

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**імені О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ**  
**З МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

**Частина I**

**Київ - 2020 рік**

## Зміст

<b>Практичне заняття</b>	<b>ТЕМА</b>	<b>Сторінка</b>
№1	Організація мікробіологічної лабораторії. Барвники і прості методи фарбування мікроорганізмів. Мікроскопія	3
№2	Фарбування бактерій за Грамом	11
№3	Морфологія і структура бактерій	18
№4	Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів, найпростіших	24
№5	Поживні середовища для культивування мікроорганізмів. Стерилізація	29
№6	Ріст і розмноження мікроорганізмів. Виділення чистих культур бактерій (1-е заняття)	37
№7	Ріст і розмноження мікроорганізмів. Виділення чистих культур бактерій (2-е заняття)	46
№8	Виділення чистих культур бактерій (3-є заняття)	51
№9	Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики	56
	Рекомендована література	62

## Практичне заняття №1

### Тема: «Організація мікробіологічної лабораторії. Барвники і прості методи фарбування мікроорганізмів. Мікроскопія»

#### Актуальність теми:

Мікробіологічні лабораторії розташовуються в спеціальних науково-дослідних, науково-практичних або практичних установах, в яких проводять мікробіологічні, вірусологічні та серологічні дослідження. Мікробіологічні лабораторії в лікувально-профілактичних установах виконують відповідні аналізи з метою діагностики інфекційних хвороб, визначення строків виписування хворих з лікувальних закладів, визначення чутливості збудників до антибіотиків та інших препаратів. Тому на першому занятті важливо вивчити структуру бактеріологічної лабораторії, її оснащення та організацію.

Бактеріоскопічне дослідження інфекційного матеріалу є одним з найпоширеніших методів лабораторних досліджень. На занятті студентам надається можливість оволодіти методикою виготовлення бактеріальних препаратів із чистих культур мікроорганізмів, фарбуванням бактерій із застосуванням анілінових барвників та мікроскопії з використанням імерсійних об'єктивів.

#### Конкретні цілі:

- Ознайомлення із структурою та функцією бактеріологічної лабораторії, її місцем в системі практичних лікувальних та діагностичних закладів охорони здоров'я.
- Оволодіння методикою виготовлення бактеріальних препаратів із чистих культур бактерій з використанням простих методів фарбування.
- Розгляд методів мікроскопії, що застосовуються при діагностиці різних інфекційних захворювань.
- Засвоєння методики імерсійної мікроскопії бактеріальних препаратів.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція)**

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
Анатомія людини	Аналізувати інформацію про будову тіла людини, системи, що його складають, органи і тканини
Гістологія, цитологія, ембріологія	Інтерпретувати мікроскопічну та субмікроскопічну структуру клітин
Медична і біологічна фізика	Тракувати загальні фізичні та біофізичні закономірності, що лежать в основі біологічних процесів.
Медична біологія	Пояснювати на молекулярно-біологічному та клітинному рівні закономірності біологічних процесів

Медична хімія	Тракувати загальні фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі процесів розвитку клітин
---------------	---

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:**

<b>Термін</b>	<b>Визначення</b>
Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія	Навчальна дисципліна, сукупність наук про походження, еволюцію та властивості патогенних для людини мікроорганізмів, нормальної мікрофлори людини, закономірності взаємодії мікроорганізмів з макроорганізмом, імунну систему, методи діагностики, принципи лікування та специфічної профілактики інфекційних захворювань.
Мікробіологічна лабораторія	Первинний підрозділ в системі мікробіологічної служби практичних лікувальних та діагностичних закладів охорони здоров'я.
Препарат-мазок	Готують на предметному склі із матеріалу або чистих культур мікроорганізмів і досліджують у мікроскопі з метою виявлення збудників захворювань чи дослідження їх морфологічних і тинкторіальних властивостей.
Анілінові барвники	Похідні аніліну, які використовують для фарбування мікроорганізмів з метою збільшення їх контрастності та подальшої мікроскопії.
Мікроскопія	Сукупність методів із застосуванням мікроскопів різної конструкції та способи виготовлення мікроскопічних препаратів.
Імерсійна система	Складається з імерсійного об'єктиву (x 90) та імерсійного масла, яке забезпечує концентрацію променів, що проходять через мікроскопічний об'єкт в об'єктив і, таким чином, забезпечує кращі умови для дослідження мікроорганізмів.

**Теоретичні питання до заняття:**

- Структура мікробіологічної лабораторії, призначення різних підрозділів.
- Організація та оснащення робочого місця лікаря-бактеріолога.
- Методика виготовлення бактеріального препарату-мазку.
- Анілінові барвники та приготування фарбуючи розчинів для фарбування мікроорганізмів.
- Прості та складні методи фарбування мікроорганізмів.
- Види та принципи мікроскопії.
- Світловий мікроскоп, будова, призначення окремих частин.
- Визначення збільшення та роздільної здатності мікроскопа.
- Імерсійна система.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

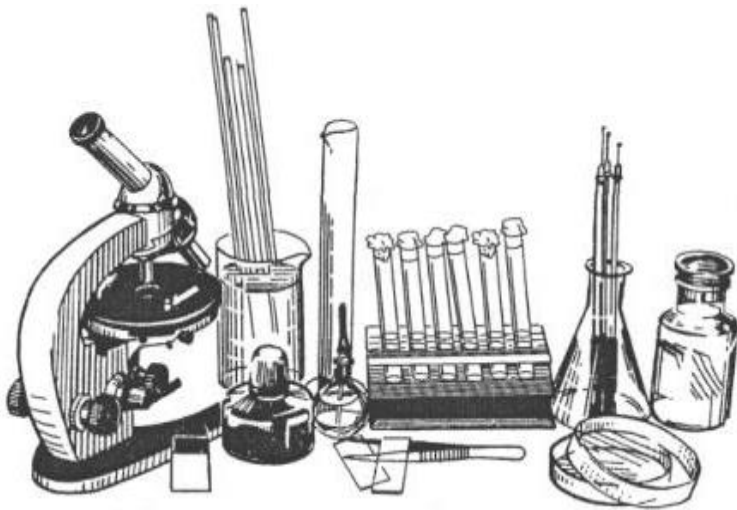
- Ознайомитись з принципами організації мікробіологічної лабораторії та правилами роботи в ній.
- Вивчити барвники і фарбуючі розчини, які використовуються в мікробіології.
- Засвоїти методику виготовлення бактеріологічного препарату і фарбування простими методами.
- Ознайомитись з різними методами мікроскопії, що застосовуються для діагностики інфекційних захворювань.
- Оволодіти методами мікроскопічного дослідження бактеріологічних препаратів з використанням імерсійного об'єктиву.

### **Зміст теми:**

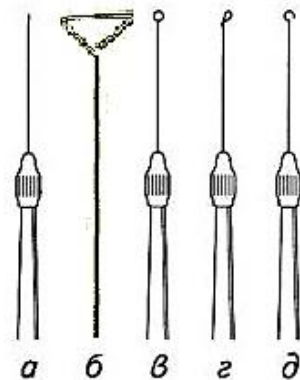
На практичному занятті студенти вивчають структуру мікробіологічної лабораторії, правила роботи в ній, організацію робочого місця лікаря-бактеріолога, готують мазки із чистих культур стафілокока та кишкової палички, фарбують мазки простими методами, ознайомлюються із видами мікроскопії, вивчають методику імерсійної мікроскопії бактеріальних препаратів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### **Основні матеріали та обладнання, потрібні студентіві до кожного заняття:**

*мікроскоп з освітлювачем, спиртівка, сірники, бактеріологічні петлі, шпатель та голки; предметні та покривні скельця, промивалка з водою, вата, олівець по склу або маркер; фільтрувальний папір, дезінфікуючий розчин, набір барвників, скляний місток, ємність для фарбування препаратів, імерсійна олія.*



**Рис. 1.** Інвентар для проведення лабораторних робіт



**Рис. 2.** Бактеріологічні голка, шпатель та петлі:  
а – голка; б – шпатель;  
в-д – петлі  
(в – правильно зроблені; г, д – неправильно зроблені)

## Методи мікроскопії

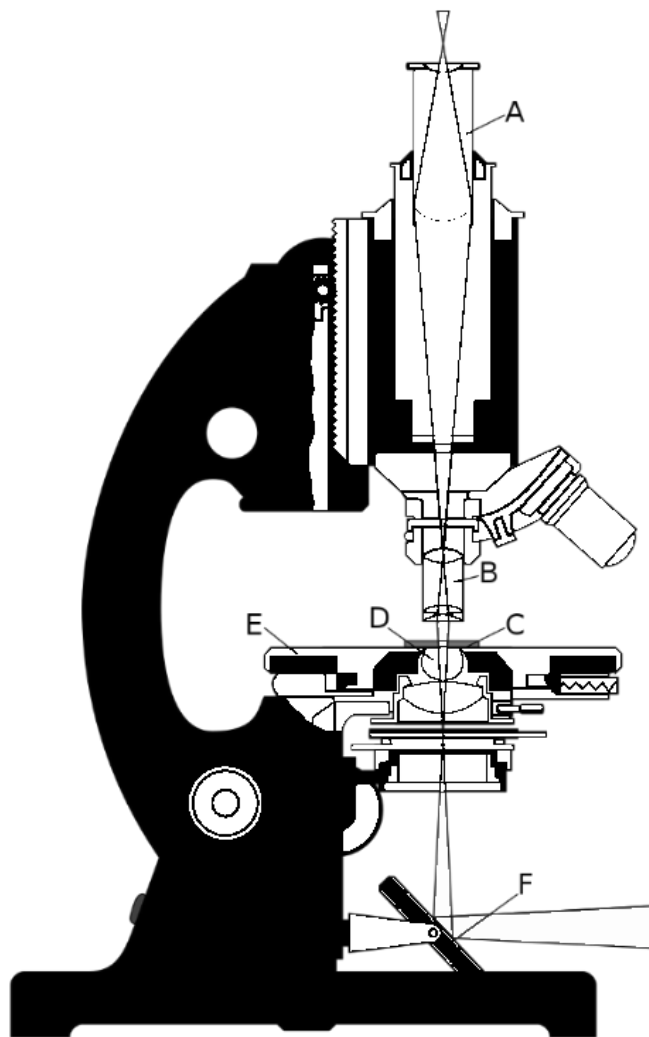
### I. Оптична (світлова) мікроскопія.

Оптичні мікроскопи працюють за рахунок фокусування, дифракції і відбиття електромагнітних хвиль видимого діапазону на препараті.

Збільшення мікроскопу = збільшення об'єктиву × збільшення окуляра.  
Роздільна здатність мікроскопу – 0,2 мкм.

#### 1. Світлопольна мікроскопія.

Візуалізації досліджуваного об'єкта ґрунтується на вибіркового поглинанні ним або елементами його структури світла з різною довжиною хвилі. У мікроскопі зафарбований об'єкт видно на світлому фоні.



- A – окуляр;
- B – об'єктив;
- C – препарат;
- D – конденсор;
- E – столик мікроскопа;
- F – дзеркало;

Рис.3. Будова оптичного мікроскопу

#### 2. Темнопольна мікроскопія.

Замість конденсора Аббе застосовується спеціальний конденсор темного поля (параболоїд-конденсор), у якому бокова поверхня дзеркальна, а центральна частина нижньої лінзи затемнена, в результаті чого утворюється темне поле зору. В об'єктив проникають лише ті промені, які відбиваються частинками препарату завдяки заломленню або дифракції. На темному полі зору мікробні клітини й інші дрібні частинки виглядають дуже яскравими та нагадують «зоряне небо». Метод дозволяє досліджувати рухливість мікроорганізмів.

### *3. Фазово-контрастна мікроскопія.*

Живі клітини (бактерії), слабо поглинаючи світло, здатні змінювати фазу проникаючих променів. У різних ділянках клітини товщина, щільність та заломлення світла будуть неоднакові. За допомогою спеціального фазовоконтрастного пристрою ці різниці у фазах можна зробити видимими. При роботі з фазовоконтрастним пристрієм клітини можуть виглядати темними (позитивний фазовий контраст) або світлими (негативний контраст) у порівнянні з оточуючим фоном.

### *4. Аностральна мікроскопія.*

Різновид фазовоконтрастної мікроскопії, при якій використовують об'єктиви зі спеціальними пластинками, нанесеними на одну з лінз у вигляді затемненого кільця кіптяви або міді. Це обумовлює поглинання близько 10 % світла і робить фон поля зору сіро-коричневим.

### *5. Інтерференційна мікроскопія.*

Основана на тих же принципах, що й фазово-контрастна, але на відміну від останньої дає можливість вивчати деталі прозорих об'єктів і проводити їх кількісний аналіз. Це досягається завдяки роздвоєнню світлового променя: один промінь проходить через частинку об'єкту, а другий поза нею. В окулярі обидва промені з'єднуються і інтерферують між собою. Різницю виникаючих фаз можна виміряти, визначаючи тим самим масу різних структур в клітині, що дає змогу зробити побічні висновки про проникність мембран, активність ферментів, метаболізм клітин, тощо.

### *6. Люмінесцентна мікроскопія.*

Цей метод дозволяє спостерігати первинну або вторинну люмінесценцію мікроорганізмів. Зображення в люмінесцентному мікроскопі виникає через світіння самого препарату, яке виникає при освітленні його короткохвильовою частиною спектра. Метод оснований на використанні явища флуоресценції. Так як більшість мікроорганізмів не мають власної люмінесценції, їх спочатку обробляють слабкими розчинами спеціальних барвників – флуорохромів. Найчастіше застосовують такі флуорохроми: акридиновий оранжевий, аурамін, корифосфін, ізотіоціанат флуоресцеїну та ін.

### *7. Конфокальна мікроскопія.*

Цей метод застосовує точкове освітлення та діафрагму з мініатюрним отвором, встановлену перед детектором, щоб прибрати розсіяне позафокусне світло. Конфокальний мікроскоп дозволяє реконструювати на основі отриманих зображень тривимірну структуру досліджуваного зразка.

## **II. Електронна мікроскопія.**

Для вивчення будови мікроорганізмів на субклітинному і молекулярному рівнях, а також для дослідження структури і архітектоніки вірусів використовують електронний мікроскоп. Це високовольтний вакуумний прилад, у якому збільшене зображення отримують за допомогою потоку електронів. Він має високу роздільну здатність і може давати збільшення від 20 тис до 5 млн разів. За принципом дії розрізняють просвічуючі (трансмисивні), скануючі (растрові) й комбіновані електронні мікроскопи.

## Рекомендації для оформлення протоколу

### ПРАВИЛА РОБОТИ В УЧБОВІЙ МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

У мікробіологічних лабораторіях працюють з матеріалом, що містить мікроорганізми. У зв'язку з цим необхідно дотримуватись правил роботи, які забезпечують її стерильність і запобігання можливості виникнення внутрішньо лабораторних заражень:

1. В лабораторію заборонено входити у верхньому одязі, працювати дозволено лише в халаті і шапочці.
2. Кожний студент повинен працювати на своєму робочому місці, яке необхідно утримувати в чистоті. На робочому місці не має бути нічого зайвого.
3. Матеріал для практичної роботи одержує черговий у лаборантській кімнаті і роздає студентам групи в присутності викладача.
4. Використані в роботі матеріали, пробірки з культурами бактерій необхідно знезаразити, для чого черговий здає відпрацьований матеріал у лаборантську.
5. Якщо випадково розіб'ється посуд з заразним матеріалом чи розіллється рідкий заразний матеріал, студент повинен негайно сповістити викладача і разом з ним знезаразити інфіковане місце.
6. Черговий студент контролює порядок та чистоту на робочих місцях студентів в групі
7. У лабораторії ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ вживати їжу, протирати вологою ганчіркою ввімкнені прилади; працювати з надтріснутим скляним посудом.

### Структура та відділи мікробіологічної лабораторії

*Бактеріологічна лабораторія* - спеціальні науково-дослідні, науково-практичні або практичні установи, в яких проводять мікробіологічні, біологічні та серологічні дослідження. Їх організують при профільних науково-дослідних інститутах, навчальних закладах, клінічних лікарнях, санітарно-епідеміологічних відділах.

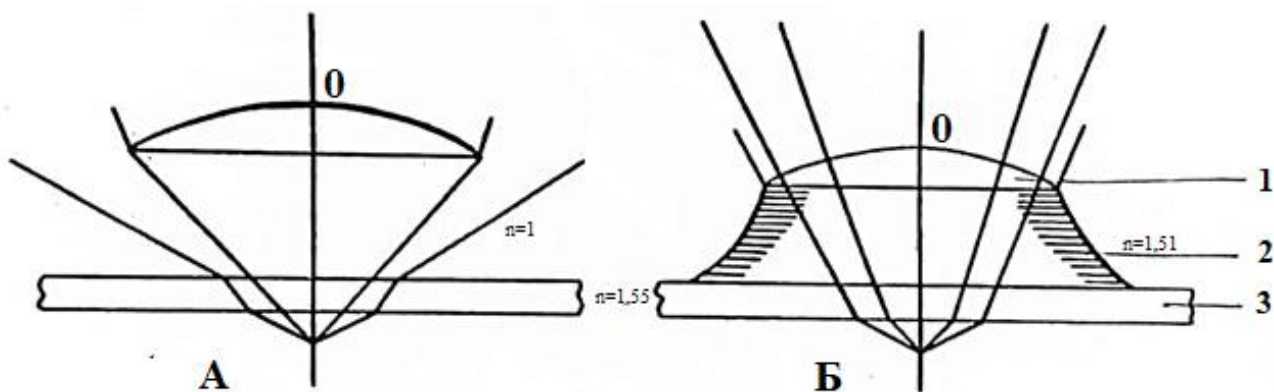
*Вірусологічна лабораторія* - установа, що вивчає віруси, проводить діагностику вірусних інфекцій, виготовляє різноманітні вірусні препарати (вакцини, діагностикуми, противірусні імунні сироватки тощо).

У *мікологічних лабораторіях* проводять мікроскопічні дослідження та ідентифікацію культур патогенних грибів з метою діагностики мікозів. Режим їх роботи повинен попередити розсіювання зараженого грибами матеріалу, щоб уникнути інфікування персоналу.

*Паразитологічні лабораторії* - науково-практичні й практичні діагностичні установи, в яких здійснюються макроскопічні, мікроскопічні та імунологічні дослідження з метою діагностики паразитарних хвороб.

*Імунологічні лабораторії* - самостійними структурні одиниці або частина мікробіологічної лабораторії, що спеціалізується на проведенні серологічних тестів.





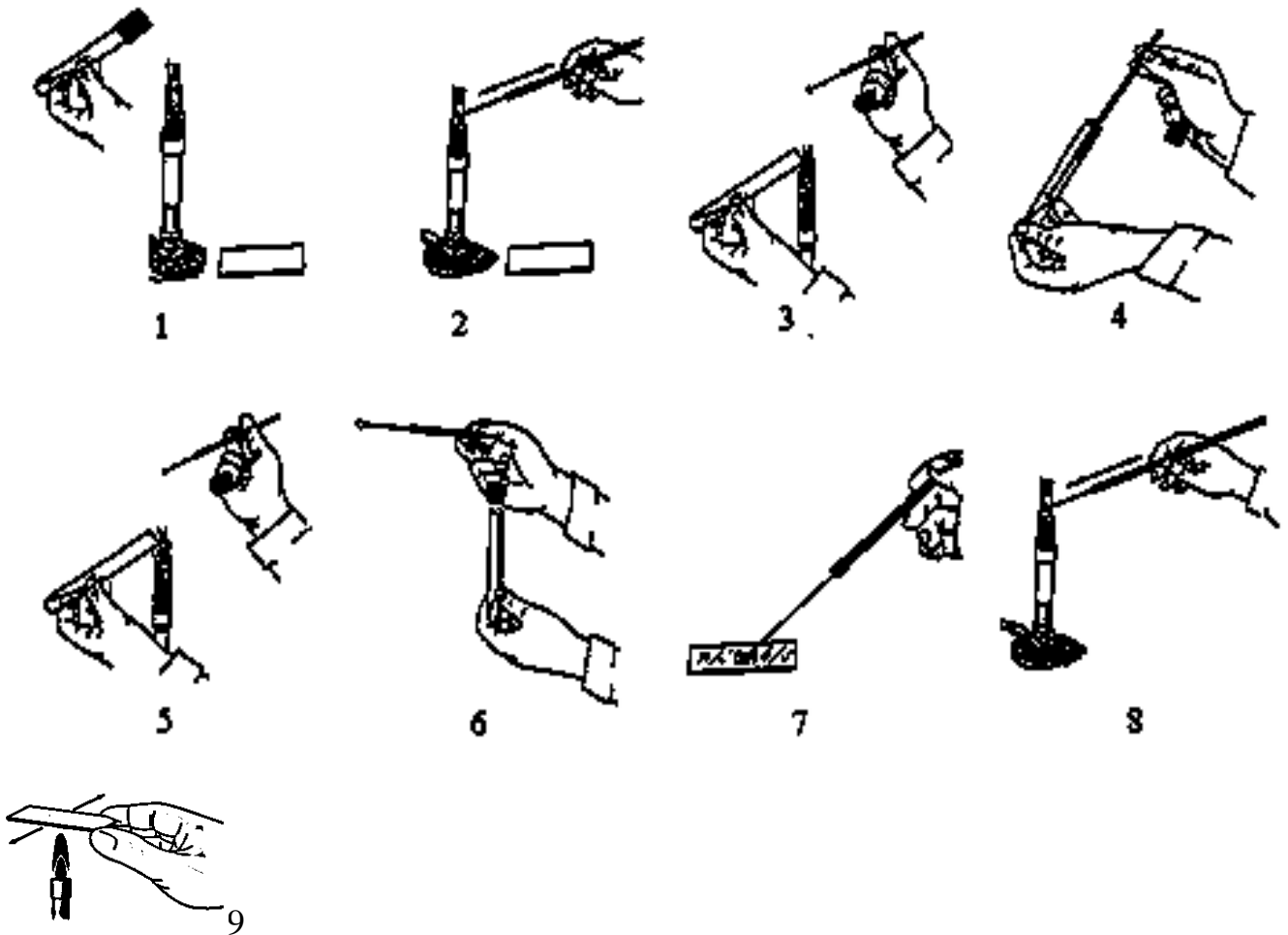
**Рис. 4.** Схема промінів при сухій (А) і масляній (Б) системах;  
1-фронтальна лінза об'єктиву; 2-імерсійне масло; 3-предметне скло.

**Імерсійний об'єктив** (лат. *Immersio* - занурення) – це об'єктив мікроскопа, у якого простір між першою лінзою і розглядаються предметом заповнений рідиною з показником заломлення як у скла (наприклад, кедрова олія).

#### Анілінові барвники

Водно-спиртові розчини похідних аніліну, що використовуються для фарбування мікроорганізмів. Анілінові барвники бувають: нейтральні, кислі та основні (для фарбування застосовуються останні).

Колір	Основні	Кислі
Червоний	Нейтральний червоний Фуксин Сафранін Піронін	Кислий фуксин Еозин
Фіолетовий	Генціанвіолет Кристалвіолет	-
Синій	Метиленовий синій	-
Зелений	Малахітовий зелений Бриліантовий зелений	-
Чорний	Інулін	Нігрозин
Жовтий	-	Конго Аурантія
Коричневий	Хризоїдин	-



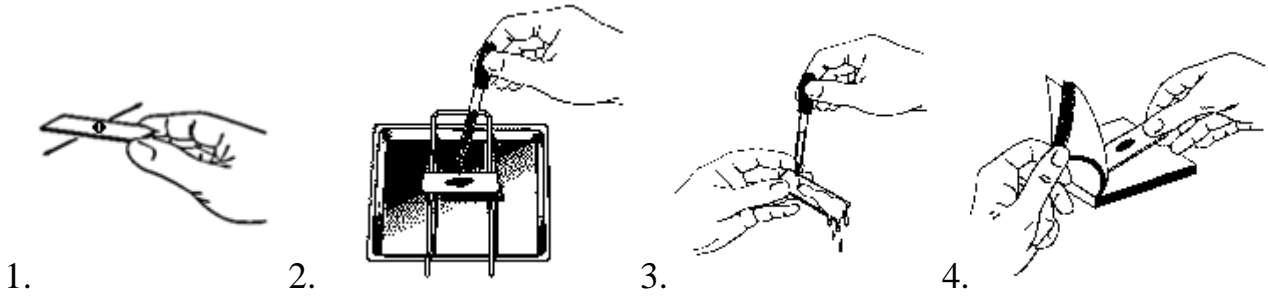
**Рис. 5.** Техніка виготовлення бактеріального препарату-мазку

#### **Техніка виготовлення бактеріального препарату-мазку**

1. Приготуйте чисте предметне скельця.
2. Простерелізуйте бактеріологічну петлю.
3. Візьміть пробірку з культурою в ліву руку і помістіть її похило між великим і вказівним пальцем. Відкрийте пробірку, затискаючи корок мізинцем правої долоні.
4. Стерильну петлю введіть у пробірку з культурою, охолодіть, доторкнувшись до внутрішньої поверхні пробірки, а потім візьміть нею невелику кількість біомаси мікроорганізмів
5. Обпаліть краї пробірки та корка.
6. Закрийте пробірку, поставте її в штатив.
7. Петлею з біомасою зробіть штрих на склі, додайте краплю фізичного розчину та розтріть вийшла суспензія.
8. Простерилізуйте петлю.
9. Зафіксуйте мазок.

Існують **прості** та **складні** методи фарбування мікроорганізмів. **Прості** – з використанням одного барвника; **складні** – два та більше барвників.

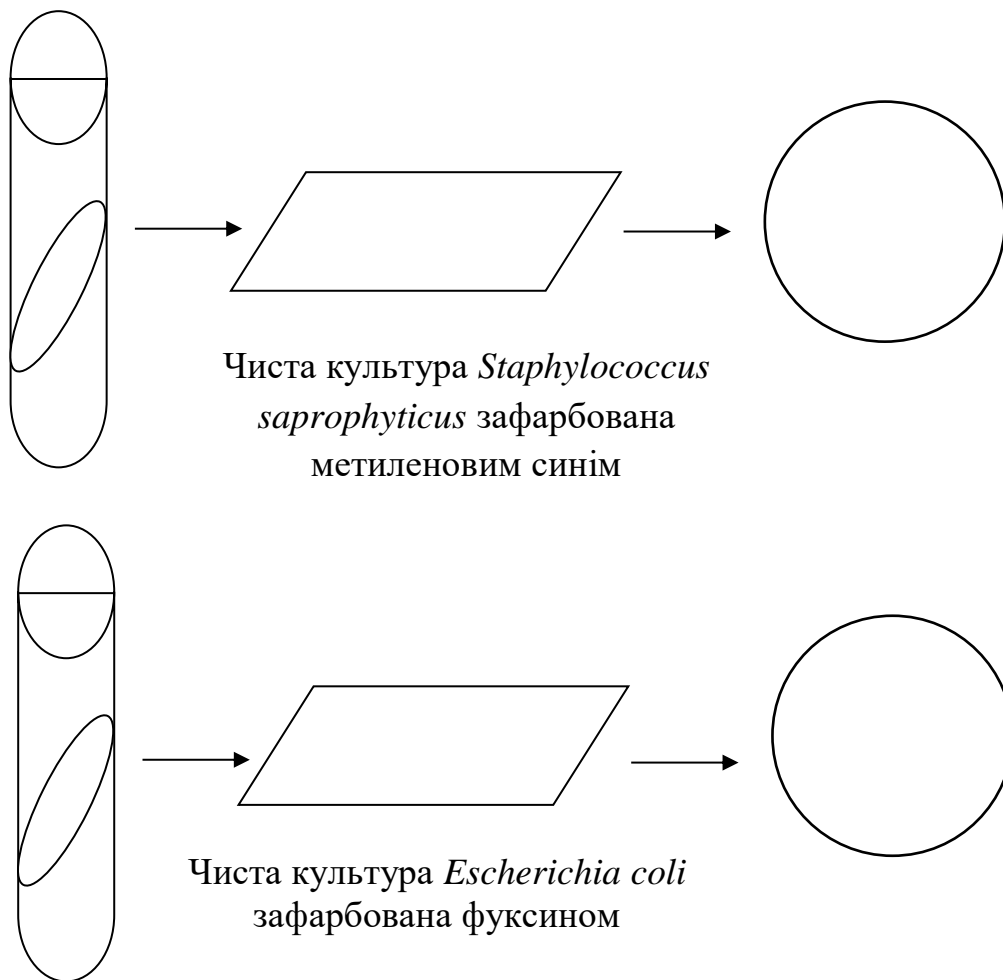
**Рис. 6.** Схема фарбування простим методом



**1-2.** На фіксований препарат нанести кілька крапель барвника (фуксин, метиленовий синій). Препарат з фуксином витримувати 1–2 хв, з метиленовим синім – 3–5 хв.

**3-4.** Промити водою та просушити фільтрувальним папером.

**Завдання №1.** Приготувати бактеріальні препарати із коків та паличок, пофарбувати простими методами, провести мікроскопію.



**Висновок:**

**Питання для самоконтроля:**

- Що вивчає медична мікробіологія?
- Яка структура мікробіологічна лабораторія та яке призначення її підрозділів?
- Які види мікроскопії Вам відомі? Назвіть їх переваги та недоліки.
- Що таке імерсійна система? Які ознаки імерсійного об'єктиву?
- Як розрахувати загальне збільшення мікроскопа?
- Що таке роздільна здатність мікроскопа і чому вона дорівнює?
- Що таке анілінові барвники? Особливості їх приготування та застосування?
- З якою метою роблять фіксацію мазків на предметному склі?
- Які особливості фарбування мікроорганізмів? Назвіть їх види

## Практичне заняття №2

### Тема: «Фарбування бактерій за Грамом»

#### Актуальність теми:

Метод фарбування бактерій за Грамом відноситься до складних методів. Складні методи застосовують для детального вивчення структури бактеріальних клітин, а також для диференціації одних мікроорганізмів від інших. Отже, вони мають важливе диференційно-діагностичне значення в мікробіології. Серед складних методів фарбування метод Грама є найбільш поширеним. При фарбуванні бактерій цим методом їх можна поділити на дві групи: грамнегативні та грампозитивні. Особливості фарбування за Грамом враховуються, поряд з іншими властивостями, при визначенні виду бактерій.

#### Конкретні цілі:

- Засвоїти техніку фарбування за Грамом, використовуючи культури грампозитивних та грамнегативних бактерій.
- Вивчити властивості грампозитивних та грамнегативних бактерій.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:**

Термін	Визначення
Складні методи фарбування бактерій	Складні методи дозволяють диференціювати одні мікроорганізми від інших, а також вивчити особливості будови мікробних клітин. До складних методів відносять фарбування за Грамом, за Романовським-Гімзою, методом Циля-Нільсена, Нейсера.
Метод Грама	Метод розробив Крістіан Грам у 1884р. Серед складних методів фарбування він є найбільш поширеним. Він має важливе диференційно-діагностичне значення, оскільки допомагає визначити таксономічне положення тих чи інших бактерій
Тинкторіальні властивості бактерій	Особливість забарвлення бактерій тими чи іншими методами називають їх тинкторіальними властивостями.
Грампозитивні бактерії	Грампозитивні бактерії забарвлюються за методом Грама в темно-фіолетовий колір (здатні утворювати міцну сполуку з генціанвіолетом та йодом).
Грамнегативні бактерії	Грамнегативні бактерії забарвлюються за методом Грама в червоний колір (сполука з генціанвіолетом та йодом вимивається спиртом, тому вони забарвлюються фуксином в червоний колір).

### Теоретичні питання до заняття:

- Складні методи фарбування бактерій.
- Метод Грама.
- Механізм фарбування за Грамом.
- Методика фарбування за Грамом.
- Властивості грампозитивних та грамнегативних бактерій.
- Тинкторіальні властивості окремих груп мікроорганізмів.

### Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Вивчити властивості грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.
- Записати тинкторіальні властивості окремих груп мікроорганізмів.
- Вивчити фактори, що впливають на фарбування за Грамом.
- Вивчити особливості хімічного складу клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій.
- Приготувати препарати-мазки з чистих культур бактерій, пофарбувати за методом Грама, дослідити в мікроскопі, визначити морфологічні та тинкторіальні властивості.

### Зміст теми:

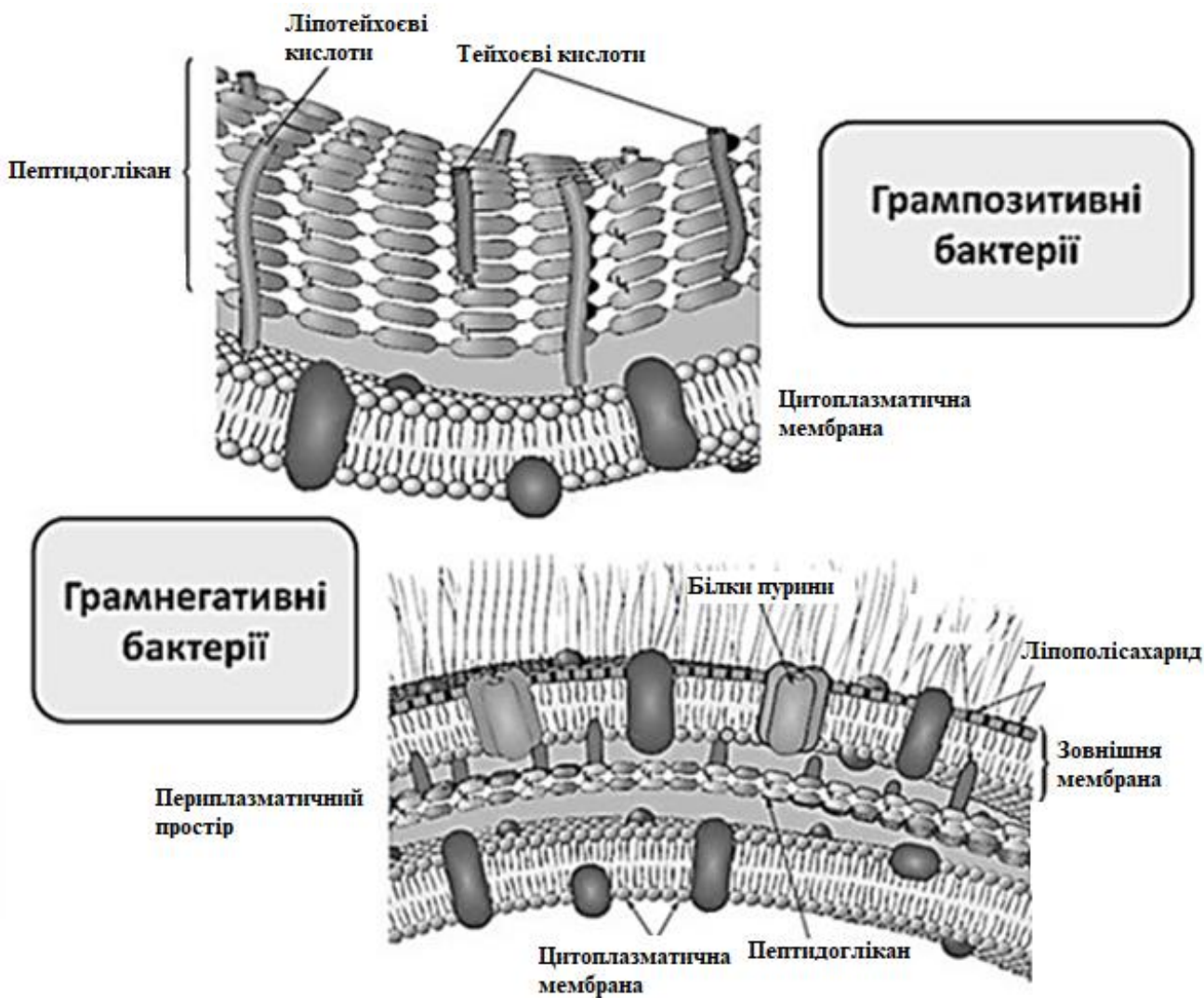
На практичному занятті студенти вивчають методику фарбування за Грамом, готують мазки із чистих культур стафілокока та кишкової палички, фарбують мазки за методом Грама, вивчають виготовлені препарати із використанням імерсійного об'єктиву, властивості грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, тинкторіальні властивості окремих груп мікроорганізмів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### Рекомендації для оформлення протоколу.

#### ВЛАСТИВОСТІ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

ГРАМПОЗИТИВНІ	ГРАМНЕГАТИВНІ
Не чутливі до дії пепсину, трипсину, панкреатину.	Перетравлюються ферментами шлунково-кишкового тракту.
Чутливі до лізоциму, пеніциліну.	Мало чутливі.
Слабо виражені імуногенні властивості.	Добре виражені імуногенні властивості.
Можуть бути кислотостійкими.	Чутливі до дії кислот.
Можуть утворювати ендоспори.	Ендоспор не утворюють.
Фімбрій не мають.	Можуть мати фімбрії.
Можуть утворювати екзотоксин.	Рідко продукують екзотоксин. При руйнуванні клітин виділяється ендотоксин.

## Оболонка бактеріальної клітини



## ТИНКТОРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ДЕЯКИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

ГРАМПОЗИТИВНІ	ГРАМНЕГАТИВНІ
1. Стафілокок.	1. Менінгококи.
2. Стрептокок.	2. Гонококи.
3. Коринебактерії дифтерії.	3. Кишкова паличка.
4. Мікобактерії туберкульозу.	4. Сальмонели.
5. Збудник правця.	5. Шигели.
6. Збудник газової гангрені.	6. Збудник чуми.
7. Збудник ботулізму.	7. Збудник туляремії.
8. Актиноміцети.	8. Холерний вібріон.

## ФАКТОРИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ЗА ГРАМОМ

1. Клітинна стінка грамположитивних бактерій містить до 90% пептидоглікану (глікопептиду, муреїну), містить тейхоєві кислоти. Муреїн багатозаровий. У грамположитивних бактерій, проникність клітинної стінки нижча, ніж у грамнегативних бактерій. Комплекс генціанвіолет-йод утримується в стінці після

дії спирту, оскільки при цьому зменшується діаметр пор в глікопептиді. Стінка грамнегативних бактерій містить глікопептиду значно менше, його молекула “зшита” слабкіше порівняно з стінкою грампозитивних бактерій. Вважають, що після обробки етиловим спиртом пори в молекулі глікопептиду грамнегативних бактерій залишаються широкими, що дозволяє екстрагувати комплекс генціанвіолет-йод.

2. У грампозитивних бактерій виявлено велику кількість рибонуклеїнату магнію (співвідношення РНК: ДНК у грампозитивних бактерій дорівнює 8:1, а у грамнегативних бактерій 1:1). Вважають, що рибонуклеїнат магнію утворює великі стійкі комплекси з барвником і йодом, які не вимиває спирт.

3. Відмінність в кислотності білків цитоплазми у грампозитивних та грамнегативних бактерій. Ізоелектрична точка білків цитоплазми грампозитивних бактерій знаходиться в межах рН 4-5, у грамнегативних бактерій – в межах рН 5-6. Кислі білки грампозитивних бактерій мають спорідненість до основних анілінових барвників, утворюють з йодом та генціанвіолетом більш стійкі до дії спирту комплекси.

### ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ

ГРАМПОЗИТИВНІ	ГРАМНЕГАТИВНІ
1. У клітинній стінці мало білків, а пептиди одноманітні за складом амінокислот.	Клітинна стінка містить усі амінокислоти, містить білки.
2. Ліпідів мало.	Ліпідів багато (до 22%).
3. Пептидоглікану до 90%.	Пептидоглікану мало (5-9%).
4. Містять тейхоеві кислоти.	Тейхоеві кислоти відсутні.

### СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННИХ СТІНОК

#### ГРАМПОЗИТИВНІ

1. Просто побудована клітинна стінка
2. Клітинна стінка складається з пептидоглікану. Товщина клітинної стінки 100-500А.
3. Пептидоглікан багат шаровий
4. Матрикс представлений полісахаридами (в тому числі тейхоеві кислоти)

#### ГРАМНЕГАТИВНІ

1. Клітинна стінка має складну структуру.
2. Клітинна стінка багат шарова: внутрішній- глікопептид; середній- фосфоліпіди, ліпопротеїни, білки; зовнішній- ліпополісахариди.
3. Один шар муреїну(пептидоглікану)
4. На пептидоглікановому каркасі зовні розміщуються ліпопротеїди, ліпополісахариди, фосфоліпіди. Тейхоеві кислоти не виявлені.

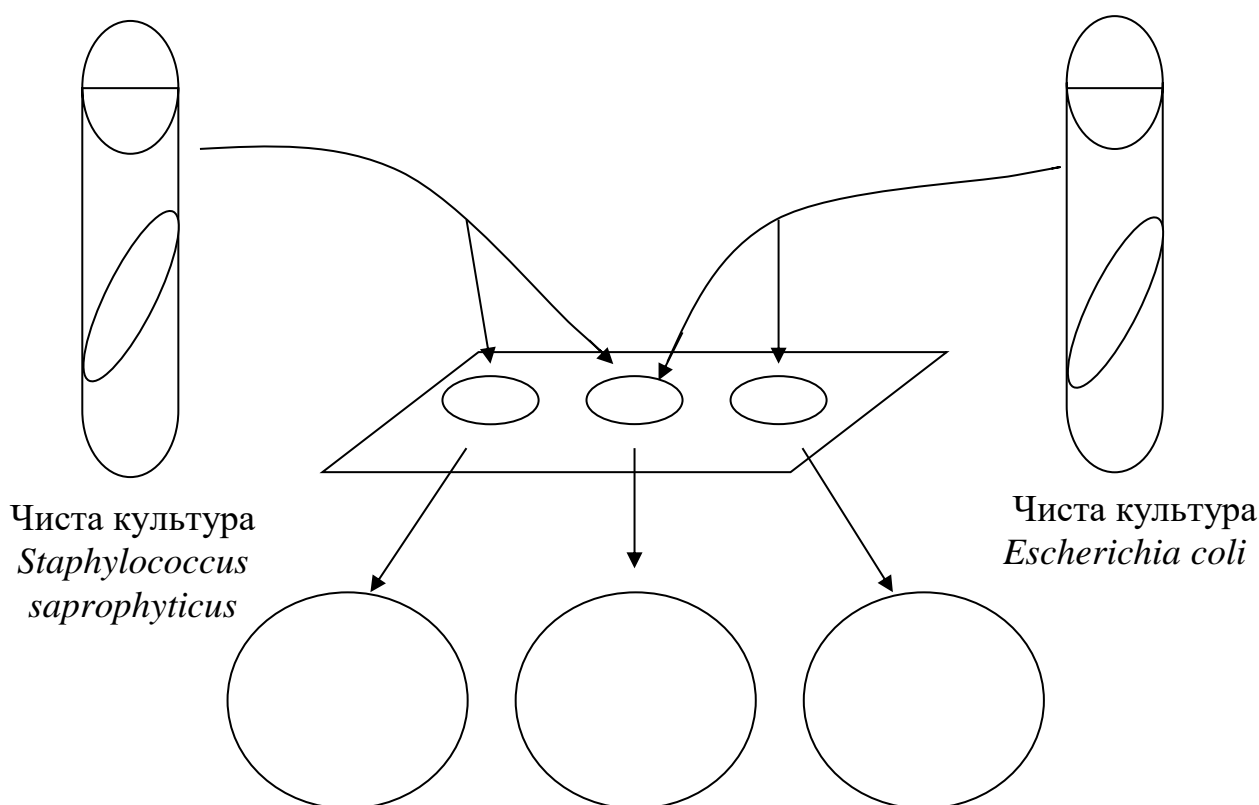
### Методика фарбування за Грамом.

1. На фіксований мазок наносять розчин генціанвіолету на 1-2 хв., після чого розчин зливають, не змиваючи його водою.



2. Наносять на мазок розчин Люголя на 1-2 хв.
3. Знебарвлюють мазок 96% спиртом протягом 15-20 сек.
4. Промивають водою.
5. Наносять на мазок розчин фуксину на 1-2 хв.
6. Промивають водою, висушують фільтрувальним папірцем.

**Завдання 1.** Приготувати бактеріальні препарати із коків, паличок та їх суміші, пофарбувати за Грамом, встановити морфологічні та тинкторіальні властивості.



### **Висновок:**

#### **Питання для самоконтроля:**

- Методика фарбування за Грамом.
- Чому метод Грама називають диференційним?
- Які особливості хімічного складу клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій?
- Які особливості будови клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій?
- Назвіть основні фактори, що впливають на забарвлення бактерій за Грамом.

## Практичне заняття №3

### Тема: «Морфологія і структура бактерій»

#### Актуальність теми:

Бактерії – це одноклітинні мікроорганізми, що відносяться до царства *Procaruota*. Вони широко розповсюджені, включають багато представників, серед яких є сапрофітні і патогенні форми.

Морфологія бактерій – це наука, що вивчає форму і структуру бактерій в онто- і філогенезі. На основі морфологічних досліджень бактерій встановлено, що вони відрізняються за розмірами, формою і розташуванням клітин. Відомості про будову бактеріальних клітин допомагають визначити функції окремих структур.

Знання морфологічних і структурних особливостей різних бактерій є необхідними для їх ідентифікації і диференціації, для розуміння їх впливу на макроорганізм. Це зумовлює актуальність теми заняття, яка спрямована на формування позитивної мотивації її вивчення.

#### Конкретні цілі:

- Ознайомитись з морфологією різних бактерій.
- Вивчити постійні структурні елементи бактеріальних клітин і їх функції.
- Розглянути роль непостійних структур в життєдіяльності бактерій.
- Приготувати мікроскопічні препарати з чистих культур бактерій і охарактеризувати їх за морфологічними і тинкторіальними властивостями.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:**

Термін	Визначення
Прокаріоти	Одноклітинні організми, що мають двохланцюгову кільцеву ДНК, не мають сформованого ядра, типових клітинних структур, мітозу.
Коки	Бактерії кулястої форми
Бацили	Бактерії паличкоподібної форми
Звивисті бактерії	Бактерії зігнутої форми з одним або декількома обертами.
<b>Постійні структурні елементи бактеріальних клітин</b>	
Нуклеоїд	Аналог ядра у бактерій, подвійна кільцева нитка ДНК
Цитоплазма	Колоїдна система, що вміщує різні клітинні структури, органічні і неорганічні сполуки; в ній перебігають процеси метаболізму
Цитоплазматична мембрана	Обмежує цитоплазму, складна за хімічним вмістом будова, виконує активну роль в процесах метаболізму

Мезосоми	Аналог мітохондрій є похідним цитоплазматичної мембрани, приймає участь в енергетичному метаболізмі, поділі клітин, тощо.
Клітинна стінка	Біогетерополімер зі складним хімічним вмістом; зовнішня оболонка бактерій.
Рибосоми	Білок синтезуючі системи
<b>Непостійні структурні елементи бактеріальної клітини</b>	
Капсули	Захисний слизовий шар, який вкриває клітинну стінку
Спори	Форма існування бактерій в несприятливих умовах для збереження генетичної інформації
Джгутики	Поверхневі структури у деяких паличкоподібних бактерій, що зумовлюють їх активний Рух
Пілі (фімбрії, війки)	Тонкі полі нитки, що вкривають поверхню бактеріальних клітин, обумовлюють їх адгезію
Секс-пілі	Приймають участь у кон'югації бактерій
Включення	Запасні поживні речовини (волютин, глікоген тощо)

#### **Теоретичні питання до заняття:**

- Відмінності в будові, хімічному складі, функціях прокариотичних і еукаріотичних клітин.
- Класифікація бактерій за морфологічними ознаками.
- Характеристика постійних структурних елементів бактеріальних клітин і їх функції.
- Непостійні структурні компоненти і їх роль в процесах життєдіяльності бактерій.
- Визначення різних бактерій за морфологічними і тинкторіальними ознаками.
- Практичне значення вивчення морфології бактерій.

#### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Вивчити різні морфологічні форми і взаємне розташування клітин бактерій, пофарбованих за Грамом.
- Виявити спори у паличкоподібних бактерій при фарбуванні за методом Ціля-Нільсена.
- Знайти включення у бактерій на препаратах, пофарбованих за методом Лефлера.
- Визначити капсули у бактерій при використанні фарбування за Йоне.
- Виявити джгутики у паличкоподібних бактерій, пофарбованих за методом Лефлера.
- Зробити препарати-мазки з чистих культур невідомих бактерій, пофарбувати за Грамом і охарактеризувати за морфологічними і тинкторіальними властивостями.

#### **Зміст теми:**

На практичному занятті студенти вивчають відмінності в будові та функціях прокариотів і еукаріотів, знайомляться з морфологічними і структурними

особливостями бактеріальних клітин, засвоюють роль постійних і непостійних структур в життєдіяльності бактерій, готують препарати-мазки з чистих культур різних бактерій, фарбують їх за методом Грама і характеризують на підставі морфологічних і тинкторіальних властивостей. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

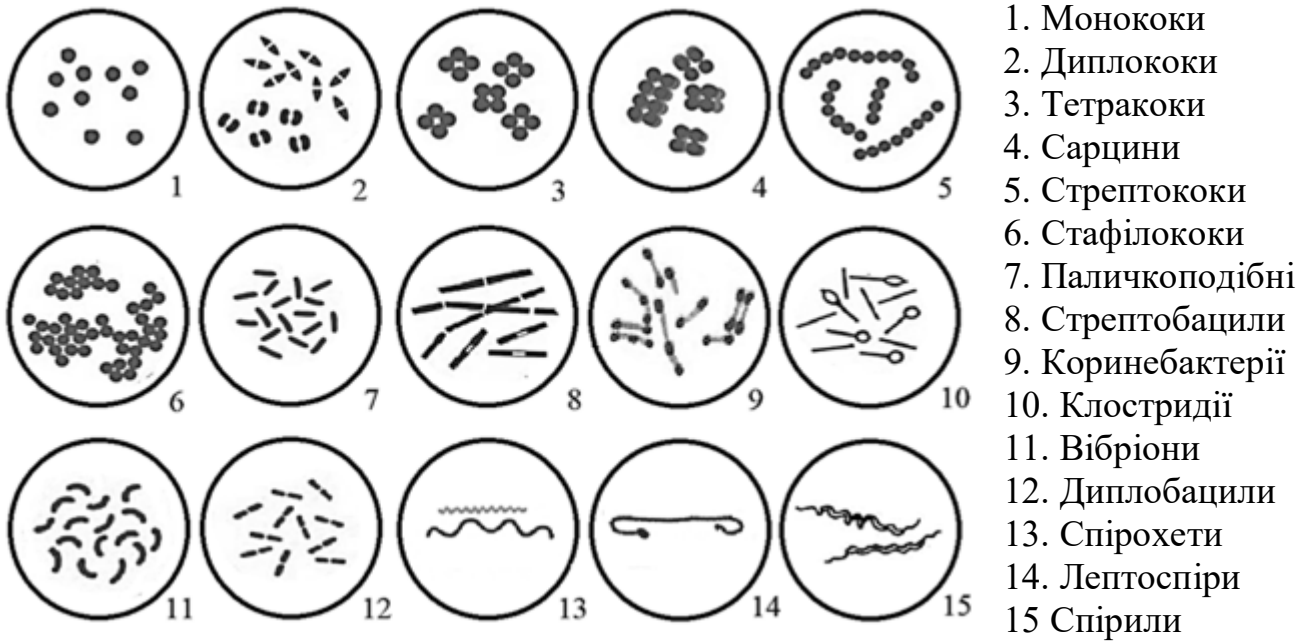
### Рекомендації для оформлення протоколу.

#### Різниця між прокариотичними і еукаріотичними клітинами

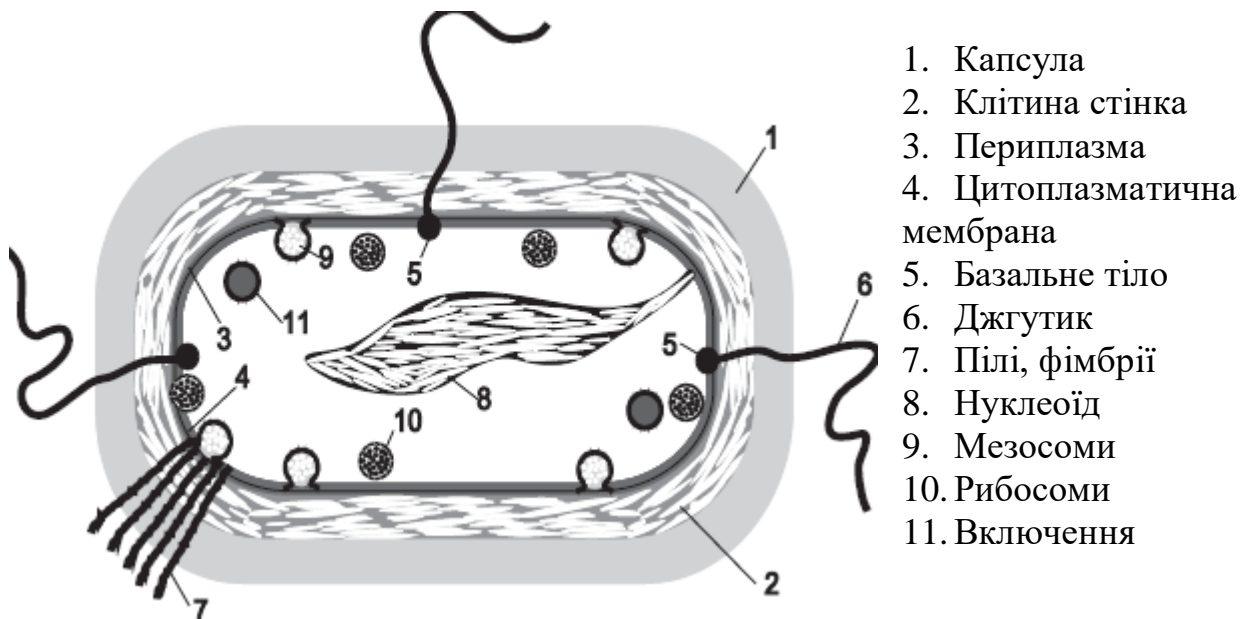
Ознаки	Прокариоти	Еукаріоти	
		рослини	тварини
<b>Розміри клітин</b>	Діаметр у середньому складає 0,5-5 мкм	Діаметр складає до 40 мкм	
<b>Форма</b>	Одноклітинні	Одноклітинні і багатоклітинні	
<b>Генетичний матеріал</b>	Кільцева ДНК, що знаходиться в цитоплазмі. Ядерна мембрана і ядерця відсутні. Не містять гістонів	Знаходиться в ядрі, в якому лінійні молекули ДНК зв'язані з гістонами білками. Наявні ядерце	
<b>Синтез білка</b>	В 70S-рибосомах. Ендоплазматичної сітки немає. (Синтез білка характеризується чутливістю до антибіотиків)	У 80S-рибосомах. Рибосоми можуть бути прикріплені до ендоплазматичної сітки	
<b>Клітинна стінка</b>	Жорстка (містять полісахариди і амінокислоти). Основний компонент - муреїн.	Основний структурний полісахарид - целюлоза	Наявний поверхневий шар над плазматичною мембраною – глікокалікс
<b>Джгутики</b>	Прості (мікротрубочки відсутні). Діаметр $\approx$ 20 нм	Складні з розташуванням мікротрубочок. Діаметр $\approx$ 200 нм	
<b>Двохмембранні внутрішньоклітинні структури</b>	Відсутні	Є (ядро, мітохондрії, пластиди)	
<b>Ендоплазматична сітка</b>	Відсутня	Є	Є
<b>Клітинний центр</b>	Відсутні	Є (у більшості)	Є
<b>Мітохондрії</b>	Відсутні	Є	Є

<b>Комплекс Гольджі</b>	Відсутні	Є	Є
<b>Лізосоми</b>	Відсутні	Є	Є
<b>Пластиди</b>	Відсутні	Є	Відсутні
<b>Вакуолі</b>	Відсутні (за винятком деяких представників)	Є	Відсутні
<b>Поділ клітин</b>	Амітоз (прямий поділ)	Мітоз (непрямий)	Мітоз (непрямий)

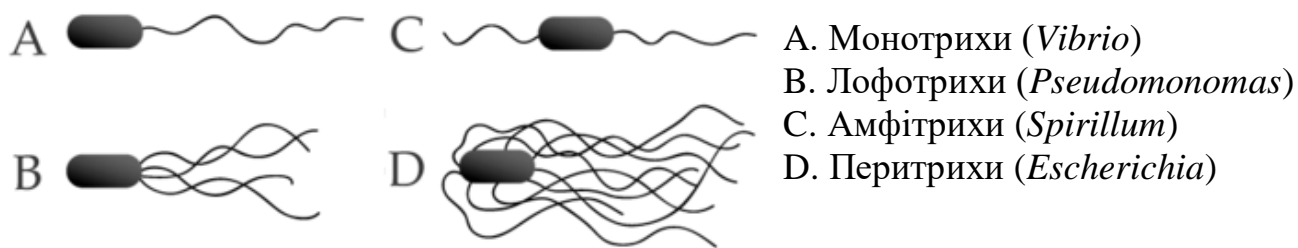
**Рис. 1.** Морфологічні форми бактерій



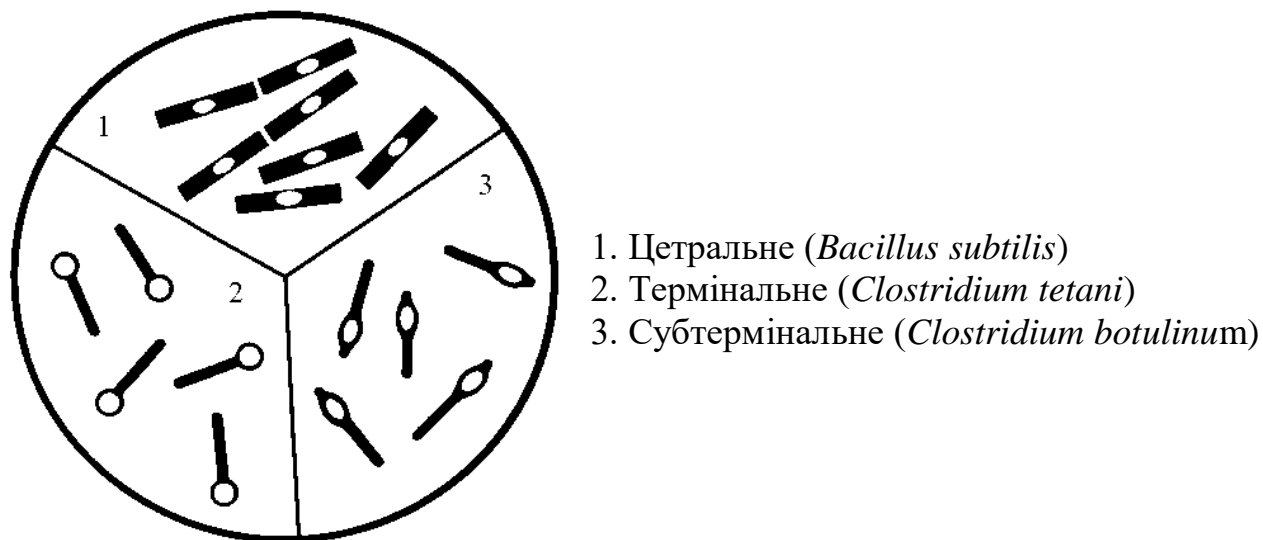
**Рис. 2.** Схема будови бактеріальної клітини



**Рис. 3.** Класифікація бактерій за кількістю та розташуванням джгутиків

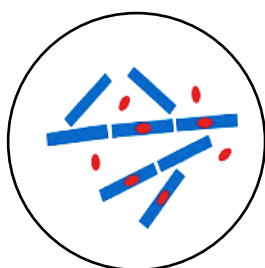


**Рис. 4.** Типи розташуванням спор щодо бактеріальної клітини

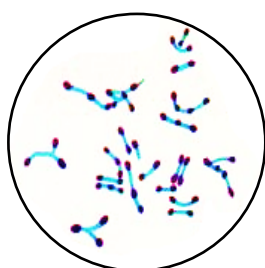


**Завдання 1.**

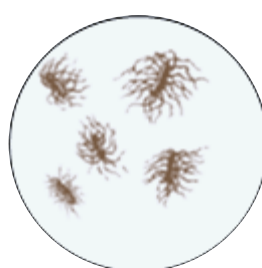
Студенти вивчають демонстраційні препарати мікроорганізмів та вносять малюнки до протоколів.



**Спори.**  
 Метод  
 Циля-Нільсена



**Включення.**  
 Метод  
 Леффлера



**Джгутики.**  
 Метод  
 Леффлера

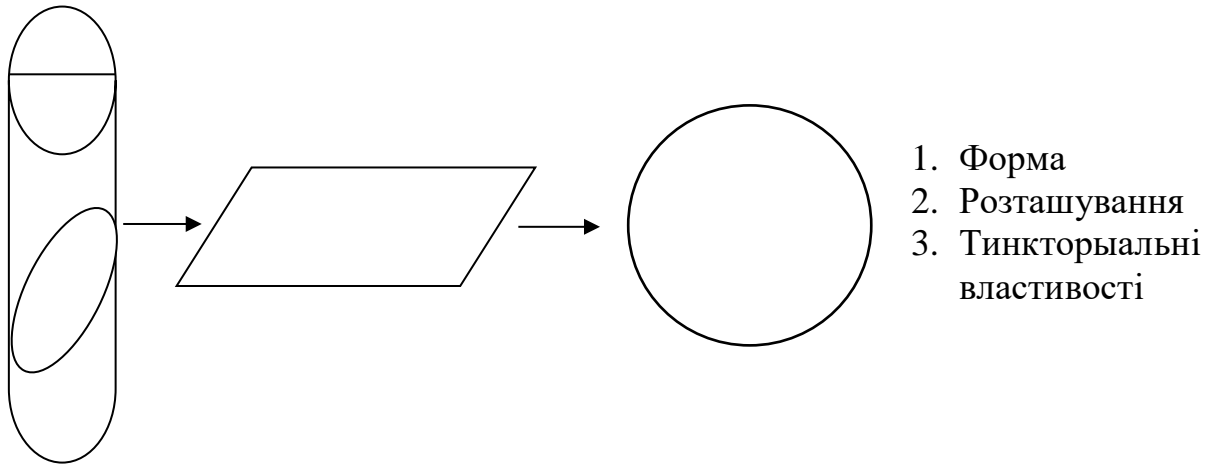


**Капсула.**  
 Метод Йоне

**Завдання 2.**

Студентам необхідно зробити препарати-мазки з чистих культур невідомих бактерій, пофарбувати за Грамом і охарактеризувати за морфологічними і тинкторіальними властивостями. Результати внести у протоколи.

## Культура №\_



### Висновок:

#### Питання для самоконтроля:

- Що таке бактерії, що вивчає морфологія бактерій?
- Яка різниця між прокаріотами і еукаріотами?
- Яка класифікація бактерій за морфологічними ознаками?
- Які структурні елементи є постійними в бактеріальній клітині, їх призначення?
- Що собою являють непостійні структурні елементи клітин бактерій, які їх функції?
- З якою метою вивчають морфологічні і структурні особливості бактеріальних клітин?

## Практичне заняття №4

### Тема: «Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів, найпростіших»

#### Актуальність теми:

На підставі глибоких відмінностей в будові клітин і їх функцій мікроорганізми поділяються на царства *Procaryotae* і *Eucaryotae*. В межах доменів окремі групи мікроорганізмів значно відрізняються за будовою і фізіологічними особливостями. Щоб визначити належність їх до доменів, родини, роду, виду, в першу чергу, треба вивчити їх морфологічні властивості. Все це зумовлює актуальність теми заняття та спрямоване на формування позитивної мотивації її вивчення.

#### Конкретні цілі:

- Вивчити морфологічні та структурні особливості спірохет, актиноміцетів, грибів, найпростіших.
- Охарактеризувати за морфологічними і тинкторіальними властивостями чисту культуру дріжджів.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:**

Термін	Визначення
Мікроміцети	Еукаріоти. Група грибів та грибоподібних організмів мікроскопічних розмірів.
Спірохети	Прокаріоти. Одноклітинні рухливі мікроорганізми, являють собою тонкі спіральні звивисті клітини.
Актиноміцети	Прокаріоти. Ниткоподібні гіллясті клітини, що нагадують гіфи грибів.
Найпростіші	Еукаріоти. Поліфілетична група одноклітинних або колоніальних еукаріотів, які мають гетеротрофний тип живлення.
Дріжджі, дріжджеподібні гриби	Еукаріоти з овальною, паличкоподібною формою клітин, аспорогенні
Цисти	Форма існування спірохет і найпростіших в несприятливих умовах
Фібрили	Довгі ниткоподібні молекули білка флагеліна, які складають центральну вісь клітин спірохет і забезпечують їх рухливість.
Гіфи	Основний структурний елемент актиноміцетів і грибів – короткі паличкоподібні або ниткоподібні утворення
Міцелій	Накопичення гіфів, що переплітаються



Спори, спороутворення	Спосіб зберігання бактерій у несприятливих умовах, спосіб розмноження актиноміцетів і грибів
Друзи	Колбоподібні потовщення гіф актиноміцетів, що утворюються в патологічному матеріалі
Брунькування	Спосіб розмноження дріжджів і дріжджеподібних грибів
Псевдоміцелій	Ланцюжок подовжених клітин дріжджоподібних грибів, який утворюється внаслідок розмноження їх шляхом брунькування, але утворені дочірні клітини не розходяться

### **Теоретичні питання до заняття:**

- Місце мікроміцетів, актиноміцетів, спірохет в системі живих істот
- Морфологічні властивості і структура спірохет, схожість з бактеріями і найпростішими.
- Морфологія і тинкторіальні властивості актиноміцетів. Спільні та відмінні ознаки з бактеріями і грибами.
- Морфологічні особливості мікроміцетів. Дріжджі та дріжджеподібні гриби.
- Морфологія найпростіших.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Вивчити на демонстраційних препаратах-мазках морфологічні властивості дріжджів, дріжджеподібних та пліснявих грибів, актиноміцетів, спірохет, найпростіших.
- Зробити препарати-мазки чистої культури дріжджів та охарактеризувати морфологічні особливості.

### **Зміст теми:**

На практичному занятті студенти вивчають на демонстраційних препаратах морфологічні і структурні властивості спірохет, актиноміцетів, мікроміцетів, найпростіших. Готують препарати-мазки з чистої культури дріжджів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### **Рекомендації для оформлення протоколу**

В протоколи необхідно записати інформацію про мікроскопічні гриби, зробити малюнки демонстраційних препаратів спірохет, актиноміцетів, грибів, найпростіших.

### **Скорочена інформація про мікроскопічні гриби.**

*Гриби* – це еукаріоти, що належать до царства *Mycota (Fungi)*. Вони відрізняються від прокаріотичних мікроорганізмів більш складною будовою і більш досконалим способом розмноження. Класифікацію грибів здійснюють за типом міцелію та способом розмноження:

**Нижчі***Chitridiomycetes**Hyphochitridiomycetes**Oomycetes**Zygomycetes***Вищі***Ascomycetes**Basidiomycetes**Deuteromycetes***Досконалі***Ascomycetes**Basidiomycetes***Недосконалі***Deuteromycetes*

Більшість патогенних грибів належить до дейтеромицетів, деякі – до аскомицетів або зигомицетів.

За морфологією відрізняють гриби ниткоподібні (плісняві) і дріжджі, дріжджоподібні гриби роду *Candida*.

Клітини пліснявих грибів називають гіфами, вони переплітаються, галузяться, утворюючи тіло гриба – міцелій. Він буває одноклітинний (несептований) – нижчих грибів, і багатоклітинний (септований) – у вищих. Септи – це перегородки в гіфах. Розрізняють субстратний (вегетативний) міцелій і повітряний (репродуктивний), який може бути пігментованим.

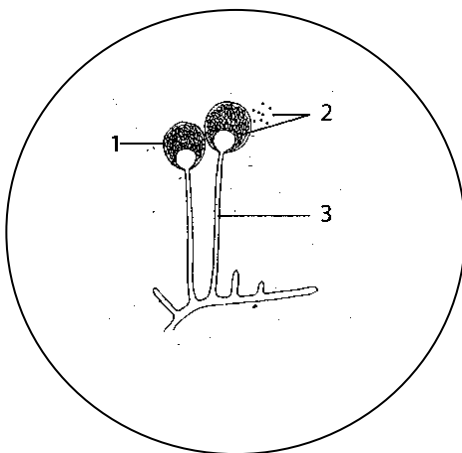
Дріжджі і дріжджоподібні гриби роду *Candida* – це одноклітинні мікроорганізми овальної форми. Вони не утворюють міцелій, але *Candida* внаслідок брунькування можуть створювати ланцюжки з подовжених клітин, що називають псевдоміцелієм.

Клітини грибів вкриті оболонкою, мають цитоплазматичну мембрану, чітко диференційоване одне або кілька ядер з ядерцями, комплекс Гольджі, мітохондрії, лізосоми, різноманітні включення.

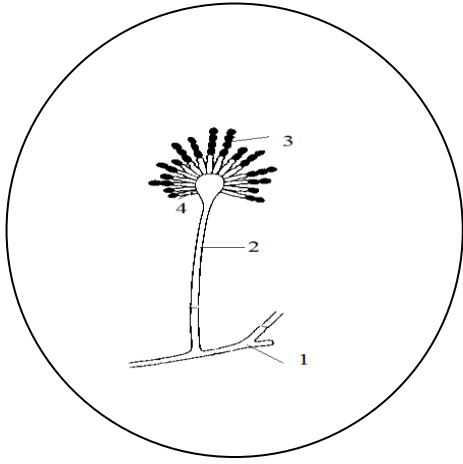
Культивують гриби на поживних середовищах Сабуро, Чапека, сусло-агарі. Більшість з них аероби.

Гриби розмножуються безстатевим і статевим шляхами. Ті, що розмножуються безстатевим шляхом – вегетативно (брунькуванням, поділом грибниці, спорами), називають недосконалими.

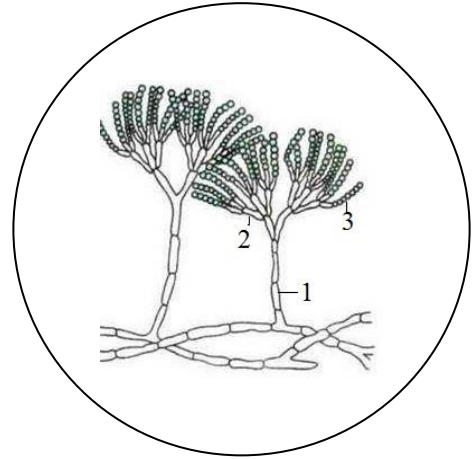
Гриби, що розмножуються шляхом статевого процесу – злиття чоловічих та жіночих гамет, внаслідок чого утворюються гаплоїдні клітини – спори, називаються досконалими.

**ЦВІЛЬОВІ ГРИБИ****МУКОР**

1. Спорангій з ендоспорами
2. Спори
3. Спорангієносець (спорофора)

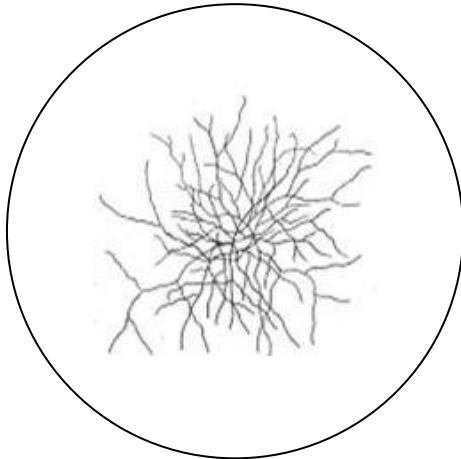


АСПЕРГІЛ



ПЕНІЦИЛ

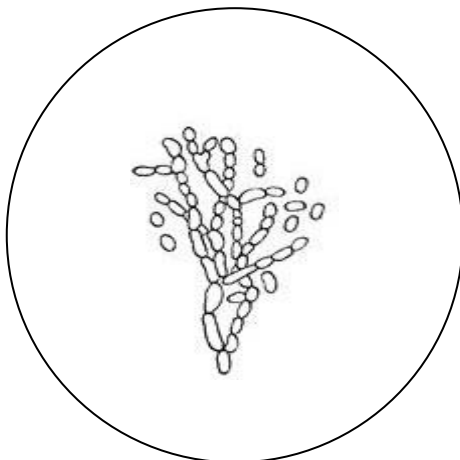
1. Гіфа
2. Конідієносець (спорофора)
3. Конідії (екзоспори)
4. Стеригми



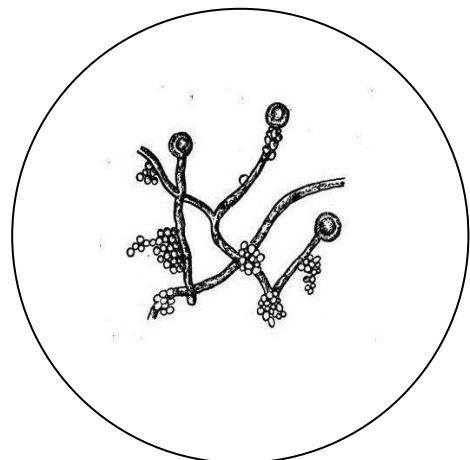
АКТИНОМІЦЕТИ



СПІРОХЕТИ



ДРІЖДЖІ



ДРІЖДЖЕПОДІБНІ ГРИБИ

**Висновки:**

### **Питання для самоконтролю:**

- До яких доменів належать спірохети, актиноміцети, гриби, найпростіших?
- Морфологічні особливості спірохет. Чим вони схожі з бактеріями і найпростішими?
- Морфологічні властивості актиноміцетів. Навести ознаки, які наближають їх до грибів, бактерій.
- Морфологічні властивості мікроміцетів. За якими ознаками їх поділяють на нижчі і вищі, досконалі і недосконалі?
- Охарактеризуйте спільні та відмінні морфологічні властивості дріжджів і дріжджоподібних грибів?
- Які морфологічні особливості виокремлюють найпростіших в окреме царство?

## Практичне заняття №5

### Тема: «Поживні середовища для культивування мікроорганізмів. Стерилізація»

#### Актуальність теми:

Мікробіологічна робота, і в першу чергу практичні завдання, пов'язана з приготуванням поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів. Середовища необхідні для накопичення, виділення і зберігання мікроорганізмів. Поживні середовища використовуються при бактеріологічній діагностиці інфекційних захворювань. Крім цього, поживні середовища використовуються для вирощування культур з метою дослідження їх обміну речовин, для виробництва за допомогою мікроорганізмів цінних продуктів метаболізму: ферментів, антибіотиків, вітамінів тощо. Якість діагностики і якість бактеріальних препаратів часто залежить від повноцінності поживних середовищ.

Для засвоєння цієї теми студенти повинні вивчити хімічний склад мікробної клітини, метаболізм мікроорганізмів, механізм живлення, класифікацію мікроорганізмів за типом дихання та інше. Студентам надається можливість ознайомитись з класифікацією поживних середовищ, принципами їх приготування, вимогами до них; засвоїти методи визначення ферментативної активності бактерій.

Не менш актуальною є тема «Стерилізація». Вивчення цієї теми дає можливість студентам ознайомитись з впливом фізичних, хімічних і біологічних факторів на життєдіяльність мікроорганізмів. Ознайомитись з методами стерилізації і стерилізаційною апаратурою, оволодіти методами контролю стерилізації в автоклаві.

Все це зумовлює актуальність теми заняття та спрямоване на формування позитивної мотивації її вивчення.

#### Конкретні цілі:

- Ознайомитись з різноманітними поживними середовищами для культивування мікроорганізмів та їх класифікацією.
- Вивчити зразки готових поживних середовищ, їх компоненти. Ознайомитись з технікою приготування, розливу і підготовки до стерилізації різних поживних середовищ (МПА, МПБ, бульйон Мартена, Хоттінгера, м'ясо-пептонний желатин, пептонна вода, кров'яний агар, середовище Ендо, Левіна, кольоровий ряд Гіса та інше).
- Засвоїти методику визначення цукролітичних, ліполітичних, протеолітичних, пептолітичних, гемолітичних властивостей бактерій.
- Вивчити принципи і методи стерилізації, стерилізаційну апаратуру, режими стерилізації в різних апаратах і контроль ефективності стерилізації в автоклаві та повітряно-жаровому стерилізаторі.
- Пояснити дію фізичних, біологічних та хімічних факторів на мікроорганізми.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:**

<b>Термін</b>	<b>Визначення</b>
Фізіологія мікроорганізмів	Розділ загальної мікробіології, який вивчає метаболізм мікроорганізмів, їх живлення, ріст, розмноження, хімічний склад, культивування. Фізіологічні властивості мікроорганізмів використовують при їх систематиці, вони важливі для вивчення патогенезу інфекційних захворювань, мікробіологічної діагностики, а також при розробці біотехнологічних процесів одержання діагностичних, лікувальних і профілактичних препаратів та біологічно активних речовин мікробного походження.
<b>Групи поживних середовищ</b>	
Основні поживні середовища	Середовища, які за складом, наявністю поживних речовин придатні для культивування багатьох видів бактерій (МПБ, МПА).
Спеціальні поживні середовища	Використовуються в тих випадках, коли мікроорганізми не ростуть на простих поживних середовищах, До них належить кров'яний, сироватковий агар, сироватковий бульйон, асцитичний бульйон.
Елективні середовища	Середовища, на яких мікроорганізми певного виду ростуть швидше, більш інтенсивно, випереджають у своєму розвитку інші види бактерій. Наприклад, 1 % лужна пептонна вода є елективним середовищем для холерних вібріонів, середовища Ру та Леффлера – для збудників дифтерії.
Селективні середовища	Середовища, які завдяки додаванню певних компонентів (жовч, анілінові барвники, антибіотики та ін.) здатні пригнічувати розвиток одних видів мікроорганізмів, але не впливають на інші види. Наприклад середовище Мюллера є селективним для тифо-паратифозних бактерій, фуразолідоно-твіновий агар – для коринебактерій і мікрококів. Додавання антибіотиків до складу середовищ робить їх селективними для грибів (напр. середовище Сабуро та ін.).
Диференціально-діагностичні середовища	Середовища, які дозволяють визначити певні ферментативні властивості мікроорганізмів і проводити їх диференціацію. Вони поділяються на середовища для визначення протеолітичних, пептолітичних, цукролітичних, ліполітичних, гемолітичних, редукуючих властивостей бактерій. (Середовища Ендо, Левіна, Плоскірева, Гіса).
Транспортні середовища	Використовують для короткострокового зберігання і транспортування мікроорганізмів. Зазвичай в такі

	середовища поміщають матеріал, який повинен бути доставлений в лабораторію для дослідження. Культивування мікроорганізмів в цих середовищах не проводять. Середовища даного типу містять компоненти, що забезпечують оптимальний рН і консистенцію.
Середовища збагачення	Використовують у тих випадках, коли є потреба збільшити концентрацію бактерій певного виду( 10% жовчний МПБ для збудника черевного тифу).
Стерилізація	Повне знищення вегетативних і спорових форм мікроорганізмів на предметах, матеріалах, у поживних середовищах.
Дезінфекція	Сукупність заходів для повного, часткового або селективного знищення потенційно-патогенних для людини збудників на різних об'єктах довкілля з метою попередження передачі збудника від джерела інфекції до сприйнятливого організму.

### **Теоретичні питання до заняття:**

- Що вивчають у розділі «Фізіологія мікроорганізмів»?
- Особливості метаболічних процесів у бактерій, ферменти бактерій, їх класифікація.
- Механізми живлення у бактерій. Класифікація мікроорганізмів за типом живлення.
- Способи дихання у бактерій. Класифікація мікроорганізмів за способом диханням.
- Поживні середовища для культивування бактерій, класифікація. Вимоги до поживних середовищ.
- Характеристика та принципи виготовлення окремих груп середовищ.
- Методи визначення ферментативної активності бактерій.
- Чутливість мікроорганізмів до дії фізичних, хімічних та біологічних агентів. Механізми їх дії на бактеріальну клітину.
- Розкрити поняття стерилізація, дезінфекція, асептика, антисептика. Їх принципи і методи,
- Стерилізаційна апаратура, режим роботи цих приладів.
- Контроль ефективності стерилізації в автоклаві та повітряно-жаровому стерилізаторі.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Ознайомитись з класифікацією і принципами виготовлення різних груп поживних середовищ: основних, спеціальних і диференціально-діагностичних.
- Вивчити зразки поживних середовищ і компонентів, які входять до їх складу.
- Засвоїти методику визначення цукролітичних, протеолітичних, пептолітичних, редуруючих, гемолітичних властивостей бактерій.

- Ознайомитись з методами стерилізації, стерилізаційною апаратурою та принципами контролю ефективності стерилізації в автоклаві.
- Ознайомитись зі стерилізаційною лабораторією кафедри та апаратурою, яка в ній знаходиться (автоклав, повітряно-жаровий та текучопаровий стерилізатор, апарат для інактивації сироватки).

### **Зміст теми:**

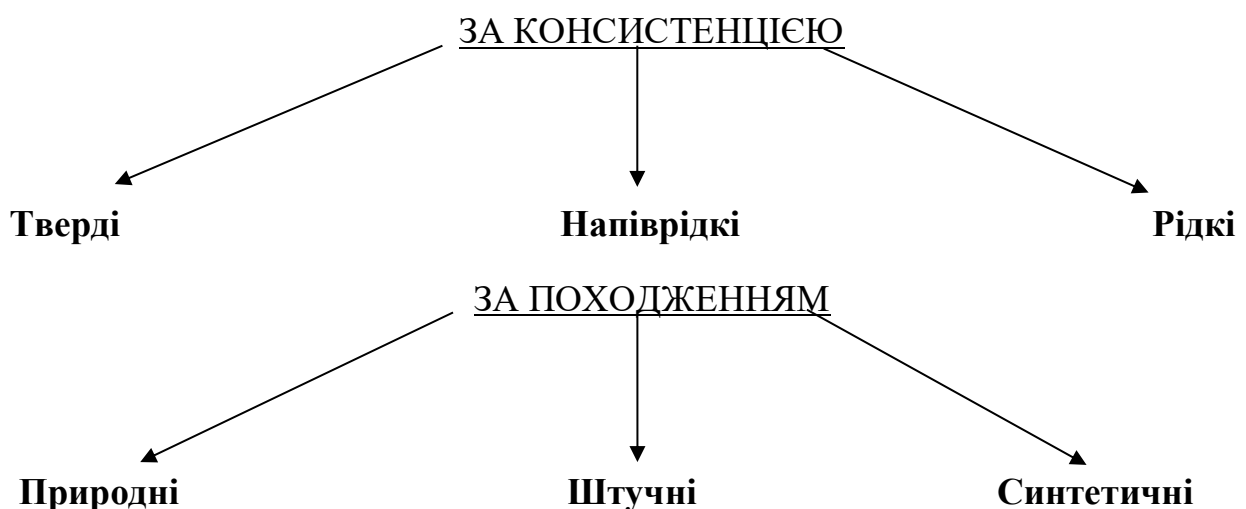
На практичному занятті студенти вивчають поживні середовища для культивування мікроорганізмів, їх призначення і принципи одержання. Вивчають методикау визначення ферментативних властивостей бактерій. Знайомляться зі стерилізаційною апаратурою, вивчають методи стерилізації, які застосовуються в мікробіологічній практиці та принципами контролю ефективності. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### **Рекомендації для оформлення протоколу.**

#### **ВИМОГИ ДО ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ**

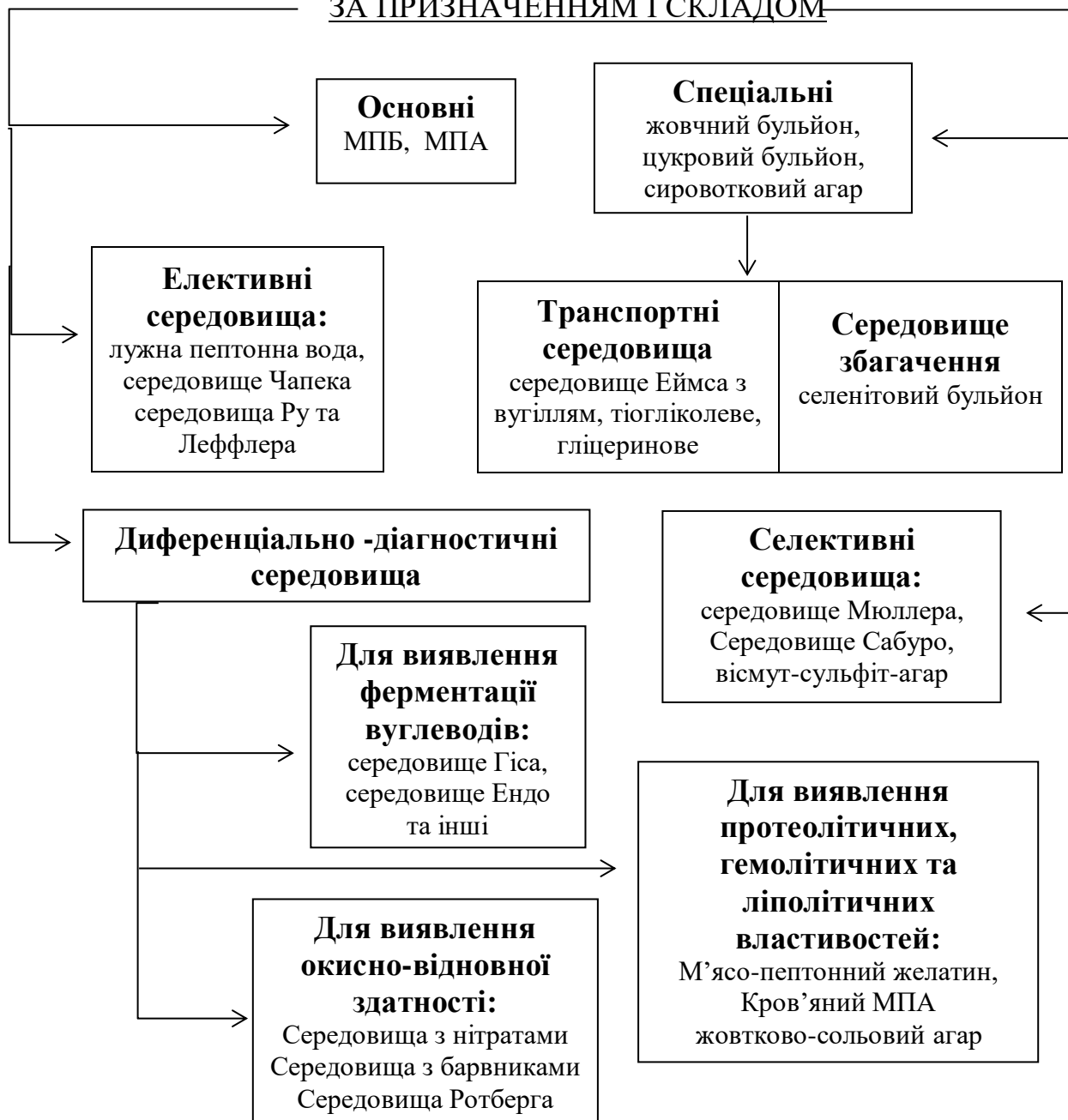
- Повноцінність за хімічним складом.
- Наявність ростових факторів
- Стабілізація оптимуму рН середовища
- Буферність
- Відповідний окисно-відновний потенціал
- Ізотонічність
- В'язкість
- Вологість
- Прозорість
- Стерильність

#### **Класифікація поживних середовищ**





## ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ І СКЛАДОМ

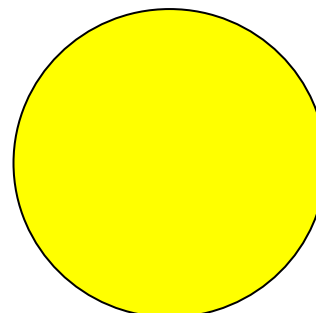


**Завдання 1.** Замалювати в протоколі зразки різних поживних середовищ.

### Основні поживні середовища

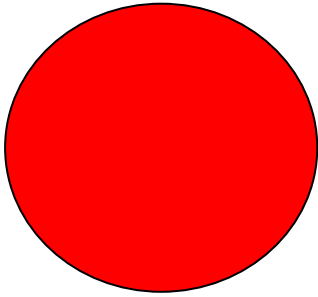


М'ясо-пептонний бульйон (МПБ)

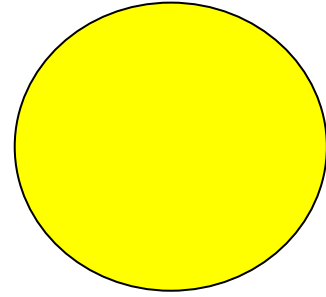


М'ясо-пептонний агар (МПА)

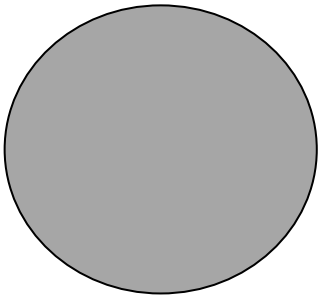
## Спеціальні середовища



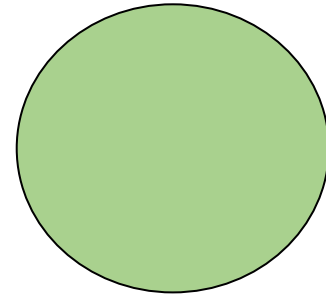
Кров'яний МПА



Жовтково-сольовий агар  
(ЖСА)

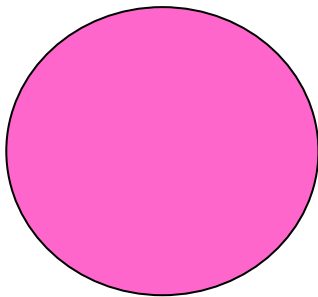


Середовище Мансуро

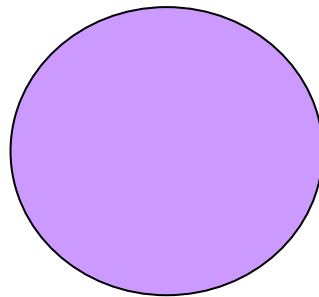


Вісмут-сульфіт-агар

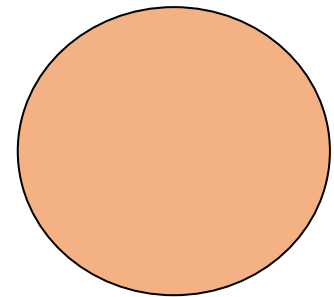
## Диференційно-діагностичні середовища



Ендо



Левіна



Плоскірева

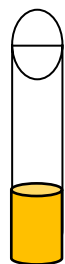
### Склад середовища Ендо:

*М'ясо-пептонний агар, 1% лактози, індикатор рН – основний фуксин  
(знебарвлений розчином сульфїту натрія)*

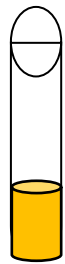
## Кольоровий ряд Гїса



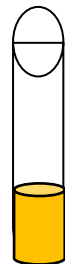
Глюкоза



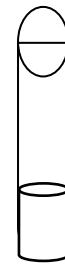
Лактоза



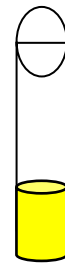
Манїт



Сахароза



Молоко

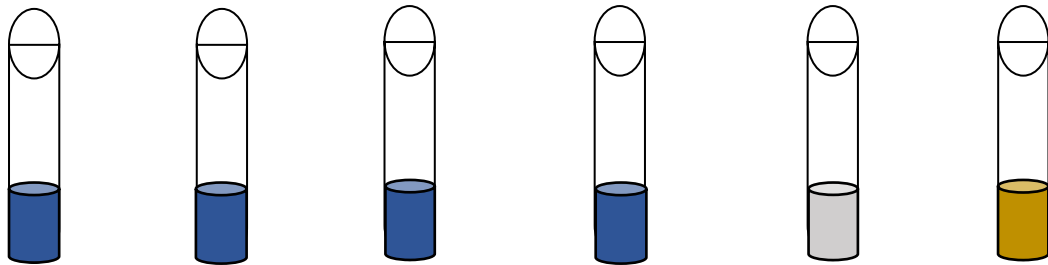


МПБ

### Кольоровий ряд Гіса:

МПА (МПБ)+1% вуглевода + індикатор рН

**Завдання 2.** Визначити ферментативну активність досліджуваної культури бактерій на кольоровому ряді Гіса.



Кольоровий ряд Гіса через добу після посіву чистої культури бактерій (відбулась ферментація глюкози та лактози).

Для визначення ферментативних властивостей бактерій здійснюють посів культури *E. coli* на ряд Гіса (виявлення цукролітичних властивостей). Студенти повинні ознайомитись зі змінами, які відбуваються на середовищі Гіса.

**Завдання 3.** Вивчити принципи та методи стерилізації.

ФІЗИЧНИЙ	ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ	ХІМІЧНИЙ	БІОЛОГІЧНИЙ
Теплова Ультразвукова Променева Електрострумом і струмом ультрависокої частоти	Адсорбційно-фільтраційна, фільтри (диски, свічки Шамберлана, Беркефельда) (азбестові, нітроцелюлозні, фарфорові, діатомітові)	Обробка: галоїдами, кислотами, альдегідами, лугами, ефірами, спиртами та ін.	Обробка антибіотиками та іншими хіміотерапевтичними препаратами

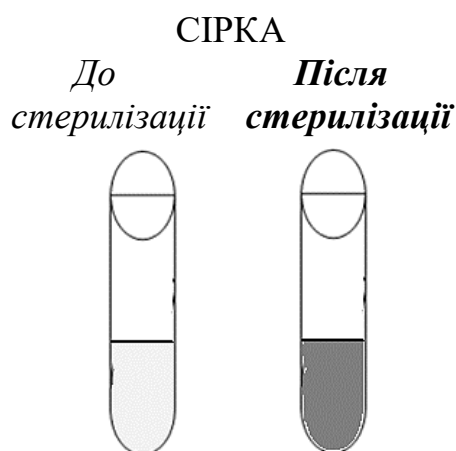
### Теплова стерилізація

Методи стерилізації	Апарати	Умови стерилізації		Об'єкти, що стерилізують
		Температура	Час	
Прожарювання та обпалювання	Пальник	> 200 °C	2-3-с.	Петлі, шпатель, пінцети, предметне скло
Кип'ятіння	Стерилізатор	100°C	30-60 хв.	Голки, шприци, хірургічні інструменти, гумові трубки

Текучою парою (з незагвинченою кришкою автоклава). Стерилізація парою під тиском	Текучопарові стерилізатори (апарат Коха)  Автоклави	100°C  120°C 134°C 1,5-2атм.	3 дні підряд по 30 хв. (дрібна стерилізація)  20 хв 40 хв	Желатин, молоко, живильні середовища з вуглеводами, МПБ, МПА. Відпрацьовані культури бактерій
Тиндалізація (багаторазова дія парою)	На водяній бані	60-65°C	По 1 годині 5 днів	Білкові рідини, вітаміни, деякі ліки
Пастеризація	--- // ---	70°C 80°C	30 хв 10 хв	Молоко, вино, соки
Сухим жаром у сухожаровій шафі	Сухі повітряні стерилізатори	160° 180°	120-150 хв, 45-60 хв.	Скляний посуд, олія, інструменти та ін.

### Контроль ефективності стерилізації в автоклаві.

*Хімічний контроль* – використовують речовини з певною температурою плавлення (сірка – 119°C, бензойна кислота – 120-122°C, бензонафтол – 110°C, маноза і сечовина – 132-133°C, індикаторні папірці температурного режиму).



*Біологічний контроль* – застосовують біотести, виготовлені з тест- культури мікроорганізмів (з групи антракоїдів). У стерилізатор вміщують щонайменше 5 тестів та 1 (контрольний) залишають при кімнатній температурі. Після стерилізації змиви з біотестів засівають на живильні середовища. Результат читають наступним чином: у змивах, які перебували у стерилізаторі, росту культури не повинно бути; у змивах з контрольного тесту – рясний ріст культури;

### Висновки:

#### Питання для самоконтроля:

- Що вивчає фізіологія мікроорганізмів?

- Які особливості метаболічних процесів у бактерій?
- Які є ферменти у бактерій, їх класифікація?
- Який механізм живлення у бактерій і як поділяються мікроорганізми за типом живлення?
- Як поділяються мікроорганізми за типом дихання?
- Класифікація поживних середовищ для культивування мікроорганізмів. Як поділяються поживні середовища за призначенням, за походженням?
- Які принципи приготування різних груп поживних середовищ, вимоги до них?
- На яких середовищах визначають ферментативну активність бактерій?
- Яка чутливість спорових та вегетативних форм мікроорганізмів до дії фізичних, хімічних та біологічних агентів?
- Які існують принципи і методи стерилізації?
- Які стерилізаційні прилади та режими стерилізації застосовують в мікробіологічній практиці?
- Які існують методи контролю ефективності стерилізації в автоклаві і повітряно-жаровому стерилізаторі?
- Розкрити поняття дезінфекція, асептика, антисептика.

## Практичне заняття №6

### Тема: «Ріст і розмноження мікроорганізмів. Виділення чистих культур бактерій (1-е заняття)»

#### Актуальність теми.

*Чиста культура* - це популяція мікроорганізмів одного виду, яка вирощена на стерильному поживному середовищі.

Виділення мікроорганізмів з різних матеріалів і одержання їх чистих культур широко використовується для дослідження мікробного забруднення об'єктів навколишнього середовища, виявлення мікробної контамінації шовного, перев'язного матеріалу, інструментарію тощо.

В клініко-діагностичних мікробіологічних лабораторіях виділення чистих культур і їх ідентифікація представляють собою суть основного методу діагностики інфекційних захворювань – бактеріологічного. Вивчення чистої культури дає змогу всебічно охарактеризувати біологічні властивості мікроорганізмів, які її складають, та встановити їх видову належність. А це, як відомо, є найбільш точним критерієм в діагностиці інфекційного захворювання або бактеріоносійства.

Виділення чистих культур необхідно для проведення науково-дослідних робіт, а також в мікробіологічному виробництві вакцин, антибіотиків і інших біологічно активних продуктів мікробної життєдіяльності.

#### Конкретні цілі:

- Вивчити принципи, методи, етапи виділення чистих культур бактерій.
- Оволодіти технікою засіву матеріалу з метою одержання ізольованих колоній бактерій.
- Засвоїти методику культивування анаеробних бактерій.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.**

Термін	Визначення
Чиста культура	Популяція мікроорганізмів одного виду, яка вирощена на стерильному поживному середовищі.
Популяція мікроорганізмів	Сукупність мікроорганізмів одного виду, які відносно довгий час існують на певній території (в біотопах).
КУО	Колоніє утворююча одиниця - показник кількості утворюючих колоній бактерій в 1 мл середовища.
Аеробні мікроорганізми	Мікроорганізми, метаболізм яких відбувається при наявності в середовищі існування вільного кисню, який виконує функцію кінцевого акцептора отриманих від субстрату електронів.

Анаеробні мікроорганізми	Мікроорганізми, які для синтезу та будови мікробної клітини, її структурних компонентів та для процесів життєдіяльності отримують енергію без доступу вільного кисню шляхом розщеплення поживних речовин.
Етологія мікробів	Вчення про їх «біосоціальну» поведінку, «мову» і механізми спілкування між собою. Цей напрямок розвитку мікробіології носить назву « <i>Quorum sensing</i> ». Мікроби живуть як біосоціальні істоти в колоніях, культурах, біоплівках.

### **Теоретичні питання до заняття:**

- Поняття про чисту культуру мікроорганізмів.
- Мета виділення чистої культури мікроорганізмів.
- Принципи та методи виділення чистих культур бактерій.
- Етапи виділення чистих культур, їх суть.
- Поняття про колонію мікроорганізмів.
- Методи отримання ізольованих колоній мікроорганізмів.
- Методи створення анаеробних умов для культивування анаеробних мікроорганізмів.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Вивчити принципи, методи, етапи отримання чистих культур бактерій.
- Засвоїти роботу з бактеріологічною петлею, чашками Петрі, пробірками та здійснити посів досліджуваного матеріалу на тверді поживні середовища з метою отримання ізольованих колоній бактерій.
- Ознайомитись з методами культивування анаеробів.

### **Зміст теми**

На практичному занятті студенти вивчають принципи, методи та етапи виділення чистих культур бактерій; засвоюють техніку посіву матеріалу на тверді поживні середовища методом штрихових посівів; здійснюють перший етап виділення чистих культур аеробних і анаеробних бактерій, засіваючи досліджувані матеріали на відповідні середовища і створюючи відповідні умови культивування, необхідні для мікроорганізмів з різними біологічними властивостями. Мета – одержання ізольованих колоній. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

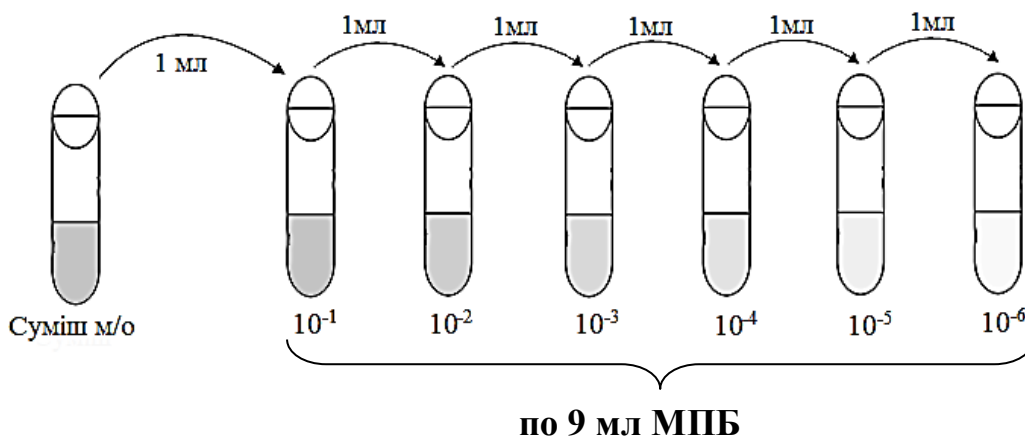
### **Рекомендації для оформлення протоколу**

#### **Методи та принципи виділення чистих культур бактерій.**

#### **I. Методи, які ґрунтуються на принципі механічного роз'єднання мікроорганізмів:**

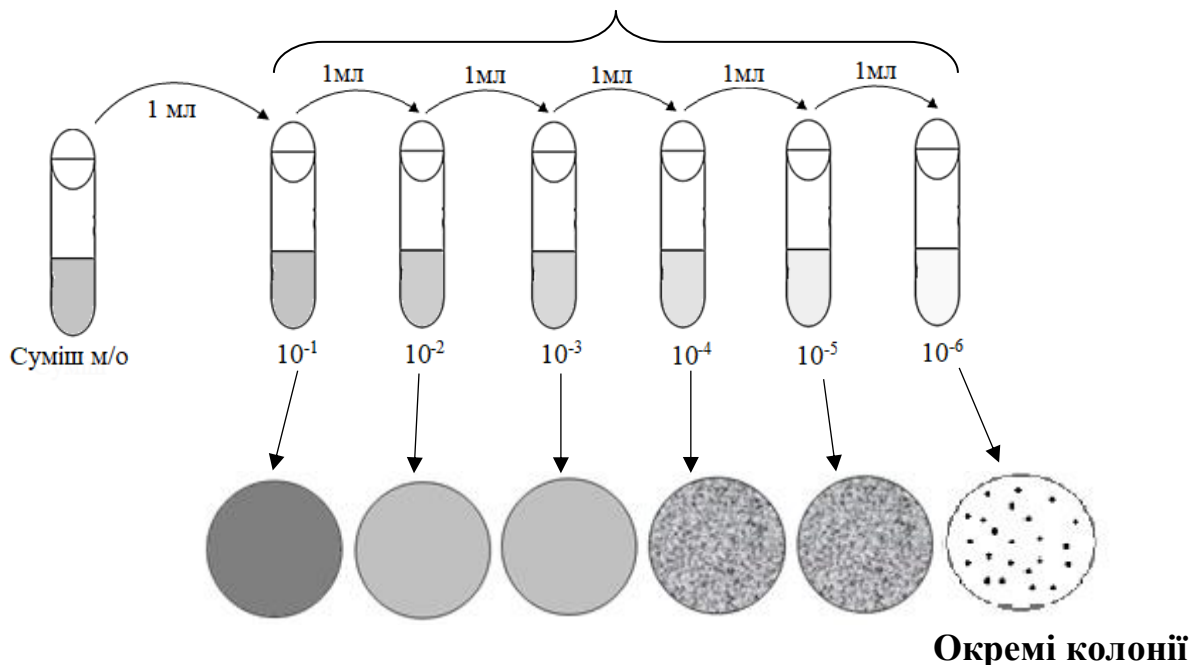
1. *Метод Л. Пастера*, або метод серійних розведень матеріалу в рідкому поживному середовищі був одним із найперших, який застосовувався для механічного роз'єднання мікроорганізмів. Він полягає в проведенні послідовних серійних розведень матеріалу, який містить мікроби, в стерильному рідкому

поживному середовищі. Цей прийом достатньо кропіткий і недосконалий у роботі, оскільки не дозволяє контролювати кількість мікробних клітин, які попадають у пробірки при розведеннях.



2. *Метод Коха*, або метод пластинчатих розведень матеріалу з використанням щільних поживних середовищ на основі желатину або агар-агару. Матеріал з асоціаціями різних видів бактерій розводився у декількох пробірках з розтопленим і дещо охолодженим желатином, вміст яких пізніше виливався на стерильні скляні пластини. Після застигання середовища воно культивувалось при оптимальній температурі. У його товщі утворювались ізольовані колонії мікроорганізмів, які легко можуть бути перенесені на свіже живильне середовище за допомогою бактеріологічної петлі для одержання чистої культури бактерій.

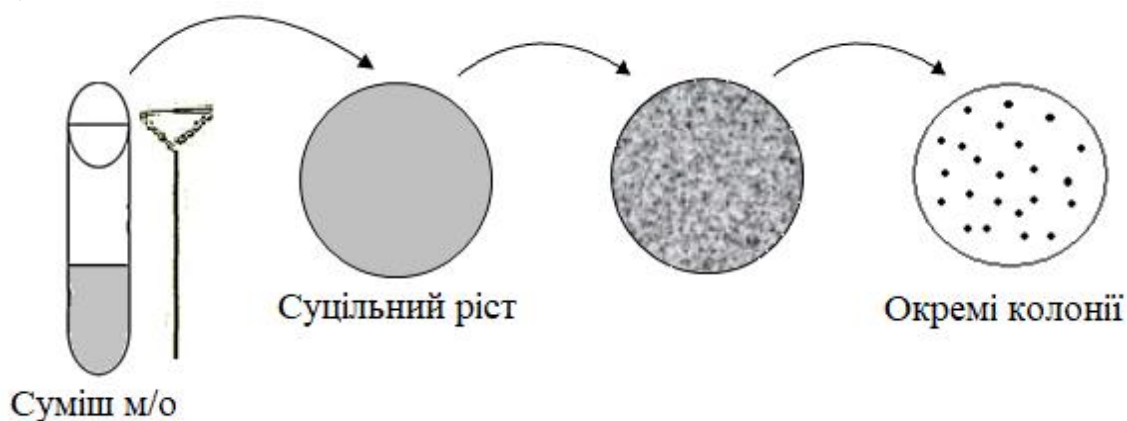
**по 9 мл МПА (50°C)**



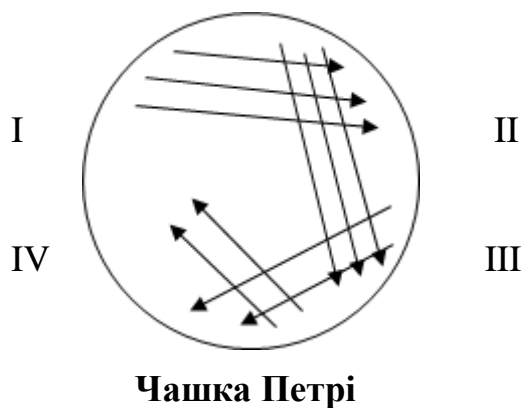
3. *Метод Дригальського*, полягає в розсіві матеріалу по поверхні твердого поживного середовища за допомогою шпателя. Спочатку на поверхню середовища в чашці Петрі піпеткою або петлею наносять досліджуваний матеріал і за допомогою металевого або скляного шпателя рівномірно розподіляють по поверхні. Не стерилізуючи шпателя, проводять ним посів матеріалу в іншій чашці



Петрі, при потребі – в третій. На поверхні середовища в першій чашці спостерігаємо, як правило, суцільний ріст бактерій, у другій – густий ріст, а в третій – ріст у вигляді ізольованих колоній.



4. Метод штрихових посівів використовується в мікробіологічних лабораторіях найчастіше. Матеріал, який містить мікроорганізми, розсівають паралельними штрихами по поверхні твердого поживного середовища за допомогою бактеріологічної петлі.



5. Одержання клону, або метод виділення чистої культури з однієї клітини за допомогою мікроскопу і мікроманіпулятора.

## II. Методи, які ґрунтуються на принципі використання біологічних особливостей мікроорганізмів:

1. *За типом дихання.* Всі мікроорганізми за типом дихання поділяються на дві основні групи: *аеробні* та *анаеробні*. Якщо матеріал, з якого слід виділити анаеробні збудники, попередньо прогріти, а потім культивувати в анаеробних умовах, то виростуть саме ці бактерії.

2. *За спороутворенням.* Спори стійкі до дії факторів зовнішнього середовища. Якщо досліджуваний матеріал прогріти, а потім посіяти в поживне середовище, то через певний час на ньому виростуть саме ті бактерії, які здатні до спороутворення.

3. *Стійкість мікробів до дії кислот і лугів.* Наприклад, збудники туберкульозу стійкі до дії кислот, тому матеріал, який його містить, попередньо обробляють рівним об'ємом 10 % розчину сірчаної кислоти, а потім висівають на поживні середовища. Стороння мікрофлора гине, а мікобактерії внаслідок їх резистентності до кислот, виростають.

4. *Рухливість бактерій.* Деякі мікроби мають тенденцію до повзучого росту. Для виділення таких збудників їх засівають у краплинку конденсаційної рідини, яка утворюється при охолодженні стовпчика скошеного агару. Через 16-18 год вони розповсюджуються на всю поверхню середовища. Чисту культуру збудників здатних до повзучого росту можна виділити з верхньої частини агару.

5. *Чутливість мікробів до дії хімічних речовин, антибіотиків та інших протимікробних засобів.* Наприклад, стафілококи стійкі до дії 7,5–10 % хлориду натрію, тому для виділення цих збудників використовують елективні поживні середовища (жовтково-сольовий агар, маніт-сольовий агар), де інші бактерії при такій концентрації хлориду натрію практично не ростуть. Ністатин використовується для гальмування росту грибів у матеріалі, який сильно контамінований ними.

6. *Здатність мікроорганізмів проникати через неушкоджені шкірні покриви.* Для виділення патогенних бактерій, що здатні проникати через непошкоджену шкіру, на тілі лабораторної тварини голять шерсть і в цю ділянку втирають досліджуваний матеріал, який містить збудника і велику кількість сторонньої мікрофлори. За деякий час тварину забивають, а з крові або внутрішніх органів виділяють мікроби.

7. *Чутливість лабораторних тварин до збудників інфекційних захворювань.* Наприклад, при будь-якому способі введення *Streptococcus pneumoniae* білим мишам у них розвивається генералізована пневмококова інфекція.

### **Виділення чистої культури анаеробних бактерій**

Анаеробні мікроорганізми більш вибагливі до поживних середовищ, ніж аероби, частіше потребують спеціальних ростових добавок, вимагають припинення доступу кисню при їх культивуванні, тривалість росту їх довшя. Важливим є захист матеріалу, що містить анаеробні збудники від токсичного впливу атмосферного кисню.



**Анаеростат**

**Методи виділення чистих культур бактерій, які ґрунтуються на:**

<i>принципи механічного роз'єднання мікроорганізмів</i>	<i>принципи використання біологічних особливостей мікроорганізмів</i>
1.Метод «Пастера» 2.Метод «Коха» 3.Метод «Дригальського» 4.Метод штрихових посівів 5.Метод отримання клону	1. Метод виділення рухливих бактерій. 2. Метод виділення термостійких бактерій. 3. Метод виділення анаеробів. 4. Методи виділення кислото- і лугостійких мікроорганізмів. 5.Метод виділення мікроорганізмів, стійких до антибіотиків, анілінових барвників, тощо. 6. Методи виділення бактерій на елективних середовищах. 7. Метод виділення культур шляхом зараження чутливих лабораторних тварин.

### Основні етапи виділення чистої культури бактерій

<b>Етапи</b>	<b>Завдання етапів</b>
<i>I. Взяття досліджуваного матеріалу.</i> Посів матеріалу на тверді поживні середовища.	Взяти матеріал, який містить збудника; зберегти збудника в матеріалі та запобігти від інфікування себе і оточуючих осіб. Одержати ізольовані колонії.
<i>II. Дослідження ізольованих колоній:</i> Вивчення культуральних властивостей. Мікроскопічне дослідження (фарбування за Грамом) Пересів відібраної колонії на тверде (рідке) поживне середовище.	Відібрати ізольовану колонію та визначити в неї ознаки чистої культури: морфологічну однорідність, однотипність та однотинкторіальність мікроорганізмів. Накопичити чисту культуру.
<i>III. Дослідження культуральних ознак та мікроскопія препарату, пофарбованого за Грамом.</i>	Перевірити чистоту культури (на основі вивчення культуральних та морфологічних властивостей) з метою подальшої ідентифікації мікроорганізмів.

Виділення чистих культур і їх ідентифікація (визначення видової належності) представляють собою суть бактеріологічного методу - основного методу діагностики інфекційних захворювань.

**Чиста культура** - це популяція мікроорганізмів одного виду, яка вирощена на стерильному поживному середовищі.

**Вид** – сукупність мікроорганізмів, які мають спільні морфофізіологічні властивості (морфологічні, тинкторіальні, культуральні, ферментативні, антигенні

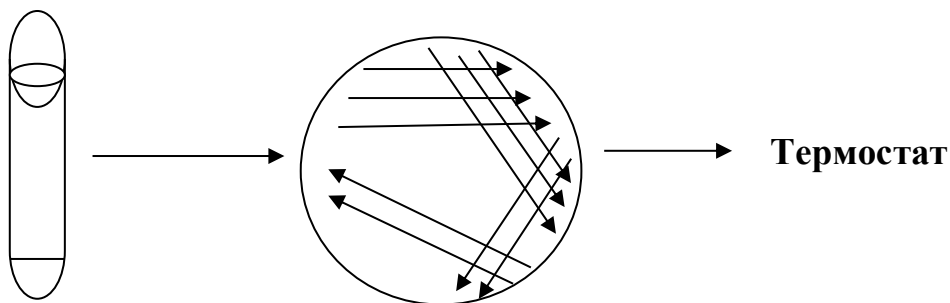
та ін.) і схожий генотип (високий ступінь гомології ДНК, близький сумарний вміст пар Г+Ц).

Після виділення мікроорганізму в чистій культурі визначають його вид (проводять ідентифікацію).

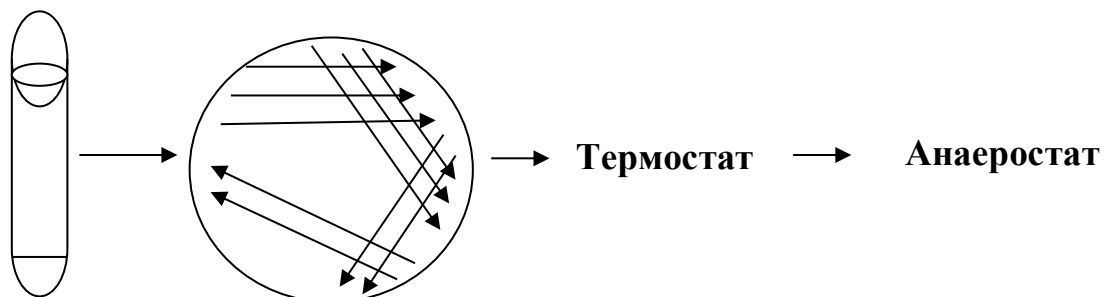
### Основні етапи ідентифікації чистої культури бактерій

Етапи	Мета
1. Визначити морфологічні і тинкторіальні властивості (фарбування за Грамом або іншим методом).	<b>ВИЗНАЧИТИ ВИД МИКРООРГАНІЗМА</b>
2. Визначити рухливість (методи "роздавленої" або "висячої" коапли).	
3. Визначити культуральні властивості (тип колоній, характер росту в рідких та на твердих поживних середовищах).	
4. Визначити ферментативні властивості (посів на диференційно-діагностичні середовища).	
5. Визначити антигенні властивості (провести серологічні реакції).	
6. Визначити чутливість культури до специфічного фагу.	
7. Визначити патогенність (інфікування лабораторних тварин).	
8. Визначити інші властивості (за необхідністю).	

**Завдання 1.** Розпочати виділення чистої культури аеробних бактерій із суміші мікроорганізмів.



**Завдання 2.** Розпочати виділення чистої культури анаеробних бактерій із ґрунту.



### **Питання для самоконтролю**

- В чому полягає суть бактеріологічного методу діагностики інфекційних захворювань?
- Що таке чиста культура мікроорганізмів?
- Які ознаки чистої культури бактерій?
- З якою метою одержують і де застосовують чисту культуру мікроорганізмів?
- Які існують методи посіву мікроорганізмів з метою отримання ізольованих колоній?
- На яких принципах ґрунтуються методи виділення чистої культури?
- Які біологічні властивості мікроорганізмів покладені в основу методів виділення чистих культур бактерій?
- Які основні етапи виділення чистої культури, в чому їх суть?
- Які ви знаєте методи створення анаеробних умов для культивування мікроорганізмів?

## Практичне заняття №7

### Тема: «Ріст і розмноження мікроорганізмів. Виділення чистих культур бактерій (2-е заняття)»

#### Актуальність теми

Одним з етапів бактеріологічного методу дослідження (основного методу діагностики інфекційних захворювань) - є одержання ізольованих колоній мікроорганізмів. Кожний вид мікроорганізмів має певний характер росту та певні ознаки колоній на твердому поживному середовищі (так само, як і свої особливості росту в рідкому поживному середовищі). Враховуючи це, з метою виділення збудника інфекційного захворювання, треба знати методи та володіти технікою отримання ізольованих колоній з матеріалу. Крім того, морфологічні і тинкторіальні ознаки, які виявляють при фарбуванні за Грамом, культуральні, а також характер рухів мають надзвичайно велике діагностичне значення при характеристиці окремих мікроорганізмів, та дозволяють дати попередню відповідь про збудника інфекції.

#### Конкретні цілі:

- Засвоїти методики дослідження колоній мікроорганізмів (зовнішні ознаки, мікроскопія, рухливість мікроорганізмів).
- Оволодіти технікою пересіву колоній бактерій на поживні середовища (аеробних бактерій на скошений МПА, анаеробних бактерій на спеціальні середовища).

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.**

Термін	Визначення
Культуральні властивості	Характеристика росту в рідких та на твердих поживних середовищах, властивості колоній
Колонія	Потомство однієї мікробної клітини, що виросло на поверхні, або в глибині твердого поживного середовища.
Дисоціація мікробів	Одна з форм внутрішньопопуляційної мінливості, коли в популяції з'являються особини та клони, які відрізняються від вихідного типу формою колоній ( <i>S-R дисоціація</i> ) та іншими ознаками (наприклад, втратою капсули, рухливості; зниження ферментативної активності, вірулентності, антигенності; чутливості до фагів, фізичних та хімічних факторів та ін.)
Типи колоній	<i>S-колонії</i> - круглі, опуклі, мають рівний край та гладку і блискучу поверхню. При пересіві в рідке поживне середовище утворюють рівномірне помутніння.

	<i>R-колонії</i> - для них характерною є неправильна форма, зазубрений край і зморшкувата, шорстка поверхня. При пересіві в рідке поживне середовище утворюють зернистий осад.
Ріст мікроорганізмів	Узгоджене збільшення кількості всіх компонентів бактеріальної клітини
Розмноження мікроорганізмів	Збільшення числа клітин в популяції.
Способи розмноження бактерій	Бінарний поділ (більшість бактерій), фрагментація клітин (актиноміцети); спорами (стрептоміцети); фрагментація та брунькування (мікоплазми); цикл розвитку хламідій (у них є 2 форми: позаклітинні інфекційні елементарні тільця (не здатні до поділу) та внутрішньоклітинні, здатні до бінарного поділу, внаслідок чого формуються елементарні тільця).
Ріст бактерій в періодичній культурі (стаціонарне культивування)	Ріст бактеріальної популяції в умовах середовища, до якого не додаються поживні речовини та з якого не видаляються продукти метаболізму. Періодична культура має декілька фаз розвитку: лагфаза - період між внесенням мікробів в поживне середовище та початком розмноження; логарифмічна фаза (експоненціальна, log-фаза) - збільшення числа бактерій проходить зі сталою швидкістю; стаціонарна – кількість бактерій перестає збільшуватись, тобто в одиниці об'єму стала кількість мікробів; відмирання – зменшення кількості бактерій в популяції в результаті їх загибелі.

### **Теоретичні питання до заняття:**

- Методи дослідження колоній.
- Ознаки, за якими характеризують колонії.
- Поняття про морфологічні, тинкторіальні, культуральні властивості мікроорганізмів.
- Пігменти бактерій, їх фізіологічне значення.
- Характер росту мікроорганізмів в рідких поживних середовищах.
- Поняття «ріст» та «розмноження» мікроорганізмів.
- Способи розмноження бактерій.
- Фактори, що гальмують розмноження мікробів.
- Поняття «періодична культура», фази її розвитку.
- Методи визначення рухливості бактерій.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Вивчити ознаки, за якими характеризують колонії.
- Засвоїти способи макро- та мікроскопічного дослідження колоній.
- Визначити рухливість аеробних бактерій методом «роздавленої» краплі.

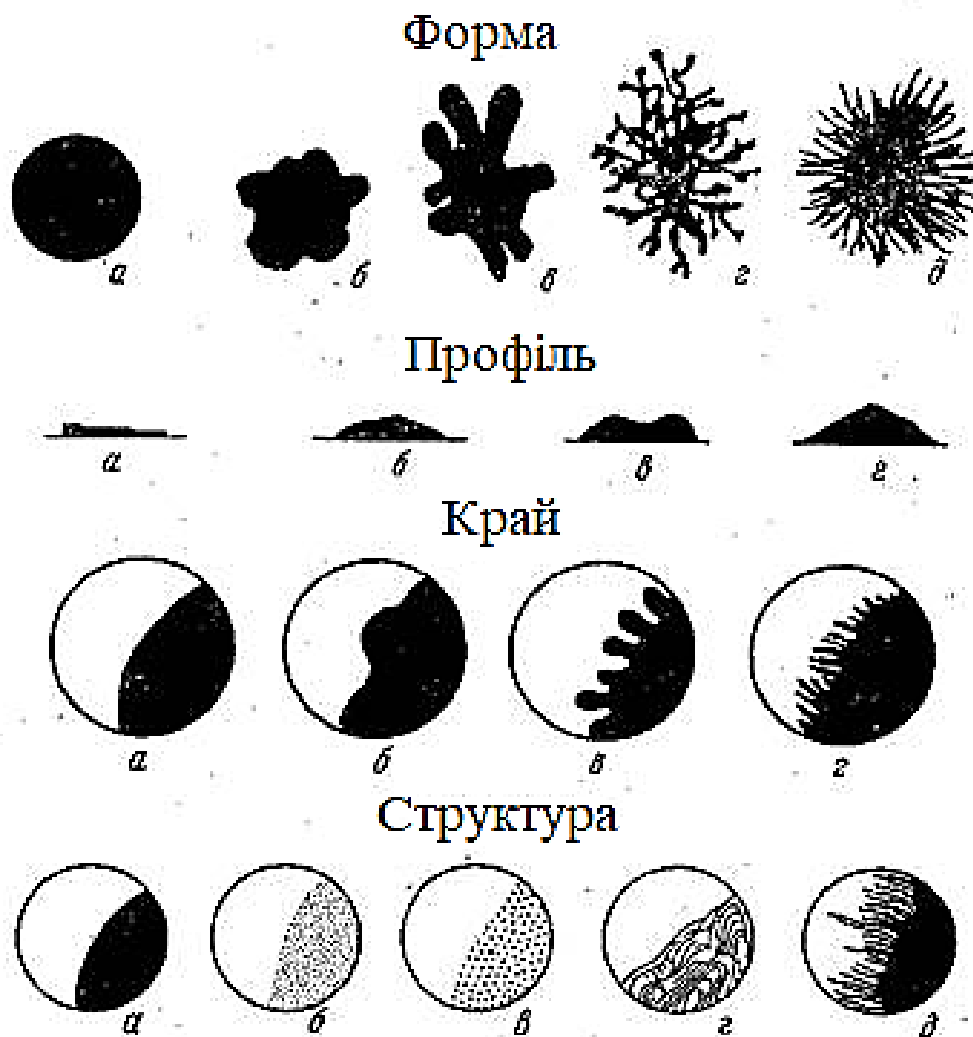
- Здійснити посів мікроорганізмів на тверді та рідкі поживні середовища з метою отримання чистої культури.

### Зміст теми

На практичному занятті студенти вивчають ознаки, за якими характеризують колонії, засвоюють способи макро- і мікроскопічного дослідження колоній; засвоюють техніку посіву матеріалу петлею на тверді поживні середовища (в пробірки із скошеним МПА) та в рідкі поживні середовища (середовище Врублевського) для одержання чистих культур аеробних і анаеробних бактерій. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### Рекомендації для оформлення протоколу.

#### Ознаки колоній



1. *Форма*: кругла, розетко подібна, листковидна, зірчаста, тощо.
2. *Профіль*: плоский, плоско-припіднятий, злегка опуклий, горбистий, опукло-порізаний, з вдвленим центром, з опуклим центром, куполоподібний.
3. *Контур краю*: рівний, зубчастий, хвилястий, фестончатий, війчастий, бахромчастий, нитчастий, гіллястий.
4. *Структура*: однорідна, дрібнозерниста, грубозерниста, волокниста.

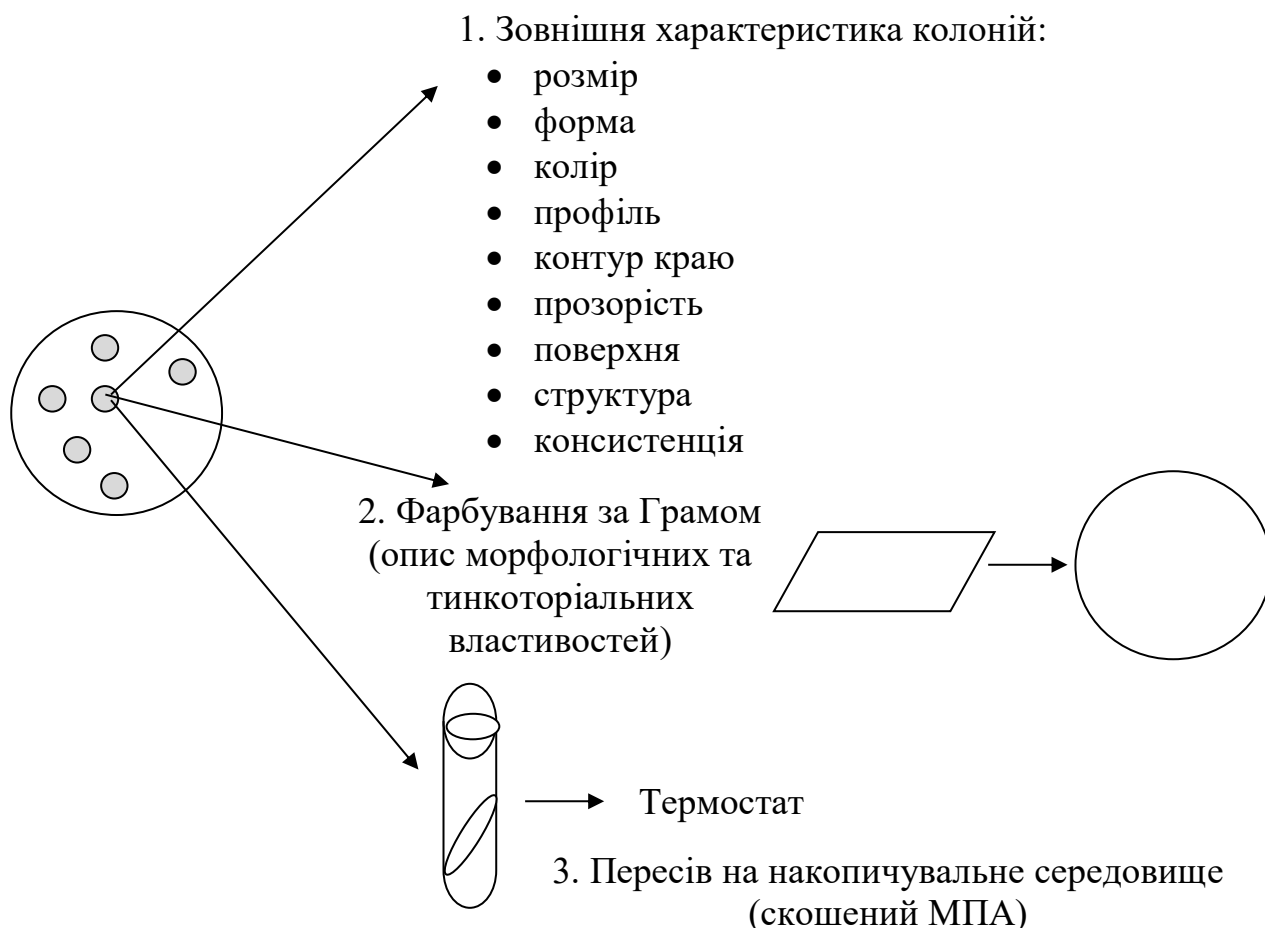


5. **Консистенція:** суха, волога, слизиста.
6. **Колір:** білий, жовтий, червоний; безбарвні. Відзначають, чи виділяється пігмент у середовище.
7. **Прозорість:** прозорі, напівпрозорі, непрозорі.
8. **Поверхня:** гладка, шорстка, зморшкувата, горбиста; блискуча, матова.
9. **Розмір:** великі (діаметр більш як 4-5 мм), середні (2-4 мм), дрібні (1-2 мм). Якщо діаметр становить менш 1 мм, то такі колонії називають точковими.

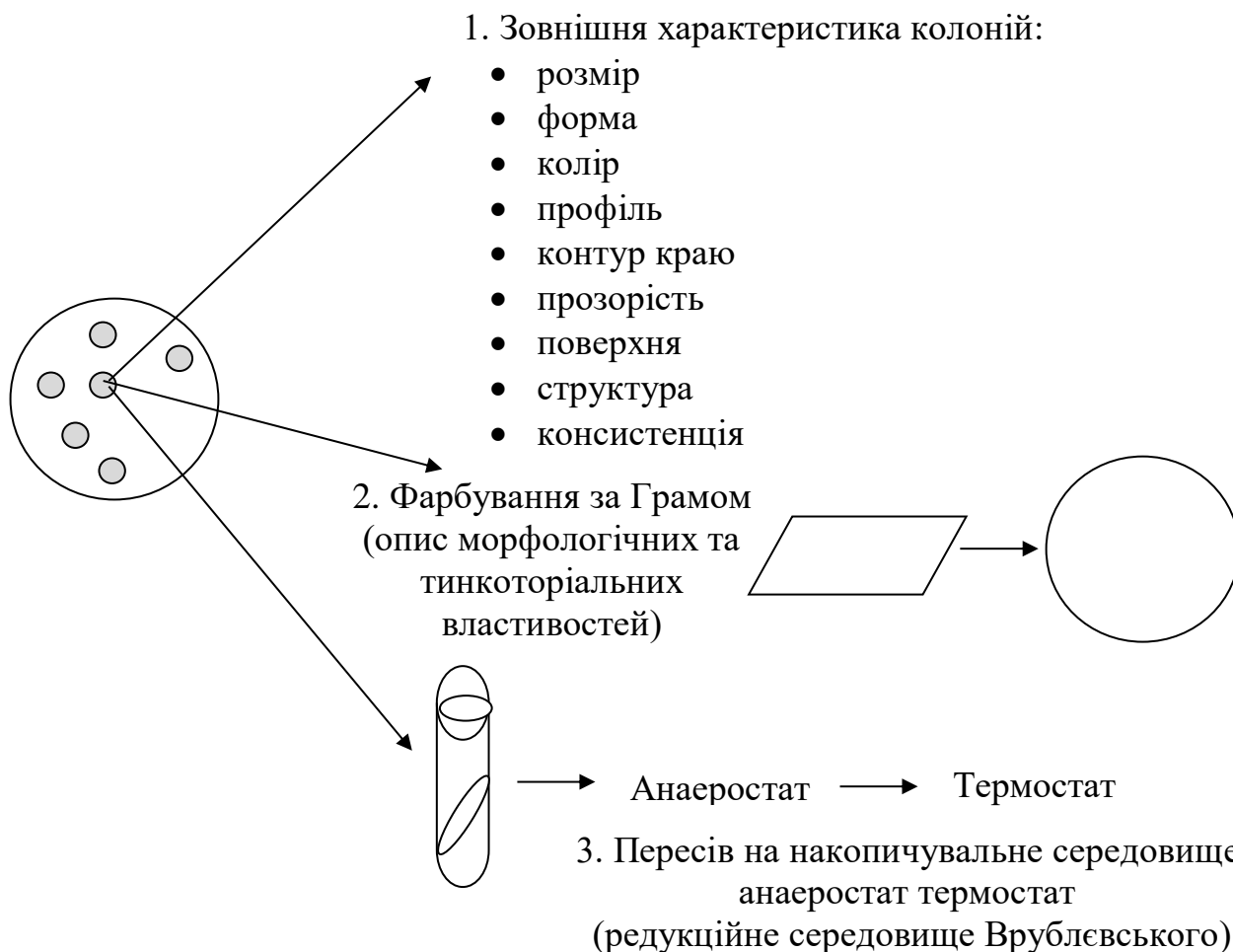
### Класифікація пігментів бактерій

Група пігментів	Розчинність	Типовий представник
Каротиноїди	Жиророзчинні	<i>Staphylococcus aureus</i>
Меланіни	Не розчинні в воді і кислотах	<i>Bacteroides (Prevotella) melaninogenica</i>
Пиролові	Спирторозчинні	<i>Serratia marcescens</i>
Фенозинові	водорозчинні	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Завдання №1.** Продовжити виділення чистих культур аеробних бактерій. Дослідити отримані колонії і пересіяти їх на скошений агар.



**Завдання №2.** Продовжити виділення чистих культур анаеробних бактерій. Дослідити отримані колонії і пересіяти їх на редукційне середовище Врублевського.



**Висновок:**

**Питання для самоконтролю:**

- Які існують методи дослідження колоній мікроорганізмів?
- За якими ознаками роблять висновок про чистоту колонії?
- В чому полягає біологічне значення S-R-дисоціації?
- Яке фізіологічне значення для бактерій мають пігменти?
- Чи може бути зовнішній вигляд колонії та здатність утворювати пігменти стійкою ознакою виду, яку використовують для їх ідентифікації?
- Чим відрізняється ріст мікроорганізмів на твердих та в рідких поживних середовищах?
- Від чого залежить характер росту мікроорганізмів в рідких поживних середовищах?
- Як називається потомство однієї мікробної клітини, що виросло на поверхні, або в глибині твердого поживного середовища?
- Чим відрізняються експоненціальна та стаціонарні фази розвитку періодичної культури?
- Яку біологічну властивість мікроорганізмів визначають методом «роздавленої» краплі?

## Практичне заняття №8

### Тема: «Виділення чистих культур бактерій (3-є заняття)»

#### Актуальність теми

Заключним етапом бактеріологічного методу дослідження є ідентифікація чистої культури, тобто визначення виду мікроорганізмів. Виділення чистої культури з патологічного матеріалу і встановлення її виду дає можливість ідентифікувати збудника інфекційного захворювання і визначити його чутливість до антибіотиків для раціональної терапії.

Методи ідентифікації мікроорганізмів:

1. *Морфологічні та тинкторіальних методи* - дозволяють виявити характерні морфологічні структури збудника шляхом дослідження мазків пофарбованих простими або складними методами. Також використовують фазово-контрастну і темнопольну мікроскопію для прижиттєвого вивчення мікроорганізмів, імунофлюоресценту - для експресдіагностики.

2. *Культуральні методи* дозволяють ідентифікувати виділену культуру за ферментативними властивостями (цукролітичними, протеолітичними, ліполітичними). З цією метою використовують:

- *мініатюризовані системи ідентифікації*: тест-системи або планшети для прискореної біохімічної ідентифікації бактерій;

- *автоматизовані системи ідентифікації*: автоматичні або напівавтоматичні системи («bioMerieux», Франція; «LACHEMA», Чехія; "Labsystems", Фінляндія, WalkAway 60 (DADE Intern., Inc., США));

- *хромогенні поживні середовища* - диференціальні середовища нового покоління, принцип дії яких заснований на виявленні високоспецифічних ферментів мікроорганізмів: при розщепленні хромогенного субстрату відповідним ферментом утворюються забарвлені і/або флюоресцируючі продукти і мікроорганізм забарвлюється в певний колір або набуває здатності до флюоресценції при ультрафіолетовому опроміненні.

3. *Хроматографічні методи ідентифікації* дозволяють виявити складові частини клітинної стінки збудників в досліджуваному матеріалі або специфічні для даної групи мікроорганізмів метаболіти.

4. *Імунологічна ідентифікація* полягає у визначенні антигенів збудників (в реакції аглютинації, преципітації та їх модифікаціях, а також РІФ (прямий або непрямий варіанти)).

5. *Молекулярно-генетичні методи ідентифікації*:

- полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР);

- ПЛР в «реальному часі» (Real-Time PCR);

- лігазна ланцюгова реакція.

6. *Методи внутрішньовидової ідентифікації* (серотипування, фаготипування, коліцінотипування) є надзвичайно важливими як для ідентифікації, так і для епідеміологічного контролю.

7. *Новітні методи ідентифікації*:

- застосування молекулярно-біологічних мікрочіпів (мічену нуклеїнову кислоту використовують для визначення специфічної послідовності серед фрагментів ДНК,

зафіксованих на твердій основі) дозволяє швидко визначити наявність бактеріальних збудників;

-*мас-спектрометрія* (MALDI TOF) виявляє унікальний набір білків мікроорганізмів, своєрідний «відбиток пальця» - «протеомна дактилоскопія»: в процесі вимірювань виводиться спектр константних рибосомних білків невідомих мікроорганізмів, в подальшому порівнюваний з базою даних. База даних складається з клінічно значущих видів і більше 25 000 спектрів. Метод дозволяє проводити точну ідентифікацію понад 4000 існуючих видів мікроорганізмів, скорочуючи при цьому терміни ідентифікації на 24-72 години.

#### **Конкретні цілі:**

- Дати визначення таксономічним категоріям в класифікації мікроорганізмів.
- Визначити морфологічні, тинкторіальні властивості та оцінити чистоту культури.
- Визначити мету та засвоїти основні етапи ідентифікації чистої культури бактерій.
- Освоїти мікроскопічний метод дослідження рухливості бактерій - метод «роздавленої» краплі.
- Визначити ферментативні властивості чистої культури аеробних бактерій.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.**

<b>Термін</b>	<b>Визначення</b>
Вид	Сукупність мікроорганізмів, які мають спільні морфофізіологічні властивості (морфологічні, тинкторіальні, культуральні, ферментативні, антигенні та ін.) і схожий генотип (високий ступінь гомології ДНК, близький сумарний вміст пар Г+Ц).
Штам	Чиста культура мікроорганізмів, отримана з певного джерела (організму, зовнішнього середовища), або з одного і того ж джерела в різні проміжки часу.
Клон	Потомство однієї клітини.
Ідентифікація	Визначення виду мікроорганізмів на підставі вивчення їх морфологічних, тинкторіальних, культуральних, ферментативних (біохімічних), антигенних та інших властивостей.

#### **Теоретичні питання до заняття:**

- Таксономічні категорії в класифікації мікроорганізмів.
- Ознаки чистої культури.
- Біологічні особливості, покладені в основу ідентифікації мікроорганізмів.
- Класифікація ферментів мікроорганізмів.

- Методи визначення ферментативної активності мікроорганізмів.
- Методи визначення здатності мікроорганізмів до активного руху.

### Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Дослідити культуру аеробних бактерій - визначити культуральні, морфологічні, тинкторіальні ознаки, активну рухливість методом «роздавленої» краплі. Зробити висновок про чистоту культури.
- Визначити ферментативні властивості чистої культури аеробних бактерій.
- Дослідити культуру анаеробних бактерій - визначити культуральні, морфологічні, тинкторіальні ознаки. Зробити висновок про чистоту культури.

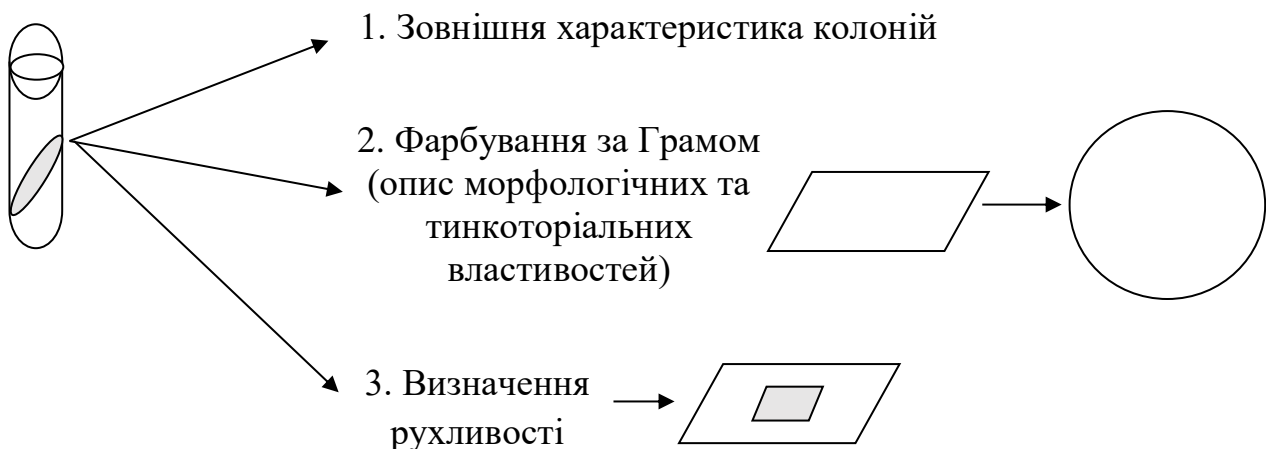
### Зміст теми

На практичному занятті студенти вивчають таксономічні категорії мікроорганізмів, визначають морфологічні, тинкторіальні властивості. Досліджують культуру анаеробних бактерій, роблять висновок про чистоту культури. Визначають мету ідентифікації чистої культури та засвоюють основні етапи ідентифікації чистої культури бактерій. Визначають ферментативні властивості чистої культури аеробів та досліджують здатність бактерій до активного руху за допомогою мікроскопічного методу - методу «роздавленої» краплі. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача. Після виділення мікроорганізму в чистій культурі визначають його видову належність, тобто ідентифікують.

### Рекомендації для оформлення протоколу

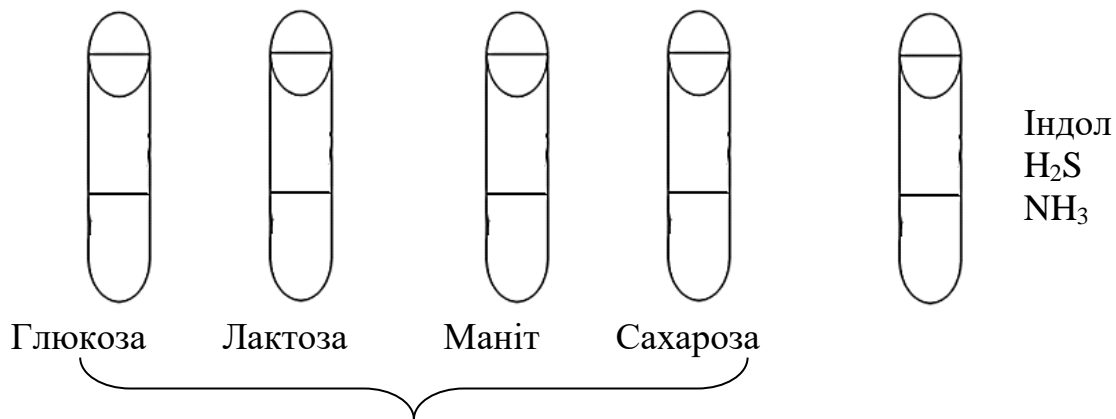
З метою ідентифікації чистої культури бактерій (визначення виду мікроорганізмів) необхідно:

**Завдання 1.** Дослідити культуру аеробних бактерій (визначити культуральні, морфологічні, тинкторіальні ознаки, визначити активну рухливість та ферментативні властивості)



### Висновок:

4. Визначення ферментативних властивостей чистої культури аеробних бактерій (посів на кольоровий ряд Гісса)



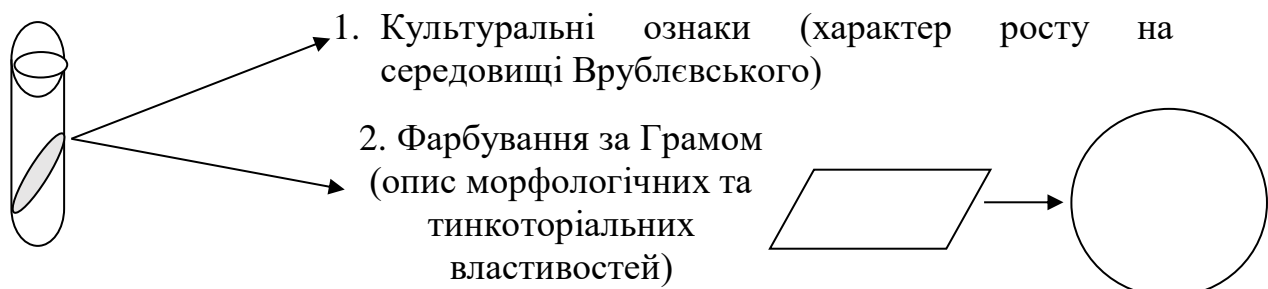
Індикатор ВР

(суміш водного голубого з розаловою кислотою)

**Посів на кольоровий ряд Гісса дозволяє:**

1. Виявити ферментацію вуглеводів (цукрів) до кислоти і газу.
2. Виявити редукційні властивості і інтенсивність відтворення кольору індикатора.
3. Виявити пептолітичні властивості (на МПБ). Про розклад пептону судимо на основі виявлення кінцевих продуктів:
  - сірководню (індикаторний папірець змочений розчином ацетату свинцю – чорніє);
  - індолу (індикаторний папірець змочений 12% розчином щавелевої кислоти стає рожевого кольору);
  - аміаку (червоний лакмусовий папірець набуває синього забарвлення).
4. Встановити характер росту на рідкому поживному середовищі.

**Завдання 2.** Дослідити культуру анаеробних бактерій (визначити культуральні, морфологічні, тинкторіальні ознаки) на середовищі Врублевського.



**Висновок:**

**Питання для самоконтролю**

- На які таксономічні категорії поділяють мікроорганізми?
- За якими ознаками роблять висновок про чистоту культури?

- Які властивості мікроорганізмів вивчають та визначають з метою ідентифікації чистої культури бактерій?
- Чим зумовлена біохімічна активність мікроорганізмів?
- Які існують класифікації ферментів?
- Які існують методи визначення ферментативної активності бактерій?
- Для яких мікроорганізмів здатність утворювати пігменти є стійкою ознакою виду, яку використовують для їх ідентифікації?
- Дайте визначення термінам штаб, вид, клон.

## Практичне заняття №9

### Тема: «Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики»

#### Актуальність теми

Хіміотерапія – один з найважливіших засобів у боротьбі з інфекційними захворюваннями та злоякісними пухлинами. Застосування антибіотиків та протимікробних препаратів зробило можливим ефективне лікування багатьох смертельних хвороб, збільшило тривалість життя людини та покращило його якість.

В той же час безконтрольне застосування антибіотиків та протимікробних препаратів може призвести до розвитку численних ускладнень.

Отже, лікар, що застосовує хіміотерапію, повинен чітко уявляти собі механізми дії антибіотиків та протимікробних препаратів, можливу користь та шкоду і призначати препарати виходячи з балансу першого і другого.

Для цього він повинен володіти основними методиками визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

Все це зумовлює актуальність теми заняття та спрямоване на формування позитивної мотивації її вивчення.

#### Конкретні цілі:

- Аналізувати явище мікробного антагонізму.
- Пояснювати механізм дії антибіотиків на мікробну клітину.
- Оцінювати методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.
- Робити висновок про чутливість мікроорганізмів до антибіотиків.
- Тракувати механізми стійкості мікроорганізмів до антибіотиків.
- Пояснювати механізми ускладнень антибіотикотерапії.

**Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).** Дивись практичне заняття №1.

**Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.**

Термін	Визначення
Протимікробний препарат	Хімічна речовина, що здатна вибірково пригнічувати ріст і розмноження мікроорганізмів в живому організмі
Хіміотерапія	Використання протимікробних препаратів для лікування інфекційних захворювань та хіміопрепаратів – для лікування злоякісних пухлин
Хіміотерапевтичний індекс	Співвідношення максимальної переносимої дози до мінімальної терапевтичної
Максимальна переносима доза	Максимальна доза протимікробного препарату, яка не викликає у пацієнта побічних дій
Мінімальна терапевтична доза	Мінімальна доза протимікробного препарату, здатна пригнічувати ріст і розмноження мікроорганізмів



Антиметаболіт	Протимікробний препарат, який за хімічною структурою подібний до корисних для бактерії речовин, але блокує процеси їхнього обміну
Антагонізм	Тип взаємовідносин між організмами, при якому один вид пригнічує розвиток іншого
Антибіотик	Хіміотерапевтичні препарати біологічного походження, або їхні напівсинтетичні похідні і синтетичні аналоги, які здатні в низьких концентраціях вибірково пошкоджувати або вбивати мікроби або клітини злоякісних пухлин, пригнічувати в організмі хворого збудників захворювань або затримувати ріст злоякісних новоутворень
Антибіотик вузького спектру дії	Здатен впливати на окремі типи мікроорганізмів (наприклад, тільки на грампозитивні чи тільки на грамнегативні)
Антибіотик широкого спектру дії	Здатен впливати на різні типи мікроорганізмів (і на грампозитивні, і на грамнегативні)
Бактерицидний антибіотик	Знищує мікроорганізми
Бактеріостатичний антибіотик	Припиняє ріст мікроорганізмів
Оксфордська одиниця	Мінімальна кількість пеніциліну, що припиняє ріст золотавого стафілококу в 50 мл МПБ
Одиниця дії	Мінімальна концентрація антибіотику, що припиняє ріст чутливого мікроорганізму в певному об'ємі поживного середовища
Міжнародна одиниця	Як правило, 1 мікрограм антибіотика
Мінімальна пригнічуюча концентрація	Мінімальна кількість антибіотика яка зупиняє ріст мікроорганізмів
Лікарська стійкість	Здатність мікроорганізму рости в присутності мінімальної пригнічуючої концентрації антибіотика

### Теоретичні питання до заняття:

- Історія розвитку антимікробної терапії. Періоди розвитку хіміотерапії.
- Праці Д.Л. Романовського, П. Ерліха, Г. Домагка. Відкриття сульфаніламідів.
- Основні принципи раціональної хіміотерапії.
- Поняття про протимікробний препарат, хіміотерапевтичний індекс.
- Мікробний антагонізм, його механізми. Мікроби-антагоністи – продуценти антибіотиків. Вчення І.І. Мечникова про фізіологічну роль молочнокислих бактерій кишечнику.
- Історія відкриття перших антибіотиків: О. Флемінг, З. Ваксман. Антибіотики, визначення, біологічна роль в природі. Принципи одержання антибіотиків.

- Класифікація антибіотиків за походженням, хімічним складом, за механізмом та спектром антимікробної дії. Природні, напівсинтетичні та синтетичні антибіотики.
- Механізм дії антибіотиків на мікробну клітину. Антибіотики – інгібітори синтезу пептидоглікану клітинної стінки, синтезу білка, нуклеїнових кислот, а також такі, що порушують функцію цитоплазматичної мембрани.
- Бактерицидна та бактеріостатична дія антибіотиків.
- Одиниці виміру антимікробної активності антибіотиків. Методи визначення чутливості бактерій до антибіотиків. Поняття про мінімальну пригнічувальну концентрацію. Антибіотикограма.
- Ускладнення антибіотикотерапії. Дисбактеріоз. Антибіотикорезистентні, антибіотикозалежні та толерантні до антибіотиків штами бактерій.
- Природна та набута стійкість до антибіотиків. Генетичні та біохімічні механізми антибіотикорезистентності. Роль плазмід та транспозонів у формуванні лікарської стійкості бактерій. Шляхи запобігання формуванню резистентності бактерій до антибіотиків. Принципи раціональної антибіотикотерапії.
- Міжклітинна комунікація у бактерій („відчуття кворуму”) та перспективи створення на її основі антимікробних препаратів нового покоління.

### **Практичні завдання, які виконуються на занятті:**

- Ознайомитись з методами визначення мікробного антагонізму.
- Вивчити демонстрацію визначення мінімальної концентрації антибіотиків, що пригнічує ріст бактерій, методом серійних розведень.
- Оволодіти методикою визначення чутливості мікроорганізму до антибіотиків методом дисків.

### **Зміст теми**

На практичному занятті студенти вивчають явище антагонізму у бактерій, методи визначення антагонізму та способи його практичного використання, основні класифікації антибіотиків та приклади препаратів, що ілюструють ці класифікації, знайомляться з методикою визначення мінімальної пригнічуючої концентрації антибіотиків методом серійних розведень та проводять визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків методом дисків. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

### **Рекомендації для оформлення протоколу**

*Хіміотерапевтичний індекс* – це співвідношення максимальної переносимої дози до мінімальної терапевтичної.

*Максимальна переносима доза* – найбільша кількість препарату, яка не викликає побічних ефектів у хворого.

*Мінімальна терапевтична доза* – найменша доза, яка здатна пригнічувати ріст і розмноження мікроорганізмів. Максимальна переносима доза повинна втричі або більше перевищувати мінімальну терапевтичну.

*Антагонізм у бактерій* – форма взаємовідносин, коли один мікроорганізм пригнічує розвиток інших

#### **Механізми антагонізму:**

- Конкуренція за поживний субстрат (різна швидкість росту)
- Виділення мікробами-антагоністами кислот, спиртів та лугів
- Виділення мікробами-антагоністами антибіотиків та бактеріоцинів
- Хижацтво

*Антибіотики* – хіміотерапевтичні препарати біологічного походження, або їхні напівсинтетичні похідні і синтетичні аналоги, які здатні в низьких концентраціях вибірково пошкоджувати або вбивати мікроби або клітини злоякісних пухлин, пригнічувати в організмі хворого збудників захворювань або затримувати ріст злоякісних новоутворень.

#### **Вимоги до антибіотиків:**

- Висока активність проти мікробів
- Мінімальна токсичність
- Збереження активності в рідинах організму
- Розчинність, хороший розподіл в організмі, легке виведення
- Відсутність алергенності
- Якомога повільніший розвиток лікарської стійкості у мікробів

#### **Класифікація антибіотиків за походженням**

<b>Продуценти</b>	<b>Приклади антибіотиків</b>
Бактерії	Поліміксин, граміцидин
Гриби	Пеніциліни, цефалоспоріни
Актиноміцети	Стрептоміцин, тетрациклін
Вищі рослини	Іманін, сальвін, хлорофіліпт
Тварини	Лізоцим
Мохи та лишайники	Уснінова кислота

#### **Класифікація антибіотиків за механізмами дії на мікроорганізми:**

- Інгібітори синтезу клітинної стінки
- Інгібітори функцій клітинної мембрани
- Інгібітори синтезу білка
- Інгібітори синтезу нуклеїнових кислот

#### **Вимірювання активності антибіотиків:**

*ОД – одиниця дії* – мінімальна кількість антибіотику, здатна пригнічувати ріст чутливого мікроорганізму в певному об'ємі поживного середовища. В теперішній

час активність більшості антибіотиків вимірюється в мікрограмах. Звичайно 1 мкг хімічно чистого антибіотику відповідає 1 ОД

### Ускладнення при антибіотикотерапії:

- Токсична дія
- Дисбактеріоз
- Алергічна реакція
- Ендотоксичний шок
- Побічна дія на мікроорганізми (розвиток лікарської стійкості)

### Лікарська стійкість:

Здатність мікроорганізмів рости в присутності антибіотику.

### Розрізняється

- Видова (природна) лікарська стійкість
- Набута лікарська стійкість

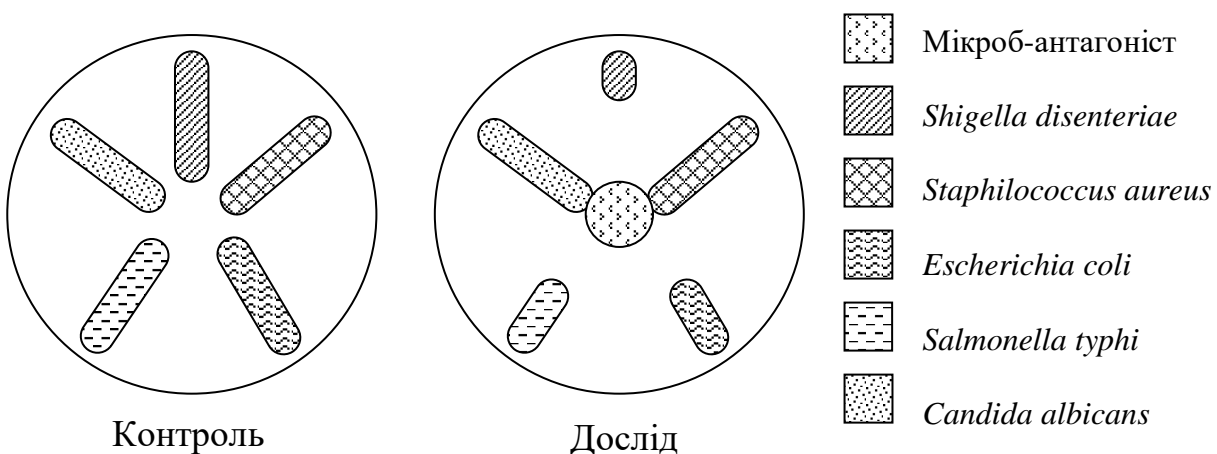
### Механізми формування лікарської стійкості:

- Продукція ферментів, що руйнують антибіотик ( $\beta$ -лактамази)
- Мутації
- Інфікування R-плазмідами і транспозонами
- Зникнення або модифікація мішені для дії антибіотику (L-форми)

### Принципи раціональної антибіотикотерапії

- Застосування антибіотиків залежно від чутливості до них збудників
- Суворе дотримання схем антибіотикотерапії
- Застосування комбінованої антибіотикотерапії
- Періодична заміна антибіотиків в процесі лікування

**Завдання 1.** Вивчити на демонстраційному препараті явище антагонізму у бактерій.



**Висновок:** Мікроб-антагоніст пригнічує ріст *Shigella dysenteriae*, *E. coli* та *Salmonella typhi*, та не впливає на *S. aureus* і *Candida albicans*.

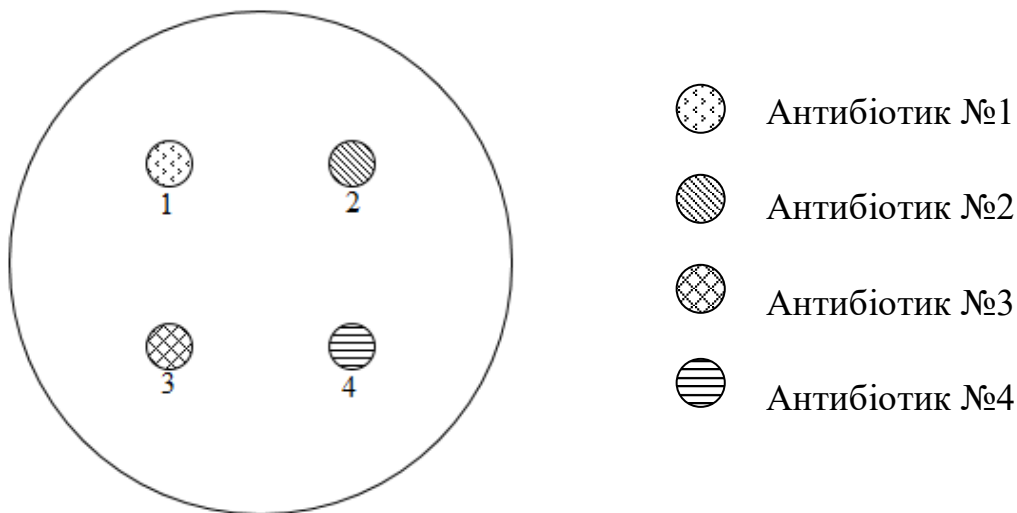
**Завдання 2.** Визначити мінімальну пригнічуючу концентрацію (МПК) антибіотиків методом серійних розведень.

Розведення стрептоміцину	64 ОД	32 ОД	16 ОД	8 ОД	4 ОД	2 ОД	1 ОД	0,5 ОД	0,25 ОД	Контроль <i>E.coli</i>	Контроль стрептоміцину
Ріст <i>E.coli</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
Розведення пеніциліну	38,4 ОД	19,2 ОД	9,6 ОД	4,8 ОД	2,4 ОД	1,2 ОД	0,6 ОД	0,3 ОД	0,15 ОД	Контроль <i>S.aureus</i>	Контроль пеніциліну
Ріст <i>S.aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—

+ - ріст мікроорганізмів у середовищі  
— - відсутність росту мікроорганізмів

**Висновок:** МПК стрептоміцину для *E. coli* складає 2,0 ОД, МПК пеніциліну для *S. aureus* – 0,6 ОД.

**Завдання 3.** Визначення чутливості бактерій до антибіотиків методом паперових дисків.



**Питання для самоконтролю.**

- В чому відмінності фармакотерапії та хіміотерапії?
- В чому полягає історичний внесок Ерліха, Домагка, Флемінга та Ваксмана у вчення про хіміотерапію?
- Що таке антибіотик?
- Як визначається хіміотерапевтичний індекс?
- З яких джерел добувають антибіотики?
- Які вимоги до антибіотику?
- Які механізми дії антибіотиків на мікроорганізми?
- Як вимірюється активність антибіотиків?
- Як визначається чутливість мікроорганізму до антибіотиків?
- Навіщо визначати чутливість мікроорганізмів до антибіотиків?
- Які існують ускладнення антибіотико терапії?
- Як повинен діяти лікар, щоб запобігти цим ускладненням?

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

### Основна:

1. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. /Широбоков В.П., Клімнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.] –Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
2. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.], - Вінниця: Нова книга, 2018.- 576 с.
3. Широбоков В.П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. Высш. Мед. учеб. Заведений: перевод с укр. издания / [Адрианова Т.В., Бобырь В.В., Виноград Н.А. и др.], - Винница. – Новая Книга, 2015. – 856 с.: ил.
4. Широбоков В.П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. навч. закл. / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011, 952 с.: іл.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. (За редакцією В.П.Широбокова). Вінниця: «Нова Книга», 2010. 447 – 451, 912 с.
6. Янковский Д.С., Широбоков В.П., Дымент Г.С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. К: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2011. 169 с.
7. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П. Медицинская и санитарная микробиология. М., 2006.
8. Поздеев О.А. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И.Покровского. – 4-е изд. испр. – М: ГЭОТАР – Медиа, 2006.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Под ред. А.А.Воробьева, М., 2004, с. 354-356.
10. Климнюк С. І, Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. – Практична мікробіологія. -Тернопіль, „Укрмедкнига”, 2004, с. 190-194.

### Додаткова:

1. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. – 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
2. W.Levinson, E. Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw-Hill Companies, 2000, 582 p.