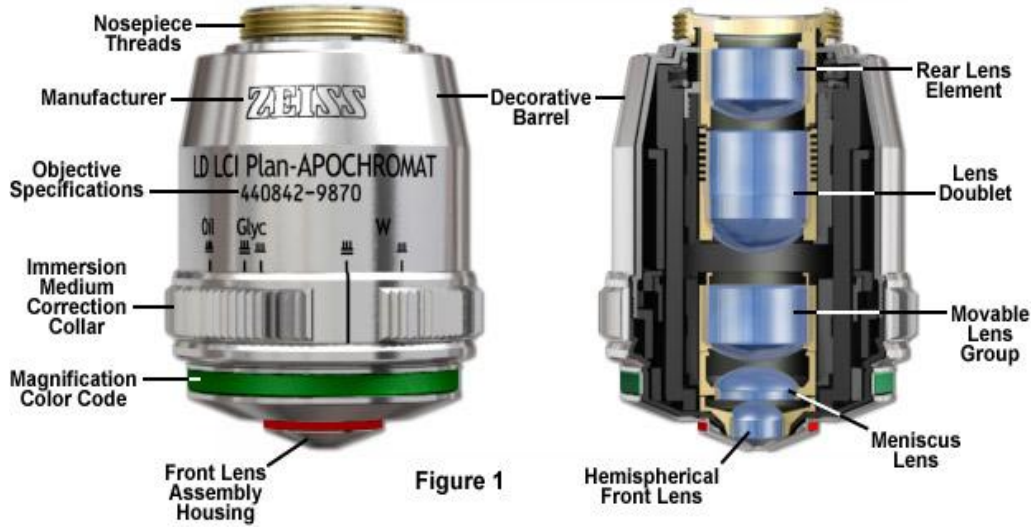
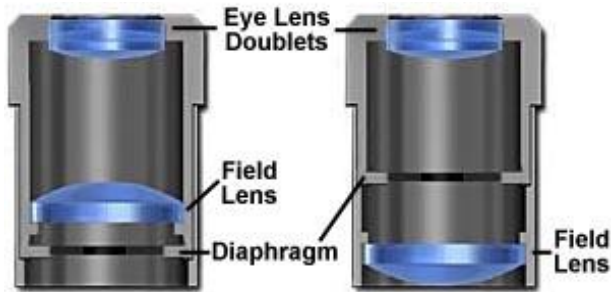


Figure 1

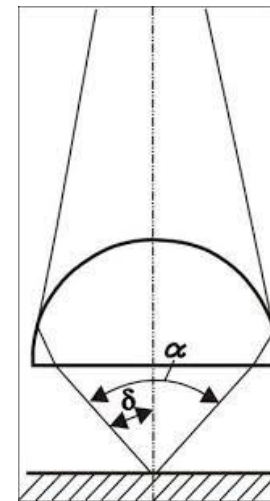
Апертура (A) - добуток показника заломлення середовища на синус половини апертурного кута при вершині конуса світлового потоку, який проходить через об'єкт

$$A = n \cdot \sin \alpha / 2$$

## 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).

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

$\lambda$  - 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 .

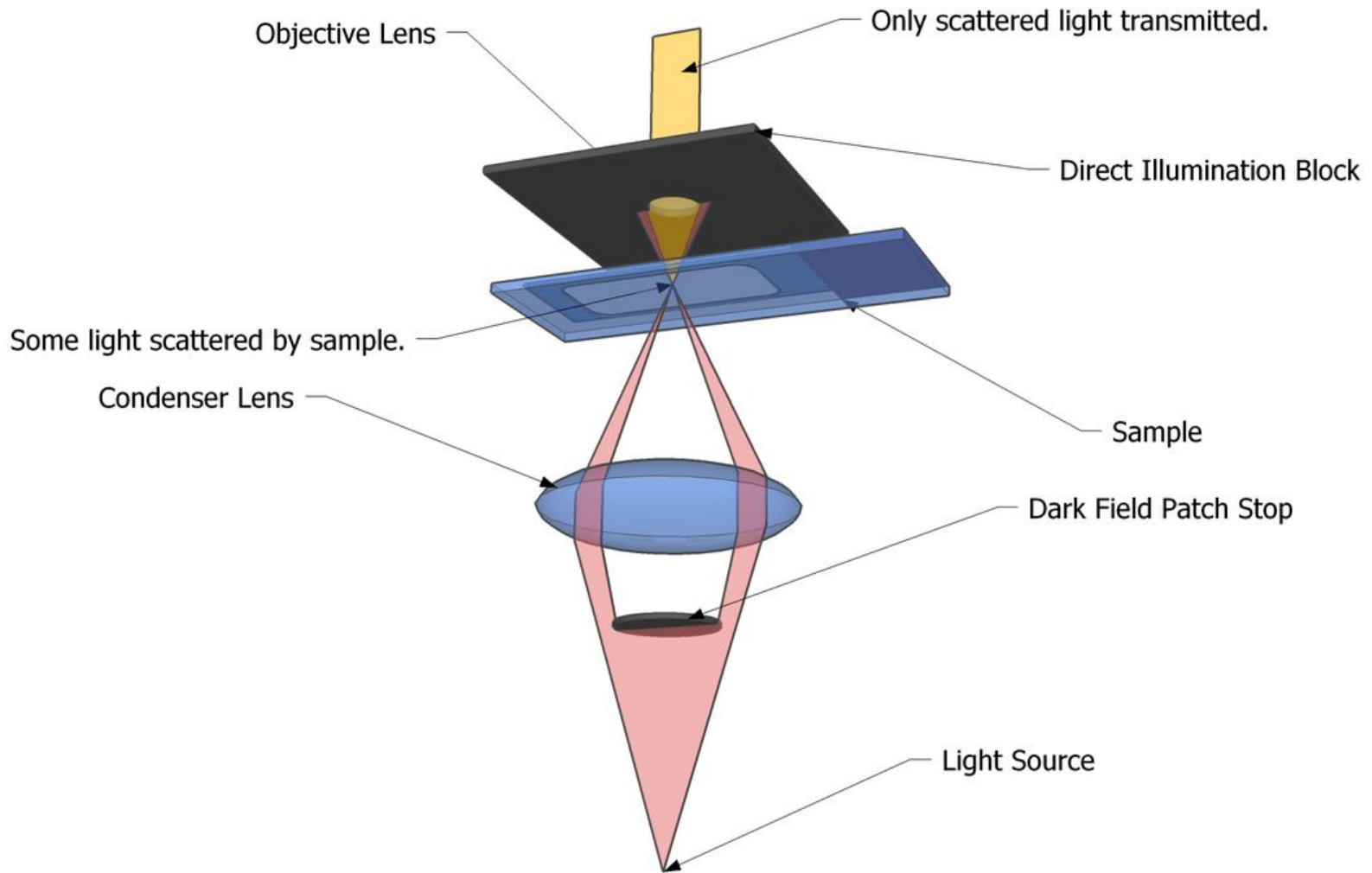
*Чим менше значення R тим краще*

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

$$V = V_{об} \times V_{ок}$$



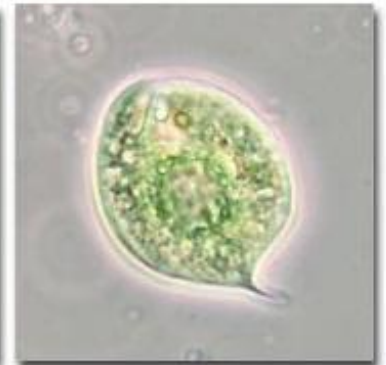
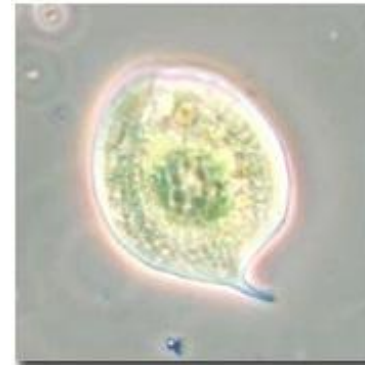
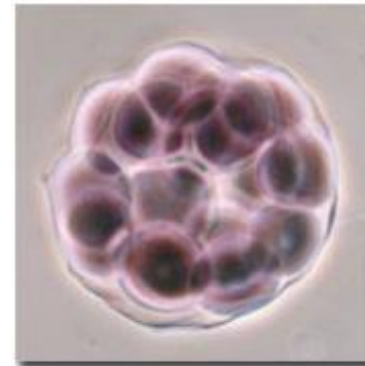
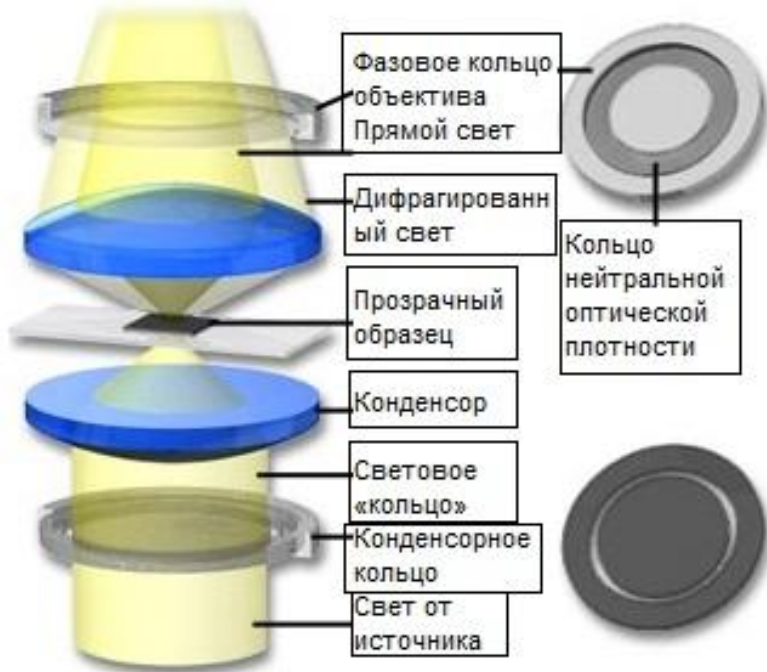
# Мікроскопія у темному полі



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 Тундаля*) 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

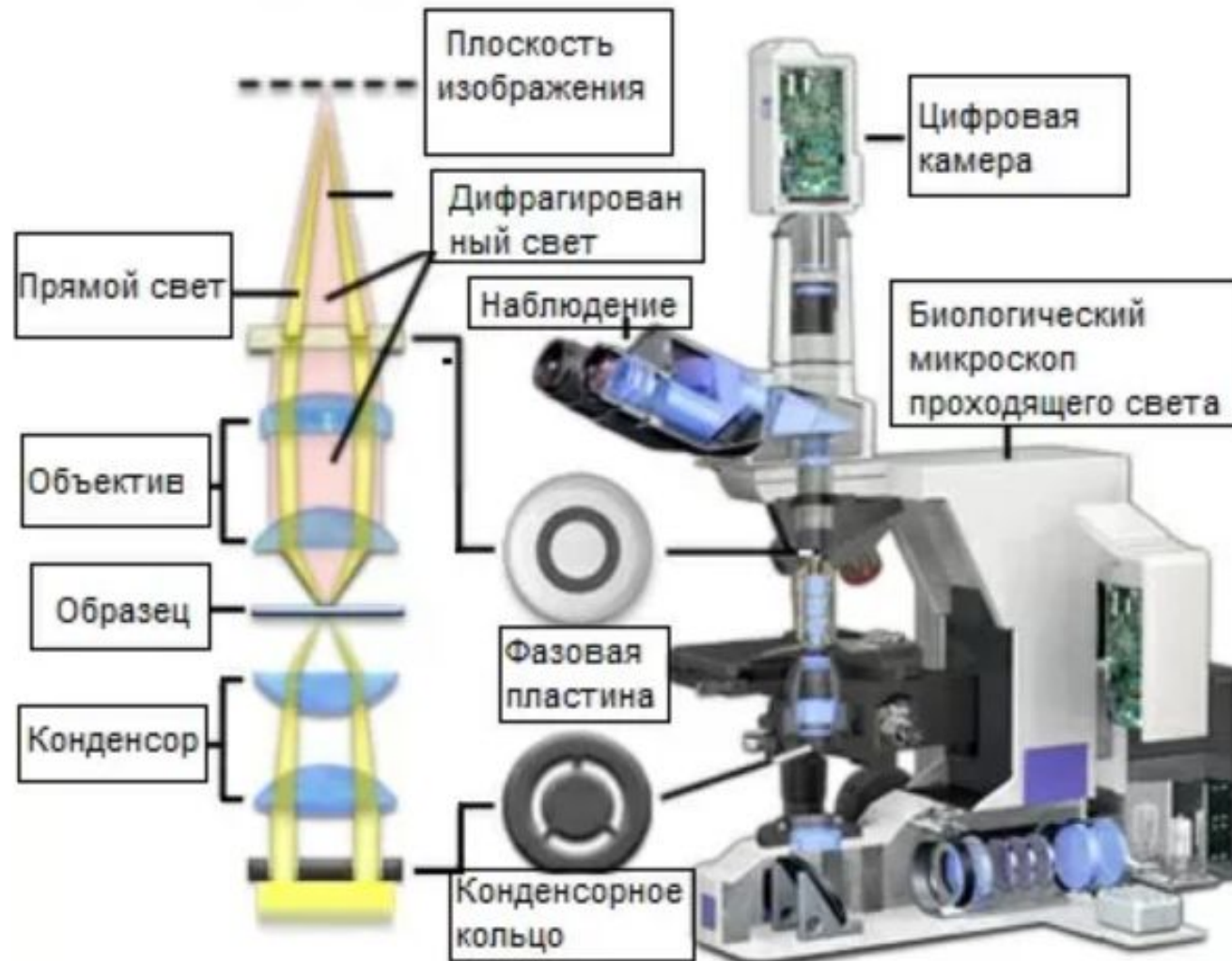


**Фазово-контрастну мікроскопію** використовують для вивчення внутрішніх структур живих прозорих не кольорових об'єктів. Різні показники заломлення світла між різними внутрішньоклітинними структурами стають більш помітними. Здійснюють за допомогою світлового мікроскопу і спеціального пристрою: фазово-контрастного 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).

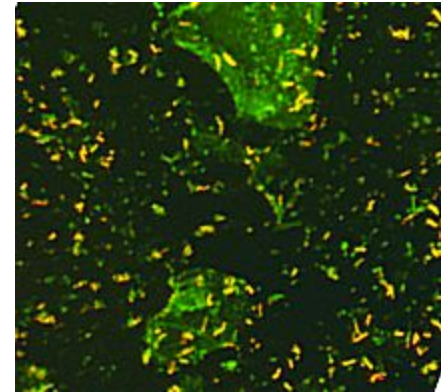
Через кільцеву діафрагму в об'єктив потрапляє кільце світла, причому промінь, який проходить через прозорий об'єкт розпадається на два промені: прямий і заломлений. Прямий промінь фокусується на кільці фазової пластинки, а заломлений як би «обходить» її. Оскільки шляхи променів різні - то виникає **різниця 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, відрізнити спори від колоній клітин тощо.

# Будова та принцип роботи фазово-контрастного мікроскопу



# Люмінесцентна мікроскопія



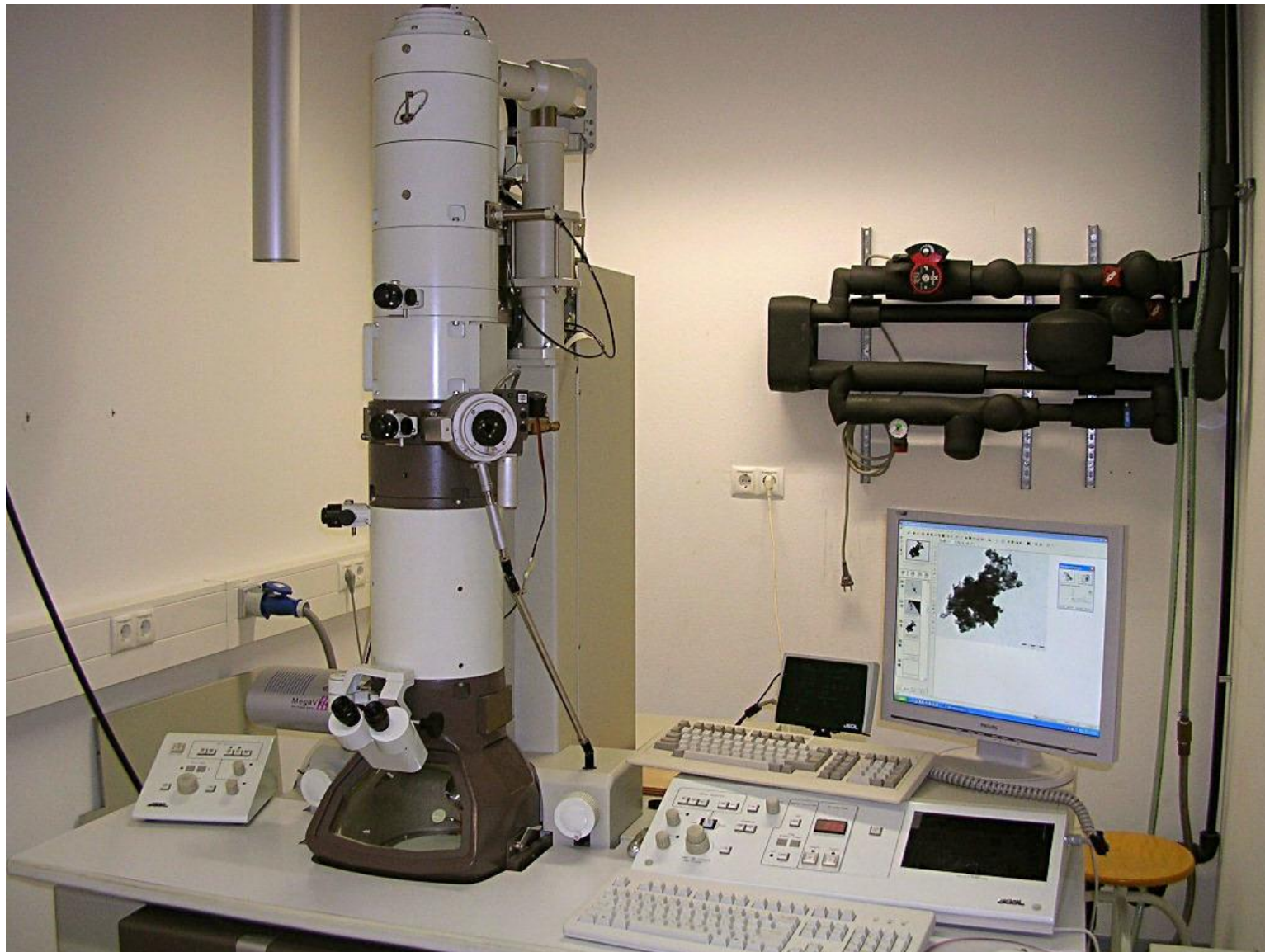
*Mycobacterium tuberculosis*  
- паличка Коха  
вторинна флюоресценція

**Люмінесцентну мікроскопію** використовують для живих і фіксованих клітин, метод дозволяє проводити кількісні дослідження. Має кращу роздільну здатність ніж інші види світлової мікроскопії (менша  $\lambda$  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  $\lambda = 300-460$  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***

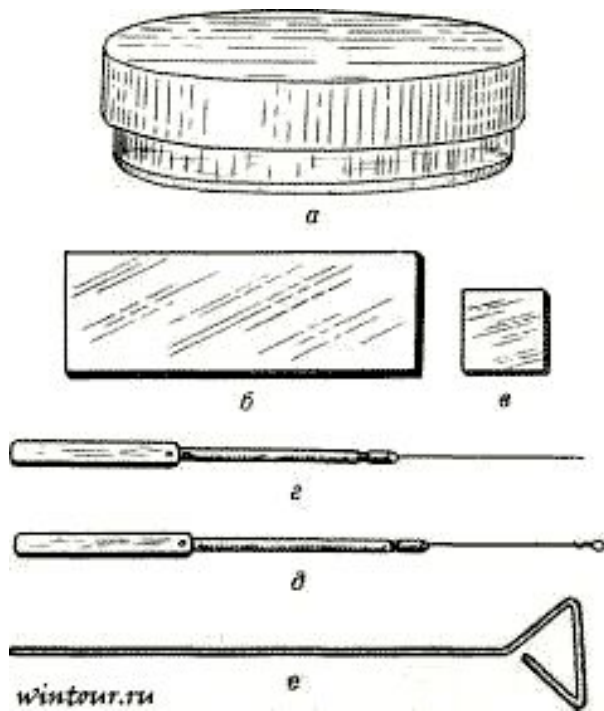


# Електронний мікроскоп



- В **електронній мікроскопії** замість світлових променів використовують пучок електронів з  $\lambda = 0,04$  нм, що в  $10^4$  раз менша  $\lambda$  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.
- **Трансмiсійний (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
- **Сканувальний (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

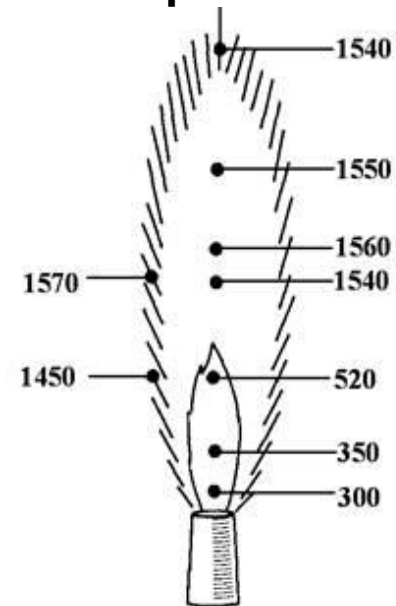
Стерилізація:

- **Термічна** (кип'ятіння, пастерізація, прожарювання в полум'ї пальника стерилізація паром під тиском)
- **Сухим** жаром
- **Хімічна**
- **УФ променями**
- **Фільтрування** через бактеріальні фільтри

# Прожарювання у полум'ї пальника



Спиртівка

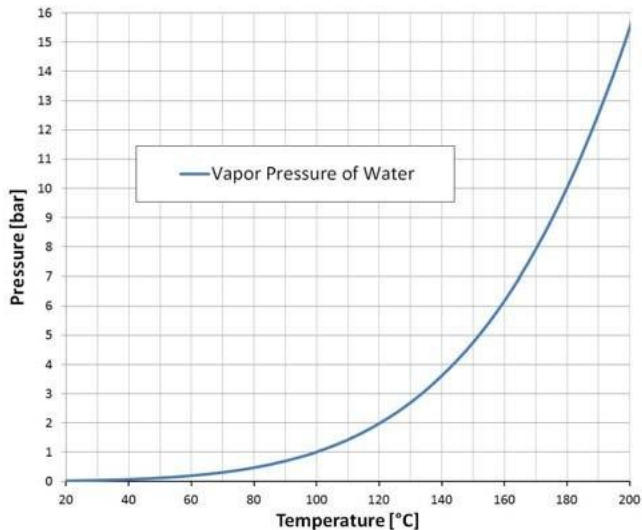


Температура полум'я пальника

# Стерилізація насиченою парою під тиском



Величина тиску в атмосферах	Показання манометра автоклава, техн. атм.	Температура, °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



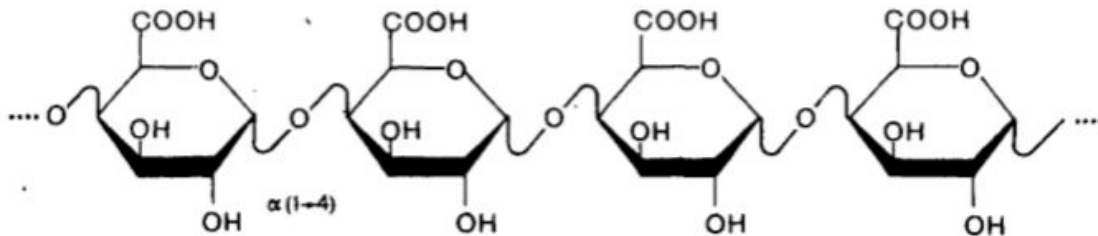
# Класифікація поживних середовищ

Консистенція				Склад та походження			Призначення	
Рідкі	Напіврідкі	Щільні	Сипучі	Натуральні	Синтетичні	Напівсинтетичні	<i>Загального призначення</i>	<i>Спеціального призначення</i>
								Елективні



# 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 °С. На таких середовищах можна культивувати мезо- та термофільних мікроорганізмів.



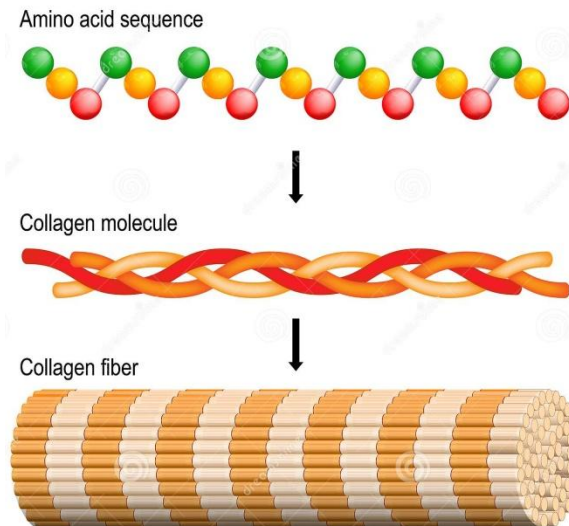
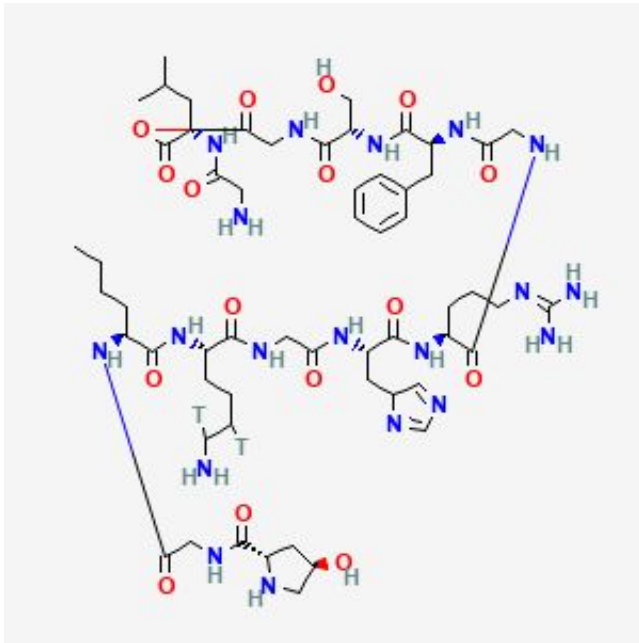
Полігалактуронова (пектова) кислота





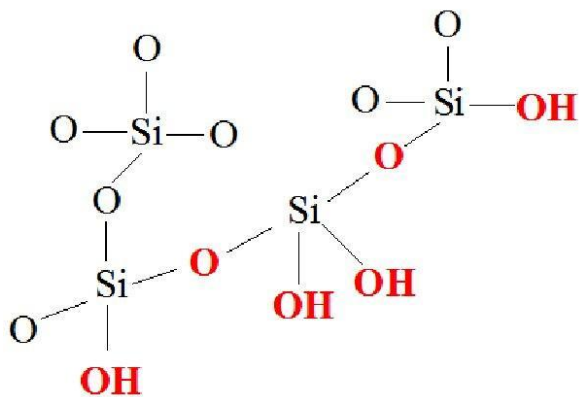
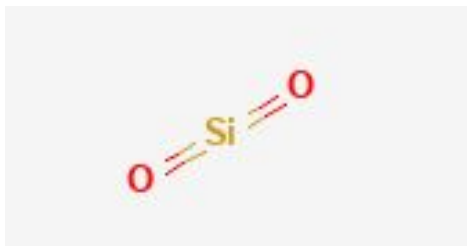
# Ущільнюючі компоненти для твердих середовищ

**Желатина** – екстракт, отриманий із субстратів, багатих на колаген (білок кісток, хрящів, сухожиль). Утворений желатиною гель плавиться за температури 25 °С, яка нижче температури інкубації багатьох мікроорганізмів (30-37°С). 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

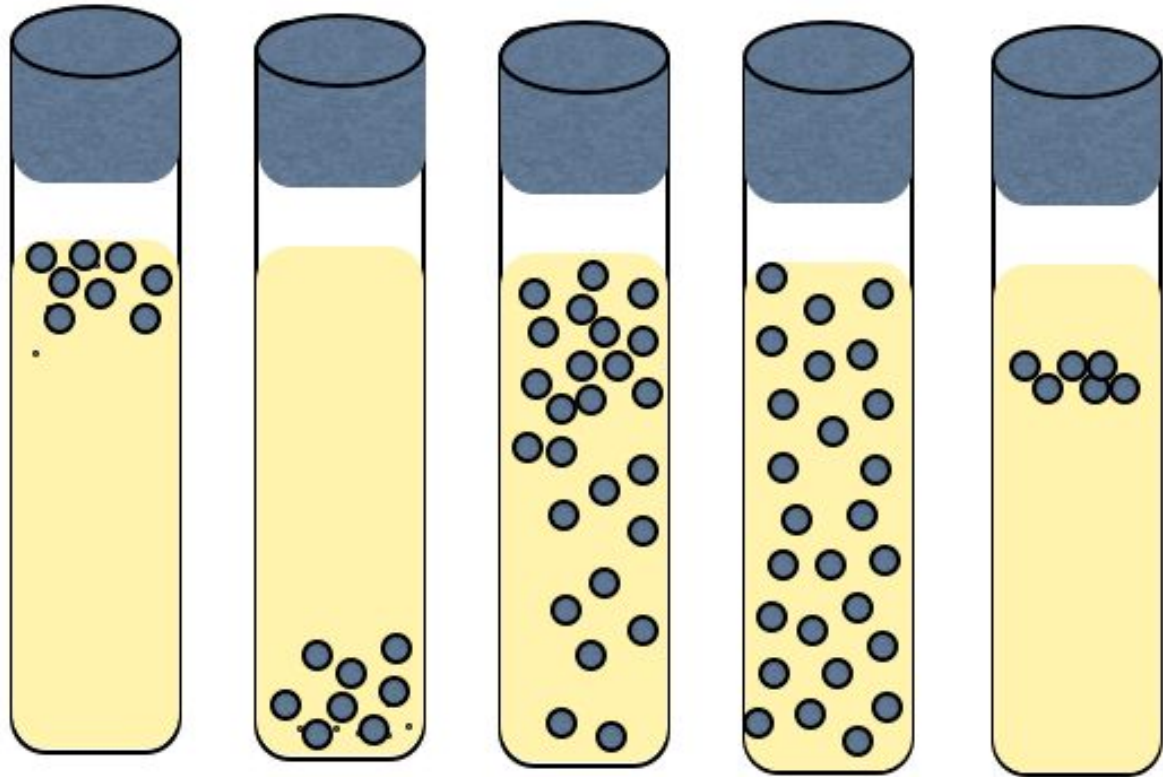


# Культури мікроорганізмів

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, рН), створюють умови і інокують середовище природною популяцією, наприклад з ґрунту. Найбільш пристосований до такого середовища мікроорганізм зростає і витісняє всі інші.

# Аеробне культивування



Obligate  
aerobes

Obligate  
anaerobes

Facultative  
anaerobes

Aerotolerant  
anaerobes

Microaerophilic

# Анаеробне культивування



анаеростат



герметичний бокс



пробірки



контейнер