

Практична робота 3

ТЕМА: «Методи виготовлення та підготовки препаратів мікроорганізмів для мікроскопічних досліджень»

Мета роботи: оволодіти основними методами виготовлення препаратів мікроорганізмів для мікроскопічних досліджень; набути практичних навичок приготування нативних і фіксованих препаратів, бактеріальних мазків, їх фіксації та фарбування; навчитися правильно проводити мікроскопію препаратів і визначати основні морфологічні ознаки мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: вітлові біологічні мікроскопи; предметні та покривні скельця; предметні скельця з лункою; бактеріологічні петлі та голки; піпетки (крапельниці); пінцети; скляні палички; спиртівка або лабораторний пальник; штативи для пробірок; пробірки та чашки Петрі; фільтрувальний папір; імерсійна олія; стерильна дистильована вода та фізіологічний розчин; культури мікроорганізмів; мікробні суспензії; готові нативні та фіксовані препарати; барвники для простого й диференційного фарбування (метиленовий синій, кристалічний фіолетовий, сафранін, фуксин); розчин Люголя; етиловий спирт; вазелін для виготовлення препарату «висяча крапля»; дезінфекційні засоби; контейнери для знезараження використаних матеріалів; лабораторні рукавички та інші засоби індивідуального захисту.

Завдання:

Виготовити препарат методом “роздавлена крапля” із культур сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus*).

Виготовити препарат з настою гною методом “висяча крапля”.

Виготовити фіксований препарат з чистої культури бактерій *Erwinia carotovora*.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

ДОСЛІДЖЕННЯ ЖИВИХ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ МЕТОДАМИ “РОЗДАВЛЕНОЇ” І “ВИСЯЧОЇ” КРАПЕЛЬ

Завдання:

1. Виготовити препарат методом “роздавлена крапля” із культур сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis* і *Bacillus mesentericus*).

2. Виготовити препарат з настою гною методом “висяча крапля”.

Найчастіше мікроорганізми в живому стані вивчають на препаратах: “роздавлена крапля”, “висяча крапля” та препаратах “відбитків”. На живих препаратах можна спостерігати за рухом, розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо.

Хід роботи

Метод “роздавленої краплі”. На чисте предметне скло наносять краплину водопровідної води. В неї вносять культуру мікроорганізмів і змішують з водою. Накривають краплю накривним скельцем так, щоб під ним не утворювались пухирці повітря. Складною паличкою притискають накривне скло до предметного і видаляють надлишок води фільтрувальним папером, підносячи його до країв накривного скла. При розгляді препарату під мікроскопом в імерсійній системі на накривне скельце наносять краплю кедрової олії.

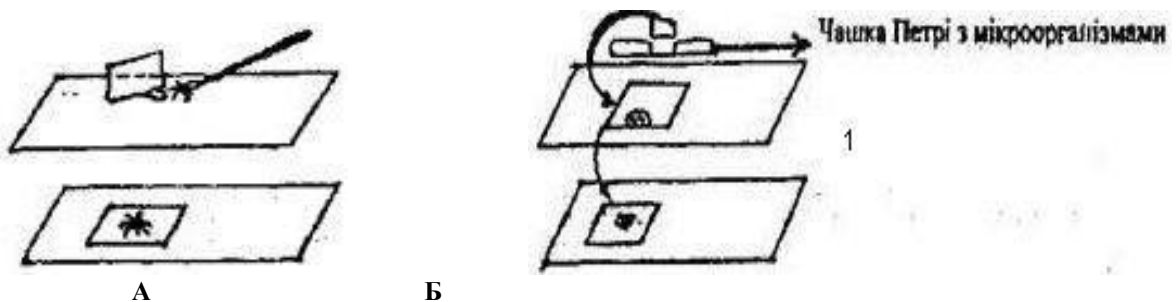


Рис. 1. Препарати: А - «роздавлена крапля»; Б - «відбиток»

Метод “вісячої краплі”. Застосовується метод “вісячої краплі” для тривалих спостережень за клітинами мікроорганізмів. На стерильне накривне скельце наносять препарувальною голкою нещільну суспензію мікроорганізмів, вирощених в рідкому поживному середовищі. Накривне скло перевертають і кладуть на стерильне предметне, з лункою посередині так, щоб краплина вільно звисала над лункою. Для герметичності краї лунки змащують вазеліном (рис. 4).

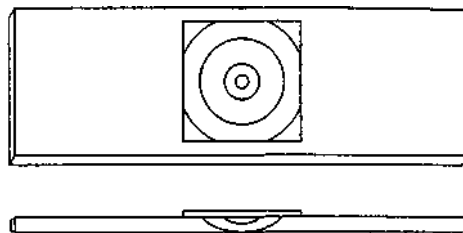


Рис. 2. Виготовлення препарату “вісяча крапля”

Під час дослідження клітин мікроорганізмів методами “роздавленої” і “вісячої” крапель застосовують барвники: метиленовий синій, нейтральний червоний в концентрації від 0,001 до 0,0001% (вітальне забарвлення).

Препарати вивчають під мікроскопом у сухій та імерсійній системах (незначно затемнюють поле зору, конденсор опускають, поступлення світла регулюють ввігнутим дзеркалом).

Препарат “відбитків”. Для виготовлення препарату “відбитків” із агарового середовища в чашці Петрі скальпелем вирізають блок із досліджуваної колонії мікробів, переносять його на предметне скло колонією догори. Накладають на колонію накривне скло, обережно натискають на нього пінцетом і відразу знімають. Накривне скло відбитком донизу кладуть на друге предметне скло в краплю води або метиленової синьки. Виготовлений у такий спосіб препарат вивчають під мікроскопом у сухій та імерсійних системах.

ФІКСОВАНІ ПРЕПАРАТИ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Завдання: Виготовити фіксований препарат з чистої культури бактерій *Erwinia carotovora*.

В мікробіології часто застосовують ці препарати. Їх розглядають під мікроскопом забарвленими. Фіксація – це така обробка живого об’єкта, яка дає можливість швидко перервати протікання життєвих процесів в ньому, зберігаючи його тонку структуру. В результаті фіксації клітини міцно прикріплюються до скла і краще фарбуються. Фіксація необхідна і для роботи з патогенними мікроорганізмами (для безпеки).

Виготовлення мазка

Для виготовлення мазка із культури мікробів, вирощених на рідкому живильному середовищі, спочатку беруть у праву руку бактеріологічну петлю

/тримають як олівець/ і фламбують її в полум’ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлю з правої руки, беруть у ліву руку пробірку чи колбу з мікроорганізмами. Над запаленою спиртівкою її відкривають з рідким живильним середовищем /безіменним пальцем і мізинцем правої руки захоплюють і виймають із пробірки /колби/ ватно-марлевий корок, тримаючи його у такому положенні під час усіх наступних маніпуляцій. Вийнявши корок, обпалюють край отвору пробірки /колби/ над полум’ям спиртівки /стерилізують/, вводять в неї через полум’я стерильну петлю, охолоджують її на стінці пробірки /колби/, набирають краплю середовища на петлю. Потім її виймають, а пробірку /колбу/ закривають, обпалюючи її краї і корок, ставлять у штатив на стіл. Краплю взятого середовища наносять петлею на середину обезжиреного предметного скла і круговими рухами розтирають рідину по склу

/готують мазок/. Площа мазка повинна бути в діаметрі 1,5 – 2 см. Чим тонший мазок, тим він ясніший. Петлю стерилізують у полум’ї спиртівки і ставлять у штатив.

Для приготування мазка із мікроорганізмів, вирощених на твердому живильному середовищі, спочатку на чисте обезжирене предметне скло наносять краплю стерильної води стерильною петлею, потім беруть у ліву руку пробірку чи колбу із культурою мікробів і тримають так, щоб добре було видно поверхню живильного середовища із колоніями мікроорганізмів. Фламбують петлю у

полум'ї спиртівки і, дотримуючись тих же правил стерильності, відкривають пробірку чи колбу, виймають корок, обпалюють край отвору над полум'ям спиртівки, вводять через полум'я стерильну петлю, охолоджують її на стінці всередині пробірки /колби/ і набирають на петлю невелику кількість мікробної маси із твердого живильного середовища. Петлю виймають, а пробірку над полум'ям закривають корком /обпалюючи край пробірки і корка/ і ставлять на стіл або у штатив. Петлю із культурою мікробів вносять у краплину води на предметне скло і коловими рухами розтирають по склу (готують мазок). Петлю стерилізують у полум'ї спиртівки й ставлять у штатив.

Приготовлений мазок із колонії мікроорганізмів, вирощених на рідкому чи твердому живильних середовищах, висушують на повітрі або в струмі теплого повітря. Для цього предметне скло мазком догори тримають за повздовжні ребра високо над полум'ям спиртівки (на висоті 15-20 см).

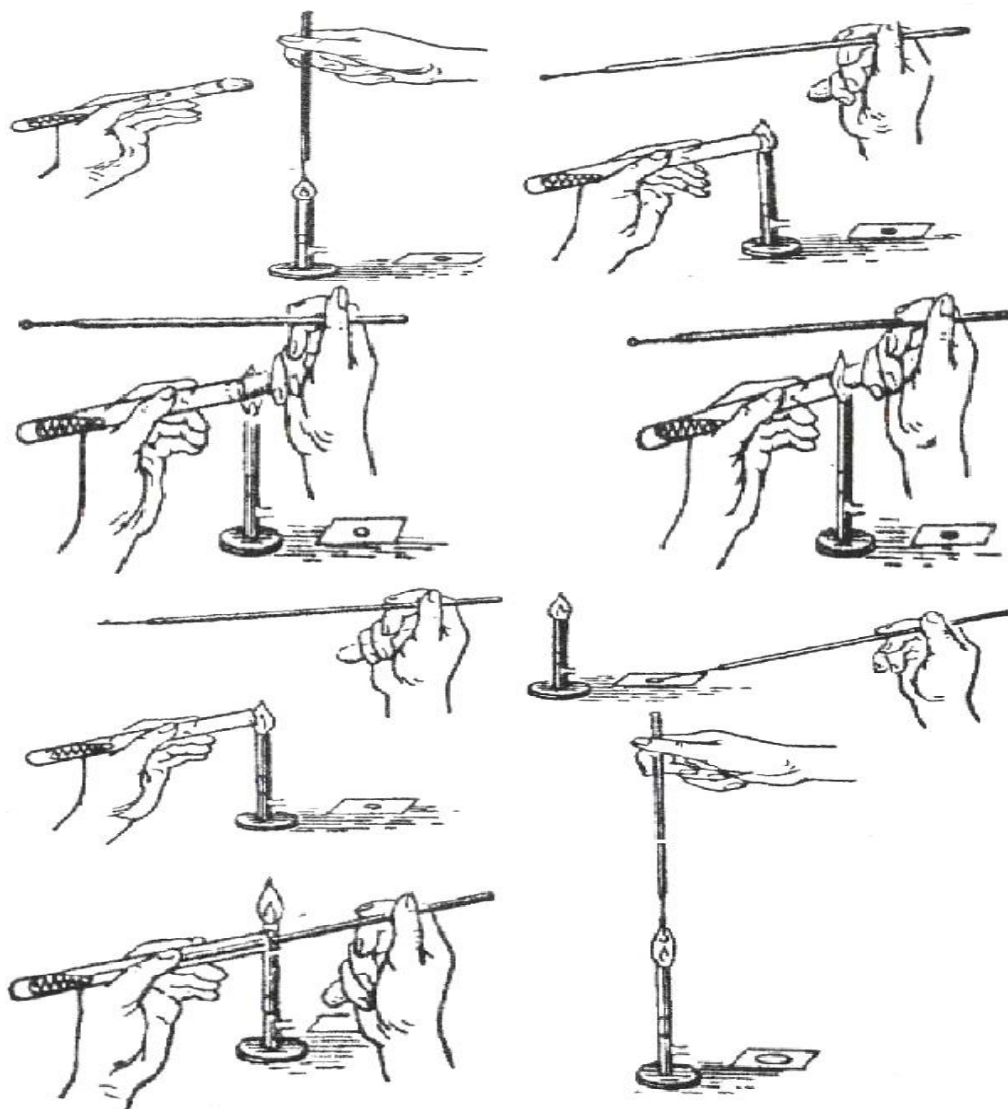


Рис. 3. Стерильний відбір мікроорганізмів бактеріологічною петлею.

Фіксація мазка

Висушений мазок фіксують. Мета фіксації – вбити мікроорганізми, прикріпити їх до скла і поліпшити наступне фарбування. Для цього скло тримають за ребра мазком догори і проводять його 4-5 разів через найбільш гарячу частину полум'я спиртівки. Можливе фіксування мазка і хімічними речовинами – етиловим чи метиловим спиртом, ацетоном, а також їхніми сумішами. Необхідно пам'ятати, що під час надмірного перегрівання або фіксації вологого препарату мазок псується: відбувається денатурація і звертання білка, порушується морфологія і структура бактерій. При недостатній фіксації мікроорганізми не знищуються, що робить препарат небезпечним, і не приклеюються до скла, а під час подальшої обробки легко змиваються з нього.

Фарбування мазка

При фарбуванні мазка препарат кладуть на препаратотримач (рис. 5). На мазок наносять декілька крапель барвника. В залежності від виду барвника і мети дослідження тривалість фарбування змінюється від 1 до 5 хв., в окремих випадках до 30 хв. і довше. Час фарбування (експозиція) для фуксину червоного – 2 хв., сафраніну – 2 хв., метиленового синього – 5 хв. Потім фарбу змивають водою, а мазок просушують між листочками фільтрувального паперу, і препарат розглядають під імерсійною системою мікроскопа.

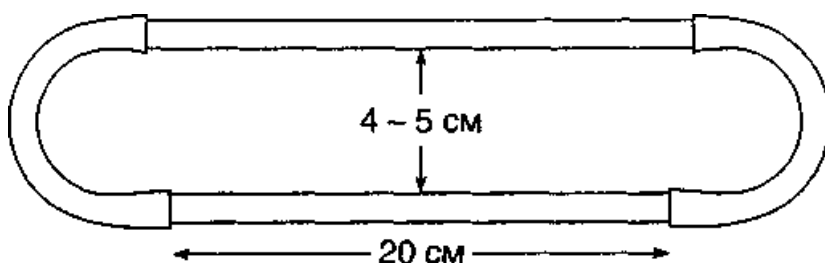


Рис. 5. Препаратотримач

Існують прості і складні (диференціальні) методи забарвлення. При простому забарвленні використовують один барвник, наприклад метиленовий синій, фуксин, генціан фіолетовий в лужних або карболових розчинах. Профарбовується вся клітина. При складному забарвленні різними барвниками профарбовуються окремі структури клітини.

Для фарбування мікробних клітин використовують кислі або цитоплазматичні лужні або ядерні барвники. Кислі барвники вступають в реакцію з речовинами лужної, лужні – кислотної природи. Оскільки в білках є лужні (NH_2) і кислотні (COOH) радикали, клітинні структури добре фарбуються обома барвниками.

Із основних барвників найчастіше в мікробіології використовують: червоні – нейтральний червоний, піронін, сафранін, фуксин, гематоксилін, тионін; сині –

метиленовий синій, вікторія; фіолетові – генціан фіолетовий, кристалічний фіолетовий, метиленовий фіолетовий; зелені – метиленовий зелений, малахітовий зелений; коричневі – везувін, хризойдин; чорні – індулін. Кислі барвники: червоні-рожеві – кислий фуксин, еритрозин; чорні – нігрозин; жовті – конго, флуоресцин.

Застосовуючи низькі концентрації фарб, можна також фарбувати різні мікроорганізми і на живих препаратах, що дає змогу краще визначати їхню справжню форму і розміри. З цією метою найчастіше використовують метиленову синьку, нейтральрот та деякі інші малоотруйні форми в розведенні 1:1000, 1:10 000, 1:100 000. Техніка приготування таких препаратів є дуже простою. На предметному склі за допомогою петлі змішують краплю мікробної культури з краплиною розчину фарби, накривають накривним скельцем і вивчають під мікроскопом.

Хід роботи.

А – додатково знежирити предметне скло. Для цього його необхідно натерти сухим господарським милом та витерти насухо марлевою серветкою. Із зворотної сторони скла олівцем по склу позначити межі майбутнього препарату та його номер.

Б – за допомогою петлі нанести на скло краплю стерильної дистильованої води. Бактеріальну культуру в невеликій кількості забрати з поверхні щільного поживного середовища за допомогою петлі та внести в краплю води на склі. Мікробний матеріал розподілити на склі рівномірним шаром у вигляді мазка правильної форми площею 1,5 – 2 см.

В – висушити виготовлений препарат при кімнатній температурі на повітрі, помістивши предметне скло на препаратотримач.

Г – підсушений препарат зафіксувати жаром у полум'ї пальника.

Д – зафіксований препарат помістити на препаратотримач кристалізатора і нанести безпосередньо на мазок водно – спиртовий розчин фуксину основного. Фарбування проводити протягом 3 хв.

Ж – легким струменем води змити барвник з препарату над кристалізатором, притримуючи предметне скло пінцетом. Промивання препарату слід проводити, поки вода, що стікає з мазка, не стане прозорою.

З – препарат висушити на повітрі, зібравши частину води зі скла за допомогою фільтрувального паперу.

К – розглянути препарат під мікроскопом та замалювати.

Мікроскопія фіксованих препаратів мікроорганізмів.

Препарати мікроорганізмів досліджують під мікроскопами, які мають імерсійні об'єктиви (збільшення не менше $\times 90$) з використанням імерсійного масла.

Краплю імерсійного масла нанести безпосередньо на виготовлений препарат.

Помістити скло на предметний столик мікроскопа і зафіксувати його. Установити імерсійний об'єктив. Макрогвинтом опустити об'єктив у краплю імерсійного масла, контролюючи занурення об'єктиву збоку. Дивлячись в окуляр мікроскопа, сфокусувати зображення об'єкту за допомогою макро – і мікрогвинтів.

Рухаючи предметний столик, розглянути декілька полів зору огляду та вибрати найбільш вдалу зону препарату. Бактеріальні клітини в полі зору не повинні знаходитись у вигляді суцільного шару. У правильно виготовленому препараті поле зору має залишатися світлим, а зафарбованими бути тільки клітини.

Замалювати препарат у масштабі поля зору із збереженням відповідних розмірів та кольору клітин. Підписати рисунок.

Зняти предметне скло. Протерти об'єктив марлевою серветкою, змоченою спиртом, для зняття імерсійного масла.

Завдання для самостійної роботи

1. Опрацювати основні методи виготовлення нативних, фіксованих і забарвлених препаратів мікроорганізмів.

2. Охарактеризувати особливості виготовлення препаратів методами «роздавленої» та «висячої» крапель.

3. З'ясувати переваги та недоліки дослідження мікроорганізмів у живому й фіксованому стані.

4. Вивчити основні способи фіксації бактеріальних препаратів та пояснити її значення для мікроскопічних досліджень.

5. Ознайомитися з методами простого та диференційного фарбування мікроорганізмів і визначити їх діагностичне значення.

6. Пояснити відмінності між справжньою рухливістю бактеріальних клітин і броунівським рухом.

7. Скласти схему послідовності виготовлення бактеріального мазка: підготовка скла → нанесення матеріалу → висушування → фіксація → фарбування → промивання → висушування → мікроскопіювання.

8. Повторити правила асептики, техніки безпеки та знезараження матеріалів під час роботи з культурами мікроорганізмів.

9. Підготувати коротку порівняльну характеристику основних методів виготовлення препаратів мікроорганізмів та визначити сфери їх застосування у фітомікробіологічних дослідженнях.

Література:

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 312 с.

2. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 142 с.

3. Бойко А. Л. Екологія вірусів рослин / А. Л. Бойко. К.: Вища школа, 1990. 164 с.

4. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навчальний посібник / М. Д. Мельничук. К.: Поліграфконсалтинг, 2005. 320 с.
5. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, С. М. Рижук та інш. / за редакцією В. П. Поліщука / К.: Фітосоціоцентр, 2001. 220 с.
6. Гуменюк, І. І. Актуальні питання біобезпеки у сучасних умовах. У О. І. Дребот, А. І. Парфенюк (Ред.), Екологічна та біологічна безпека України: моногр. 2022. Київ: Видавництво НУБіП України. С. 238–268.
7. Левішко, А., Мазур, С., & Гуменюк, І. Оцінка мікробного ценозу ґрунтів, що зазнали впливу активних військових дій. Інноваційні екологобезпечні технології рослинництва в умовах воєнного стану. 2023. Київ: ІАП. С. 95
8. Левішко, А. С. Агрономічно корисні мікроорганізми як основа біологічної безпеки сільського господарства. У С. Т. Омелячука (Ред.), Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини. 2023. Київ: МВЦ «Медінформ». С. 125–126.
9. Віннічук Т., Коваленко О., Болоховська В. Біопрепарати проти хвороб. Пропозиція. 2013. № 4. С. 92–93.
10. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Kadmiri, I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology. Sec. Microbiotechnology*, 12. 2021.
11. Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology. Section Plant Pathogen Interactions*, 8. 2017.
12. Caracciolo, A. B., & Terenzi, V. Rhizosphere microbial communities and heavy metals. *Microorganisms*, 2021. №9(7), 1462 p.