

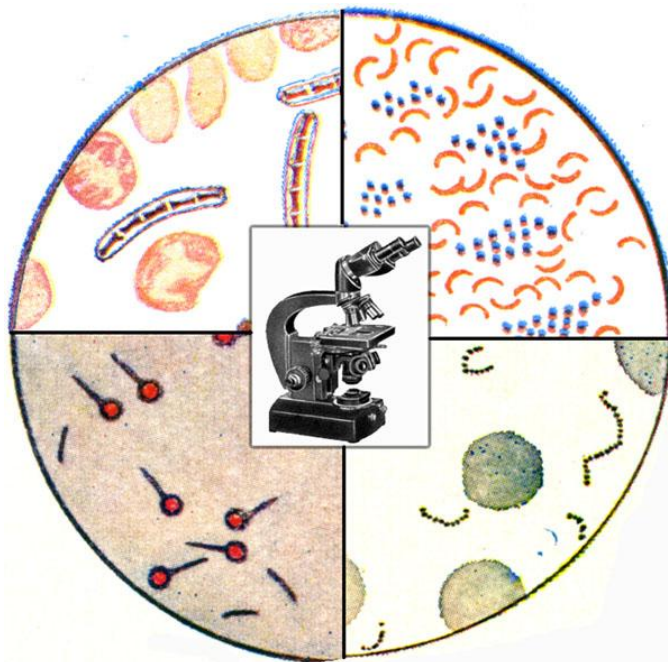
**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра зоогігієни та ветеринарії

МІКРОБІОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр»
спеціальності 204 – «ТВППТ»
денної і заочної форм навчання



**Миколаїв
2017**

УДК 579.64 (075.8)
М 59

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 27.04.2017 р., протокол № 8.

Укладачі:

С. П. Кот – кандидат біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;

В. А. Кириченко – канд. с-г наук, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;

В.О. Мельник – кандидат біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

І. В. Наконечний – д-р біол. наук, професор, завідувач кафедри екології, Миколаївський національний університет ім. В. О. Сухомлинського.

Г. І. Калиниченко – канд. с-г наук, доцент кафедри технології виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет.

Зміст

Вступ	4
Заняття 1. Ветеринарна лабораторія. Мікроскопи та правила роботи з ними	4
Заняття 2. Морфологія бактерій. Простий метод фарбування	8
Заняття 3. Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування	11
Заняття 4. Фарбування спор, капсул, включень. Вивчення рухливості бактерій	14
Заняття 5. Морфологія грибів і актиноміцетів	17
Заняття 6. Лабораторна апаратура і методи стерилізації	19
Заняття 7. Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур	25
Заняття 8. Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів	32
Заняття 9. Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу	38
Заняття 10. Визначення активності антибіотиків і антибіотикорезистентності мікроорганізмів	41
Заняття 11. Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту	42
Заняття 12. Імунітет. Серологічні реакції	47
Заняття 13. Збудники сибірки. Емфізематозного карбункула (емкару), туберкульозу, бешихи свиней	55
Заняття 14. Збудники бруцельозу, колібактеріозу, сальмонельозу, трихофітії (трихофітозу)	61
Заняття 15. Колоквіум по розділах: «Інфекція і імунітет», «Збудники деяких інфекційних хвороб тварин»	68
Заняття 16. Дослідження мікрофлори кормів	68
Заняття 17. Збудники молочнокислого бродіння	74
Заняття 18. Облік мікроорганізмів у молоці	81
Заняття 19. Виділення чистих культур молочнокислих мікробів. Пропіоновокислі бактерії	85
Заняття 20. Мікрофлора м'яса і яєць	89
Рекомендована література	93

Вступ

Сучасні економічні процеси, що відбуваються в нашому суспільстві зобов'язують вищу школу підняти якість підготовки технологів, які будуть здатні направлено регулювати мікробіологічні процеси з метою підвищення якості кормів, молока, молочних продуктів, м'яса, яєць, профілактики і лікування хвороб тварин.

Лабораторні заняття дають можливість студентам набути навички роботи в мікробіологічній лабораторії і більш детально вивчити деякі питання теоретичного курсу.

Об'єкти вивчення – мікроорганізми – невидимі неозброєним оком, тому студенти можуть ознайомитися з ними тільки з допомогою мікроскопа. Це відрізняє роботу в лабораторії з мікробіології від деяких інших біологічних дисциплін. В процесі вивчення у студентів формуються певні уявлення про мікроорганізми, про їх роль в природі і в тій галузі господарства, де буде працювати майбутній фахівець. Опанування мікробіологічними навичками, знайомство з властивостями мікробів допоможуть технологу правильно осмислено підійти до використання багатьох позитивних властивостей цих істот на практиці.

Усі лабораторні роботи виконуються студентами самостійно, результати роботи фіксуються в зошиті.

Методичні вказівки покликані допомогти студентам при підготовці до занять і у проведенні практичної роботи. Теоретична підготовка за усіма темами повинна проводитися за підручником та лекційним матеріалом.

Засвоєння навчального матеріалу систематично контролюється питаннями для самоперевірки, які наведені в кінці кожної теми та за допомогою тестових завдань.

Заняття 1

Тема: Ветеринарна лабораторія Мікроскопи та правила роботи з ними

Мета заняття: ознайомити студентів з обладнанням та структурою ветеринарної лабораторії, технікою безпеки в лабораторії. Вивчити особливості роботи з імерсійною системою.

Матеріальне забезпечення: мікроскопи і освітлювачі, зафарбовані мазки, мікробіологічні петлі, пастерівські піпетки, зливні

чашки, предметні скельця, барвники, кедрова олія, вода дистильована, таблиці.

Зміст заняття: студенти знайомляться з будовою та обладнанням мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній. Опановують техніку мікроскопії у імерсійній системі.

Ветеринарна лабораторія – це самостійна державна структурна одиниця в системі ветеринарної служби району, області, країни. Основна задача лабораторії – діагностика хвороб свійських тварин та птиці, хутрових тварин, риб, бджіл, а також проведення експертизи молока, м'яса і інших продуктів та кормів.

Матеріалом для мікробіологічних досліджень служать кров, сироватка крові, молоко, сеча, фекалії, трупи загинув тварин, шматочки паренхіматозних органів, проби води, повітря, ґрунту, кормів, рослин.

Нормативні документи, у яких викладені обов'язкові норми з лабораторної діагностики містяться у Ветеринарному законодавстві (том 3).

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає того, щоб приміщення лабораторії було ізольоване від житлових будинків, харчових складів, проїжджих доріг. У лабораторії передбачають такі окремі ізольовані приміщення (кімнати): для бактеріологічних, вірусологічних, серологічних, паразитологічних, хімічних і хіміко–токсикологічних, радіологічних, мікологічних, гематологічних, біохімічних, гістологічних досліджень, досліджень шкіряної сировини на сибірку, прийому патологічного та інших матеріалів, розтину трупів та обробки матеріалу, який поступив на дослідження, утримання здорових лабораторних тварин, зараження тварин та їх утримання, миття та автоклавування посуду, приготування живильних середовищ, розчинів тощо.

Основне обладнання лабораторії: мікроскопи різних типів, термостати, сушильні шафи, автоклави, водяні бані, центрифуги, апарати Коха, дистильатори, бактерицидні лампи і ін.

Правила роботи і поведінки у лабораторії

Знати і виконувати правила і техніку безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії необхідно для створення безпечних умов праці, покращення санітарно-гігієнічних умов у приміщеннях, а також запобігання нещасним випадкам. Тому співробітники і студенти повинні дотримуватись таких правил:

- Заходити і працювати в мікробіологічній лабораторії тільки в халаті.
- Не вносити у лабораторію сторонні речі.
- Працювати на одому й тому ж місці і користуватися закріпленим обладнанням.
- Дотримуватися чистоти і акуратності при роботі.
- Під час перерви у лабораторії забороняється палити і приймати їжу.
- На столі повинно бути тільки необхідне для виконання завдання.
- Весь матеріал, який потрапляє у лабораторію, повинен розглядатися як інфікований.
- При розпаковуванні заразного матеріалу необхідно дотримуватись обережності: банки, які містять матеріал для дослідження, обтирають зверху дезінфікуючим розчином і ставлять не прямо на робочий стіл, а в спеціально призначений для цього посуд – підноси, кювети.
- При дослідженні зараженого матеріалу і роботі з патогенними культурами необхідно суворо дотримуватись загальноприйнятих у бактеріологічній практиці технічних прийомів, що виключають зіткнення рук із заразним матеріалом.
- Уражений матеріал та непотрібні культури підлягають обов'язковому знищенню в той же день.
- Після закінчення заняття робоче місце і обладнання приводять в порядок.
- Щоб попередити вибух не запалювати одну спиртівку від іншої, використовувати для цієї мети сірники, запальничку.
- Без дозволу викладача або лаборанта не включати електроприлади і апаратуру.
- Дотримуватись правил поведінки з хімічними реактивами.
- Виходячи з лабораторії, вимити руки.

Мікроскопи і мікроскопія

Мікроскоп – оптичний прилад, який використовується для вивчення мікрооб'єктів. При вивченні мікробіологічних об'єктів застосовують мікроскопи різних моделей. Загалом, всі мікроскопи мають ідентичну будову. Серед світлових мікроскопів найбільш поширені моделі МБД (*мікроскоп біологічний дослідницький*), МБР (*мікроскоп біологічний робочий*) та «Біолам» – серії «Біолам – Р» – *робочий*, «Біолам – Д» – *дорожній*. Оптичне обладнання мікроскопів

дозволяє отримати максимально корисне збільшення об'єктів у 1350 разів.

Робота з імерсійною системою

Мікроскоп ставлять навпроти джерела світла, конденсор піднімають у верхнє положення, діафрагму максимально відкривають. Об'єktiv малого збільшення $\times 8$ підводять на 1,5 – 2 см від предметного столика наводять світло і визначають на препараті ділянку мікроскопії. Ліпше користуватись освітлювачем. Потім на вибране місце наносять краплю кедрової олії (коефіцієнт заломлення якої 1,51) і об'єktiv переводять на імерсійний ($\times 90$). За допомогою макрогвинта занурюють фронтальну лінзу об'єktivа у краплю олії до слабкого дотику її до предметного скла (під контролем ока збоку). Імерсійні об'єктиви мають коротку фокусну віддаль (до 1,3 мм), тому наводять на різкість шляхом піднімання тубуса макрогвинтом до появи зображення в полі зору мікроскопа. Після грубої наводки, більш точне фокусування досягають за допомогою мікрометричного гвинта, який дозволяється крутити не більше, ніж півоберта в той чи інший бік.

При дослідженні препарат рухають по горизонтальній площині, при цьому крапля імерсійної олії «повзе» і забезпечує оптичне гомогенне середовище у необхідному місці.

Після закінчення роботи об'єktiv піднімають, знімають препарат і протирають фронтальну лінзу об'єktivа серветкою, а потім її зволожують спиртом і знову протирають. Чистити об'єktiv від імерсійної олії ксилолом або бензином не рекомендується, вони можуть розчиняти речовини, що склеюють лінзи об'єktivу.

Мікроскоп зберігають у спеціальному футлярі або під скляним ковпаком, щоб захистити його від пилу, а оптичну систему – від попадання променів сонця. Револьвер після роботи треба перевести на мале збільшення, на предметний столик під об'єktiv покласти чисту суху марлю, конденсор необхідно трохи опустити.

Контрольні питання

1. Задачі ветеринарної лабораторії.
2. Основні правила техніки безпеки у лабораторії.
3. Що таке імерсійний об'єktiv, імерсійна система мікроскопа, імерсійна рідина?
4. Як за зовнішнім видом визначити імерсійний об'єktiv?
5. Який коефіцієнт заломлення імерсійної олії?

Заняття 2

Тема: Морфологія бактерій

Простий метод фарбування

Мета заняття: вивчити різні форми бактерій по таблицях, діапозитивах, мазках–препаратах. Приготувати, зафарбувати, провести мікроскопію і замальовати препарати із різних культур.

Матеріальне забезпечення: штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному і рідкому живильному середовищі, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарбників, змивні чашки, предметні скельця, олівці або чорнила по склу, анатомічні пінцети, спиртівки, мікроскопи, кедрова олія.

Таблиці: кокові форми мікробів.

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

Приготування фарбованих препаратів

1. Підготовка предметних скелець. Препарати готують на предметних скельцях, які повинні мати товщину не більше 1,2 – 1,4 мм. Застосування товстіших скелець не дозволяє одержати різке зображення країв діафрагми освітлювача в площині препарата, так як воно попадає в товщу скла, що порушує фокусування конденсора і різко знижує чіткість зображення.

Для бактеріологічних досліджень необхідно використовувати чисті, добре знежирені скельця. Нові скельця промивають водою, витирають насухо і зберігають у склянках із спиртом або спиртом-ефіром (порівну). Скельця, що використовувалися, витримують 1 – 2 години в концентрованій сірчаній кислоті або сірчано-хромовій суміші, а потім промивають водою, кип'ятять в мильній воді, промивають водою, ополіскують дистильованою водою, висушують в сушильній шафі. Скельця із рідин дістають пінцетом. Перед використанням їх, проводять через полум'я вогню. При роботі скельця беруть тільки з боків.

2. Приготування мазків. Мазок готують на предметному склі із допомогою бактеріологічної петлі або пастерівської піпетки.

Бактеріологічну петлю виготовляють із платинового дроту завдовжки 50 – 90 мм, вставляють у спеціальний тримач з рукояткою.

Вищезгадані інструменти в роботі тримають трьома пальцями – як олівець. Робочі частини – петлю або голку – перед взяттям матеріалу обпалюють у полум'ї вогню у вертикальному положенні. Мазки виготовляють із культур мікробів, тканин, крові, і т.д.

При виготовленні мазків із мікробних культур беруть у ліву руку пробірку з культурами так, щоб дно її було назовні, а корок, що її закриває, був усередині. Пробірку фіксують у долоні під кутом 45° , притискаючи її великим пальцем. В праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і фламбірують її в полум'ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають ватний корок до долоні, виймають його з пробірки і тримають так під час послідовних маніпуляцій. Відкритий край пробірки обпалюють над полум'ям вогню і після цього вводять в пробірку стерильну петлю, охолоджують і набирають невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату. Горлишко пробірки після взяття матеріалу знову обпалюють в полум'ї спиртівки, потім обпалюють ватний корок і закривають ним пробірку. Взятий таким чином матеріал наносять на предметне скельце і рівномірно розподіляють по поверхні тонким шаром у вигляді мазка, а петлю знову розжарюють. Щоб отримати мазок менш густий, спочатку готують суспензію культури на запасному склі, а з неї готують мазок.

Якщо мазок готується із культур, що вирости, на щільних живильних середовищах, то попередньо на центр предметного скельця наносять краплю води або фізрозчину, петлею вносять дослідний матеріал і розподіляють його на предметному склі так, щоб отримати рівномірний мазок площею $1-1,5 \text{ см}^2$. Якщо дослідний матеріал рідина, то попередньо краплю води або фізрозчину не наносять. Мазок висушують на повітрі або ж в струмені теплого повітря над полум'ям спиртівки і фіксують. Мазки повинні бути тонкими, висušеними на повітрі і зафіксованими.

При приготуванні мазків із дуже дрібних колоній, їх беруть нікельованою голкою злегка зігнутою на кінці. Кінчиком голки обережно забирають з центра колонії бактерійну масу і суспендують у фізрозчині, а потім з неї петлею роблять мазок.

Для фіксації бактерійних клітин на поверхні предметного скла останнє протягом 3-5 сек. декілька разів проводять крізь полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале

нагрівання скла недопустимо, так як при цьому настає деформація бактерій.

Фіксація мазків хімічним способом.

1. Етиловий спирт 96⁰. Термін фіксації 15-20 хв.
2. Спирт – ефір. Термін фіксації 15-20 хв.
3. Метиловий спирт. Термін фіксації 1-5 хв.

Хімічний метод фіксації має переваги перед нагріванням тим, що при цьому морфологія бактерій не змінюється і застосовується переважно для фіксації мазків крові, мазків із молочних продуктів і т.д. В результаті фіксації мазок прикріплюється до скла, обеззаражуються мікроби, відбувається їх краще фарбування.

Простий метод фарбування мазків.

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

В основі фарбування лежить фізико-хімічний процес, при якому проходить адсорбція фарби мікробною клітиною. Комплекс із мікроба і фарб є досить стійким і не піддається вимиванню водою. Чим вище концентрація фарби, тим вище швидкість адсорбції.

Після фарбування залишки фарби змивають і мазок висушують фільтрувальним папером. При неповному висушуванні залишки вологи з імерсійною олією утворюють непрозору емульсію, яка погіршує зображення. Простим методом бактерії фарбуються в один колір рівномірно, і інколи появляється зернистість, а також метакромазія (розчеплення тону кольору).

Контрольні питання

1. Як обробляють предметні і покривні скельця?
2. Виготовлення мазка для фарбування.
3. Як підготувати бактеріологічну петлю?
4. Із яких етапів складається процес виготовлення мазка?
5. З якою метою і як фіксують мазки?
6. Техніка простого метода фарбування мазків.

Заняття 3

Тема: Паличкоподібні бактерії Складні методи фарбування

Мета заняття: ознайомитися з приготуванням фарбуючих розчинів. Оволодіти методикою фарбування за Грамом.

Матеріальне забезпечення: пробірки з культурами *Vac. megaterium* і *E. coli* або суміш мікроорганізмів, колба з прокислим пивом, мікробіологічні петлі, предметні скельця, спиртівки, набір фарб для фарбування за Грамом, фільтрувальний папір, мікроскопи, імерсійна олія. Таблиці зафарбованих бактерій та фарбування за Грамом.

Зміст заняття: студенти готують мазки з культур на щільному середовищі або прокислого пива, проводять фарбування фіксованих мазків за Грамом.

Фарби. При фарбування мазка фарба проникає в мікробну клітину. Це дає можливість розглядати не тільки її зовнішні ознаки, але й деякі особливості внутрішньої структури - спори. У мікробіологічній практиці використовують основні і кислі фарби. Мікроби, як і ядра клітин, фарбуються основними фарбами, рідше нейтральними. Кислі фарби служать для створення фону, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Із основних фарб частіше застосовують фуксин основний, феноловий, сафронін, нейтральрот, (червоні фарби); метиловий голубий, азур II (сині фарби); малахітовий зелений (зелена фарба); везувін, хризоїдин (жовтокоричневі фарби); пікринову кислоту (жовта фарба); нігрозин (чорна фарба) і т.д.

Розчини фарб можуть бути як спиртові, так і водні. Спиртові розчини фарб більш стійкі. Заздалегідь готують насичені спиртові розчини. До спирту додають стільки фарби, щоб на дні залишався нерозчинений осад. Із цих насичених розчинів готують розбавлені водно-спиртові розчини фарб для фарбування мікробів. Для підсилення дії фарби до неї додають протравлюючу речовину, яка підвищує стійкість водоспиртових розчинів, сприяє розрихленню оболонки і кращому фарбуванню мікробів. Для цього використовують спирт, формалін, фенол, луги, нагрівання фарби.

Рецепти виготовлення фарб та фарбуючих розчинів

1) Карболовий фуксин Ціля. Беруть 10 мл етилового спирту, додають 1 г основного фуксину. Залишають на одну добу додають 100 мл 5 % розчину карболової кислоти на дистильованій воді. Через добу розчин фільтрують і розливають по флаконах. Такий розчин фарби зберігається довго. В чистому вигляді його використовують для фарбування спор, збудника туберкульозу, лепри та інших.

Для фарбування багатьох видів мікроорганізмів застосовують розбавлені розчини. Беруть одну частину основного розчину і розбавляють у 10 мл дистильованої води.

2) Карболовий генціанвіолет – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, далі додають 100 мл 2% розчину фенолу. Фільтрують, розливають по флаконам. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

3) Метиленова синька – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, додають 30 мл 0,01% КОН. Через добу фільтрують. Ця фарба використовується для простого фарбування бактерій. Експозиція 1-2 хвилини.

4) Водний розчин сафраніну – 1 г фарби розчиняють у 50 мл гарячої дистильованої води, гарячим фільтрують, розливають по флаконам. Ця фарба добре фарбує капсулу збудника сибірки.

5) Водний розчин метилвіолету – 1 г фарби розчиняють у 100 мл гарячої дистильованої води, фільтрують. Фарба нестійка. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

6) Фарба Романовського–Гімзи – це суміш азуру – 0,8 г, еозину – 3,0 г, гліцерину х.ч. – 250 мл, метилового спирту – 250 мл. Фарби дуже ретельно розтирають у невеликій кількості гліцерину і спирту, далі додають решту кількість гліцерину та спирту. Розчин 4-6 діб витримують у термостаті при температурі 37⁰С, фільтрують.

Розчин Люголя – 2 г КІ розчиняють у 25 мл дистильованої води, додають 1 г кристалічного йоду, додають 275 мл дистильованої води, фільтрують.

Складні (диференціюючі) методи фарбування.

Складні методи фарбування застосовують з метою ідентифікації та диференціації мікробів. Хімічний склад і будова клітинної стінки мікробів різні і тому вони фарбуються одними і тими ж фарбами по різному і не однаково віддають їх при послідовному обезбарвленні етиловим спиртом, кислотами і іншими реактивами.

Фарбування за Грамом. Відношення бактерій до фарбування за Грамом визначається їх здатністю утримувати комплекс фарби з йодом. У грампозитивних бактерій клітинна стінка містить 90% пептидоглікану, тоді як у грамнегативних бактерій – 10% пептидоглікану, який представлений тонким шаром у глибині стінки клітини. В оболонці грамнегативних бактерій значно більше, ніж у грампозитивних міститься білків та ліпідів, які разом з поліцукридами утворюють поверхневі шари у вигляді мозаїки. Їх цитоплазма містить РНК та ДНК у співвідношенні 1:1, а у грампозитивних – 8:1. Проникність стінки у грампозитивних бактерій менша, ніж у грамнегативних. Це пов'язано з тим, що у грампозитивних бактерій міститься більше пептидоглікану та діаметр пор у них менший, ніж у грамнегативних бактерій.

Суть цього методу полягає в тому, що грампозитивні мікроорганізми містять магнієву сіль РНК, яка утворює з генціанвіолетом і йодом стійкий комплекс, який не знебарвлюється спиртом і зберігає початкове фіолетове забарвлення. Грамнегативні мікроби не здатні утримувати фіолетову фарбу і при проведенні через спирт знебарвлюються. Використання водного фуксину на завершальному етапі сприяє фарбування таких мікробів у рожево-червоний колір.

Техніка фарбування за Грамом

1. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрувальний папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають.

2. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

3. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.

4. Мазок ретельно промивають водою.

5. На 1-2 хвилини наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, а грамнегативні у червоний.

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

Грамом. Кишечна паличка і оцтовокислі бактерії – грамнегативні; капуста бацила і дріжджі – грампозитивні.

Контрольні питання

1. Які фарби використовуються в мікробіологічній практиці?
2. Структура, хімічний склад та функції клітинної стінки бактерій. Відмінності в будові клітинної стінки у грампозитивних та грамнегативних бактерій.
3. Яке значення в мікробіології має метод фарбування мікробів за Грамом?
4. Методика фарбування мікробів за Грамом.

Заняття 4

Тема: Фарбування спор, капсул, включень Вивчення рухливості бактерій

Мета заняття: оволодіти методикою фарбування спор, капсул та включень. Навчити визначення рухливості бактерій методами «роздавлена» та «висяча» крапля.

Матеріальне забезпечення: пробірки з добовою культурою *Bac. mesentericus* (картопляна бацила) і ізотонічним розчином натрію хлориду, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарб, 3% - ний розчин H_2SO_4 , дистильована вода, піпетки, предметні і покривні скельця, зливні чашки, пінцети, спиртівки, мікроскопи, імерсійна олія.

Зміст заняття: студенти вивчають техніку фарбування спор, капсул включень. Досліджують мікроби в живому стані і визначають характер їх руху.

Фарбування спор. Ряд мікроорганізмів (бацил) в несприятливих для них умовах утворюють спори. При цьому процесі у протоплазмі формується зневоднене тіло. Воно вкривається п'ятишаровою оболонкою. В одній бактеріальній клітині утворюється завжди одна спора. Ендоспори бацил локалізуються у центрі і не перевищують діаметр материнської клітини. У клостридій вони розташовуються ексцентрично, термінально та субтермінально, завжди при цьому перевищуючи діаметр вегетативної клітини. Тому бацили різних видів, які містять спори, морфологічно між собою практично

відрізнити важко, тоді як клостридії мають форму веретена, ложки, ракетки або барабанної палички. Спора може мати форму кулі, циліндра тощо. Поверхня спор може бути гладкою або мати вирости у вигляді шипів, кутів зірки тощо. Всі ці особливості характерні для виду і мають таксономічне значення. Зрілі спори погано фарбуються. Для виявлення спор та вивчення їх особливостей застосовуються спеціальні методи фарбування: Златогорова, Меллера, Ожежки.

Фарбування за Златогоровим. Висушений мазок 10 раз (замість 5-ти) проводять над полум'ям спиртівки для того, щоб вбити спори та розрихлити їхню оболонку. Далі на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля і підігрівають до появи пари протягом 5-7хв. Знімають папір, зливають залишки фарби, наносять на 10 секунд 3 % розчин сірчаної кислоти, промивають водою. На 2-3 хвилини наносять розчин метиленової синьки. Промивають водою і висушують мазок фільтрувальним папером. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативна клітина – у синій.

Спосіб Меллера відрізняється від фарбування за Златогоровим тим, що на фіксований мазок наливають 5 % розчин хромової кислоти, витримують хвилину, зливають кислоту водою – далі фарбують у тій же послідовності, що і за Златогоровим.

Метод Ожежки. На нефіксований мазок наливають 0,5% розчин соляної кислоти, 2-3 хвилини підігрівають над полум'ям спиртівки. Кислоту зливають, препарат промивають водою, просушують і фіксують над полум'ям. Далі фарбують за Ціль-Нільсеном: на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля, підігрівають до появи пари. Знімають папір, після охолодження скла мазок промивають водою, знебарвлюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти або 3% розчином солянокислого спирту. Промивають водою і дофарбовують 3-5 хвилин метиленовою синькою.

Дослідження мікробів в живому стані

Багато мікроорганізмів в живому стані здатні пересуватися. Швидкість і характер руху залежать від віку культури, оточуючого середовища і виду мікроба. Добре виражена рухливість у молодих культур, у старих вона сповільнена або зовсім відсутня. Рухливість припиняється із нагромадженням продуктів життєдіяльності. Наявність або відсутність руху – одна із ознак при визначенні виду мікробів.

Органами руху є джгутики, які здійснюють кругові рухи і по-різному розміщуються на тілі мікробної клітини. Для визначення

рухливості у мікробів беруть молоді (12-24-годинні) культури. Дослідження проводять шляхом приготування висячої або притиснутої краплі.

Приготування висячої краплі.

Висячу краплю готують на предметному склі з виїмкою. Край виїмки змазують тонким шаром вазеліну. В центр покривного скла наносять краплю рідкої бактерійної культури. Якщо мікроби вирощені на щільному середовищі, то спочатку на покривне скло наносять краплю ізотонічного розчину NaCl, а потім в неї – культуру мікробів. Предметне скло, виїмкою донизу, акуратно притискають до покривного так, щоб крапля знаходилась в центрі виїмки. Перевертають препарат покривним скельцем доверху. Крапля рідини повинна вільно звисати у центрі виїмки не торкаючись дна або стінок. Під малим збільшенням об'єктиву знаходять край краплі, ставлять його в центр, револьвер мікроскопу переводять на об'єktiv «40» і дивляться в злегка затемненому полі конденсора, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Приготування притиснутої краплі.

На поверхню предметного скла наносять краплю дослідного матеріалу або суспензію бактерій, накривають покривним склом. При притискуванні покривного скла рідина не повинна виходити за його край. Мікроскопують об'єktivом «40» в темному полі конденсора.

При вивченні рухливості необхідно відрізнити справжній рух від броунівського, при якому мікроби залишаються на місці, роблять коливальні рухи під впливом молекул оточуючого середовища або пересуваються за током рідини.

Контрольні питання

1. Роль капсули у життєдіяльності бактерій. Її хімічний склад.
2. Процес спороутворення у мікроорганізмів. Структура та хімічний склад спори.
3. Методи фарбування спор.
4. Методи фарбування капсул.
5. Чим обумовлені рухові реакції мікробів ?
6. Що таке позитивний і негативний таксис?
7. Методи визначення рухливості мікробів.

Заняття 5

Тема: Морфологія грибів і актиноміцетів

Мета заняття: ознайомити з морфологічними особливостями плісневих грибів, дріжджів і актиноміцетів, замалювати деяких представників.

Матеріальне забезпечення: чашки з культурами грибів роду *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, дріжджів, препарати актиноміцетів, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, препарувальні голки, пастерки, розчин гліцерину, спирту та води порівну, пінцети, спиртівки, мікроскопи. Таблиці: схеми будови мукора, пеніцила і аспергіла.

Зміст заняття: студенти вивчають особливості будови грибів, дріжджів, актиноміцетів. Виявляють подібність та відмінність актиноміцетів з бактеріями та нижчими грибами. Готують препарати з культур грибів родів *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Препарати замальовують в зошити.

Морфологія грибів

Гриби – безхлорофільні мікроорганізми, живуть на поверхні різних субстратів. Клітини грибів мають диференційоване ядро, тому їх відносять до еукаріотів. Плісневі гриби не вимогливі до поживних середовищ, але більшість з них потребують кисень повітря. Легко переносять низькі температури, можуть жити і розмножуватись в холодильних камерах, серед грибів зустрічаються як сапрофіти, так і паразити.

Всі гриби ділять на вищі і нижчі і поділяють на 6 класів. Хітридієві, ооміцети, зигоміцети відносять до нижчих грибів; аскоміцети, базидіоміцети і дейтеромицети, недосконалі гриби – до вищих.

Всі гриби (рис 1), окрім примітивних нижчих і деяких вищих (дріжджів), мають вегетативне тіло – міцелій, або грибницю, яка складається із тонких розгалужених гіф. Міцелій може бути занурений (субстрактний), який розвивається всередині середовища, і поверхневий (повітряний), який розвивається на поверхні середовища. У нижчих грибів гіфи не мають поперечних перетинок (несептований), у вищих - гіфи багатоклітинні. Інколи міцелій грибів утворює ризоїди – коренеподібні вирости, при допомозі яких прикріплюється до субстрату і одержує поживні речовини.

Склероції – це сплетіння гіф округлої або продовгуватої форми. Вони мають великі розміри, ущільнені, стійкі до несприятливого впливу середовища, містять мало води і багато поживних речовин.

Від міцелію відходять плодоносячі тіла спорангієносців у мукорових і конідієносці у монілієвих. Спорангієносці закінчуються розширенням – спорангієм з ендоспорами. На конідієносцях утворюються конідії, або екзоспори.

Мікроскопічне дослідження грибів. Звичайно гриби досліджують в незафарбованому стані. На предметне скло наносять краплю рідини (вода, спирт, гліцерин порівну). Препарувальною голкою беруть частину міцелію і розміщують його у краплі рідини. Міцелій обережно розправляють голкою і накривають покривним скельцем. Препарат вивчають спочатку під малим, а потім під середнім збільшенням в затемненому полі зору (звужена діафрагма). Препарат треба готувати поблизу предметного скла, не допускаючи розсіювання спор. Препарувальні голки після закінчення роботи ретельно фламбують над полум'ям спиртівки.

Дріжджі мікроскопують аналогічним методом, або готують з них мазки і фарбують за Грамом, а потім розглядають препарат під імерсійною системою мікроскопа.

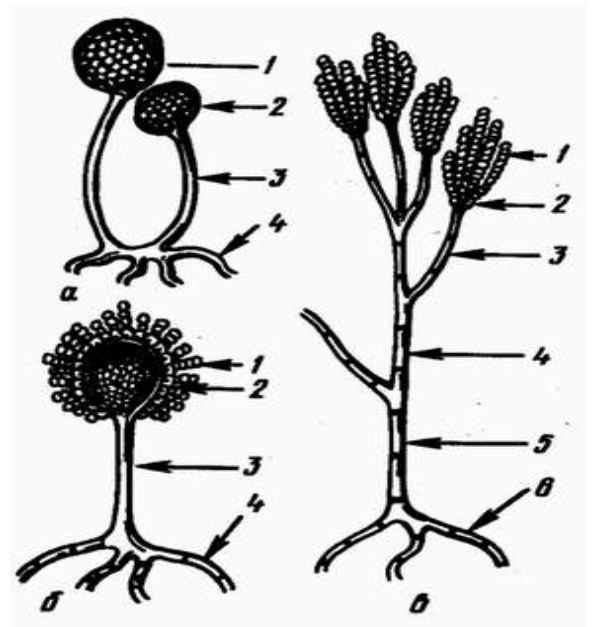


Рис. 1. Схема будови: а) мукора (клас зигоміцети): 1-ендоспори; 2-спорангій (плодове тіло); 3-спорангієносець; 4-міцелій; б) аспергилалесечна плісень (клас дейтероміцети): 1-конідії (екзоспори); 2-стерігми; 3-конідієносець; 4-міцелій; в) пеніцил (клас дейтероміцети): 1-конідії; 2-фіаліди; 3-метула; 4-гілка; 5-конідієносець; 6-міцелій

Контрольні питання

1. Підготовка матеріалу і особливості мікроскопії грибів.
2. Особливості будови плісневих грибів.
3. Народного господарського значення грибів.
4. Морфологія, біологічні особливості головчатої плісені, чорного аспергіла, зеленого кістьовика.
5. За якими ознаками актиноміцети розрізняються і подібні до грибів та бактерій?
6. Будова дріжджів.

Заняття 6

Тема: Лабораторна апаратура і методи стерилізації

Мета заняття: ознайомитися з обладнанням і апаратурою бактеріологічної лабораторії; основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням; правилами миття, обробки та підготовки до стерилізації лабораторного посуду, інструментів тощо; знезараження відпрацьованого патматеріалу.

Матеріальне забезпечення: стерилізатори, термостат, автоклав, водяна баня, мікроанаеростат, ексикатор, апарат Коха, піч Пастера, бактерицидна лампа, бактеріологічні фільтри, лабораторний посуд, інструменти, чашки Петрі, пробірки з культурами бактерій, таблиці.

Зміст заняття: студенти знайомляться з будовою і роботою автоклава, сушильними шафами, вивчаються різні методи стерилізації, підготовка посуду і інструментів до стерилізації. Вивчають засоби дезінфекції в баклабораторії.

Стерилізація - процес, який передбачає знищення у об'єкті усіх вегетативних і спорових, патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

Підготовка до стерилізації: посуд миють і висушують. Пробірки, колби, флакони закривають ватно-марлевым корком. Зверху на корки одягають паперові ковпачки (окрім пробірок). Чашки Петрі стерилізують загорнутими в папір по 1-5 штук, пастерівські піпетки по 3-15 штук. В верхню частину піпетки вкладають трохи вати для того, щоб попередити потрапляння матеріалу до рота. Під час роботи піпетки потрібно брати за верхній кінець. Градуйовані піпетки з ватним корком зверху, загортають кожну окремо у смужку паперу, для чого його нарізають смужками розміром (2-2,5) X (50-70) см. Лівий кінець загинають, накручують на піпетку, а верхній - закручують, або приклеюють. Посуд стерилізують сухим жаром при температурі 150 або 160, 190°C відповідно 2, 1 і 0,5 годин або у автоклаві при тиску 1 атм. протягом 20-30 хвилин.

Стерилізація шприців. Окремо циліндр і поршень опускають у 2% розчин соди і стерилізують 30 хвилин. При роботі з споровим матеріалом поміщають в автоклав, стерилізують 15 хвилин при 2 атмосферах (132°C) або 30 хвилин при тиску 1,5 атм. (126°C) . Шприци збирають після охолодження простерилізованими пінцетами.

Стерилізація металічних інструментів. Ножиці,

скальпелі, пінцети тощо стерилізують у 2% розчині соди. Гострі частини інструментів необхідно загортати в марлю або вату.

Стерилізація бакпетель проводиться полум'ям: петлю у горизонтальному положенні спочатку вносять в нижню частину полум'я, щоб не відбувалося розбризкування патматеріалу. Коли все згорить, петлю переносять в верхню частину полум'я і переводять петлю у вертикальне положення. Вслід за петлею фламбують нижню частину тримача.

Стерилізацію паперу, марлі, вати проводять у сушильній шафі при температурі 160° протягом 1 години, або у автоклаві при 1 атм протягом 30 хвилин.

Стерилізацію гумових рукавичок, які забруднені вегетативними формами збудників хвороб, проводять кип'ятінням у 2% розчині соди або текучою парою протягом 30 хвилин. При спорових формах - автоклавуванням 20-30 хвилин при 1,5-2 атмосферах. Рукавички перед стерилізацією пересипають тальком. Кожну пару окремо обгортають марлею.

Стерилізація патогенних культур. Пробірки і чашки Петрі з непотрібними культурами складають в металевий бак, пломбують кришку і здають в стерилізацію, де проводять автоклавування протягом 30 хвилин при 1 атмосфері. Вегетативні форми можна кип'ятити. Матеріал, що стерилізують заливають 2-5% розчином луку і ставлять на вогонь. Кип'ятять 1,5-2 години. Кришка бака повинна мати отвори для виходу пари.

Види стерилізації

Фізичні методи включають: 1)стерилізацію сухим жаром (фламбування, сухим нагрітим повітрям), 2)стерилізацію вологим жаром (кип'ятіння, текучою парою при 100⁰С, дробову стерилізацію при температурі нижче, ніж 100⁰С, стерилізація паровою під тиском з температурою вище 100⁰С, пастеризація), 3) стерилізацію фільтруванням (бактеріологічні фільтри), ультрафіолетовими променями, ультразвуком.

Засоби стерилізації сухим жаром. Фламбуванням або пропалюванням, стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети і інші металеві предмети.

Стерилізація *сухим нагрітим повітрям* здійснюється в спеціальних сушильних шафах (печі Пастера) з подвійними стінками. Зовні шафа облицьована теплоізоляційним матеріалом, всередині – стінки

металеві. У верхній частині шафи знаходиться термометр. Між теплонепроникною обшивкою і внутрішнім металом шафи на дні є автоматичний електронагрівальний елемент. В печі Пастера стерилізують чистий скляний посуд. Колби закривають ватними корками, накривають паперовими ковпачками і зав'язують. Чашки Петрі і пастерівські піпетки загортають пачками в пергаментний папір. При включенні сушильної шафи в електромережу повітря всередині шафи нагрівається. При досягненні заданої температури відзначають час початку стерилізації. Режим стерилізації – при температурі 155-160°C, експозиція 2 год, при 165 - 170°C - 1-1,5 год, при 180°C – 1 год. По закінченні часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45°C, шафу відкривають. Речовини, що запалюються, живильні середовища, гумові та пластмасові предмети стерилізувати сухим жаром не можна.

Засоби стерилізації вологим жаром. Кип'ятіння - засіб стерилізації інструментів (шприци, голки, пінцети, ножиці, скальпелі та ін.) і деяких гумових та скляних предметів в стерилізаторах, які мають решітку. На решітку кладуть два-три шари марлі або тонкий шар гігроскопічної вати. Шприци стерилізують у розібраному вигляді, в голки вставляють мандрени. Леза скальпелів і ножиці рекомендується обгортати марлею або ватою. В стерилізатор наливають воду (краще дистильовану) так, щоб вона повністю вкривала інструменти. Стерилізатор закривають кришкою. Кип'ятять 20-30 хвилин. Після стерилізації воду обережно зливають, а інструментами користуються тільки після їхнього охолодження.

Стерилізація текучою парою. В основу цього способу покладений засіб дрібної стерилізації (розроблений Тиндалем, 1877) при різних температурних режимах не вище 100°C. Здійснюють стерилізацію в апараті Коха при 100°C 30-40 хв. Апарат являє собою металевий котел циліндричної форми з подвійним дном, що закривається кришкою з отвором для термометра і виходу пари. Всередині котла є спеціальна підставка з отвором для матеріалу, що стерилізують і нагрівальні елементи. На дно апарата наливають воду до рівня, про який судять за показами водомірної трубки.

Початком стерилізації вважають момент закипання води. Пара, що утворюється при цьому підіймається доверху безперервно до матеріалу, який стерилізується. Стерилізацію проводять 3 дні підряд. Однократне прогрівання вбиває тільки вегетативні форми мікроорганізмів. Спори, які залишалися життєздатними в періоди між

стерилізацією проростають у вегетативні форми. Стерилізація на наступний день викликає їхню загибель. На третій день прогрівання гарантує повну стерильність матеріалу. Ефективність дробної стерилізації залежить від проростання спор, а тому в проміжках між нагріванням матеріали витримують при кімнатній температурі (25°C). Дробну стерилізацію при 100°C можна проводити і в автоклаві, закритому не герметично, у тих же режимах. Текучою парою стерилізують живильні середовища і інші матеріали, що руйнуються при нагріванні їх вище 100°C (желатина, вуглеводи).

Тиндалізація – дробна стерилізація при температурах нижче 100°C. Стерилізацію здійснюють у водяній бані. Принцип цього способу той же, що і при стерилізації текучою парою. Кратність нагріву залежить від температур, що застосовуються: при 70-80°C протягом 3 діб, 60-65°C – 5 діб, 56-58°C – 6-7 діб. В перший день матеріали стерилізують 2 год., в наступні дні – по одній годині. В проміжках між прогріванням матеріал, що стерилізується витримують при кімнатній температурі для проростання спор. За допомогою тиндалізації при 56-58°C стерилізують матеріали, що руйнуються при більш високій температурі (колоїдні розчини, сироватка крові і ін.).

Автоклавування – стерилізацію парою під тиском з високою температурою, здійснюють в спеціальному апараті – автоклаві. В основі цього способу лежить нагрівання матеріалу, поміщеного в автоклав з герметично закритою кришкою, чистою насиченою парою під тиском вище атмосферного. При зустрічі насиченої пари з більш холодним об'єктом пара конденсується перетворюючись на воду, в результаті чого виділяється велика кількість тепла, і температура об'єкту стерилізації швидко підвищується. Крім того, при конденсації пари відбувається зменшення його обсягу, що сприяє проникненню пари у внутрішні частини матеріалу. Обов'язковою умовою є надходження справді насиченої пари, щоб її торкання з холодним предметом вело до негайної конденсації і нагрівання та не призводило до вилучення води з матеріалу, який стерилізується. Сучасні автоклави електричні. Промисловість випускає автоклави вертикальні і горизонтальні.

Вертикальний автоклав являє собою двостінний металевий котел циліндричної форми, що закривається герметично кришкою. Через спеціальний кран з лійкою між стінками заливають воду до певного рівня. Внутрішня стінка котла у верхній частині має отвір, в нижній частині — кран, через який при нагріванні води пара витісняє повітря з котла. Автоклав нагрівають включенням в електромережу. Автоклав

завантажують матеріалом, кришку закривають герметично, закривають кран, через який заливають воду, нижній кран тимчасово залишається відкритим. При закипанні води між стінками автоклаву пара, що утворюється піднімається доверху і через верхній отвір внутрішньої стінки потрапляє всередину котла, витісняючи повітря через нижній відкритий кран. Коли повітря все витиснеться і пара починає виходити рівним струменем, нижній кран закривають. В результаті тиск пари всередині автоклаву підвищується. Початком стерилізації вважають момент досягнення показань манометра заданої величини. Нагрівання регулюють протягом усієї стерилізації, підтримуючи тиск пари на одному рівні. При надмірному підвищенні тиску всередині автоклава передбачений запобіжний клапан, через який автоматично надлишок пари виходить назовні:

При підвищенні тиску пари, відповідно підвищується і температура в автоклаві:

$0,505 \cdot 10^5$ Па (0,5 атм) температура 110-112°C

$1,01 \cdot 10^6$ Па (1 атм) » 120-121°C

$1,515 \cdot 10^6$ Па (1,5 атм) » 124-126°C

$2,02 \cdot 10^6$ Па (2 атм) » 132-133°C

Манометр показує тиск пари без врахування навколишнього атмосферного тиску (760 мм рт. ст.). По закінченні часу стерилізації автоклав відключають. Після охолодження при нульовій позначці манометра відкривають кран для того, щоб випустити пару. Кришку відкривають обережно на себе, не заглядаючи в котел, уберігаючи очі від можливої залишкової пари. До повного виходу пари відкривати кришку не можна, бо при швидкому падінні тиску всередині автоклаву простерилізовані рідкі середовища закипають, корки з пробірок виштовхуються разом з рідиною.

В автоклаві стерилізують живильні середовища, що витримують нагрівання вище 100°C (МПА, МПБ, фізрозчин), скляний посуд, загорнутий в папір, перев'язочний матеріал, халати. Крім того, в автоклаві знезаражують використані бактеріальні культури, посуд. В цих випадках тиск пари і експозиція стерилізації повинні бути тривалішими (1,5 атм - 1 год.), ніж при стерилізації чистого матеріалу (0,5 атм. – 30-40 хв.). Для перевірки якості роботи автоклаву, відповідність показів манометра і температури пари використовують різноманітні хімічні речовини (бензонафтол, сірка), які мають певну температуру плавлення.

Горизонтальний автоклав відрізняється від вертикального

конструкцією, але принцип роботи той же.

Пастеризація – спосіб запропонований Пастером з метою збереження біологічної цінності харчового продукту (молоко, м'ясні, рибні і овочеві консерви), що знижується при кип'ятінні (руйнуються вітаміни і інші нестійкі до високої температури речовини). При пастеризації продукт нагрівають до 80°C 30 хв., після цього різко охолоджують (до 4-8°C). Пастеризацією досягається часткова стерилізація – гинуть вегетативні форми бактерій, а спори зберігаються. Різде охолодження і наступне зберігання при низькій температурі (4-5°C) перешкоджають проростанню спор і наступному розмноженню бактерій.

Стерилізація фільтруванням полягає в пропусканні рідкого матеріалу через бактеріологічні фільтри шляхом створення на фільтрі перепаду тиску, або шляхом створення вакууму в приймальникові фільтрату. Дія фільтру полягає в механічній затримці і в адсорбції мікроорганізмів стінками пор фільтру. Розміри мікробів часто бувають менші середнього діаметру пор фільтрів. Фільтрують звичайно рідини, які не витримують нагрівання (сироватки крові, розчини антибіотиків і ін.). Фільтри бувають тверді – керамічні, азбестові і мембранні.

Більш частіше в роботі використовують фільтри Зейтца і мембранні фільтри, які вмонтовані в спеціальному утримувачі-лійці, вставленому в корок, що закриває колбу Бунзена (товстостінна колба з тубусом). Змонтований фільтр загортають папером і стерилізують в автоклаві. Рідину, яка фільтрується наливають у лійку над фільтром, на тубус колби надягають гумову трубку, приєднану до ручного або електричного насоса, викачуванням повітря з колби створюють понижений тиск, і рідина фільтрується, бактерії залишаються на фільтрі. Стерильність отриманих фільтратів перевіряють посівом на живильні середовища з наступним інкубуванням в термостаті протягом декількох діб.

Стерилізація ультрафіолетовим промінням. В лабораторії джерелом УФ-опромінення служать спеціальні бактерицидні лампи. Ці промені використовують для знезараження повітря в приміщеннях (боксах, операційних). Бактерицидні лампи знайшли також своє застосування в харчовій промисловості при зберіганні різноманітних продуктів (температура вище 0°C) .

Ультразвук, як фізичний стерилізуючий чинник, може бути використаний, наприклад, для знезараження води, молока, деяких

продуктів. Стерилізуюча дія ультразвуку пов'язана з виникненням в цитоплазмі бактерій кавітаційних міхурців, заповнених парою з тиском біля 10 тис. атм., внаслідок чого руйнуються внутрішні структури бактеріальної клітини.

Стерилізація за допомогою хімічних речовин в лабораторній практиці має обмежене застосування і зводиться до консервування, з метою попередження бактеріального забруднення живильних середовищ, вакцин, а також лікувальних і діагностичних сироваток різноманітними хімічними сполуками (солі металів, луги, антибіотики і ін.). Живильні середовища консервують хлороформом, толуолом, інколи ефіром (для звільнення від консерванту середовище нагрівають до 56°C). Вакцини і лікувальні сироватки консервують фенолом (0,25-0,5%-ним), хлороформом (0,5%), формаліном (0,5%).

Хімічні речовини застосовують в лабораторіях і для дезінфекції.

Дезінфекція - це знищення патогенних мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища. Навіть у фіксованих і зафарбованих мазках іноді зберігаються збудники деяких хвороб. Тому дезінфекція в баклабораторії - це обов'язковий повсякденний захід. Дезінфекції не підлягає лише той посуд, де культивувались мікроорганізми; його складають в бікси, пломбують і здають в стерилізацію.

Контрольні питання

1. Поняття «стерилізація», «дезінфекція», їх застосування у практиці.
2. Методи стерилізації.
3. Автоклав, його будова і призначення.
4. Методи дрібної стерилізації.
5. Стерилізація сухим жаром.

Заняття 7

Тема: Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур

Мета заняття: вивчити види і призначення живильних середовищ, навчитися готувати звичайні, спеціальні, диференціально-діагностичні і синтетичні середовища. Ознайомитися з будовою термостата, анаеростата і їх призначенням; засвоїти техніку посівів бактерій на живильні середовища. Засвоїти діагностичне значення

виділення чистої культури і оволодіти методами, які застосовуються для отримання чистої культури.

Матеріальне забезпечення. Пробірки з МПБ, МПА скошений та стовпчиком, МПЖ, агар Ендо, Левіна, ЖС Кітта-Тароцці, пробірки з вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синькою, агар Ейкмана, кров'яний агар, зразки сухих живильних середовищ фабричного виробництва, компоненти живильних середовищ – агар-агар, желатина, пептон, сіль. Пробірки з лимонно-жовтим стафілококом, сінною паличкою, кишковою паличкою, бактеріологічні петлі, ексикатор, прилад Міхаеліса.

Зміст заняття: студенти знайомляться з рецептурою приготування живильних середовищ. Проводять посіви мікроорганізмів на живильні середовища (МПБ, МПА, МПЖ, Ендо). Знайомляться з будовою термостата, ексикаторів. Засвоюють техніку виділення чистої культури методом Дригальського.

Для постановки діагнозу часто необхідно виділити збудника хвороби в чистій культурі. Для розмноження мікробів в лабораторії їх вирощують на живильних середовищах у термостатах. Живильні середовища за консистенцією бувають щільні та рідкі. За складом: білкові, безбілкові та мінеральні (розчини). За походженням: природні - тваринного походження (молоко, яйця, жовч, кров, кров'яна сироватка) та рослинного походження (овочі, плоди, соки, зерно гороху тощо) . Широке застосування знайшли штучні середовища тваринного походження (МПА, МПБ, МПЖ) та рослинного (настої і відвари сіна, соломи, дріжджів, пивне сусло).

Любе живильне середовище повинно відповідати таким вимогам:

1. Містити поживні речовини необхідні для росту даного мікроорганізму в певних пропорціях.
2. Бути вологим, так як мікроорганізми засвоюють речовини з розчинів (голозойним шляхом).
3. Бути стерильним.
4. Бути прозорим - ця вимога тільки для тих середовищ, на яких вивчаються культуральні і біохімічні властивості (МПА, МПБ, МПЖ, вуглеводні середовища) .
5. Повинно мати слабо лужну реакцію (рН 7,2-7,4), крім тих, які призначені для вирощування молочнокислих бактерій та грибів.

Живильні середовища за своїм призначенням поділяють на звичайні (прості), кольорові і спеціальні. До простих відносять молоко, картоплю, МПБ, МПЖ, МПА. Кольорові - це середовища з

індикаторами, які змінюють свій колір при виділенні продуктів життєдіяльності мікробів - кислот, ферментів. Спеціальні середовища готують для тих мікроорганізмів, які не ростуть на звичайних середовищах.

Агар-агар – це речовина, яку отримують з морських водоростей. Сорти: одеський, архангельський та інші. Складається з пектинових азотистих речовин і вуглеводів. Агар, як поживну речовину, більшість патогенних мікробів не використовують. Желатина – білкова речовина, яка отримується при виварюванні кісток, хрящів тварин. В гарячих розчинах агар і желатина розбухають і перетворюються на драглисту масу.

Для вирощування майже всіх збудників хвороб в заводських умовах виготовляють сухі живильні середовища. На етикетках вказано скільки необхідно взяти порошку на літр дистильованої води. Приготовані середовища нагрівають до розчинення порошку, визначають рН, фільтрують і стерилізують.

Кольорові живильні середовища (Гісса) використовують для визначення цукролітичних властивостей бактерій.

Середовища для визначення ферментації вуглеводів: агар Ендо – бактерії, які розкладають лактозу, фарбують середовище в червоний колір, а негідролізуючі – утворюють безбарвні колонії. Середовище Левіна – має фіолетовий колір; бактерії, що розщепляють лактозу утворюють сині або чорні колонії, а що не розщепляють - безбарвні.

Живильні середовища для вирощування анаеробів: Кітта-Тароцці, кров'яний цукровий агар, мозкове середовище. Середовища для вирощування грибів: Сабуро, агар Чапека.

Техніка посіву мікробів. Посіви для вирощування аеробів здійснюють як з нативного матеріалу, що надсилається в лабораторію, так і з вже наявних бактеріальних культур. Живильні середовища повинні бути стерильними. Посіви з проб матеріалу, що надійшов в лабораторію, проводять пастерівською піпеткою, з бактерійної маси — бактеріологічною петлею (рис. 4). Бактеріологічну петлю перед взяттям клітин мікроорганізмів стерилізують (рис. 2). Для цього дрід нагрівають до червона в полум'ї спиртівки і одночасно обпалюють частину тримача, що ближче до петлі, яка буде вводитися в пробірку з мікроорганізмами. Петлю рекомендується тримати в полум'ї спиртівки майже вертикально, щоб дрід був рівномірно розпечений на всій довжині. При фламбуванні необхідно пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній і периферичній частинах полум'я

(рис. 3), тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки. Зразу ж після стерилізації петлю вводять в пробірку з мікроорганізмами. Щоб не пошкодити клітин мікроорганізмів, петлю спочатку охолоджують, доторкаючись нею до внутрішньої поверхні пробірки або до живильного середовища, вільного від клітин мікроорганізмів, і тільки після цього захоплюють невеличку кількість мікробної маси.



Рис. 2 Техніка посіву мікроорганізмів

Посів обов'язково потрібно робити над полум'ям спиртівки. При посіві в рідкі середовища (МПБ, молоко) пробірку з матеріалом, що досліджується і пробірку з живильним середовищем тримають в лівій руці, в правій розташована петля або піпетка для переносу матеріалу в середовище і корки від пробірок. Біля полум'я спиртівки петлю (або піпетку) вносять в пробірку з матеріалом, беруть одну краплю, після цього обережно переносять в пробірку з стерильним середовищем, злегка занурюючи в нього, після цього обережно виймають, закривають корками пробірки, петлю фламбують над полум'ям спиртівки (пастерівську піпетку занурюють в банку з дезрозчином - фенолом, формаліном). Стежать, щоб не змокрили корки.

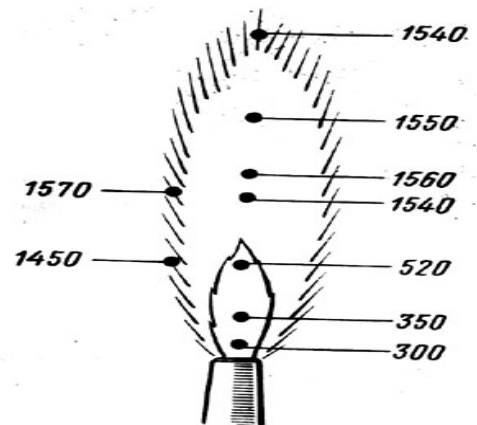


Рис.3. Значення температури ($^{\circ}\text{C}$) в різних ділянках полум'я

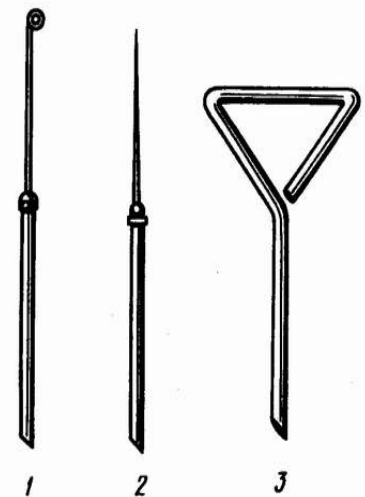


Рис.4. Інструменти для посіву і розсіву культур мікроорганізмів:

- 1-мікробіологічна петля;
- 2-мікробіологічна голка;
- 3-шпатель

При посіві на щільне середовище пробірки з мікробною культурою і стерильним живильним середовищем (МПА) беруть в ліву руку, тримають скошеною поверхнею МПА доверху, корками в бік полум'я спиртівки. У відкриту у полум'ї пробірку з мікробною культурою, яку засіваємо (або іншим матеріалом) обережно опускають петлю, злегка торкаючись до поверхні вмісту пробірки, і, взявши одну краплю, переносять її в іншу пробірку зі стерильним середовищем. Петлю опускають до дна пробірки, занурюють в конденсаційну рідину і роблять посів штрихом — зигзагоподібними рухами проводять петлею вверх вздовж поверхні середовища. Пробірки закривають, петлю фламбують. Всі засіяні пробірки ставлять в термостат для вирощування. Через 16-18 або 24-48 год враховують результат.

Культивування мікроорганізмів відбувається в термостатах при певних температурах. Збудників хвороб теплокровних тварин культивують при 37-38°C, людини — 36-37°C, бджіл — 34-35°C, грибів — 28-30°C. Крім забезпечення температурного режиму, необхідно враховувати тип дихання мікроорганізмів: при аеробному типі дихання ніяких додаткових умов створювати не потрібно. Для анаеробів необхідно вилучити доступ вільного кисню повітря. З цією метою використовують ексикатор. З ексикатора фізичним, хімічним або біологічним методом видаляють повітря і ставлять його в термостат. Фізичний - за допомогою насоса викачують повітря, хімічний - на дно ставлять чашку Петрі з хімічними речовинами, які активно зв'язують кисень повітря (пірогалол + їдкий натр), біологічний - на одну половину поживного середовища засівають аеробний мікроб, а на другу - анаеробний.

Виділення чистих культур. Вид — це сукупність мікроорганізмів, які мають однакове походження і генотип, подібну будову та функціональні ознаки. Ріст мікробних клітин одного виду на щільному або рідкому живильному середовищі називають **чистою культурою**. Культури мікробів одного виду, які вилучені з різних джерел, або з одного й того ж джерела, але в різні часи називають **штамом**. Види складаються з індивідуумів, які відрізняються між собою за якоюсь ознакою або групою ознак - це **варіанти**. Розрізняють культуральні, біохімічні, серологічні варіанти або варієтети за визначником Берджі. Культура, отримана внаслідок розмноження однієї клітини називається **клоном**. Клони широко використовують в науково-дослідних закладах. Бактерії одного виду, які виростили на щільному середовищі складають **колонію**.

Чисті культури необхідні для ідентифікації виду, приготування діагностичних, лікувальних і профілактичних препаратів, отримання в промислових умовах антибіотиків, ферментів, вітамінів, біогенних стимуляторів, виготовлення певних сортів молочних продуктів, вин, пива тощо. Належність мікробної культури до певної систематичної групи (класу, родини, роду, виду, варієтету) встановлюють шляхом вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних ознак. Велике значення в визначенні видів має пігментоутворення. Червоний пігмент утворює *Serratia marcescens*, білий – *Staph. albus*, золотистий – *Staph. aureus*, синьо-зелений – *Pseudomonas aeruginosa*, чорний – *Aspergillus niger*.

Виділення чистої культури. Один з перших методів був запропонований Пастером – **метод розведення** – полягає в тому, що матеріал, який досліджується послідовно розводять в рідкому живильному середовищі: беруть ряд пробірок зі стерильним МПБ (по 9-10 мл), матеріал, що досліджується піпеткою вносять в першу пробірку, перемішують, після цього з неї невелику кількість (0,1 мл) переносять в другу, після перемішування — в третю і т. д. (інколи до 10 пробірок) . Пастер вважав, що в останній пробірці можливе зростання одного виду мікроба. Цей метод використовують тільки як допоміжний при інших засобах.

Метод Дригальського – метод пластинчатого посіву. Беруть 4–5 стерильних чашок Петрі. Агарове середовище в колбі розплавляють на водяній бані, після цього, вийнявши пробку, злегка прогрівають краї колби і агар розливають в чашки Петрі рівномірним шаром. Закриті кришкою чашки Петрі залишають на столі. Після ущільнення середовища чашки ставлять в термостат для підсушування вверх дном на 3-4 години при 37-38°C. Краплю матеріалу, що досліджується бактеріологічною петлею вносять на поверхню агару, шпателем Дригальського розтирають рівномірно по поверхні середовища. Цим же шпателем, не опалюючи його, розтирають (засівають) по поверхні середовища другої чашки, після цього послідовно в третій, четвертій чашках. Після посіву їх розміщують у термостаті вверх дном. Зростання ізольованих колоній досягається в останніх чашках. Далі потрібну колонію відзначають, відвивають в МПБ і МПА, ставлять в термостат для вирощування.

Для отримання чистих культур користуються і іншими методами: нагріванням, додаванням до живильних середовищ (або до матеріалу, що досліджується) хімічних речовин, біологічним методом (зараження

лабораторних тваринних). В випадках необхідності відділення *спорових форм від видів, які не утворюють спори*, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогрівують її в водяній бані при 80°C 30-40 хв. — вегетативні форми мікроорганізмів гинуть, спори зберігаються життєздатними. Далі прогріту суспензію висівають методом Дригальського.

Хімічний метод полягає в тому, що хімічні речовини в певній концентрації додають до живильних середовищ. Дія цих речовин на різні види мікробів неоднакова: одні види гинуть (бактерицидна дія), інші — затримуються в своєму рості (бактеріостатична дія), а на треті ці речовини не виявляють згубного впливу. На цьому принципі засноване застосування вибіркового і елективного середовищ.

Біологічний метод дозволяє виділити чисту культуру тільки патогенних хвороботворних мікроорганізмів: матеріал, що досліджується (суспензія тканини, суспензія бактерій) вводять чутливій тварині (біла миша, морська свинка, голуб, кріль). Тварини гинуть, їх розтинають, і посіви з внутрішніх органів дозволяють виділити чисту культуру.

Отримання чистої культури анаеробів. Принцип зберігається той же, що і при роботі з аеробами, тільки використовують спеціальні середовища: застосовуючи метод Дригальського, посів проводять на глюкозо-кров'яний агар в чашках Петрі, які після цього поміщають в умови анаеробіозу (в ексикатор, мікроанаеростат). Користуються також засобом посіву на середовище Вільсона–Блера. Коли зростають окремі чорні колонії, їх пересівають в середовище Кітта–Тароцці, одержуючи таким чином чисту культуру. Для цієї ж мети може служити біологічна проба: матеріалом що досліджується (або змішаною культурою) заражають чутливу лабораторну тварину. Після її загибелі і розтину — проводять посіви в середовище Кітта–Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на глюкозо-кров'яний агар, як згадано вище.

Контрольні питання

1. Призначення живильних середовищ і вимоги до них.
2. Класифікація живильних середовищ.
3. Живильні середовища для культивування грибів.
4. Культивування аеробів.
5. Культивування анаеробів.
6. Метод Пастера, Дригальського.
7. Що таке вид, клон, штам, варіант, чиста культура?

Заняття 8

Тема: Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів

Мета заняття: вивчити культуральні, цукролітичні, протеолітичні, редукційні властивості мікроорганізмів отриманих на попередніх заняттях і визначити їх видову належність за визначником.

Матеріальне забезпечення. Предметні та покривні скельця, культури стафілокока, кишкової палички в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ, середовища з різними вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синьою, агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева, МПБ з додаванням 2% азотнокислого калію, кров'яний агар, фільтрувальний папір, просочений 12% водним розчином щавлевої кислоти і 10% розчином оцтово-кислого свинцю, пробірки і чашки Петрі з посівами попереднього заняття, набори для фарбування за Грамом, Ціль-Нільсоном, таблиці.

Зміст заняття: студенти враховують результати посівів на попередньому занятті - при консультації викладача відмічають характер росту на рідкому і щільному живильних середовищах. Культури розглядають макроскопічно (візуально) і мікроскопічно (під лупою). Потрібну колонію пересівають в пробірки з середовищами для визначення цукролітичних, протеолітичних і редукційних властивостей мікроорганізмів, ставлять у термостат. Викладач знайомить студентів з існуючими визначниками мікробів і технікою визначення виду. З колоній, які виростили на МПА студенти роблять мазки і фарбують їх за Грамом і Ціль-Нільсоном. Використовуючи основні ознаки, визначається вид мікроорганізмів.

Культуральні властивості. Колонії, які виростили, характеризують за розміром, формою, кольором, консистенцією, контуром краю, структурою та характером поверхні.

Зростання мікроорганізмів в рідких живильних середовищах не характеризується великою різноманітністю. При макроскопічному дослідженні (неозброєним оком) відзначають характер і ступінь помутніння середовища: рівномірне (дифузне), інтенсивне, помірне, слабе і у вигляді опалесценції. Зростання культури в рідкому середовищі може бути поверхневим у вигляді плівки на всій поверхні середовища, підійматися (загинатися) на стінки пробірки або займати тільки частину поверхні середовища, не доходячи до стінки пробірки. Враховують колір плівки (блакитний, жовтуватий, сірий, білий),

товщину (тонка, товста, ніжна, груба), характер поверхні плівки (складчаста, зморшкувата, гладка, сітчаста, пухнаста), консистенцію (крихка, ослизла,). Культури мікробів деяких видів в рідкому середовищі утворюють осад – він може бути численний і незначний, щільний (компактний), пухкий, зернистий, у вигляді шматочків вати, пластівців, ослизлий. За кольором – білий, жовтий, матовий, зеленуватий, сіруватий та ін. При струшуванні осад або розбивається, створюючи рівномірне помутніння середовища, або утворюються великі або ж дрібні пластівці, грудки; ослизлий осад може підійматися уверх в вигляді «коси» з помутнінням середовища, або воно при цьому залишається прозорим.

Зростання культури в рідкому середовищі може бути пристінним. Воно супроводжується прикріпленням та розмноженням мікробів на склі (на стінках пробірок) з утворенням характерного матового нальоту, дрібних пластівців, зерен.

Зростання мікробів в напіврідкому середовищі, що не володіють рухливістю, відбувається за уколом у вигляді білуватого стрижня. Навколишнє середовище при цьому залишається прозорим. Рухомі мікроорганізми викликають помутніння напіврідкого агару різної інтенсивності, що розповсюджується у вигляді «хмарок». Посів мікробів в МПА, МПЖ (стовпчиком) роблять уколом суворо по центру в глибину середовища або в безпосередній близькості до стінки пробірки.

Зростання мікробів на щільних живильних середовищах (МПА) супроводжується утворенням колоній – скупчень мікробів (рис 5), що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини.

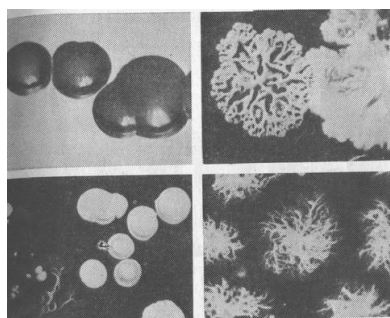


Рис. 5. Колонії різних мікроорганізмів на МПА

Колонії характеризуються великою різноманітністю, можуть бути ізольованими і злитими. Вивчення їх проводять неозброєним оком і з допомогою мікроскопа або лупи. Звичайно заздалегідь відзначають характер зростання – численний, помірний, незначний; після цього враховують наступні ознаки:

А) форма – правильна (овальна, округла), неправильна (зіркоподібна, гілляста та ін.);

Б) розмір (вимірюють з допомогою лінійки або окуляра-мікромметра мікроскопа) – великі (діаметр понад 4 мм), середні (діаметр 2-4 мм), дрібні (діаметр 1-2 мм) і дрібні – росяні (діаметр менше 1 мм);

В) край колонії (рис 6) – рівний (S-форма), шорсткий (R-форма), хвилястий, бахромчастий, зубчастий, локоноподібний;

Г) прозорість і блиск – прозора, напівпрозора, мутна колонія;

Д) колір – сірувато-білий, безбарвний, білий, кремовий, оранжевий, блакитний, зелений, золотистий, жовтий, червоний, синій, чорний та ін. Колір колоній культури бактерій залежить від кольору пігменту, який вони виробляють;

Е) профіль (рельєф) (визначають у відбитому світлі) – опуклий, плоский, конусоподібний, кратероподібний, з валиком по колу;

Ж) поверхня (рис. 7) - гладка, горбкувата, зморшкувата, складчаста, з концентричними колами;

З) консистенція (визначають дотиком до поверхні колонії бактеріологічною петлею) – щільна (легко знімається з агару або виростає в товщу середовища), крихка, крихка, ослизла (тягуча, прилипає до петлі), тістоподібна, олієподібна;

І) структура - однорідна, волокнувата, плівчаста, зерниста.

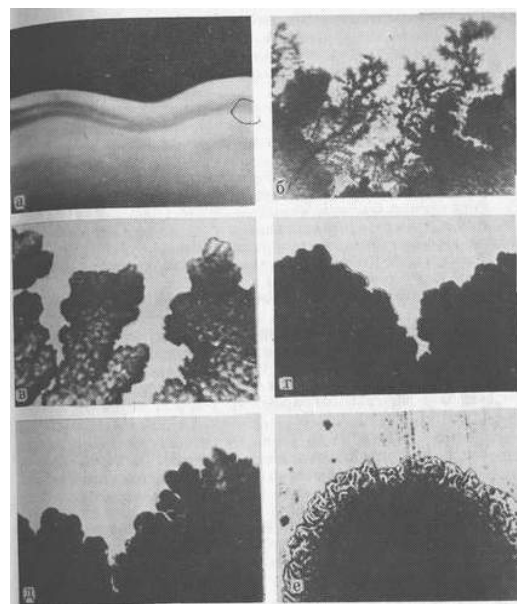


Рис.6. Край колоній мікробів:
1-хвилястий; 2-гілчастий;
3-розірваний; 4-різаний;
5-лопасний; 6-локоноподібний

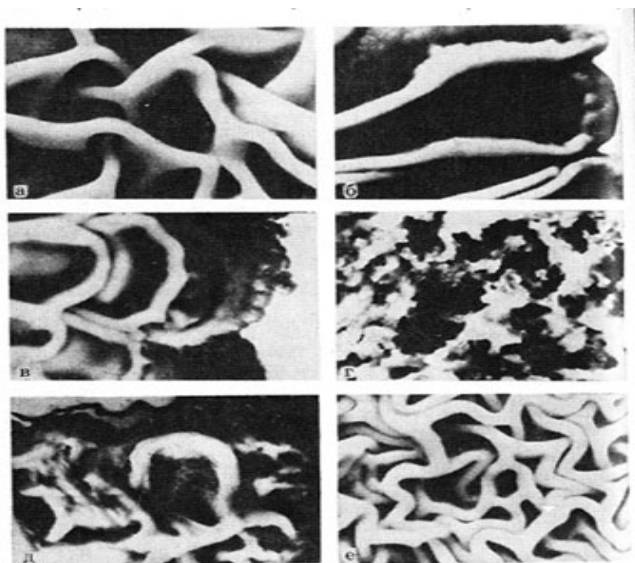


Рис.7. Поверхня колоній мікробів:
1-складчаста; 2-радіально складчаста; 3-поперечно складчаста; 4-ніздревата; 5-з кратероподібним центром; 6-мозковидна

При перегляді колоній під мікроскопом чашки Петрі розміщують на предметний столик дном уверх, а пробірки з агаровою культурою – скошеною поверхнею агару донизу. На поверхні агару при посіві штрихом бактерії ростуть у вигляді ізолюваних колоній або утворюють суцільний наліт з рівними, хвилястими, краями. Інколи цей наліт буває дифузним, перистим або ризоїдним (деревоподібним). При цьому відзначають колір, характер

поверхні, консистенцію, прозорість штриху.

Колонії *вивчають* у віці однієї доби!

Культуральні властивості анаеробів вивчають на середовищі Цейслера. Вони утворюють десять видів колоній. Для ветлікаря мають значення шість з них:

1. Гудзикоподібні підвищення. Колонії оточені великою коричнево-болотистою непрозорою зоною - *CI. perfringens*.

2. Округлі, коренеподібні, безбарвні або ніжно сірі колонії - *CI. botulinus*, *CI. oedematiens*.

3. Вуалеподібні із зрізаними краями колонії, часто з ніжними відростками, безбарвні. Легкий гемоліз - *CI. tetani*, *Vibrio septique*.

4. Колонії мають вигляд перламутрового гудзика і форму виноградного листа. Плоскі з підвищеннями в центрі, ніжно синьо-фіолетового відтінку. Незначний гемоліз - *CI. chauvoei*.

5. В'язкі, іноді у вигляді твердих бородавок колонії, білі або непрозорі. Часто вузька інтенсивна зона гемолізу - *CI. sporogenes*.

6. Білі, ніжно блакитні або безбарвні майже круглі, дуже дрібні колонії. Оточені ніжним гемолізом - *CI. histolyticum*, а іноді *CI. tetani*.

Біохімічна активність мікроорганізмів дуже різноманітна і зумовлена наявністю у них специфічних ферментних систем, а також умовами навколишнього середовища. Ферменти відіграють велику роль у життєдіяльності мікробів. Вони беруть участь у різноманітних біохімічних реакціях, що лежать в основі живлення, дихання, росту і розмноження мікроорганізмів. В лабораторній мікробіологічній практиці вивчення біохімічних властивостей бактерій є одним з найважливіших диференціально-діагностичних засобів точного розпізнавання збудника інфекційної хвороби.

Цукролітичні властивості виявляють при посіві бактерій на диференціально-діагностичні середовища з різними вуглеводами і індикатором. Частіше застосовують середовище Гісса (з індикатором Андреде). Набір середовищ з різними вуглеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, цукроза, манніт, дульцит, і ін.), стерильне знежирене просте молоко, молоко з лакмусом, молоко з метиленовим синім — називають *строкатим рядом*. Посіви культур здійснюють за звичайною методикою бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Після інкубування в термостаті враховують результат ферментації вуглеводів: зміна кольору живильного середовища (в червоний колір з індикатором Андреде) означає розщеплення вуглеводу і утворення в середовищі кислих продуктів розпаду. Якщо при розщепленні даного

вуглеводу утворюється не тільки кислота, але й газоподібні речовини, останні виштовхують частину рідини з поплавця, і міхурці газу збираються у його верхній частині. Для визначення цукролітичних властивостей часто застосовують напівщільні середовища з вуглеводами і індикатором ВР (суміш водного блакитного з розоловою кислотою), а також щільні середовища з вуглеводами і індикатором (агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева).

Для виявлення протеолітичної спроможності мікроорганізмів культуру, що досліджується засівають в МПЖ, просте молоко. Посів мікробів в МПЖ стовпчиком проводять уколом, зануливши голку (або петлю) з культурою, що досліджується, вглиб живильного середовища до дна пробірки. В тих пробірках, де під дією ферментів бактерій відбудеться протеоліз желатини, середовище розріджується. Мікроби різноманітних видів розріджують МПЖ неоднаково. Одні з них у вигляді лійки (збудник сибірки), інші – у вигляді «панчохи» (стафілококи). Буває розрідження пошарове (синьогнійна паличка та ін.).

Спроможність мікроорганізмів гідролізувати казеїн визначають на молочному агарі Ейкмана. Посів здійснюють петлею і шпателем по всій поверхні середовища, щоб одержати ізольовані колонії. Витримують в термостаті 24-48 год. Протеоліз виявляється пептонізацією казеїну – навколо колоній утворюється чітка зона просвітлення молочного агару. При посіві в молоко протеоліз виявляється просвітленням стовпчика молока, появою пухкого або ослизлого відстою на дні пробірки.

Ступінь протеолізу і глибину розщеплення білка у різних видів бактерій визначають шляхом утворення кінцевих продуктів розпаду (індол, сірководень, аміак та ін.)

Індол встановлюють різноманітними способами. Найбільш доступним і зручним вважається спосіб з використанням індикатору, що виготовлений за рецептом:

- фільтрувальний папір просочують гарячим насиченим водним 12%-вим розчином щавлевої кислоти, висушують на повітрі, розрізають на смужки (10*0,5 см) і зберігають в скляній банці з притертою кришкою. Щоб виявити утворення індолу, культуру, що досліджується засівають у пробірку з МПБ або бульйоном Хоттінгера, куди вставляють індикаторний папір, притискаючи його кінець ватним корком (нижній край паперу не повинен торкатися живильного середовища). Витримують в термостаті при 37°C 1-3 доби. За наявності

індолоутворення нижня частина індикаторного паперу фарбується в рожевий колір.

Визначення сірководню проводять на щільному середовищі МПА, яке містить сірчаноокисле залізо, гіпосульфід натрію, глюкозу, індикатор фенолрот водний. Посів роблять на скошений агар, а після цього уколом в нижню частину стовпчика середовища. За наявності сірководню під впливом бактеріальної культури стовпчик середовища рожевіє, нижня частина фарбується в чорний колір.

Інший спосіб визначення сірководню в рідкому середовищі заснований на почорнінні фільтрувального паперу з 10%-вим розчином оцтовокислого свинцю (утворюється сірчистий свинець чорного кольору).

Визначення аміаку. В пробірці з засіяною бактеріальною культурою закріплюють між стінкою пробірки і корком рожевий лакмусовий папір, що в присутності аміаку синіє. Аміак в середовищі можна також виявити з допомогою реактива Несслера. Для цього у фарфорову чашку піпеткою вносять краплю культури амоніфікаторів, вирощених на МПБ, і стільки ж реактива Несслера.

При наявності аміаку суміш забарвлюється в жовтий або коричневий колір, в залежності від його кількості. Коричнєве забарвлення вказує на великий вміст продукту гнилісного розкладу.

Редукуючі властивості мікробів визначають на підставі зміни кольору органічної фарби (метиленової синьки, малахітової зелені, нейтрального червоного та ін.), що внесені в живильні середовища (часто в молоко). Петлю культури, що досліджується, висівають в середовище з фарбою, інкубують в термостаті 24 год. Під впливом мікробних ферментів барвник відновлюється, відбувається його знебарвлення або зміна вихідного кольору.

Визначення каталази можна здійснювати різними способами.

1. На поверхню добової агарової культури рівномірно тонким шаром наливають 1 мл 1%-ного розчину перекису водню. За наявності каталази відзначають виділення міхурців кисню.

2. На предметне скло наносять краплю 3-10%-вого розчину перекису водню та вносять в нього петлю з бактеріальною агаровою культурою. Виділення міхурців газу(кисню) свідчить про наявність у мікробів каталази.

Визначення гемолітичних властивостей. Бактерії деяких видів в процесі життєдіяльності продукують особливі речовини, які володіють лізуючою дією на еритроцити – гемотоксини (білкової природи), що

руйнують оболонку еритроцитів. Для визначення гемолітичної активності бактеріальні культури висівають на живильні середовища, що містять 5% дефібринованої крові (частіше кров'яний МПА). При зростанні мікроорганізмів, що володіють гемолітичними властивостями, навколо колонії в результаті лізису еритроцитів утворюється прозора зона (безбарвна або пофарбована). В рідких середовищах при гемолізі середовище стає прозорим (червона лакова кров).

Контрольні питання

1. Характер росту мікроорганізмів на МПБ.
2. Характер росту мікроорганізмів на щільному живильному середовищі.
3. Методи визначення цукролітичних властивостей.
4. Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.
5. Методи визначення індолу, аміаку, сірководню.
6. Техніка визначення видів мікроорганізмів.

Заняття 9

Тема: Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу

Мета заняття: ознайомити студентів з методами зараження лабораторних тварин, правилами відбору і пересилки патматеріалу для бактеріологічного дослідження. Вивчити схему дослідження патологічного матеріалу.

Матеріальне забезпечення: білі миші, морські свинки, кролі для демонстрації різних методів зараження.

Стерильні шприци і голки, фізіологічний розчин, 5% спиртовий розчин йоду, ватні тампони, 70% спирт, металеві шпателі, спиртівки, ножиці. Патматеріал (шматочки тканин). Труп білої мишки, парафінований папір, банки з кришкою, 5% розчин фенолу, 30% розчин гліцерину, 10% розчин хлорного вапна, МПБ, МПА, набір для фарбування за Грамом.

Зміст заняття: студенти знайомляться з методами зараження лабораторних тварин з метою визначення патогенності мікроорганізмів та виділення чистих культур.

Самостійно фіксують лабораторних тварин і заражають підшкірним, внутрішкірним, внутрім'язовим інтраперитоніальним, оральним, інтраназальним методами. Далі розтинають труп білої миші. Беруть патматеріал, консервують, пакують і пишуть супровідну в ветлабораторію. Знайомляться з порядком проведення бактеріологічного дослідження патматеріалу і постановкою діагнозу. Роблять мазки-відбитки з паренхіматозних органів, посіви на МПА. Фарбують мазки за Грамом.

При дослідженні того або іншого матеріалу, щоб виділити чисту культуру патогенного мікроба, або виявити його вірулентність проводять зараження лабораторних тварин. Застосовують такі способи зараження:

- 1) через шлунково-кишковий тракт – культура мікробів дається з кормом;
- 2) підшкірно - матеріал, що досліджується, шприцом вводиться безпосередньо під шкіру (морським свинкам в ділянці черева, або стегна, мишам - ближче до основи хвоста, кролям - в ділянці черева);
- 3) внутрішньошкірно - безпосередньо в шкіру (0,1-0,2 мл);
- 4) внутрішньом'язово - в товщу м'язів (в області стегна);
- 5) в черевну порожнину - при цьому тварину тримають головою донизу, для того, щоб не травмувати кишечник;
- 6) інтравенозно - шляхом ін'єкції в вену, кролям - в зовнішню вушну краєву, мишам - хвостову;
- 7) субдурально - під тверду мозкову оболонку;
- 8) скарифікація - скальпелем роблять насічки на шкірі і в них втирають дослідний матеріал, або бактеріологічну культуру.

Місце введення в організм дослідного матеріалу необхідно обробити: вистригти шерсть, протерти шкіру спиртом, змастити йодом. При зараженні тварин необхідно забезпечити їх фіксацію.

Бактеріологічне дослідження необхідно проводити одразу ж після загибелі тварини. Тіло тварини фіксують у спинному положенні в кюветі з парафіном. Місце розрізу дезінфікують 5% розчином фенолу. Розтинають шкіру по білій лінії живота, далі шкіру відпрепаровують від м'язів, роблять поперечні надрізи і шкіряні клапті відводять в сторону. Розтинають грудну порожнину. Враховують патологічну картину, записують дані до журналу експертизи. Поверхню серця, легенів, лімфатичних вузлів запікають нагрітим скальпелем, пастерівською петлею пропалюють в цьому місці орган, беруть

невелику кількість крові і висівають її на живильні середовища. Далі розтинають черевну порожнину. Пінцетом відтягують доверху черевну стінку і ножицями розрізають її від діафрагми до анального отвору. Оглядають органи черевної порожнини, беручи до уваги розміри, колір та консистенцію паренхіматозних органів, стан кишечника, наявність ексудату в черевній порожнині та його характер. Опісля припікання поверхні роблять посіви з печінки, селезінки, лімфатичних вузлів та при необхідності - із вмісту кишечника. Паралельно з тканин та органів роблять мазки-відбитки.

Усю роботу з трупами тварин проводять, дотримуючись заходів безпеки, які попереджують розповсюдження збудника інфекції. Після закінчення дослідження трупа кювети і робочий стіл дезінфікують. Інструменти стерилізують. Трупи тварин і окремі органи знезаражують автоклавуванням.

Патологічний матеріал, який отримали після розтину трупа зараженої лабораторної тварини, або надісланої до лабораторії досліджують в такій послідовності:

1. Виготовляють мазок, фарбують простим методом, або за Грамом з метою виявлення мікробів (мазки зберігають як документ).
2. Проводять посів на щільні живильні середовища і ставлять в термостат.
3. Вивчають колонії (через добу).
4. Відсівають колонії на щільні середовища і ставлять в термостат.
5. Виготовляють з колоній мазки, фарбують за Грамом і проглядають під мікроскопом.
6. Вивчають характер росту мікробів на живильних середовищах (розмір, форму, колір колоній і зміни в живильних середовищах).
7. Виготовляють, фарбують і продивляють мазки з культури із якого-небудь живильного середовища.
8. Досліджують мікроби на рухливість і спороутворення.
9. Відбирають і заражають тварин відповідно з передбачуваними в матеріалі мікробами.
10. Вивчають і співвідносять усі одержані дані та на підставі усіх ознак визначають вид мікроба.

Контрольні питання

1. Яких тварин використовують для біопроби?
2. Методи фіксації лабораторних тварин.

3. Методи зараження лабораторних тварин.
4. Порядок розтину і бактеріологічне дослідження трупів.

Заняття 10

Тема: Визначення активності антибіотиків і антибіотикорезистентності мікроорганізмів

Мета заняття: навчити студентів визначати активність антибіотиків і антибіотикорезистентність мікроорганізмів.

Матеріальне забезпечення: банка з дезрозчином. Серія послідовних розведень пеніциліну в пробірках на фізіологічному розчині (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Дві чашки Петрі з МПА, бульйонна культура золотистого стафілококу, стерильні паперові диски, культура мікроорганізмів, виділена з патматеріалу. Стерильні пробірки, стерильний фізрозчин у пробірках. Паперові диски, просочені різними антибіотиками, очні піпетки, пінцет, спиртівка.

Зміст заняття: студенти готують ряд розведень антибіотика, що досліджується (1:10, 1:100, 1:1000, т.д.). В чашки Петрі з стерильним МПА вносять культуру тест-мікроба і рівномірно розподіляють по всій поверхні, надлишок зливають в банку з фізрозчином. Чашку залишають на 30 хвилин при кімнатній температурі. Далі паперові диски просочують відповідними розведеннями антибіотика і розташовують на МПА на однаковій відстані одне від одного. У центі чашки Петрі розміщують паперові диски просочені різними антибіотиками: пеніциліном, стрептоміцином, байтрілом та іншими. Антибіотик, яким просочений диск, дифундує в агар і чим більша його активність, тим більша зона відсутності росту тест-мікроба.

Антибіотикорезистентність збудників хвороб перевіряють по відношенню до декількох антибіотиків.

Агарову культуру збудника хвороби, що досліджується змивають фізіологічним розчином і готують одномільярдну суспензію. 1 мл суспензії засівають суцільним шаром в чашку з МПА, надлишок рідини відсмоктують

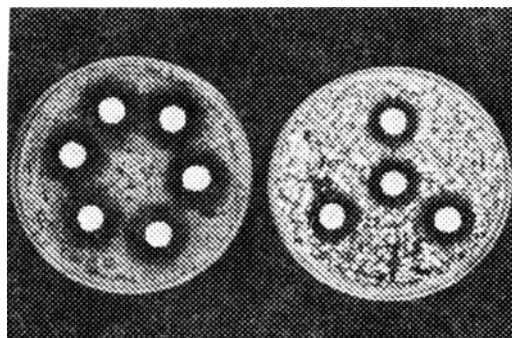


Рис.8 Визначення активності антибіотиків методом дифузії в агар з допомогою паперових дисків.

піпеткою. Засіяні чашки підсушують в термостаті при 37°C 15-30 хвилин. Диски просочені антибіотиками стерильним пінцетом розкладають на відстані 2 см від краю (рис. 8). У одній чашці одночасно розміщують 4-5 різних антибіотиків. Чашки з дисками витримують при кімнатній температурі 2-3 години і далі - у термостаті 14-15 годин при температурі 37°C. За величиною затримки росту збудника судять про його чутливість до відповідного антибіотика. Мікроорганізм вважається чутливим до антибіотика, якщо зона затримки росту дорівнює 15-25 мм, малочутливим - до 15 мм, резистентним при відсутності зони затримки росту.

Контрольні питання

1. Походження антибіотиків. Мікробний антагонізм.
2. Одиниці дії антибіотиків.
3. Методи визначення активності антибіотиків.
4. Визначення резистентності мікробів до антибіотиків.

Заняття 11

Тема: Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту

Мета заняття: ознайомитися з правилами відбору ґрунту та води для бактеріологічного дослідження, вивчити методи бактеріологічного дослідження води, повітря та ґрунту.

Матеріальне забезпечення.

Для дослідження води: батометр, водопровідна вода у колбі, стерильні пробірки, стерильні градуйовані піпетки, стерильні чашки Петрі, МПА, агар Ендо, таблиці.

Для дослідження ґрунту: наважка ґрунту 10 грам, стерильна вода у колбі, марлева салфетка, стерильні колби для приготування суспензії, мірні циліндри, піпетки на 1 мл, чашки Петрі, пробірки з середовищем Кеслера, МПА, агар Ендо, Левіна.

Для дослідження повітря: чашки Петрі з МПА.

Санітарно-бактеріологічне дослідження води. З відкритих водосховищ проби води відбирають з глибини 10-15 см від поверхні і на відстані 10 — 15 см від дна. Із водопроводу воду беруть в

стерильні флакони з притертим корком ємністю 0.5 л, а з глибини водосховища – прив'язаним до жердини батометром або скляною посудиною з притертим корком, до якого прикріплений шнур. Водопровідну воду наливають після попереднього пропалювання крана і витікання перших порцій води з нього протягом 10-15 хв. Воду з колодязя необхідно брати до початку користування ним або через 10-12 год. після припинення користування. Проміжок часу з моменту взяття проби до бактеріологічного дослідження не повинен перевищувати 2 год. (при температурі 1-5°C можна зберігати до 6 год.).

Визначення загальної кількості бактерій у воді. Загальна кількість бактерій у воді показує кількість бактерій у 1 мл води. Воду перед посівом розводять стерильною водопровідною водою 1:10, 1:100 і далі в залежності від забруднення. З кожної проби беруть для посіву не менше двох різних розведень. Воду з артезіанських свердловин та водопроводів можна засівати не розводячи, в кількості 0,5-1 мл. Воду що досліджують добре перемішують і проводять посів у чашки Петрі: 1 мл води градуйованою піпеткою переносять в стерильну чашку, злегка піднявши її кришку. Після цього в чашку наливають 10-12 мл розплавленого та охолодженого до 45°C МПА, чашку закривають і коловими рухами ретельно перемішують МПА з водою.

Чашки ставлять в термостат на добу. По кількості колоній, що вирости судять про кількість мікробів у воді. Загальна кількість бактерій в 1 мл водопровідної води не повинна перевищувати 100 (від 100 до 1000 колоній – вода сумнівна, від 1000 і більше – не придатна до споживання), а відкритих водосховищ – не більш 1000.

Визначення колі-титру води. Наявність у воді кишкової палички є наслідком фекального забруднення і вказує на можливість обсіменіння води патогенними мікроорганізмами. Ступінь забрудненості води кишковою паличкою характеризують колі-титром, що є найменшою кількістю води, в якій виявляють кишкову паличку, або колі-індексом (кількістю кишкової палички, що міститься в 1000 мл води). Для визначення колі-титру використовують бродильну пробу і засіб мембранних фільтрів.

Суть бродильної проби полягає в тому, що воду, яка досліджується в певній кількості висівають на середовище накопичення, після цього за наявності зростання, характерного для кишкової палички, пересівають на диференціально-діагностичні середовища. Беруть три об'єми водопровідної води по 100 мл, три – по 10 мл і три – по 1 мл. Воду в цій кількості висівають в колби і пробірки

з глюкозо-пептонним або лактозо-пептонним середовищем з індикатором і «поплавком». Усі посіви ставлять в термостат на 24 год. За відсутності зростання мікробів, утворення кислоти і газу – результат негативний (вода доброякісна). З пробірок, в яких є зростання бактерій (помутніння і зміна кольору середовища), проводять посів штрихом на поверхню середовища Ендо або Левіна і ставлять в термостат на 16-18 год. З колоній, характерних для бактерій групи кишкової палички, готують мазки, фарбують, мікроскопують. Культуру вивчають за оксидазним тестом – фільтрувальний папір змочують розчином нафтол-диетил-п-фенілендіаміна. Після цього 2-3 ізольовані колонії кожного типу з агару Ендо знімають петлею і переносять штрихом на змочений реактивом папір. Відсутність зміни в забарвленні паперу (негативний результат оксидазної проби) а наявність грамнегативних паличок в препараті (мазку) свідчать про зростання кишкової палички.

Титр кишкової палички для водопровідної води допускається не менше 333 мл, для води відкритих водосховищ – орієнтовно не менше 111 мл.

Спосіб мембранних фільтрів частіше застосовують в лабораторній практиці. Полягає він у тому, що певний об'єм води пропускають під тиском через фільтри, виготовлені з нітроцелюлози, з наступним накладанням їх матовою стороною на поверхню агару Ендо. Їх витримують у термостаті 18-24 год. Після цього підраховують кількість колоній, визначають колі-титр і колі-індекс.

Санітарне-бактеріологічне дослідження повітря.

Повітря не є сприятливим середовищем для існування мікроорганізмів. Мікроби потрапляють у повітря з ґрунту, з поверхні рослин, з води. Кількість та склад мікрофлори у повітрі не постійні. Для санітарної оцінки повітря враховують кількість мікробів у 1 м^3 .

Визначення забрудненості повітря седиментаційним методом. Седиментаційний - спосіб Коха полягає у тому, що чашки Петрі з МПА залишають відкритими на 5-10 хв. в приміщенні. Для визначення цим способом санітарно-показових мікроорганізмів (гемолітичних, стафілококів, стрептококів) чашки Петрі з кров'яним агаром залишають відкритими протягом 40 хв. Після цього чашки закривають, ставлять у термостат на 24 год, підраховують колонії мікробів.

Щоб визначити мікробне число у повітрі (кількість бактерій, що містяться в 1 м^3), його підраховують за формулою Омелянського. Правилком Омелянського передбачається, що на поверхні агару у чашці

Петрі з площею 100 см^2 за 5хв. з повітря осідає така кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря.

При санітарно-бактеріологічній оцінці повітря по наявності патогенних мікроорганізмів (мікобактерій туберкульозу, збудників пастерельозу, бруцельозу та ін.) використовують спеціальні (елективні) середовища. Після інкубації в термостаті проглядають колонії, що вирости, виділяють характерну для цього виду мікроба колонію і вивчають її; з неї готують мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують. Колонію пересівають для одержання чистої культури з наступною її ідентифікацією.

Санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту.

Медицино-ветеринарну службу цікавить виявлення патогенних мікроорганізмів, що потрапляють в ґрунт з трупами тварин, які загинули від інфекційних хвороб з виділеннями хворих тварин, з незараженими стічними водами. В таких випадках ґрунт може виявитися чинником інфікування (сибірка, правець, злякисний набряк та ін.) людей та виникнення інфекційних хвороб.

Бактеріологічний аналіз ґрунту потрібний при виборі території під пасовище, господарські будівлі – гідростанції, дитячі, спортивні майданчики, сади, лікарні. Дослідження зводяться до визначення: мікробного числа (кількість бактерій, що містяться в 1 г ґрунту), колітитру, перфрінгенс-титру, та в окремих випадках проби ґрунту досліджують на наявність певних патогенних мікробів.

Відбір проб ґрунту. На території що обстежується площею до 1000 м^2 , виділяють дві ділянки по 25 м^2 (одну – поблизу джерела забруднення, іншу у віддаленні від нього) . На кожній з двох ділянок (з дотриманням стерильності) беруть проби з 5 місць (4 – по кутах ділянки, одну — по центру на глибині 10-20 см стерильним совком. Відбирають по 200-300 г ґрунту в стерильні банки з ватними корками (можна усі проби з однієї ділянки перемішати і на дослідження направити 1 кг). На банки наклеюють етикетки, відправляють з супровідним листом. Проби ґрунту потрібно досліджувати одразу ж або протягом 6-18 год., зберігаючи їх при температурі не вище $1-5^\circ\text{C}$. В лабораторії пробу ґрунту подрібнюють, відокремлюють від каменів, коренів рослин, просівають через сито, ретельно перемішують і відважують 30 г.

В колбу ємністю 500 мл наливають 270 мл стерильної водопровідної води і вносять в неї відважену пробу ґрунту, усе інтенсивно струшують 10 хв. і, не даючи відстоятися часткам суспензії,

готують серію десятиразових послідовних розведень. Для відносно чистих ґрунтів достатньо 4 міри розведення, для забруднених – 6-9 розведень. З цією метою в штатив ставлять пробірки з 9 мл стерильної води, нумерують. В першу вносять 1 мл суспензії проби ґрунту, змішують, після цього 1 мл з першої пробірки переносять в другу, змішують, з неї 1мл – в третю і т. і. У результаті в пробірці №1 одержують розведення ґрунту 1: 100, № 2 – 1: 1000 і т. і. Підготовлені таким чином проби ґрунту досліджують.

Визначення загального мікробного числа. З останніх 3-4 пробірок з розведеною суспензією окремими стерильними піпетками вносять по 1 мл в стерильні чашки Петрі (кожне розведення окремо). В кожную чашку додають ще по 15-20 мл розплавленого (і охолодженого) до 45°C МПА. Рівномірними обережними обертовими рухами вміст чашок перемішують, залишають на столі для ущільнення агару. Далі чашки перевертають і ставлять у термостат на 24 години. Підраховують колонії що виросли в кожній чашці, множать на ступінь розведення, отримані числа складають і обчислюють середньоарифметичне число, що складе кількість мікробів, які містяться в 1 г ґрунту.

Визначення колі-титру ґрунту. Різноманітні розведення суспензії проби ґрунту окремою стерильною піпеткою засівають у пробірки із середовищем Кеслера. Посіви витримують в термостаті при 43°C протягом 48 годин. Після цього пробірки з посівами продивляються. З тих пробірок, де є газоутворення, висівають штрихом на агар Ендо в чашки Петрі, культивують при 37°C 24 год. Червоні колонії, що виросли на агарі, типові для бактерій роду ешеріхія, досліджують: мазки фарбують за Грамом, мікроскопують. При наявності у мазках поліморфних коротких грамнегативних паличок червоні колонії знов пересівають у середовище Кеслера для підтвердження газоутворення в чистій культурі *E. coli*. Найбільше розведення ґрунтової суспензії, в якій відзначена ферментація лактози (з газоутворенням), відповідає колі-титру ґрунту,

Визначення перфрінгенс-титру в ґрунті. Різноманітні розведення проби ґрунту засівають в пробірки з розплавленим та охолодженим середовищем Вільсона-Блера, інкубують в термостаті 24 – 48 год. при 43°C. *Cl. perfringens* росте в глибині середовища, утворюючи чорні колонії, внаслідок відновлення сульфату натрію до сульфіту натрію, що реагує з хлористим залізом, і утворює сірчисте залізо (чорного кольору). Газу, що накопичується в середовищі в результаті ферментації глюкози, розривають агар, де розміщені колонії

Cl. perfringens. Найбільше розведення ґрунту або найменша її кількість, яка викликала почорніння і розривання щільного середовища Вільсона-Блера в перші 12 год. зростання, відповідає (або прийнято вважати) її перфрінгенс-титру. Виявлення інших патогенних видів мікробів здійснюють посівом суспензії проби ґрунту на спеціальні елективні живильні середовища з наступною ідентифікацією виділених чистих культур збудників хвороб, включаючи біопробу і інші засоби.

Показники санітарно-бактеріологічної оцінки ґрунту

Оцінка ґрунту	Загальне число бактерій в 1г ґрунту	Колі-титр	Перфрінгенс-титр
Чиста	10000	Вище 1	Вище 0,1
Слабо забруднена	Не більше 10000	1-0,01	0,01-0,001
Помірно забруднена	100000-900000	0,01-0,001	0,001-0,0001
Сильно забруднена	1000000 і вище	Нижче 0,001	Нижче 0,0001

Контрольні питання

1. Як визначити загальну кількість мікробів у 1 грамі ґрунту?
2. Порядок визначення колі-титру ґрунту.
3. Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря.
4. Відбір проб води для бактеріологічного дослідження.
5. Визначення загальної кількості мікробів у воді.
6. Живильні середовища для визначення мікробного числа та колі-тиру води, ґрунту.

ЗАНЯТТЯ 12

Тема: ІМУНІТЕТ. СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ

Мета заняття: Розібрати сутність і продемонструвати постановку реакції аглютинації (РА), реакції зв'язування комплементу (РЗК), роз бенгал проби (РБП) і реакції преципітації (РП). Ознайомитися з виготовленням вакцин і імунологічних сироваток.

Матеріальне забезпечення. У штативі: пробірочний метод реакції

аглотинації сироваток у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400; сироватки: бруцельозна на + + + + , + + + , ++ і — (негативна). Для крапельної реакції аглютинації: предметні скельця, випробувана (розведена 1:10) сироватка (позитивна), антиген бруцельозний, ізотонічний розчин натрію хлориду, піпетки, скляні палички для змішування. Для реакції преципітації: сибірковий антиген, сибіркова преципітуюча сироватка (профільтрована), екстракт зі шкіри. Лійка з азбестовою ватою, поставлена у флакон (колбочку) з невеликою кількістю фільтрату. Шматочки шкіри, що направляється для дослідження. Штатив, пробірки Уленгута, пастерівські піпетки. Компоненти й устаткування для демонстрації РБП. Вакцини, сироватки.

Реакція аглютинації (РА). Реакцію ставлять з метою виявлення в досліджуваній сироватці специфічних антитіл (аглютинінів) по відомому антигену чи визначення мікробів по відомій аглютинуючій сироватці. Реакція аглютинації має специфічний характер і проходить у двох фазах. Спочатку відбувається взаємодія антитіл з антигенами, їх детермінантами, розташованими на поверхні мікробних клітин. Притягання антигену й антитіла обумовлено електростатичними (вони володіють протилежними електричними зарядами) і міжмолекулярними силами. Це специфічна і невидима фаза. Друга фаза протікає в присутності електроліту (ізотонічного розчину натрію хлориду), відбувається адгезія (склеювання) і осідання на дно пробірки імунних комплексів (антиген – антитіло), що видно неозброєним оком. Утворені комплекси можуть дисоціювати. При цьому обидва компоненти зберігають свої вихідні властивості.

Мікроби (антиген) вирощують на щільному живильному середовищі (агарі), змивають ізотонічним розчином натрію хлориду, а потім розводять до визначеної концентрації (кількість клітин у 1 мл середовища). Антитіла (аглютиніни) утворюються в організмі і містяться в сироватці крові хворих чи перехворілих тварин. Аглотинація — специфічна реакція, що протікає в ізотонічному розчині натрію хлориду. У неелектролітних розчинах цукру й у дистильованій воді адгезія антигену й антитіла не відбувається. Взаємодія між мікробами (збудниками) і антитілами використовується для діагностики багатьох інфекційних хвороб.

Для постановки реакції аглютинації необхідно мати: сироватку крові досліджуваної тварини, антиген, ізотонічний розчин натрію хлориду, штативи для пробірок, градуйовані піпетки з різними поділками, склянки, ванночки, колби, негативну (нормальну) і

позитивну сироватки. Сироватки, що використовуються повинні бути свіжими чи консервованими борною кислотою в порошку, по 0,5–0,7 г на одну пробірку.

Найбільш широке застосування реакція аглютинації одержала при діагностиці бруцельозу. Її ставлять на ізотонічному розчині натрію хлориду в чотирьох розведеннях: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (для овець, кіз, свиней і собак); у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 (для великої рогатої худоби, коней і верблюдів) у кількості 1 мл кожного розведення. Як контроль використовують негативну (нормальну) сироватку в тих же розведеннях, що і досліджувану; позитивну сироватку до граничного титру й антиген у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

Техніка розливу сироваток. На кожну сироватку беруть чотири пробірки. У першу вносять 2,4 мл, а в наступні по 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. До ізотонічного розчину в першій пробірці додають 0,1 мл досліджуваної сироватки, ретельно перемішують, виходить основне розведення 1:25. З основного розведення 1 мл переносять у другу пробірку і перемішують, із другої – у третю, із третьої – у четверту. Після перемішування з четвертої пробірки видаляють піпеткою 1 мл розведення, з першої – 0,5 мл. У результаті в кожній пробірці залишається по 1 мл розведеної сироватки, тобто той об'єм, у якому йде реакція аглютинації. Після розливу сироваток в усі пробірки додають по 0,05 мл антигену.

Сироватку можна розливати і мікропіпеткою в дозах 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 мл, що відповідає розведенням 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Фабричний антиген (10 млрд. мікробних клітин у 1 мл) розводять у 20 разів до 500 млн мікробних клітин у 1 мл і додають у кожну пробірку по 1 мл. Кожну сироватку розливають окремою піпеткою ретельно промивають її до 6 разів у двох-трьох склянках з ізотонічним розчином натрію хлориду. Для прискорення постановки реакції аглютинації застосовують апаратуру Флоринського, що дає можливість розливати кожен компонент одночасно в десять пробірок. Пробірки струшують, ставлять у термостат на 4 год., потім витримують при кімнатній температурі до 18 год., після чого реакцію читають. Спочатку переглядають пробірки з контрольними сироватками, а потім з досліджуваною. Для більш об'єктивної оцінки реакції аглютинації одночасно готують стандарт мутності з антигену.

При позитивній реакції аглютинації на дно пробірки випадає осад зі склеєного комплексу антиген – антитіло, утворюючи «парасольку», а

рідина (розчин) просвітлюється, тобто стає прозорою. При струшуванні осад розбивається на пластівці чи крупинки. При негативній реакції аглютинації рідина залишається мутною, у центрі дна пробірки мікроби (антиген) осідають у вигляді крапки.

+ + + + Повне просвітління рідини при наявності різко вираженої «парасольки», при струшуванні розбивається на пластівці, грудочки.

+ + + Те ж, але рідина злегка опалесцирує.

+ + Слабке просвітління рідини, «парасолька» розбивається при струшуванні на пластівці, грудочки, крупинки.

+ Просвітління відсутнє, «парасолька» виражена слабо.

– Каламуть, «парасолька» відсутня.

Позитивною сироватка вважається при наявності мікроскопічної аглютинації (+ +) у розведенні 1:50 для свиней, овець, кіз, собак і 1:100 для великої рогатої худоби, коней і верблюдів.

Пластинчаста (крапельна) реакція аглютинації.

Мікропіпеткою на чисте рівне скло наносять 0,04; 0,02; 0,01 мл одержаної сироватки. До кожної дози сироватки додають по одній краплі антигену, який у кожній пробі, починаючи з 0,01 мл, змішують із сироваткою чистою скляною паличкою. Перше розведення відповідає 1:50, друге—1:100, третє – 1:200. Якщо сироватка містить специфічні аглютиніни, то через кілька хвилин після змішування її з антигеном у краплі з'являються крупинки або пластівці, а рідина стає прозорою. Якщо в сироватці аглютинінів немає, то крапля залишається рівномірно мутною.

Прискорена реакція аглютинації. Прискорену реакцію аглютинації ставлять шляхом нанесення на один кінець предметного скла розбавленої досліджуваної сироватки, на іншій — краплі ізотонічного розчину натрію хлориду (контроль). Потім до обох крапель піпеткою додають таку ж кількість суспензії мікробів і розмішують до одержання однорідної суміші. При наявності у досліджуваній сироватці специфічних антитіл відбувається адгезія мікробів. У контролі рівномірна каламуть, аглютинації немає; у досліді – склеювання мікробів і антитіл, утворення крупинок і пластівців.

Реакція зв'язування комплексу (РЗК). За своєю чутливістю реакція зв'язування комплексу (РЗК) займає перше місце, що дозволяє виявити більшу кількість реагуючих. Сутність реакції полягає в тому, що комплекс, будучи доданий до специфічного комплексу (антиген–антитіло), зв'язується останнім. Це можна установити після додавання гемолітичної системи (гемолітична сироватка + еритроцити

барана). Якщо комплекс зв'язаний у бактеріальній системі, то гемоліз еритроцитів не відбудеться – реакція позитивна. При наявності вільного комплементу, а це буває в тому випадку, якщо в досліджуваній сироватці немає специфічних антитіл, він переходить у гемолітичну систему і викликає гемоліз еритроцитів – реакція негативна. Для постановки реакції необхідні найменші кількості кожного з компонентів, що визначають титруванням. При цьому треба мати: досліджувану сироватку (інактивовану), антиген (сапний, бруцельозний і т.д.), комплемент – свіжа чи консервована сироватка морської свинки, гемолітичну сироватку (сироватка кролика, імунізованого еритроцитами барана), еритроцити барана, ізотонічний розчин натрію хлориду (середовище, у якому йде реакція). Антиген і гемолітичну сироватку готують біофабрики, інші компоненти одержують у лабораторії.

У ветеринарній практиці РЗК ставлять при діагностиці сапу, бруцельозу, лістеріозу і ін. Реакція йде в двох системах: бактеріальній і гемолітичній. Бактеріальна система містить у собі розведені: досліджувану сироватку, антиген і комплемент, по 0,5 мл кожного компонента. Досліджувана сироватка попередньо інактивується у водяній бані при температурі 58–60° С. При з'єднанні всіх компонентів пробірки ставлять у водяну баню на 20 хв при температурі 37–38°С. Потім вносять гемолітичну систему (гемолітичну сироватку в робочому титрі і 2,5%-ну суспензію еритроцитів барана, по 0,5 мл кожного компонента) і знову витримують у водяній бані при 37–38°С протягом 20 хв. Загальний об'єм компонентів, що беруть участь у реакції, становить 2,5 мл. При масових дослідженнях об'єм компонентів зменшують наполовину.

Облік реакції проводять двічі: після закінчення досліду і після 14-годинної витримки при кімнатній температурі.

Позитивна реакція характеризується повним просвітлінням середовища, еритроцити осідають на дно.

Сумнівна – середовище злегка забарвлене, відбулося часткове руйнування еритроцитів.

Негативна – середовище інтенсивно забарвлене в червоний колір – повний гемоліз еритроцитів.

Поряд із РЗК ставлять РТЗК – реакцію тривалого зв'язування комплементу, що відбувається на холоді.

Роз бенгал проба (РБП) – пластинчаста реакція аглютинації з роз бенгал антигеном (бруцельозним антигеном, який забарвлений

бенгальським рожевим). РБП застосовують при дослідженні сироватки крові для діагностики бруцельозу у великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, верблюдів і північних оленів.

Для постановки реакції необхідні: роз бенгал антиген (бруцельозний); позитивна аглютинуюча і негативна сироватки великої рогатої худоби; 0,5%-ний фенолізований ізотонічний розчин натрію хлориду. Сироватки крові повинні бути прозорі, без домішки еритроцитів, і досліджуються не пізніше ніж через 4 дні зберігання при температурі 4–8°C. Сироватки, консервовані сухою борною кислотою (2% борної кислоти до об'єму сироватки), придатні для дослідження протягом 14 днів.

Техніка постановки РБП. Досліджувані сироватки крові в дозі 0,03 мл за допомогою шприца–напівавтомата або піпетки-крапельниці вносять на дно виямки чистих сухих металевих емальованих пластинок. Шприц або піпетку після внесення сироватки тричі промивають фенолізованим ізотонічним розчином натрію хлориду і висушують. Поруч із сироваткою за допомогою піпетки-крапельниці вносять 0,03 мл (дві краплі) антигену (при дослідженні сироваток великої рогатої худоби, коней, верблюдів і свиней) і 0,015 мл (одну краплю) при дослідженні сироваток крові овець, кіз і північних оленів. Потім краплю ретельно змішують і погойдують протягом 4 хв. Якщо в розчині з'являються пластівці рожевого кольору, то реакція вважається позитивною. При наявності гомогенної рівномірно пофарбованої суміші, відсутності аглютинації реакція вважається негативною. Сироватки, визначені в РБП як позитивні, потім досліджують у РА і РЗК (РТЗК), за допомогою яких установлюють титр аглютинінів і наявність комплементзв'язуючих антитіл.

Остаточний результат визначають з обліком даних усіх реакцій.

Сироватка вважається позитивною при такій оцінці реакцій: РБП +, РА + + +, РЗК + +; сумнівною – при РБП +, РА –, РЗК –. Сумнівну сироватку через 15–30 днів досліджують повторно. Якщо вона дає таку ж реакцію, то її вважають позитивною. Негативна РБП вважається кінцевим результатом, подальше дослідження сироватки крові в РА і РЗК не проводиться.

Реакція преципітації. При реакції преципітації, як і інших імунологічних реакціях, відбувається специфічне з'єднання антигену й антитіла. На місці з'єднання преципітуючої сироватки й екстракту (антигену) з'являється преципітат (сіро-біле кільце). Перевага цієї реакції в тому, що з її допомогою можна досліджувати матеріал, що

розклався, шкіряно-хутряну сировину. Реакцію преципітації ставлять при дослідженні шкіряно-хутряної сировини на сибірку. Антигеном тут буде соматичний полісахарид (гаптен), що міститься в стінці бацили антракса. Він термостабільний. Перед постановкою реакції сировину стерилізують у паровому стерилізаторі, щоб забезпечити подальшу роботу з ним.

Антиген готують у такий спосіб: беруть 1–2 г здрібненої шкіри, заливають 10 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, кип'ятять 30–40 хв (гарячий спосіб) чи витримують при кімнатній температурі 16–18 год. (холодний спосіб), після чого фільтрують через лійку із азбестовою ватою. Фільтрат повинний бути абсолютно прозорим. Преципітуючу сироватку готують на біологічних фабриках шляхом гіперімунізації коней вбитими і живими ослабленими бацилами сибірки. Перед постановкою реакції преципітації сироватку фільтрують.

Постановка реакції преципітації. У спеціальні, чисто вимиті, прозорі і сухі пробірки Уленгута наливають по 0,3 мл преципітуючої сироватки (сибіркової). Потім пастерівською піпеткою нашаровують екстракт у тій же кількості. Можна підшаровувати сироватку (питома вага сироватки вища, ніж в екстракта).

У лабораторіях при масових дослідженнях шкіряно-хутряної сировини на сибірку застосовують апаратуру Флоринського. Реакція вважається позитивною, якщо на границі обох рідин з'являється преципітат – сіро-біле кільце. Прісно-суху, парну, морожену шкіряно-хутряну сировину читають через 15 хв, мокросолену – через годину. Перед початком роботи ставлять такі контролі: сибірковий антиген і преципітуюча сироватка – реакція позитивна; сибірковий антиген і нормальна сироватка – реакція негативна; ізотонічний розчин натрію хлориду і преципітуюча сироватка – реакція негативна.

Реакція преципітації в агаровому гелі. Реакція преципітації строго специфічна і дозволяє знайти в матеріалі незначні кількості антигену (до 10^{-6} білка). Дифузійну реакцію преципітації ставлять у чашках Петрі з агаром, у якому на однаковій відстані один від одного за допомогою порожньої металевої трубки, з'єднаної з вакуумом, вирізують кілька виямок округлої форми. У центральну виямку вносять сироватку, що містить антитіла, в інші – досліджувані антигени або один антиген у різних розведеннях. Внесені речовини в шарі агарового гелю дифундують назустріч один одному. На місці зустрічі антитіла й антигену утворюються зони преципітації (мутні смуги у вигляді дуг). Є

різні модифікації цієї реакції. У лабораторній практиці застосовують також імуноелектрофорез, імунофлюоресцентний і інші методи.

Вакцини. Вакцини застосовують із запобіжною метою, вводять здоровим тваринам, після чого в них через 10–14–20 днів виробляється імунітет. Вакцини готують з ослаблених (атенуйованих) живих культур або оброблених формаліном, фенолом і іншими хімічними речовинами (інактивовані вакцини). Прикладом живих атенуйованих і інактивованих можуть служити такі вакцини.

Живі атенуйовані вакцини. Сибіркова вакцина СТІ – суспензія спор безкапсульного слабо вірулентного штаму збудника сибірки в 30%-ному розчині гліцерину або дистильованій воді.

Гідроокисалюмінієва вакцина ДНКІ проти сибірки. Суспензія живих слабовірулентних спор штаму Ш-15 у гідроокисі алюмінію. Такі вакцини з 1961р. випускаються в сухому вигляді (без гліцерину і гідроокисі алюмінію). Їх одержують методом ліофілізації (висушування із замороженого стану під вакуумом).

Суха вакцина проти бруцельозу зі штаму 19. Слабовірулентна культура живих бруцелл Вг. abortus у захисному сахарозно-желатиновому середовищі.

Депонована вакцина проти бешихи свиней. Культура бешихи свиней з матрикса Конєва, адсорбована на фосфатно-буферному розчині гідрату окису алюмінію й ін.

Інактивовані вакцини. *Концентрована гідроокисалюмінієва формолвакцина проти емфізематозного карбункула великої рогатої худоби.* Формалінізована бульйонна культура збудника емкару, осаджена гідратом окису алюмінію.

Імунні сироватки. Їх одержують при гіперімунізації тварин — введенні збудників в дозах, що збільшуються, проти якого хочуть виробити сироватку. Для цієї мети на біофабриках використовують тварин-продуцентів: коней, велику рогату худобу, свиней, овець і ін. У результаті гіперімунізації тварин (до трьох місяців) у них виробляються антитіла.

Сироватка здатна захистити тварину від захворювання або запобігти подальшому розвитку інфекції, якщо вона з'явилася. Сироваткою протягом декількох годин створюється пасивний імунітет, що триває 10–14 днів. Сироватки являють собою злегка опалесцюючі рідини жовтого кольору. При тривалому зберіганні на дно ємкості випадає осад, при струшуванні він розбивається в рівномірну каламуть. Відомі імунні сироватки проти багатьох хвороб: сибірки, бешихи

свиней, сальмонельозу і колібактеріозу телят (бівалентна антитоксична сироватка), диплококової інфекції молодняку, а також проти правця (антитоксична) і ін.

ЗАНЯТТЯ 13

Тема: ЗБУДНИКИ СИБІРКИ, ЕМФІЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА (ЕМКАРУ), ТУБЕРКУЛЬОЗУ, БЕШИХИ СВИНЕЙ

Мета заняття: Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників: сибірки, емфізематозного карбункула (емкару), туберкульозу і бешихи свиней. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Матеріальне забезпечення: пофарбовані мазки мікробів-збудників: сибірки, емфізематозного карбункула, туберкульозу і бешихи свиней. Мікроскопи. Кедрова олія. На штучних живильних середовищах культури збудників: сибірки на МПБ і МПА (у пробірках) і на чашці Петрі для перегляду країв колоній (вакцинний штам).

Таблиці: збудники інфекційних хвороб; морфологія і ріст збудників на живильних середовищах. Діафільми.

Сибірка – гостра, інфекційна хвороба тварин і людини. Збудник – *Vac. anthracis*.

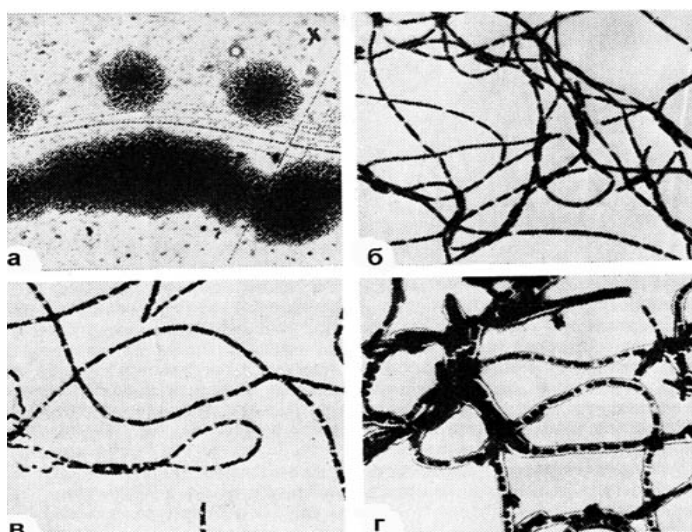


Рис. 9. Збудник сибірки: а–колонії, б–однодобова культура, в–дводобова культура, початок утворення спор, г– капсула навколо клітин

Морфологія. Велика, пряма, нерухома паличка. По Граму фарбується позитивно. В організмі утворює капсулу, поза організмом – спору, що має овальну форму і розташовується в центрі клітки. У препараті палички розташовуються поодинокі, попарно чи ланцюжком (рис.9).

У висячій краплі кінці паличок закруглені, у пофарбованих препаратах вони ніби обрублені. При наявності вологи, доступі кисню і температурі 12-42°C збудник утворює спори. Є й аспорогенні культури. Капсули фарбуються по Ольту, Міхіну й іншими методами, спори – по Златогорову, Пешкову

Культурально-біохімічні властивості. Збудник сибірки не вибагливий до живильних середовищ, росте на МПБ і МПА з рН 7,0-7,4. На МПБ – середовище прозоре, на дні утворюється пластівчастий осад у вигляді грудочки вати. При струшуванні осад розбивається з трудом. На МПА утворює колонії, що нагадують голову медузи. Края колонії локоноподібні, що представляють довгі нитки, утворені клітинами збудника. Поверхня колоній матова зі сріблястим відтінком. Локоноподібні края колоній добре видно під малим збільшенням мікроскопа. На МПЖ, розлитій в пробірки стовпчиком, при посіві уколом через 2-3 доби з'являється ріст у вигляді ялинки, спрямованою верхівкою вниз. Це вказує на те, що збудник сибірки – аероб. Розріджена желатина нагадує за формою лійку. Через 3-4 дні збудник згортає молоко.

Стійкість. Вегетативні форми збудника сибірки малостійкі. Вони гинуть протягом декількох діб. У літню пору у трупі тварини збудник лізується протягом 1-3 діб. Його антагоністи — гнильні мікроби. Спори дуже стійкі, вони зберігаються роками, а в ґрунті десятиріччями.

Розтинати трупи тварин, що загинули від сибірки, забороняється!

У лабораторію направляють товсті нефіксовані мазки крові або вуха, відрізане між лігатурами з тієї сторони, на якій лежав труп, і припечене на місці розрізу.

Біологічну пробу ставлять (проводять) на білих мишах, морських свинках, кролях одночасно з мікроскопією і посівом матеріалу. Через 1-3 доби тварини гинуть. Виділення збудника з органів і тканин лабораторної тварини з врахуванням інших ознак служить підтвердженням діагнозу на сибірку. При необхідності ставлять реакцію преципітації із знезараженим матеріалом.

Емфізематозний карбункул (емкар) – гостра інфекційна хвороба великої і дрібної рогатої худоби. Збудник *Cl. chauvoei*.

Морфологія. Товста паличка з закругленими краями, розміщується поодинокі чи парами. Іноді спостерігаються поліморфні форми. Паличка рухлива, капсул не утворює. Спори утворюються в трупі, мають овальну форму, розташовуються на одному з кінців клітини або ближче до центра і значно перевищують її поперечник (рис.10). Спори з'являються також у культурах. Молоді культури за Грамом фарбуються позитивно, старі – негативно.

Культурально-біохімічні властивості. Збудник – облигатний анаероб. Росте на середовищі Кітта-Тароцці (МППБ), утворюючи каламуть і газ. Старі культури мають специфічний запах прогірклої олії. На кров'яному агарі ріст у вигляді плоских з підвищенням у центрі колоній, іноді форма колоній нагадує виноградний листок.



Рис.10. Збудник емфізематозного карбункулу з уражених м'язів

Стійкість. Мікроби в споровій формі дуже стійкі і можуть у ґрунті зберігатися десятки років.

Чутлива до емкару з лабораторних тварин морська свинка. Її заражають суспензією з патологічного матеріалу (уражених м'язів) внутрім'язево. При наявності збудника хвороби в матеріалі і інших умов морська свинка через 1–2 доби гине. Діагноз ставлять на підставі клініки хвороби, картини патологоанатомічного розтину, мікробіологічного і біологічного досліджень.

Туберкульоз — хронічна інфекційна хвороба тварин, птахів і людини. Збудник *Mycobacterium tuberculosis*.

Морфологія. Тонка, пряма чи злегка вигнута паличка. Нерухома. Спор і капсул не утворює. Клітина має у своєму складі жировоскові речовини. Стійка до кислот, спирту і лугу. Такі мікроорганізми фарбуються за Ціль-Нільсеном.

Техніка фарбування:

1. На мазок, фіксований на полум'ї пальника, кладуть фільтрувальний папір, пофарбований фуксином основним феноловим Ціля. На неї наносять декілька крапель дистильованої води і фарбують протягом 5 хв при підігріванні до появи пари.

2. Після остигання мазка папір знімають і промивають водою.

3. Мазок знебарвлюють 5%-ною сірчаною кислотою або 3%-ною соляною кислотою в 95%-ному етиловому спирті шляхом занурення скла на 3–5 секунд у склянку з розчином.

4. Мазок ретельно промивають водою.

5. Додатково фарбують протягом 2–3 хв метиленовим голубим чи водним розчином малахітового зеленого.

6. Барвник змивають водою, препарат висушують.

Мікроскопічна картина: туберкульозні палички пофарбовані в рубіново-червоний колір, а фон – у колір додаткового барвника. За Грамом туберкульозні палички забарвлюються позитивно.

У залежності від походження і патогенності розрізняють п'ять типів збудника: людський (*M. tuberculosis humanum*), бичачий (*M. bovis*), пташиний (*M. avium*), мишачий (*M. murium*), холоднокровних (*M. poykilothermorum*).

Типи збудника туберкульозу неоднакові за формою. Паличка людського типу тонка, довга, злегка вигнута; бичачого – товща і коротша, ніж у збудника людського типу; пташиного – тонка, довга, іноді розгалужується. Палички мишачого типу і холоднокровних подібні. Припускають, що всі типи туберкульозної палички – різновидності одного збудника, який в процесі паразитування пристосувався до різних видів тваринного організму.

Культурально-біохімічні властивості. Туберкульозні мікобактерії ростуть на елективних середовищах: гліцериновому агарі, гліцериновому бульйоні, гліцериновій картоплі, яєчних і інших середовищах. Реакція середовища повинна бути нейтральною чи слаболужною. Колонії збудників з'являються не раніше ніж через 2–3 тижні, а виділених з організму – через 3–4, а іноді і пізніше. Більш швидкий ріст протягом перших п'яти днів спостерігається в атипічних мікобактерій IV групи за класифікацією Раніона (Е. Н. Runyon, 1959), що не викликають у тварин змін, характерних для туберкульозу, але володіють сенсibiliзуючими властивостями – підвищують чутливість до туберкуліну. Іноді атипічні мікобактерії вражають шкіру, легені і інші органи (мікобактеріози) у людей.

На м'ясопептонному бульйоні з гліцерином (4–5%) ріст у вигляді поверхневої плівки спостерігається через два тижні. Культури бичачого типу утворюють на поверхні середовища ніжну плівку, людського – складчасту і товсту, бульйон же залишається прозорим. На м'ясопептонному агарі з гліцерином (2–3%) ріст культури у вигляді сухого нальоту з'являється до кінця другого тижня. На гліцериновій картоплі туберкульозні бактерії утворюють колонії у вигляді бородавчастих розрощень. Збудник туберкульозу птиці росте порівняно швидко і рясно, на середовищах із гліцерином колонії бувають округлі, гладенькі і блискучі.

У лабораторію для дослідження на туберкульоз направляють: мокротиння, трахеальний слиз, молоко, а від тварин, що загинули – уражені органи (легені, кишечник, лімфатичні вузли і інше). Мокротиння беруть із трахеї за допомогою стерильного ватяного тампона на дроті, що потім поміщають у стерильну пробірку або флакон. Молоко краще брати з ураженої частки вим'я після здоювання перших порцій в окремий посуд, потім його центрифугують і досліджують осад. З уражених ділянок (вузликів, гною) готують мазки, роблять посіви і заражають лабораторних тварин. У залежності від передбачуваного виду мікобактерій туберкульозу використовують різних лабораторних тварин: морських свинок, кролів, курей і ін. Частіше для біологічної проби використовують морську свинку (трьох). Через 2–3 тижні спостерігається збільшення й ущільнення регіонарних лімфатичних вузлів. Тварини поступово худнуть і через 1–3 міс гинуть. А якщо через три місяці не настає смерть, то тварин убивають і проводять мікробіологічне дослідження паренхіматозних органів.

Виявлення в тварин, що загинули характерних змін у вигляді горбків із просяне зерно в лімфатичних вузлах, селезінці, печінці і виділення культури збудника вказують на наявність туберкульозної інфекції.

Хворі тварини чутливі до продуктів розпаду туберкульозних бактерій. Ця властивість використовується для діагностики хвороби алергічним методом. В даний час для алергічної діагностики туберкульозу у тварин і птиці застосовують альттуберкулін і сухий очищений туберкулін (ППД-протеїн пурифієд дериват). До сухого очищеного туберкуліну біофабрики випускають розчинник, що може бути в ампулах або флаконах. Такий сухий туберкулін застосовують майже усім тваринам (крім свиней і мавп), його вводять внутрішкірно чи наносять на кон'юнктиву ока. У хворих тварин на місці введення

препарату з'являється болюча, розлита припухлість або слизисто-гнійне виділення з ока.

Бешиха свиней – септична інфекційна хвороба тварин у віці 3–12 міс. Збудник - *Erysipelotrix insidiosa* (Bact. rhusiopathiae suis).

Морфологія. Збудник має форму тонких, коротких, прямих чи злегка вигнутих паличок (рис. 11). Вони розташовуються поодинокі або парами, іноді у вигляді ниток. Збудник – мікроаерофіл, грампозитивний, нерухомий. Спор і капсул не утворює.



Рис. 11. Збудник бешихи свиней

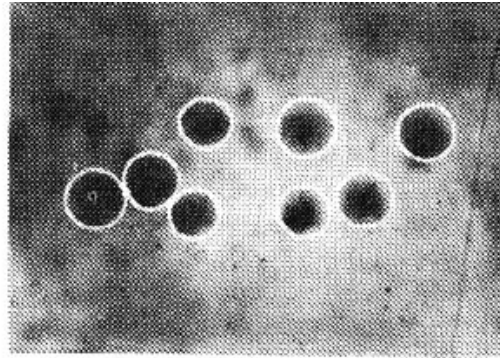


Рис.12. Колонії збудника бешихи

Культурально-біохімічні властивості. Роста на звичайних живильних середовищах. На МПБ утворює слабку рівномірну каламуть, на МПА – дрібні, прозорі, круглі, що нагадують крапельки роси колонії (рис.12). На МПЖ – ріст по уколу у вигляді горизонтальних відростків однакової величини. Желатин не розріджує. Розкладає лактозу, глюкозу, левульозу, галактозу, арабінозу, ксилозу з утворенням кислоти, але без газу. Утворює сірководень. Мікроб піддається мінливості: на щільному живильному середовищі утворює гладенькі і шорсткуваті колонії. Клітини мають воскоподібну оболонку.

Стійкість. Збудник стійкий у зовнішньому середовищі, у патологічному матеріалі він зберігається місяцями. Широко розповсюджений у природі. Сприйнятливі з лабораторних тварин: голуби, білі миші. У лабораторію для дослідження направляють трубчасту кістку, свіжі уражені органи.

Діагноз ставлять на підставі клініки хвороби, картини патологоанатомічного розтину і мікробіологічного дослідження.

ЗАНЯТТЯ 14

Тема: ЗБУДНИКИ БРУЦЕЛЬОЗУ, КОЛІБАКТЕРІОЗУ, САЛЬМОНЕЛЬОЗУ, ТРИХОФІТІЇ (ТРИХОФІТОЗУ)

Мета заняття. Пофарбувати бруцели за Козловським, замалювати препарат і вивчити властивості збудника. Провести мікроскопію, замальовку і вивчення властивостей збудників колібактеріозу і сальмонельозу. Ознайомитися з діагностикою трихофітії і замалювати уражене волосся.

Матеріальне забезпечення. У пробірках: суміш бруцельозного антигену з молоком чи іншими мікробами, великими за розмірами. Пофарбовані препарати збудників колібактеріозу і сальмонельозу. Препарати збудника трихофітії – уражене волосся (мегаспорови).

Для фарбування за Козловським: 2%-ний водний розчин сафраніну, 1%-ний розчин малахітового зеленого.

Мікроскопи, кедрова олія. Мікробіологічні петлі. Пінцети. Зливні чашки, містки. Вода дистильована в колбах для промивання мазків. Спиртівки. Культури кишкової палички і сальмонел на МПБ і МПА, на середовищах з вуглеводами (середовищах Гісса), молоці, середовищі Ендо.

Таблиці: збудники інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин; біохімічна диференціація ешерихій і сальмонел.

Бруцельоз – хронічна хвороба тварин і людини. Протікає латентно, клінічно проявляється абортами і такими ускладненнями: затриманням посліду, ендометритом.

Збудник – бактерії роду *Brucella*, що включає шість основних видів.

Br. melitensis – збудник бруцельозу в овець і кіз.

Br. abortus - збудник бруцельозу у великої рогатої худоби.

Br. suis – збудник бруцельозу у свиней, північних оленів.

Br. neotomae – збудник бруцельозу в пацюків (пустельних і деревних).

Br. ovis – збудник інфекційного епідіміту баранів і абортів в овець.

Br. canis – збудник бруцельозу в собак.

Морфологія. За формою усі види бруцел подібні між собою. Бруцела — дрібна поліморфна паличка (кокобактерія) (рис.13). У мазках збудник розміщується окремими клітинами або скупченнями. Спор і капсул не утворює. За Грамом не фарбується. Найбільш демон-

стративно бруцели фарбуються за методом Козловського, що заснований на властивості «запізнювання» бактерій до фарбування.

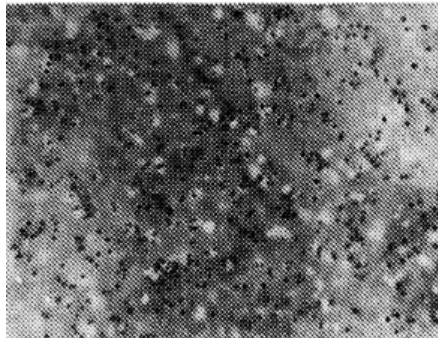


Рис.13. Збудник бруцельозу

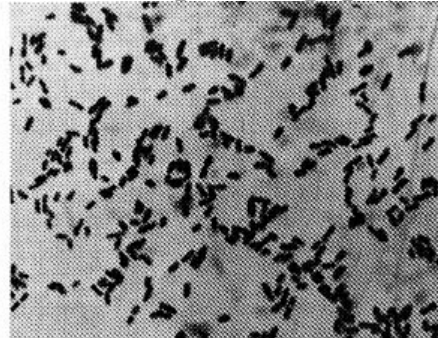


Рис.14. Збудник колібактеріозу

Техніка фарбування. Мазок фіксують над полум'ям пальника. Потім його фарбують 2%-ним водним розчином сафраніну при слабкому підігріванні протягом 4–5 хв. Промивають водою і дофарбовують 1%-ним водним розчином малахітового зеленого протягом 1 хв. Барвник змивають водою і висушують.

Мікроскопічна картина: бруцели червоні з коричнюватим відтінком, тло та інша мікрофлора пофарбована в зелений колір.

Культурально-біохімічні властивості. Бруцели ростуть на печінкових середовищах при температурі 37°C. Ріст їх дуже повільний, у зв'язку з чим культуру витримують до місяця в термостаті. Для росту збудника необхідно знижений зміст кисню і збільшений – CO₂. Такі умови створюються шляхом ізоляції культури від повітря, для чого у середину пробірки проштовхують корок і заливають його зверху парафіном. Найбільш сприятливе середовище для вирощування бруцел – агар Хеддльсона, картопляне середовище, кров'яний агар і інші.

Стійкість. Бруцели стійкі в природних умовах, особливо узимку. При низькій температурі вони можуть зберігатися місяцями. У ґрунті виживають до 100, у воді – до 150 днів. У молоці бруцели можна знайти через тиждень, у сирі – через місяць, в маслі – через два місяці. В овечій і козячій вовні бруцели зберігаються до 3–4 міс. При температурі 70°C і вище бруцели швидко гинуть.

Діагноз на бруцельоз ставлять на підставі мікробіологічного і серологічного (РА, РЗК, РДЗК, РБП) досліджень з врахуванням епізоотичних, клінічних і патологоанатомічних даних.

Для мікробіологічного дослідження в лабораторію направляють: абортований плід чи його перев'язаний шлунок із вмістом; від убитих тварин – лімфатичні вузли і паренхіматозні органи. Для серологічного дослідження - сироватку крові.

Діагноз на бруцельоз можна ставити також алергічним методом:

бруцелізатом в овець і кіз. Препарати (алергени) вводять внутрішкірно. На місці ін'єкції у хворих тварин з'являється припухлість – реакція на введення алергену.

Колібактеріоз – гостра інфекційна хвороба молодняку сільськогосподарських тварин у перші дні життя. Збудник – *E. coli* і її різновиди.

Морфологія. Ешерихія – коротка, товста, із закругленими кінцями паличка (рис.14). Спор і капсул не утворює. Факультативний анаероб. Рухливість виражена в різній ступені. Зустрічаються і нерухомі штами. У мазках розташовується поодинокі або скупченнями. За Грамом фарбується негативно.

Культурально-біохімічні властивості. Кишкова паличка росте на простих середовищах із рН 7,2–7,4 при температурі 10–46°C. Ріст при високій температурі (43–46°C) дозволяє виділити її з води, молока й інших субстратів. На МПБ утворює рівномірну каламуть, на дні осад, що легко розбивається, на МПА – колонії округлі, прозорі з голубим відтінком, що згодом приймають сіро-білий колір. МПЖ не розріджує, росте по уколу у вигляді шнура.

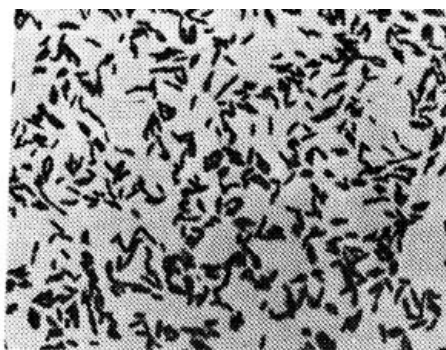
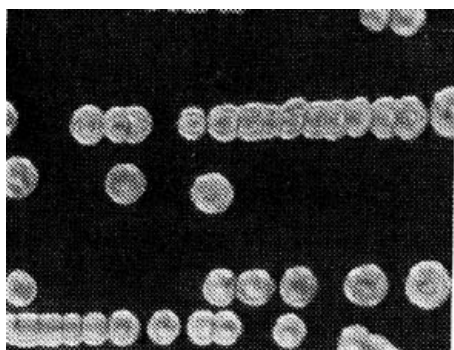


Рис. 15. Колонії збудника колібактеріозу Рис.16. Збудник сальмонельозу на середовищі Ендо

У кишкової палички добре виражена біохімічна активність. Мікроб розкладає багато вуглеводів і багатоатомних спиртів. На відміну від збудника сальмонельозу зброджує лактозу з утворенням кислоти і газу. Згортає молоко. На середовищі Ендо (рис.15) колонії червоного кольору з металевим відтінком. З газів утворює аміак і індол. Ешерихії дають позитивну реакцію з метиловим червоним, не утворює ацетилметилкарбінол (реакція Фогес – Проскауера негативна).

Збудник утворює екзо- і ендотоксини, що часто є причиною гострих шлунково-кишкових захворювань молодняку сільськогосподарських тварин. Екзотоксин руйнується при доступі повітря. Кишкова паличка — постійний мешканець шлунково-кишкового тракту.

Діагноз ставлять на підставі мікробіологічних, біологічних досліджень з урахуванням віку тварини і клініки хвороби. У лабораторію направляють трубчасту кісту і свіжі паренхіматозні органи. Серед ешерихій можуть бути і апатогені штами. Виділення кишкової палички з патологічного матеріалу не завжди може бути доказом причини загибелі тварини, тому отриманою культурою заражають білих мишей, морських свинок. Їхня загибель у комплексі з іншими даними досліджень може служити підставою для постановки діагнозу на колібактеріоз.

Сальмонельоз – гостра інфекційна хвороба молодняку сільсько-господарських тварин у віці 10–40 днів. Збудники: *Salmonella dublin*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. cholerae suis*, *S. abortus ovis* і ін.

Морфологія. Сальмонельозна паличка за розмірами (довжині) така ж, як і кишкова, але набагато тонша (рис.16). Рухлива, за винятком *S. pullorum* і *S. gallinarum*. За Грамом не фарбується.

Культурально-біохімічні властивості. Сальмонела – факультативний аероб. На МПБ утворює інтенсивну каламуть, на дні пробірки – сіро-білий осад, на поверхні середовища – іноді плівку, на МПА – напівпрозорі округлі колонії, навколо яких згодом з'являються слизуваті валики.

У біохімічному відношенні збудник сальмонельозу менш активний, ніж збудник колібактеріозу. Він не розкладає лактозу. Не згортає молоко (навіть при нагріванні). Не розріджує желатин. Не утворює індол. Збудники сальмонельозів молодняку виділяють сірководень. Сальмонели відновлюють нітрати в нітрити. На середовищі Ендо колір колоній не змінюється. Диференціацію штамів збудників сальмонельозу проводять серологічними методами (РА) за допомогою специфічних сироваток. Реакцію ставлять на склі. Антигеном служить одноклобова культура збудника, вирощена на м'ясопептонному агарі і змита ізотонічним розчином натрію хлориду. За заздалегідь відомою сироваткою визначають тип мікроба.

Діагноз. У лабораторію направляють паренхіматозні органи і трубчасту кістку. Поряд з мікробіологічними дослідженнями проводять і біологічні: вірулентність культури перевіряють на білих мишах, для чого роблять змив агарової культури (концентрація 50–100 млн. мікробних клітин у 1 мл) і вводять її підшкірно в дозі 0,2–0,3 мл. Сальмонели містять термостійкі ендотоксини, що, потрапляючи з м'ясними продуктами в їжу, викликають отруєння в людини. Диференціацію збудників сальмонельозу і колібактеріозу проводять на

середовищах з вуглеводами і багатоатомними спиртами (середовищах Гісса). Через 10-14 днів після захворювання у тварин можна досліджувати сироватку крові. Виявлення РА специфічних антитіл може служити підтвердженням позитивного діагнозу.

Дерматомікози – інфекційні хвороби шкіри і її похідних. Хворіють усі види тварин і людина. Найбільше поширення має трихофітія (трихофітоз, стригучий лишай), уражається частіше молодняк великої рогатої худоби і інші види тварин. У меншій ступені зустрічається захворюваність мікроспорією (мікроспорозом) і фавусом (паршою).

Збудники дерматомікозів відносяться до дейтероміцетів, недосконалих грибів (*Deuteromycetes*, *Fungi imperfecti*) і об'єднані в три роди: трихофітон, мікроспорон і ахоріон.

Збудники *трихофітії* (*трихофітозу*) – гриби роду трихофітон: *Trichophyton faviforme* (син. *Tr. verrucosum*), *Tr. gypseum* (син. *Tr. mentagrophutes*), *Tr. craterioforme* (син. *Tr. tonsurans*) і їхні варіанти.

Морфологія. Форма збудника в патологічному матеріалі і культурі різна. На волоссі зустрічаються звичайно спори, у культурі – гриб. Патологічний матеріал (уражене волосся із білим чохлом) кладуть на предметне скло, наносять 3–5 крапель розчину, що просвітлює (10%-ний розчин калію або натрію гідроокисі) і витримують 30–40 хв. Потім додають таку ж кількість 50%-ного розчину гліцерину, накривають покривним склом і вивчають спочатку під малим, а більш детально – під середнім збільшенням мікроскопа.

Спори гриба у волоссі можуть розташовуватися на його поверхні у вигляді чохла – *Tr. ectothrix* (рис.17) чи по його довжині ланцюжками – *Tr. endothrix*. По величині спор *Tr. ectothrix* буває крупноспоровий (мегаспорон) і дрібноспоровий (мікроідес).

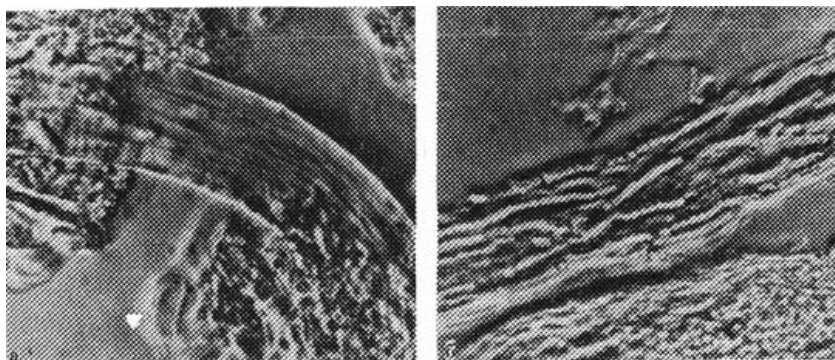


Рис.17. Волос, уражений грибом роду трихофітон

Культуральні властивості. *Фавіформні трихофітони* – повільноростучі гриби (рис.18), ріст з'являється на 10–15-у добу. На сусло-агарі (СА) утворює субстрактний і повітряний міцелій. Субстрактний міцелій проростає всередину і міцно з'єднується з щільним живильним середовищем. Повітряний міцелій з віком набуває бархатистого вигляду. Колонії можуть бути як рівні, так і складчасті.

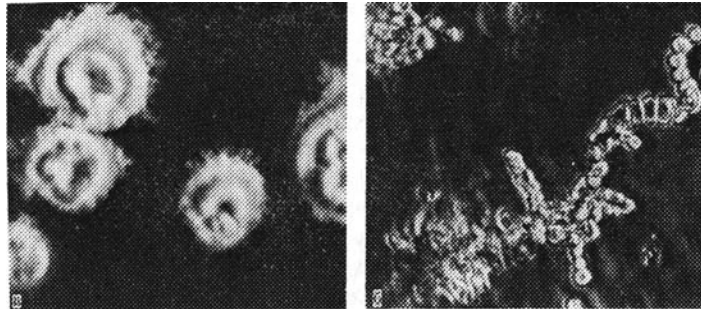


Рис.18. Фавіформний трихофітон на сусло-агарі

Гіпсоподібні трихофітони – швидкоростучі гриби, міцелій з'являється на 3–5-й день. Гриб росте в основному на поверхні середовища і легко знімається петлею. З віком колонії жовтіють, а на середовищі Сабуро і сусло-агарі зворотна сторона колоній приймає червоно-коричнєве забарвлення.

Кратероформні трихофітони ростуть швидше фавіформних, але повільніше гіпсоподібних. Колонії білувато-жовтуватого кольору, густомучнисті. Центр колоній з первинного матеріалу буває складчастий, утворюючи підвищення, що нагадує кратер. Культура легко знімається з поверхні середовища.

Мікроскопія культур. *Фавіформний трихофітон* на кінці гіф утворює хламідоспори. Міцелій має септи, при його розпаді утворюються артроспори.

Гіпсоподібний трихофітон. З боків міцелію округлі алейрії (спори). На кінцях гіф з первинного матеріалу, рідше при пересіваннях, утворює веретеноподібної форми макроконідії з перегородками. З первинного матеріалу частина гіф гриба утворює спіралі (рис.19).

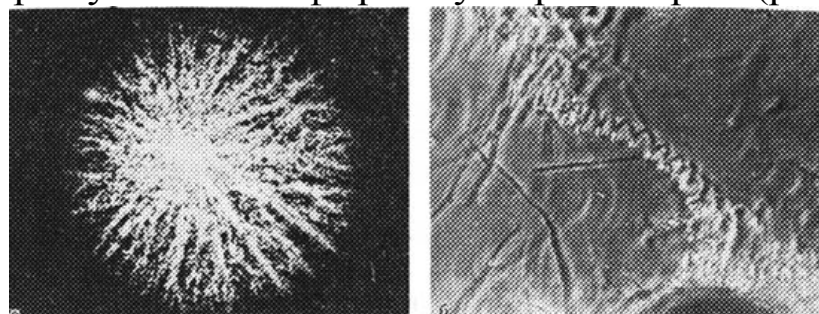


Рис. 19. Гіпсоподібний трихофітон

Кратероформний трихофітон. З боків міцелію видно у великій кількості алеїрії грушоподібної форми.

Діагноз ставлять по мікроскопії ураженого волосся, культуральних ознаках і клініці хвороби.

Збудник мікроспорії (мікроспорозу) – гриби роду *Microsporum* Gruby. Уражаються в основному кішки, собаки, коні.

Морфологія. Збудник розташовується в основі волоса і ніби чохлом огортає його поверхню. Міцелій гриба розпадається на сегменти, утворюючи спори, скупчення яких мають вигляд мозаїки.

Культуральні властивості. На середовищі Сабуро міцелій ракетоподібний, септований. Мікроконідії розташовані з боків міцелію і мають грушоподібну форму. Макроконідії нагадують гострі веретена з перегородками, кількість яких доходить до 12. Колонії складчасті з радіальними або концентричними борознами, пухнаті, білі, у старих культур набувають коричневого відтінку.

Діагноз ставлять на підставі клініки хвороби, мікроскопії зіскрібків з уражених ділянок і виділення культури збудника. При атипічному перебігу хвороби використовують люмінесцентний метод діагностики. Уражене волосся під дією ультрафіолетових променів дає зелене світіння.

Збудник фавусу (парші) – гриби роду *Achorion*. Уражаються пір'я, волосся, шкіра.

Морфологія. При мікроскопії ураженого матеріалу в полі зору можна бачити: тонкі довгі септовані нитки міцелію, великі багатогранні чи округлі спори, що часто розташовуються ланцюжками. У вигляді тяжів – міхурці повітря, крапельки жиру.

Культуральні властивості. Колонії на середовищі Сабуро зморшкуваті, підняті, коричневі чи сіро-жовтого кольору, а в деяких збудників фавусу з рожевим відтінком. Міцелій рівний, септований. Мікроконідії грушоподібні. Макроконідії з перегородками. Є й інші утворення: хламідоспори, розрощення на кінцях міцелію у вигляді рогів оленя.

Діагноз ставлять за клінікою (характерних ураженнях гребінців чи сережок у птахів) з урахуванням даних мікроскопії ураженого матеріалу.

ЗАНЯТТЯ 15

КОЛОКВІУМ ПО РОЗДІЛАХ: «ІНФЕКЦІЯ І ІМУНІТЕТ», «ЗБУДНИКИ ДЕЯКИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ТВАРИН»

Мета заняття. Визначити знання, отримані на практичних заняттях і при самостійній роботі студентів.

По розділу «Інфекція і імунітет». Інфекція. Розібрати, що таке інфекція? Які фактори визначають її виникнення і розвиток? Вірулентність і патогенність. Роль макроорганізму і умов середовища у виникненні й розвитку інфекції. Динаміка інфекційного процесу. Інкубаційний період. Карантин.

Імунітет. Види імунітету. Фагоцитоз. Антигени й антитіла. Роль клітин і органів лімфоїдної системи в утворенні імунітету. Т- і В-лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги, їхня взаємодія при виробленні антитіл. Алергія. Реакції імунітету і їх використання на практиці. Імунопрофілактика і імунотерапія. Вакцини. Імунні сироватки.

По розділу «Збудники інфекційних хвороб». Збудники бактеріальних, бацилярних, грибкових і вірусних інфекцій. Характеристика основних збудників за схемою: назва, морфологія, культивування, патогенність, стійкість, мікробіологічна діагностика. Який патологічний матеріал направляють у лабораторію для дослідження? Заходи профілактики, лікування і т.д.

ЗАНЯТТЯ 16

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОФЛОРИ КОРМІВ

Мета заняття. Ознайомитися з правилами взяття проб силосу для дослідження. Визначити мікрофлору силосу № 1 і № 2: приготування і мікроскопія мазків; ознайомлення з мікробіологічним дослідженням силосу (посіви й облік основних фізіологічних груп мікроорганізмів на різних середовищах). Оцінити якість силосу № 1 і 2 за А. Н. Міхіним.

Матеріальне забезпечення. Порцелянові ступки з товкачками (стерильні). Предметні скельця. Барвник еритрозин. Пальники. Мікроскопи. Кедрова олія. Силос № 1 і 2 у чашках. Витяжки із силосів. Універсальний індикатор, піпетки. Порцелянові чашки для визначення рН. Стандарт (кольорова шкала для визначення рН). Терези і наважки

до них. Чашки для зважування силосу. Пінцети, апарат для збовтування (шутель-апарат). Дві банки з притертими корками. Банка з розведеним силосом 1:10 (40 г силосу+360 мл стерильної води). Шість колб зі стерильною водою по 90 мл у кожній. Піпетки для приготування розведень (на 10 мл). Штатив з живильними середовищами: МПА -5 пробірок, СА-4, САК (сусло-агар із крейдою) - 6, молоко - 6, сусло пивне - 6, лактоза - 5, картопляне середовище Рушмана – 5 пробірок. В другому штативі середовища з висіяними в них розведеннями силосу; ріст мікроорганізмів, що зустрічаються в силосі, на щільних середовищах у чашках Петрі з МПА, СА, САК.

Таблиці: схема визначення якості силосу за А. Н. Міхіним; динаміка мікробіологічних процесів при дозріванні силосу.

Мікрофлора кормів багато в чому обумовлена температурою, вологістю середовища і видовим складом рослин. Вона міняється під час заготівлі і наступного зберігання кормів. Після скошування порушуються захисні функції рослини, мікроби проникають в середину, використовують живильні речовини і руйнують тканини. У цей час особливо бурхливо розвивається гнильна мікрофлора, викликаючи псування кормів. Скошені рослини можна зберегти шляхом висушування чи силосування, коли недостатньо вільної води чи створюються такі умови, при яких припиняється діяльність амоніфікаторів. Поряд із заготівлею сіна і сінажу в кормовиробництві багатьох господарств одне з перших місць займає силосування.

У кормах можуть бути виявлені цвілеві гриби, гнильні, маслянокислі і інші мікроорганізми. Такі корми часто викликають отруєння, розлад органів травлення і інших систем. В результаті дослідження можна виявити причину псування корму, усунути її і тим самим попередити захворювання тварин.

Визначення мікрофлори силосу. Взяття проб силосу. Проби силосу необхідно брати в три терміни: а) під час закладки силосу для визначення епіфітної мікрофлори; б) через 10–15 днів після закладки для визначення мікрофлори дозрілого силосу; в) при розкритті силосу.

У загальній масі силосу не у всіх її ділянках однаково проходять мікробіологічні процеси, тому у вежі беруть три проби силосу: першу і другу – на відстані одного метра від верху і низу, третю – між ними. У траншеях, у залежності від довжини, беруть дві чи три проби на глибині одного метра від поверхні. У круглих ямах пробу беруть у центрі після зняття верхнього шару, також на глибині одного метра. Проби силосу поміщають у стерильні банки з притертими корками.

Мікроскопічне дослідження силосу. У порцеляновій ступці (з невеликою кількістю стерильної дистильованої води) розтирають шматочок силосу. З розтертої маси на предметному склі товкачиком роблять мазок, потім його фіксують і фарбують еритрозином. Мазок розглядають під імерсійною системою і замальовують. У якісному силосі зустрічаються одиничні палички і коки, у поганому – виявляється велике число коків і паличок.

Мікробіологічне дослідження силосу. Проводять для виявлення різних фізіологічних груп мікроорганізмів; молочнокислих, маслянокислих, гнильних, газоутворюючих, дріжджів і плісені.

Перед посівом готують розведення. З цією метою на технічних вагах відважують 40 г силосної маси. Наважку з дотриманням правил стерильності переносять у стерильну банку з притертим корком, у яку налито 360 мл стерильної води. Щоб «відмити» мікроорганізми, що містяться на поверхні рослин, силос у банці збовтують протягом 10 хв на шутель-апараті чи руками. У банці виходить розведення 1:10. До цього часу повинні бути готові колби зі стерильною водою по 90 мл у кожній і зроблені написи: II, III, IV, V, VI, VII. Наступні розведення готують шляхом внесення 10 мл розведення 1:10 у другу колбу з 90 мл стерильної води, у результаті чого виходить розведення 1:100. З другої колби 10 мл розведення 1:100 переносять у третю колбу, виходить розведення 1:1000 і т.д. Вміст колби перед взяттям розведення силосу збовтують протягом 3 хв. Після приготування розведень готують посуд (чашки Петрі, пробірки), роблять написи.

Фізіологічні групи мікроорганізмів визначають на таких живильних середовищах:

МПА – гнильну мікрофлору,

СА – плісені і дріжджі,

САК (із крейдою) – молочнокислі бактерії,

молоці – молочнокислі бактерії, лактози – газоутворюючі (кишкові) бактерії, картопляному середовищі Рушмана – маслянокислі бацили.

У приготовлений посуд і середовища, починаючи з останньої колби, вносять по 1 мл розведень: на МПА з I, II, III, IV, V розведеннями; на СА з I, II, III, IV; на САМ з II, III, IV, V, VI, VII; на молоко з II, III, IV, V, VI, VII; на сусло пивне з II, III, IV, V, VI, VII; на лактозу з I, II, III, IV, V; на картопляне середовище Рушмана з I, II, III, IV, V розведеннями.

Після охолодження живильних середовищ до 50–45°C (а САК і після ретельного збовтування) їх вносять у чашки. Легкими

обертальними рухами чашок змішують розведення силосу із середовищем і залишають на рівній поверхні для остуження. Чашки, перевернені догори дном, витримують у термостаті при температурі 30–35°C протягом трьох діб. На четверту добу проводять облік фізіологічних груп мікроорганізмів. Чисельність різних фізіологічних груп мікроорганізмів на щільних живильних середовищах визначають шляхом підрахунку колоній, на рідких живильних середовищах шляхом виявлення росту мікробів з різних розведень, а на молоці – по згортанню його. Те із середовищ, у яке було внесено найбільше розведення, і буде визначати кількість молочнокислих мікроорганізмів у силосі. На щільних середовищах у чашках Петрі підрахунок ведуть із трьох розведень, у кожному з яких виросло не менше десяти колоній.

Оцінка якості силосу. Органолептична оцінка силосу. *Колір* повинний бути ближче до кольору рослин, з яких приготовлений силос. У доброякісного силосу можуть зустрічатися відтінки: жовтий, жовто-зелений, коричнево-зелений, світло-коричневий. У зіпсованого силосу переважає коричневий колір; звичайно він буває темно-коричневий, брудний.

Запах доброякісного силосу повинний бути приємним, що нагадує запах плодів, хлібного квасу, мочених яблук. При псуванні силосу з'являється запах оцту. Зіпсований силос має запах редьки, прогірклої олії, оселедця, що довго не зникає при розтиранні шматочка силосу між пальцями. При наявності в силосі масляної кислоти розтертий між пальцями силос має неприємний запах гною.

Смак доброякісного силосу слабокислий, приємний. У зіпсованого силосу смак різко кислий з гіркуватим присмаком.

Консистенція в доброякісного силосу повинна бути такою, яку мали вихідні рослини. У зіпсованого силосу рослинна маса робиться ослизлою, масткою, листочки не відокремлюються один від одного.

Хімічна оцінка силосу. Приготування витяжки із силосу. У літрову банку (колбу) поміщають 100 г дрібно нарізаного силосу. У банку приблизно до 3/4 об'єму наливають дистильовану воду, ретельно збовтують і доливають до літра. Вміст протягом 4–5 год. періодично збовтують. Потім фільтрують і фільтрат використовують для різних цілей (наприклад, для визначення рН).

Визначення рН силосу. Для визначення рН силосу готують дві витяжки: одну з доброго силосу, іншу – із завідомо недоброякісного. Піпеткою в порцелянову чашечку вносять 1 мл витяжки і краплю універсального індикатора. При змішуванні рідин відбувається зміна

забарвлення витяжки. Реакцію (рН силосу) визначають по стандартній шкалі, що нанесена на папері з захисним покриттям.

По А. Н. Міхіну, як індикатор використовують суміш бромтимолового синього і метилового червоного. У порцелянову чашку вносять 2 мл витяжки і 2–3 краплі суміші індикаторів. У залежності від величини рН витяжка набуває різне забарвлення, яке знаходять по таблиці.

Таблиця 1

Оцінка якості силосу в балах (по А. Н. Міхіну)

Забарвлення рідини (витяжки) після додавання індикатора	Величина рН	Бал
Визначення рН силосу		
Червоне	4,2 і нижче	5
Червоно-жовтогаряче	4,2—4,6	4
Жовтогаряче	4,6—5,1	3
Жовте	5,1 – 6,1	2
Жовто-зелене	6,1 – 6,4	1
Зелене	6,4 – 7,2	0
Зелено-синє	7,2 – 7,6	0
Запах		
Ароматно-фруктовий, слабокислий, хлібний		4
Слабоароматний, оцтовокислий, огуречний		3
Різко оцтовокислий, запах масляної кислоти		2–1
Затхлий, гною, сильний запах масляної кислоти		0
Колір силосу		
Зелений		3
Коричневий або жовто-зелений		2
Чорно-зелений		1
Чорний		0

Дані бальної оцінки при визначенні рН, запаху, кольору підсумовують, одержують загальний бал, за яким і визначають якість силосу, балів:

дуже добрий	11 – 12 .
добрий	9–10
середньої якості	7–8 .
поганий	4–6.

На практиці рН силосу визначають також колориметричним, електрометричним і іншими методами.

Силос, що має оцінку 3 бали і нижче, вважається дуже поганим і до згодовування тваринам непридатний.

Дослідження силосу на присутність у ньому токсину ботулінуса. Силос часто забруднюється ґрунтом, у якому поряд з іншими мікроорганізмами можуть бути бацили ботулінуса (Cl.

botulinum). Такі мікроби в силосній масі розподіляються нерівномірно, локально, тобто там, де є ґрунт. З підозрілих ділянок беруть 1–2 кг силосу і поміщають його в стерильні широкогорлі колби. Проби заливають подвійною кількістю стерильної води і залишають для екстрагування. Потім частину води і корму переносять у стерильну порцелянову ступку і розтирають. Витримують 1–2 год. і після цього фільтрують до одержання прозорої рідини.

Наявність токсину ботулінуса в силосі визначають на морських свинках чи білих мишах. Фільтрат поділяють на дві частини: одну з них нагрівають до 80–100°C для руйнування токсину, іншу залишають без зміни. Дослід ставлять на чотирьох свинках. Матеріал випоюють за допомогою шприца з канюлею або шприца без голки. Двом тваринам дають по 2 мл прогрітого фільтрату, іншим – таку ж кількість фільтрату, що не піддавався термічній обробці.

При вмісті в непрогрітому фільтраті токсину у тварин з'являються паралічі задніх кінцівок, черевних м'язів і інші ознаки, характерні для отруєння. Морські свинки звичайно протягом 2–3 діб гинуть. Це дає підставу (при відсутності клініки хвороби у контрольних тварин, яким випоювали прогрітий фільтрат) вважати, що в досліджуваному матеріалі є токсин.

Визначення наявності токсину в силосі можна проводити і на білих мишах, при цьому дозу фільтрату зменшують до 0,5–1 мл. Відсутність характерної клініки хвороби не виключає наявність токсину ботулінуса в кормі, тому дослідження повторюють.

Розвиток мікробіологічних процесів у силосі. Перша фаза. Переважають бактерії з групи ентеробактерій, є також і інші амоніфікатори, цвілеві гриби і дріжджі. При дотриманні всіх правил силосування така мікрофлора через 1–2 доби починає пригнічуватися продуктами життєдіяльності молочнокислих бактерій. **Друга фаза.** Протікає при домінуванні молочнокислих бактерій, спочатку молочнокислих стрептококів, а потім молочнокислих паличок.

Третя фаза. Характеризується перевагою молочнокислих паличок, чисельність кокових форм невелика. Вони менш стійкі до більш високої концентрації молочної кислоти і інших продуктів життєдіяльності мікробів. Кінцева величина рН у цій фазі досягає 4,0–4,2. Кількість молочної кислоти в доброякісному силосі складає 1,5–2% від маси корму, а рН у ньому не повинний бути вище 4,0–4,2.

Концентрація водневих іонів (рН), при якій можуть розвиватися мікроорганізми, що знаходяться в силосі, така:

молочнокислі стрептококи	4,0–8,0
молочнокислі палички	3,0–7,0
маслянокислі бацили	4,7–8,5
гнильні (амоніфікатори)	5,0–9,0
дріжджі	4,0–6,8
цвілеві гриби	1,5–9,0

ЗАНЯТТЯ 17

Тема: ЗБУДНИКИ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОДІННЯ

Мета заняття. Приготувати препарати з кисломолочних продуктів, провести мікроскопію і замалювати збудників процесу (молочнокислий стрептокок, болгарська і ацидофільна палички, мікрофлора кефіру). Вивчити морфологічні, культуральні і біохімічні властивості молочнокислих бактерій. Приготувати звичайний кисляк і ацидофілін.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури (у пробірках) молочнокислого і змішаного бродіння: молочнокислого стрептокока, болгарської і ацидофільної паличок, кефірних грибків.

Для приготування і фарбування мазків. Предметні скельця. Мікробіологічні петлі. Чашки зливальні, містки. Барвник – метиленовий голубий. Вода в колбах для змивання барвника. Олівці або чорнило по склу. Пальники, сірники. Мікроскопи. Кедрова олія. Пастеризоване молоко в колбах ємністю 250 мл по 100 мл у кожній. Закваски: молочнокислого стрептокока і ацидофільної палички. Піпетки стерильні об'ємом до 5 мл. Термостати.

Таблиці: збудники молочнокислого бродіння (морфологія); ріст збудників молочнокислого бродіння на живильних середовищах (форма колоній).

Молочнокислі мікроорганізми розділяють на типові і нетипові. До типових (гомоферментативних) молочнокислих мікроорганізмів відносять ті з них, що при зброджуванні цукрів утворюють в основному молочну кислоту (85–95 %) і незначну кількість летких кислот. Нетипові (гетероферментативні) мікроби є слабкими кислотоутворювачами, поряд з молочною кислотою вони утворюють велику кількість побічних продуктів (оцтову кислоту, етиловий спирт, вуглецю

діоксид). Молочнокислі мікроорганізми мають багато загальних ознак. Усі вони факультативні анаероби, грампозитивні, нерухомі, спор і капсул не утворюють. Серед молочнокислих мікроорганізмів розрізняють кулясті і паличкоподібні форми.

Кулясті (кокові) форми. Гомоферментативні молочнокислі стрептококи. Типовий представник цієї групи – молочнокислий стрептокок (*Streptococcus lactis*). Його клітини мають овальну форму, що у молодих культур розташовуються у вигляді коротких ланцюжків, а в старих – попарно (рис. 20). Молочнокислий стрептокок міститься у всіх кисломолочних продуктах і складає основу мікрофлори простокваш. Добре росте на агарі з гідролізованого молока і молочної сироватки. На щільних живильних середовищах утворює округлі і чечевицеподібні колонії. Округлі з'являються на поверхні, чечевицеподібні – у глибині (рис.21). На сусло-агарі з крейдою (САК) навколо колоній утворюється зона просвітління – результат взаємодії кислоти і крейди. У процесі життєдіяльності молочнокислого стрептокока нагромаджується до 1% молочної кислоти, кислотність середовища підвищується до 120°Т.

При оптимальній температурі (30–35°С) *Str. lactis* сквашують молоко протягом 10–12 год. Продукт набуває приємного запаху і кислого смаку. *Str. lactis* має антимікробну дію, утворює поліпептидні антибіотики нізини. Вони стійкі до високої температури і затримують ріст багатьох грампозитивних мікробів, у тому числі і патогенних (*Mycobacterium tuberculosis*).

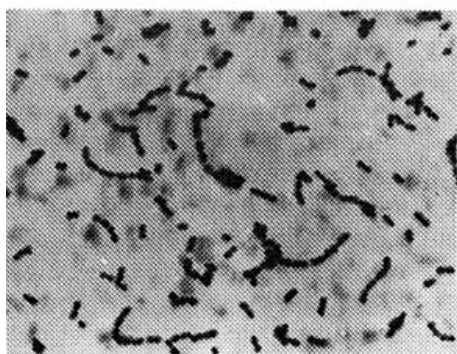


Рис.20. Молочнокислий стрептокок

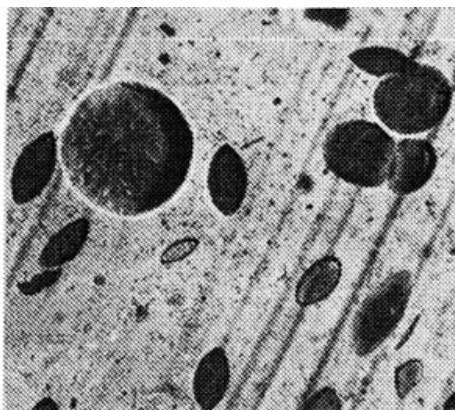


Рис.21. Колонії молочнокислого стрептокока

Вершковий стрептокок (*Str. cremoris*) утворює довгі ланцюжки (рис.22). Росте так само, як і *Str. lactis*, але кислотність середовища нижче (110–115°Т). Оптимальна температура 25–30°С. При зброджуванні молока згусток набуває сметаноподібну консистенцію. Вершковий стрептокок входить до складу заквасок для приготування

сметани, масла, сирів.

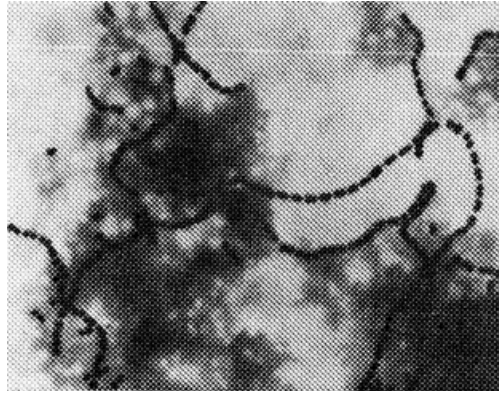


Рис. 22. Вершковий стрептокок

Гетероферментативні молочнокислі стрептококи, окрім молочної, утворюють леткі кислоти, ароматичні речовини, вуглецю діоксид. Деякі з них здатні зброджувати лимонну кислоту. Ароматоутворюючі стрептококи (*Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*, *Str. diacetylactis*) додають кисломолочним продуктам приємного смаку і аромату. За формою вони подібні на *Str. lactis*, але клітини в них дрібніші і розташовуються ланцюжком. Для приготування кисломолочних продуктів ароматоутворюючі стрептококи змішують з гомоферментативними: молочнокислим і вершковим. Вони мають майже однакову оптимальну температуру росту (30°C).

Серед гетероферментативних молочнокислих стрептококів є і термофіли (*Str. thermophilus*), що розвиваються при температурі близько 45°C. Це дозволяє використовувати їх разом з термофільними молочнокислими паличками при виготовленні південних простокваш, а також сирів (швейцарського). До гетероферментативних молочнокислих стрептококів відносять також рід *Leiconostoc*. Представники цього роду — *Leiconostoc citrovorum*, *Leiconostoc dextranicum* — мають округлі клітини, що потім приймають витягнуту форму. Зброджуючи цукри, вони утворюють невелику кількість молочної кислоти, надають специфічний запах кисломолочним продуктам, тому їх включають до складу деяких заквасок.

Палочкоподібні молочнокислі бактерії розділяють на гомоферментативні (термофільні і мезофільні) і гетероферментативні.

Гомоферментативные молочнокислі бактерії. Термофільні бактерії розвиваються при 40–45°C; нижче 15°C їх ріст припиняється. При зброджуванні цукрів утворюють до 3,5% молочної кислоти, кислотність середовища досягає 300–400°Т. Молоко згортається протягом 6–12 год. Бактерії мають вигляд довгих паличок розміром 1,5–10X0,5–1 мкм, розташовуються вони поодинокі чи у вигляді

ланцюжків. Грампозитивні, спор не утворюють.

У цитоплазмі клітин іноді видно зернистість. На щільному середовищі із сироваткою колонії утворюють розгалуження, що нагадують шматочки вати з нерівними краями чи розгалуження коренів (рис.23).

Болгарську паличку (*Lactobact. bulgaricum*) (рис.24) виділяють з південних простокваш, *ацидофільну* (*Lactobact. acidophilum*) – із вмістимого кишечника, *сирну* (*Lactobact. helveticum*) – із сирів. Ацидофільну паличку використовують для приготування ацидофіліну, який має лікувальну дію при шлунково-кишкових хворобах. Дія його більш тривала, ніж болгарського кисляку, тому що збудник знаходить більш сприятливі умови в тому середовищі, з якого він виділений.

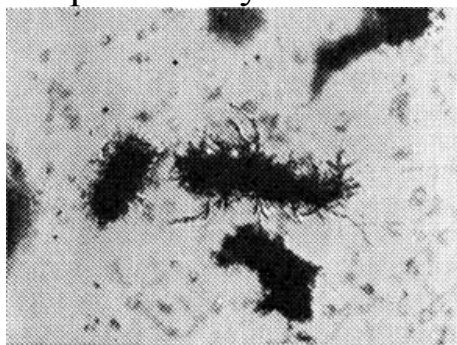


Рис. 23. Колонії ацидофільної палички



Рис. 24. Болгарська паличка

Мезофільні бактерії розвиваються при температурі 30°C і розташовуються ланцюжком, вони утворюють менше продуктів життєдіяльності, кислотність середовища, у якому вони живуть, не перевищує 180°T.

Виділяють два види стрептобактрій: *Lactobact. casei*, що бере участь у дозріванні сирів, і *Lactobact. plantarum*, що стимулює процеси силосування і квашення овочів. Молоко вони згортають повільно.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії. *Бета-бактерії* зустрічаються на рослинах, зброджують цукор з утворенням великої кількості етилового спирту і вуглецю діоксиду. Молоко не доводять до згортання, при цьому утворюється мало молочної, але багато легких кислот, що додають особливий аромат молочним продуктам (сирам, кефіру). Характерним представником бета-бактерій є вид *Lactobact. brevis*, штами якого зброджують гексози, деякі дисахариди, а також арабінозу і ксилозу.

Приготування препарату. Досліджуваний кисломолочний продукт (сироватку) мікробіологічною петлею наносять на предметне скло і розподіляють тонким шаром на його поверхні. Висушують і фіксують. Фіксувати краще спиртом-ефіром, при цьому розчиняються

крапельки жиру, поліпшується тло. Але можна фіксувати і над полум'ям пальника. Мазок фарбують метиленовим голубим протягом 2–3 хв.

Мікроскопічна картина: на світло-блакитному тлі добре видно пофарбовані в синій колір ті форми мікробів, що містяться в досліджуваному продукті.

Кефірні грибки, чи кефірні зерна. Кефірні грибки являють собою зерна неправильної форми білого кольору, висушені – золотаво-жовтого кольору. Їх використовують для виготовлення кефіру. Висушені кефірні зерна попередньо оживляють у молоці. До складу кефірних зерен входять: молочнокислі стрептококи (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) і ароматизуючі коки, молочнокислі палички (стрептобактерії), молочнокислі дріжджі (рис.25). Тіло кефірного грибка переплетене нитками палочкоподібного мікроба. Кефірні зерна служать материнською закваскою для одержання всіх наступних заквасок. Кефірні грибки одержують шляхом розмноження. Це продукт тривалого культивування молочнокислих організмів, в результаті чого відбувся стійкий симбіоз.



Рис.25. Мікрофлора кефіру

У кефірі, кумисі і інших подібних продуктах одночасно розвиваються спиртове і молочнокисле бродіння. Для виготовлення кефіру в пастеризоване й охолоджене до 20°C молоко вносять 3–5% грибної закваски, перемішують і залишають при такій же температурі для зброджування. При температурі 20°C і вище переважає молочнокисле бродіння, нижче 15°C – спиртове. Кількість спирту в кефірі коливається від 0,2 до 0,6 %. Чим триваліша витримка кефіру, тим більше в ньому спирту і вище кислотність.

Приготування препарату. Шматочок кефірних грибків поміщають між предметними скельцями, придавлюють і розтягують уздовж. Таким чином, кефірна маса залишається на дотичних поверхнях скелець. Отримані мазки потім висушують, фіксують і фарбують метиленовим

голубим протягом 2–3 хв. У полі зору мікроскопа видно переплетіння палочкоподібних мікробів, на тлі яких розташовані молочнокислі стрептококи і молочнокислі палички, а також у невеликій кількості клітини дріжджів. Палочкоподібний мікроб, що переплітає тіло кефірного грибка, на звичайних середовищах не росте і у чистому виді поки не виділений.

Приготування кисломолочних продуктів. Кисломолочні продукти мають дієтичні і лікувальні властивості. У них містяться не тільки молочнокислі мікроорганізми, але також вітаміни, антибіотики і інші корисні речовини. Специфічна дія кисломолочних продуктів обумовлюється головним чином молочнокислими мікробами, що є антагоністами гнильних. У залежності від складу мікрофлори, кисломолочні продукти поділяють на продукти молочнокислого бродіння (кисляк, ацидофілін, ацидофільне молоко; напої “Південний”, “Сніжок”) і змішаного (кефір, кумис, айран), у яких поряд з молочнокислими бактеріями можуть бути молочнокислі дріжджі і оцтовокислі бактерії.

Кисломолочні продукти одержують шляхом сквашування пастеризованого молока чистими культурами молочнокислих бактерій. Такі мікроорганізми містяться в заквасках, вони можуть бути сухими і рідкими. Спочатку готують первинну (материнську) закваску. Для цього в охолоджене пастеризоване молоко вносять порцію заводської закваски і ретельно його перемішують. Продукт ставлять при оптимальній температурі на 12–15 год. За цей час повинний утворитися, рівний щільний згусток, без міхурців газу. Якщо згусток не формується, то значить культура втратила життєздатність і її варто замінити.

У первинній заквасці культура буває малоактивною, тому для відновлення її активності готують вторинну закваску. У пастеризоване й охолоджене молоко вносять 5% первинної закваски і ставлять при оптимальній температурі на 8–10 год. Робочу закваску готують із вторинної.

Закваска для звичайного кисляку повинна містити тільки чисту культуру *Str. lactis*. Для приготування болгарського (мечніковського) кисляку використовують закваску, у яку входять *Str. lactis* (чотири частини) і *Lactobact. bulgaricum* (одна частина). Закваска для південного кисляку складається з *Lactobact. bulgaricum* (три-чотири частини), *Str. lactis* (одна-дві частини) і невеликої кількості молочних дріжджів. Для ацидофільного молока закваска повинна містити чисту культуру

Lactobact. acidophilum. У закваску для ацидофіліну входять у рівних кількостях три культури: стрептококова, ацидофільна і кефірна. Для кефіру закваскою є кефірні грибки, що представляють симбіоз мікроорганізмів: молочнокислих, дріжджів, оцтовокислих і ін. Закваскою для кумису служить такий же продукт.

Для приготування кисломолочного продукту відразу ж після пастеризації й охолодження вносять 5% закваски і витримують при оптимальній температурі того мікроорганізму, що входить до складу закваски. Оптимальна температура для гомоферментативних ароматоутворюючих стрептококів – близько 30°C, для молочнокислих паличок і термофільного стрептокока – 40-45°C. При культивуванні продуктів змішаного бродіння варто враховувати те, що збудники молочнокислого бродіння розвиваються при більш високій температурі (25–40°C), дріжджі – при більш низькій (20°C і нижче).

У процесі сквашування нагромаджується молочна кислота, зв'язується вода, набухає казеїн і через 8–12 год. утворюється щільний згусток. Готовий продукт повинний мати приємний запах і смак. При мікроскопії в продукті повинна міститися чиста культура мікроорганізмів закваски.

Ацидофілін, ацидофільне молоко, кефір і інші кисломолочні продукти корисно згодовувати молодняку сільськогосподарських тварин, тому що вони профілактують шлунково-кишкові хвороби і сприяють більш швидкому росту і розвитку організму. З препаратів, до складу яких входять молочнокислі мікроби, у тваринництві застосовують: АБК, ПАБК і ін.

Ацидофільно-бульйонну культуру (АБК) готують у ветеринарних лабораторіях. Її вирощують при 40°C в суліях на середовищі, у яке входять: молочна сироватка, кров від тварин, натрію хлорид, вода. Пропіоново-ацидофільну бульйонну культуру (ПАБК) також готують у лабораторіях. Крім ацидофільної палички, у цей продукт входять пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну В₁₂. Таким чином, ПАБК – комплексний препарат і найбільш ефективний при лікуванні хвороб молодняку і дорослих тварин. У 1 л ПАБК повинно міститися не менш 1000 мкг вітаміну В₁₂. Культуру застосовують при гіпоавітамінозах групи В, аліментарній анемії, шлунково-кишкових розладах, а також для кращого росту і розвитку молодняку сільськогосподарських тварин.

ЗАНЯТТЯ 18

Тема: ОБЛІК МІКРООРГАНІЗМІВ У МОЛОЦІ

Мета заняття. Визначити чисельність і груповий склад мікробів шляхом посіву молока на живильні середовища (МПА, СА, стерильне молоко і лактозу). Визначити мікробне забруднення молока непрямим методом. Поставити пробу на редуктазу. Провести підрахунок мікробів у молоці по методу Драйєра-Корольова.

Матеріальне забезпечення. Для 2–3 студентів: чашки Петрі – 6 шт. Стерильна вода в пробірках по 9 мл у кожній - 6 шт. Піпеток 2 мл – 8 шт.: для приготування розведень - 6 шт., для внесення розведень по 1 мл у чашки і пробірки зі стерильним молоком і лактозою – 2 шт. Середовища: МПА і СА стовпчиком – по 3 пробірки кожного; молоко і лактоза – по 6 пробірок.

Для постановки проби на редуктазу. Пробірки великі (на 20 мл молока). Метиленовий голубий (робочий розчин), резаурин (робочий розчин), по 100 мл кожного. Піпетки на 10 мл – 6 шт. Піпетки на 1 мл – 2 шт. Три проби різного молока в колбах і номери на них. Редуктазник. Електрична плитка. Водяна баня. Термометри.

Таблиці: поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого; визначення якості молока за його знебарвленням і фарбуванням (проба з резаурином).

Визначення чисельності і групового складу мікрофлори молока методом посіву. Взяття проб. Після ретельного перемішування молока його наливають в стерильну колбу 500 мл. Проба молока повинна знаходитися в холодному місці, приблизно при температурі + 6°C. Посів молока на живильні середовища краще робити відразу ж і не пізніше ніж через 4 год.

Посіви. Чисельність мікробів у молоці встановлюють шляхом посіву його на щільні і рідкі живильні середовища. На щільних живильних середовищах чисельність мікробів визначають за кількістю вирослих колоній; на рідких живильних – середовищах за найменшим розведенням, у якому з'явився ріст. Тому що універсального середовища, на якому могли б рости всі мікроорганізми немає, то посіви молока проводять: на МПА – для визначення гнильної мікрофлори; на СА – цвілевих грибів і дріжджів; у пробірки зі стерильним молоком – для визначення молочнокислих мікробів; На САК (сусло-агар із крейдою) висівають ті з молочнокислих продуктів, де припускають наявність головним чином молочнокислого

стрептокока.

Перш ніж приступити до приготування розведень молока, необхідно знати приблизний вміст у ньому мікробів: у 1 мл свіжого молока від окремих корів містяться десятки тисяч мікробів, збірного молока – сотні тисяч мікробів, збірного заводського молока — сотні тисяч і мільйони мікробів. Чим вища чисельність мікробів у молоці, тим більше треба робити розведень, з таким розрахунком, щоб в останньому розведенні було від 1 до 10 живих мікробних клітин. Розведення готують у пробірках на стерильній воді чи ізотонічному розчині натрію хлориду.

Приготування розведень. Стерильною піпеткою вносять у першу пробірку з 9 мл стерильної води 1 мл досліджуваного молока. Виходить розведення 1:10. Новою стерильною піпеткою перемішують розведення 1:10 і 1 мл його переносять у другу пробірку з 9 мл стерильної води. Виходить розведення 1 : 100 і т.д. Звичайно роблять 6–7 розведень молока. З метою економії піпеток одночасно по 1 мл необхідного розведення можна вносити й у чашки Петрі. По 1 мл кожного розведення можна, вносити і однією піпеткою, але при цьому треба починати внесення молока з найбільшого розведення. Для того щоб знати, на які середовища і з яких розведень необхідно вносити по 1 мл, написи на чашках Петрі роблять заздалегідь.

Схема посіву. Приготувати вісім розведень досліджуваного молока (від 1:10 до 1:100 млн). Зробити посів: на чашки Петрі з МПА з розведень II, III, IV; на чашки Петрі із СА з розведень I, II, III; у пробірки зі стерильним молоком з розведень III, IV, V, VI, VII; на лактозу з розведень I, II, III, IV, V, VI.

Після внесення розведеного молока (по 1 мл) розплавляють живильні середовища і при охолодженні їх до 45°C виливають у чашки Петрі. Круговими рухами чашок живильні середовища рівномірно розподіляють з досліджуваним матеріалом і залишають для охолодження. Потім усі чашки перевертають догори дном. Чашки з МПА ставлять у термостат при температурі 37°C, із сусло-агаром (СА) – при 25–28°C на 2–3 доби чи при кімнатній температурі на більш тривалий час. Пробірки з молоком (для обліку молочнокислих мікробів) і лактозою (для обліку газоутворюючих мікробів) поміщають у термостат при температурі 30–40°C. На чашках Петрі і пробірках роблять написи з указівкою дати, живильного середовища, розведення, прізвища студента і інше.

Визначення мікробного забруднення молока непрямим

методом. Постановка проби на редуктазу. Проба з метиленовим голубим. Редуктаза (анаеробна дегідрогеназа) - фермент, що мікроорганізми виділяють у середовище. Він має редукуючі (відновлюючі) властивості. Чим більше мікроорганізмів у досліджуваному продукті (сирому молоці), тим більше повинно бути ферменту. На цій властивості засноване визначення забруднення молока мікробами і його класності непрямым методом. Як індикатор на редуктазу вперше (1912 р.) був використаний метиленовий голубий. Проба з індикатором дозволяє лише приблизно визначити кількість мікробів у молоці.

Приготування робочого розчину метиленового голубого. Спочатку готують насичений спиртовий розчин метиленового голубого: 10 г метиленового голубого змішують з 100 мл 96%-ного етилового спирту. Розчин ставлять на добу в термостат при температурі 37°C, а потім фільтрують. Робочий розчин готують з насиченого: до 5мл такого розчину додають 195 мл дистильованої води і перемішують.

Постановка досліду. У великі мікробіологічні пробірки наливають по 1 мл робочого розчину метиленового голубого і по 20 мл досліджуваного молока. Пробірки закривають гумовими корками, змішують шляхом повільного перевертання пробірок і ставлять у водяну лазню при температурі 38–40°C. Зміну кольору в молоці враховують через 20 хв, 2 год. і 5 год. 30 хв. У залежності від часу знебарвлення метиленового голубого молоко розділяють на чотири класи (табл. 2).

Таблиця 2

Поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого (ДСТ 9225–59)

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість знебарвлення	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Понад 5 год. 30 хв.	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Понад 2 год. до 5 год. 30 хв.	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Понад 20 хв. до 2 год.	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	20 хв. і менше	20 млн. і вище

Верхній шар може бути пофарбованим, тому що молоко контактує з киснем повітря, але це в розрахунок не приймають.

Прискорена проба з метиленовим голубим. Для постановки прискореної проби на редуктазу робочий розчин метиленового

голубого розводять у 10 разів, а кількість молока зменшують у 2 рази.

Постановка досліду. У чисті пробірки наливають по 1 мл розведеного метиленового голубого і з кожної партії вносять по 10 мл молока. Пробірки закривають гумовими корками, перемішують і ставлять у водяну лазню, температура якої 38–40°C. Облік знебарвлення метиленового голубого у молоці проводять через 5, 10, 15 хв. Молоко, знебарвлене протягом цього часу, містить десятки мільйонів мікроорганізмів у 1 мл, головним чином газотворюючих.

Проба з резазурином запропонована пізніше (1929р.). За допомогою резазурину визначають не тільки чисельність мікробів, але і лейкоцитів у молоці. Окрім того, резаурин має деякі переваги перед метиленовим голубим — аналіз молока проводиться протягом 1 год, що дозволяє заощаджувати час і з більшою вірогідністю встановлювати його класність. Відновлення резазурину йде в двох стадіях.

Приготування робочого розчину. Спочатку готують основний розчин: 50 мг резазурину розчиняють у 100 мл прокип'яченої і охолодженої дистильованої води. Термін зберігання основного розчину при 3–5°C не більше 20 діб. Робочий розчин готують з основного шляхом розведення його прокип'яченою і охолодженою дистильованою водою у співвідношенні 1:10. Для приготування 100 мл робочого розчину до 10 мл основного розчину додають 90 мл води.

Постановка досліду. У стерильні пробірки наливають 10 мл досліджуваного молока і 1 мл робочого розчину резазурину. Пробірки закривають чистими гумовими корками і 3 рази повільно перевертають, після чого їх поміщають у водяну лазню при температурі 38°C. Облік результатів проводять через 20 хв. і через 1 год. Через 20 хв. пробірки зі знебарвленим молоком видаляють, а інші один раз перевертають і знову ставлять у водяну лазню до кінця досліду. Якість молока визначають за його знебарвленням і кольором з урахуванням часу.

Таблиця 3

Визначення якості молока за його знебарвленням і кольором (проба з резазурином)

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість зміни кольору	Забарвлення молока	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Через 1 год.	Синьо-сталево	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Через 1 год.	Бузкове чи синьо-фіолетове	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Через 1 год.	Рожеве чи біле	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	До 20 хв.	Біле	Більше 20 млн.

Безпосередній підрахунок мікробів під мікроскопом. Метод Драйєра – Корольова. Цей метод заснований на зіставленні клітин у стандартній суспензії з кількістю мікробів у досліджуваному молоці. Стандарт являє собою суміш убитих фіксованих клітин якого-небудь мікроба (наприклад, дріжджів), у 1 мл якого міститься 10 млн клітин. Після ретельного збовтування беруть 1 мл суспензії стандарту і досліджуваного молока і змішують їх. На знежирене предметне скло наносять краплю суміші і розподіляють на його поверхні. Після фіксації і фарбування проводять роздільно підрахунок клітин стандарту й іншої мікрофлори в полі зору мікроскопа. Підрахунок ведуть у 10–20 полях зору (чим більше полів, тим точніше результати). Після підрахунку визначають середнє число клітин мікробів у молоці в зіставленні із середнім числом клітин стандарту.

Приклад. У 20 полях зору виявлено 60 клітин стандарту і 80 клітин мікробів досліджуваного молока. При наявності в 1 мл стандарту 10 млн. клітин у 1 мл досліджуваного молока буде міститися приблизно 13 млн. клітин.

$$X = \frac{80 * 10^7}{60} \approx 13 * 10^6$$

ЗАНЯТТЯ 19

Тема: ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛИХ МІКРОБІВ. ПРОПІОНОВОКИСЛІ БАКТЕРІЇ

Мета заняття. Визначити результати посіву молока на живильні середовища. Оцінити молоко за вмістом загальної кількості мікробів у 1 мл і колі-титром. Провести мікроскопічний контроль приготуваних кисломолочних продуктів: звичайного кисляку й ацидофіліну. Ознайомитися з методикою виділення чистих культур: молочнокислого стрептокока, болгарської і ацидофільної паличок. Приготувати препарат, провести мікроскопію і замалювати пропіоновокіслі бактерії. Охарактеризувати збудника пропіоновокіслого бродіння.

Матеріальне забезпечення. Посіви попереднього заняття на МПА, СА, молоці, лактозі. Кисломолочні продукти: звичайний кисляк і ацидофілін. Культура збудника пропіоновокіслого бродіння (у пробірках). Метиленовий голубий. Фільтрувальний папір, оброблений генціановим фіолетовим. Розчин Люголя. Фуксин Пфейфера.

Мікробіологічні петлі. Чашки зливальні, містки. Вода дистильована в колбах для промивання мазків. Пальники, сірники. Мікроскопи, іммерсійна (кедрова) олія. Форма колоній молочнокислого стрептокока і ацидофільної палички на агарі в чашках Петрі.

Таблиця: мікробіологічна характеристика коров'ячого молока (ДСТ 13277–67).

Визначення загальної кількості мікробів у молоці. Кожна мікробна клітина на щільному живильному середовищі утворює колонію. Облік мікробів у досліджуваному молоці проводять методом підрахунку колоній, що вирости на щільному живильному середовищі у чашках Петрі.

Якщо колоній вирости багато, то для зручності підрахунку колоній дно чашки поділяють на кілька секторів. Колонії підраховують у чашках з висіяним молоком з різних розведень. Зіставляючи результати підрахунку, виводять середню кількість колоній. Кількість мікробів у 1 мл молока дорівнює числу колоній, що вирости на живильному середовищі помноженому на розведення продукту.

Вміст мікробів у 1 мл молока при посіві на стерильне незбиране чи знежирене молоко враховують по його згортанні.

Приклад. Якщо молоко згорнулося в перших п'ятих пробірках, то в 1 мл міститься 100 тис. мікробів, якщо молоко згорнулося в перших шести, то в 1 мл – 1 млн. мікробів і т.д.

Визначення колі-титру молока. Колі-титр молока визначають на середовищі Кеслера, до складу якого входять речовини (жовч, барвник генціановий фіолетовий), що пригнічують ріст молочнокислих і інших грампозитивних мікробів.

Молоко чи молочні продукти спочатку розводять 1:10, 1:100 і т.д. Потім беруть шість пробірок із середовищем: у три з них вносять по 1 мл, в інші – по 0,1 мл кожного розведення. Засіяні пробірки ставлять на дві доби у термостат при температурі 43°C. Відсутність газоутворення у всіх шести пробірках указує на чистоту продукту, і його колі-титр вважають вище 3 мл; при газоутворенні в одній пробірці, засіяної 1 мл досліджуваного продукту, колі-титр дорівнює 3 мл; при утворенні газу більш ніж в одній пробірці з 0,1 мл колі-титр вважається рівним 0,3 мл; при утворенні газу в шести чи п'яти пробірках колі-титр менше 0,3 мл. Таке молоко непридатне до вживання.

Ідентифікацію кишкової палички проводять на середовищі Ендо, для чого роблять висів на таке середовище з газоутворюючих пробірок і ставлять на добу в термостат при температурі 37°C. Утворення на

середовищі Ендо характерних колоній червоного кольору з металевим відтінком вказує на наявність кишкової палички.

Надалі мазки з таких колоній фарбують за Грамом, мікроскопіюють, а також висівають культуру на середовище Гісса з лактозою.

По вмісту кількості мікробів і титру кишкової палички пастеризоване молоко поділяють на дві групи: А и Б (табл. 4).

Таблиця 4

Мікробіологічна характеристика коров'ячого молока (ДСТ 13277–67)

Молоко	Загальна кількість мікробів у 1мл молока, не більше	Титр кишкової палички, мл
Пастеризоване в пляшках і пакетах:		
група А	75 000	3
група Б	150000	0,3
Пастеризоване у флягах і цистернах	300 000	0,3

Одночасно при підрахунку враховують фізіологічні групи мікроорганізмів на елективних середовищах і в такий спосіб визначають загальну кількість мікробів у 1 мл молока.

Методика виділення молочнокислих мікробів. Виділення чистої культури молочнокислого стрептокока проводять зі сметани чи доброї якості кисляку. Одну петлю сметани розводять у 10 мл стерильної води і з цього розведення роблять посів на агар з додаванням гідролізованого молока. Чашки Петрі ставлять на 2–3 доби у термостат при температурі 25°C. Ріст переглядають під малим збільшенням мікроскопа (об'єктив 8). Типові колонії визначають і пересівають на стерильне знежирене молоко і культивують при температурі 25–30°C.

Після згортання (через 12–24 год.) знежиреного молока проводять мікроскопію. При наявності коротких ланцюжків визначають активність стрептокока шляхом пересівання на нові середовища. Якщо щільний згусток без міхурців газу утвориться через 10 – 12 год, а при мікроскопії виявлена типова культура молочнокислого стрептокока, то такий штам використовують для приготування заквасок.

Виділення чистої культури молочнокислих паличок. Болгарську паличку виділяють шляхом посіву петлі кисляку в стерильне молоко, ацидофільну паличку – шляхом посіву вмісту шлунково-кишкового тракту людини або тварини на таке ж середовище. Культури вирощують у термостаті при температурі 40-

45°C. Через дві доби із пробірок, у яких згорнулося молоко, роблять мазки і проводять мікроскопію. При характерній формі паличок культуру пересівають 4–5 разів і вирощують при тій же температурі.

Для остаточного виділення культури з пробірок з характерним згустком одну петлю продукту вносять у 10 мл сироваткового агару (до 7,5 г агар-агару, розплавленого в 100 мл води, додають 400 мл молочної сироватки і стерилізують при 112°C протягом 20 хв). Під малим збільшенням мікроскопа розглядають ріст, визначають характерні колонії, які потім пересівають на знежирене чи незбиране молоко. Якщо продукт зброджується через 12–14 год, то таку культуру залишають у лабораторії для приготування заквасок і кисломолочних продуктів. Лабораторні культури пересівають через тиждень.

Мікроби пропіоновокислого бродіння. Збудником пропіоновокислого бродіння є *Bact. acidi propionici*, або *Propionibacterium*. Такі мікроби широко розповсюджені в природі, їх багато зустрічається в гноєві. Це нерухомі неспорові палички, краще розвиваються при відсутності кисню повітря. Деякі з них схожі на коків, грампозитивні. В молоці пропіоновокислі бактерії розвиваються повільно і згортають його на 7–10-у добу. Гранична кислотність, утворена в молоці пропіоновокислими бактеріями, значно перевищує ту, котра утвориться в цьому продукті деякими молочнокислими мікробами, вона доходить до 160–170°Т. Розвиваються пропіоновокислі бактерії при температурі 30–35°C.

Пропіоновокисле бродіння може відбуватися за рахунок молочного цукру і молочної кислоти. При цьому утвориться пропіонова, оцтова кислоти і діоксид вуглецю. Таке бродіння найбільш характерне виявляється в сирах із тривалим терміном дозрівання (швейцарський). Пропіоновокислі бактерії поліпшують якість сиру. Оцтова і пропіонова кислоти додають сиру специфічний смак і аромат. Вуглецю діоксид утворить вічка.

Пропіоновокислі бактерії ростуть на тих же середовищах, що і молочнокислі, але їх ріст проявляється набагато повільніше, пізніше. За формою колоній пропіоновокислі бактерії нагадують молочнокислий стрептокок. Пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну В₁₂. Вони входять до складу пропіоново-ацидофільної бульйонної культури, що застосовується у тваринництві і служить добрим профілактичним і лікувальним засобом при багатьох хворобах молодняку сільськогосподарських тварин.

ЗАНЯТТЯ 20

МІКРОФЛОРА М'ЯСА І ЯЄЦЬ

Мета заняття. Визначити загальне обсіменіння м'яса мікроорганізмами. Приготувати мазки-відбитки з поверхневого і глибинного шару м'яса № 1 і 2, зафарбувати за Грамом. Визначити рН колориметричним або іншим методом і аміаку реактивом Неслера у фільтраті-екстракті з проби м'яса № 1 і 2. Ознайомитися з мікрофлорою зіпсованих яєць. Провести овоскопію і пробу з зануренням у воду.

Матеріальне забезпечення. Проби м'яса № 1 (якісне) і 2 (зіпсоване). Ножиці Купера (вигнуті), пінцети, скальпелі. Генціановий фіолетовий, розчин Люголя, 96%-ний етиловий спирт. Фуксин Пфейффера. Чашки зливальні, містки. Мікробіологічні петлі. Предметні скельця. Пальники, сірники. Мікроскопи. Кедрова олія.

Екстракт із м'яса № 1 і 2. Апарат Михаеліса (макро чи мікро). Індикатор паранітрофенол. Вода дистильована. Піпетки. Реактив Неслера. Сухі чисті пробірки. Мілілітрові піпетки (для реактива Неслера, екстракту з проби м'яса № 1 і 2, дистильованої води). Три яйця різного ступеня зіпсованості і одне якісне. Овоскоп. Чашки з водою.

Таблиця: визначення якості м'яса за реакцією на аміак з реактивом Неслера (за В. Ю. Вольферцом).

Мікрофлора м'яса. Мікробіологічне дослідження м'яса проводять для визначення мікробного забруднення, мікробів-збудників різних хвороб і придатності його в їжу. Поряд з мікробами в м'ясі можуть бути продукти їхньої життєдіяльності. Спочатку проводять органолептичне дослідження м'яса, потім, у залежності від ступеня свіжості, мікроскопіюють мазки-відбитки і роблять посіви на МПБ і МПА.

Мікроскопія мазків-відбитків із проби м'яса № 1 і 2. На предметному склі роблять два відбитки: один з поверхневого, інший із глибинного шару м'яса. Для приготування мазка-відбитка з поверхневого шару м'яса стерильними ножицями вирізують шматочок і зрізаною стороною прикладають до поверхні профламбованого і охолодженого предметного скла. Для виготовлення мазка-відбитка з глибинних шарів поверхню м'яса припікають шпателем, роблять розріз, із глибини витягають шматочок м'яса, який і прикладають до поверхні скла. Препарати-відбитки висушують на повітрі, фіксують над полум'ям пальника, фарбують за Грамом і мікроскопіюють. Переглядають не менше п'яти полів зору, у кожному полі окремо підраховують кокові і палочкоподібні форми мікробів. Середню

кількість мікробів визначають шляхом додавання всіх клітин і ділення їх на число полів.

Облік результатів дослідження. *М'ясо абсолютно свіже, охолоджене – відбитків тканин м'яса на склі майже немає, фарбування мазка непомітне. У препараті-відбитку з поверхневого шару можна бачити одиничні коки і палички. У препараті-відбитку з глибинних шарів м'яса — мікроби відсутні.*

М'ясо умовно придатне – мазки-відбитки пофарбовані задовільно, тому що тканевий сік містить більше щільних речовин (початок розпаду тканин). У полі зору можна бачити коки і невелике число паличок.

М'ясо несвіже – мазки сильно пофарбовані, тому що до скла прилипає велика кількість тканини, що розпалася. У полі зору багато паличок і коків. При сильному розкладанні коки майже відсутні, у полі зору палочкоподібні форми мікробів.

Визначення загальної кількості мікробів. З кожної проби за допомогою стерильних ножиців вирізують по 1 – 2 г м'яса і поміщають у стерильні бюкси. Після їх зважування вміст переносять у ступку із стерильним товкачиком і розтирають. Потім додають 10 мл стерильної води. Перемішують. У чашку Петрі вносять по 1 мл суспензії і 10–12 мл розплавленого й охолодженого до 45°C м'ясопептонного агару. Обертальними рухами суміш розподіляють по дну чашки і залишають до охолодження. Перевернені чашки поміщають на добу в термостат при температурі 37°C. Число мікробів визначають у 1 г (1 мл) досліджуваного м'яса. Для цього підраховані колонії множать на розведення.

Визначення концентрації водневих іонів (рН). *Приготування фільтрату-екстракту.* З поверхні м'яса зрізують шматочок, звільняють його від жиру і сухожиль. Зважують 10 г, дрібно нарізають і заливають 100 мл дистильованої води, енергійно струшують. Через 15 хв фільтрують через паперовий фільтр. Витяжку досліджують колориметричним методом за загальною методикою з паранітрофенолом. У свіжому м'ясі рН досягає 5,9–6,4; у сумнівному – 6,6; у непридатному – 6,7 і вище. Витяжка зі свіжого м'яса повинна мати рН 5,8–6,3 і, як виняток, 6,4.

Примітка. Для визначення рН універсальним індикатором беруть .1 мл фільтрату-екстракту й одну краплю індикатора. Змішують. Концентрацію водневих іонів визначають за шкалою.

Визначення аміаку реактивом Неслера (крапельний метод).

Реакцію ставлять у двох пробірках: в одну з них наливають 1 мл м'ясного фільтрату-екстракту, в іншу – 1 мл дистильованої води (контроль). Реактив Неслера вносять у пробірки по краплях. Зміна кольору і появу осаду враховують після додавання кожної краплі. Результат оцінки реакції вказують хрестами (табл. 5).

Таблиця 5

**Визначення якості м'яса за реакцією на аміак з реактивом Неслера
(за В.Ю. Вольферцом)**

Число крапель реактива	Зміна кольору і випадіння осаду	Приблизний вміст аміаку, мг %	Оцінка реакції	Якість м'яса
1	2	3	4	5
10	Колір не міняється, помутніння і осаду немає	До 16	–	свіже
10	Пожовтіння і слабке помутніння, осаду немає	16-20	±	Початкова стадія псування, м'ясо підлягає терміновій реалізації
10	Пожовтіння, незначне помутніння і незначний осад	21-30	+	—“—
6-9	Пожовтіння або оранжевий відтінок і осад	31-45	++	Умовно придатне, термінова реалізація після зачищення підозрілих ділянок
1-5	Різке пожовтіння або оранжево-червоний колір і осад	Більше 45	+++	Непридатне, підлягає технічній утилізації

Реакція визначення аміаку реактивом Неслера є демонстративною і може служити одним із критеріїв при оцінці якості м'яса.

Приготування реактиву Неслера. 5 г калію йодиду розчиняють у 5 мл гарячої дистильованої води; 15 г калію гідроокисі (KOH) розчиняють у 40 мл дистильованої води. Розчини змішують і додають 1–2 мл насиченого розчину ртуті дихлориду (сулема). Після охолодження об'єм розчинів дистильованою водою доводять до 100 мл. Зберігають реактив Неслера в банці з темного скла.

Мікрофлора яєць. Мікроби попадають у яйце не тільки під час його формування, але і при зберіганні. З поверхні яйце захищене шкарлупою, що має пори діаметром від 4 до 10 мкм. Кількість пор на 1 см² шкарлупи: у яйценосних порід курей досягає 147, у м'ясних – 132.

Через пори мікроби проникають усередину яйця. Особливо цьому сприяє підвищена вологість і температура. У вмістимому уражених яєць виявляють вульгарного протей, кишкову паличку і інші мікроорганізми, тобто ті, котрі здатні рухатись. У залежності від місця зберігання, крім бактерій, через пори можуть проникати цвілеві гриби і дріжджі. Білок яйця — добре середовище для розвитку мікроорганізмів. Частіше уражаються старі яйця, у яких під час зберігання знижуються захисні сили, нейтралізується лізоцим. Свіжі яйця мають природний імунітет. Більша кількість лізоциму міститься в яєчному білку курей (5,71 мг/мл) і менша в такому ж білку водоплавної птиці: качок (1,80 мг/мл), гусей (0,38 мг/мл). Розвиток мікробів у білку яєць веде до псування продукту. У таких яйцях при просвічуванні видно колонії мікробів (у вигляді темних плям, крапок).

Особливо небезпечні яйця водоплавної птиці (качок, гусей), вони часто бувають заражені сальмонелами, мікобактеріями і іншими збудниками інфекційних хвороб, тому їх дозволяється застосовувати тільки у виробництві кондитерських виробів і то після проварювання в кип'ячій воді протягом 13–14 хв.

Пліснявіння яєць. Висока вологість і температура сприяють проникненню в яйце цвілевих грибів. Колонії, що утворюються в яйці не пропускають світло, їх найбільше біля повітряної камери (пуги). Гіфи гриба утворюють густу мережу, виділяють продукти життєдіяльності. Білок розчиняється, жовток залишається усередині, розміщений у футлярі з гіф. З цвілевих грибів частіше зустрічаються представники роду *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* і інші.

Гниття яєць відбувається під впливом амоніфікаторів. Білок руйнується. Утворюється аміак, сірководень і інші гази. Нерідко такі гази розривають шкарлупу, вміст виливається на сусідні яйця, унаслідок чого відбувається їхнє забруднення і зараження мікробами. Вміст уражених яєць зеленого, чорного і рідше жовтого кольору. З такої маси виділяють мікробів із групи *Pseudomonas* і *Proteus*, а також ешерихій, сальмонел, сінну бацилу, сарцини і ін.

Овоскопія – перегляд яйця в проникаючому світлі. Для цієї мети використовують прилад овоскоп, він являє собою ящик, у верхній частині якого є отвори для яєць. Усередині овоскопа повинно бути джерело світла (звичайна електрична лампочка). Перегляд яєць ефективніше проводити в затемненому приміщенні, але при більш сильному джерелі світла, їм можна користуватися і при природному освітленні. За допомогою овоскопа встановлюють наявність мікробних

уражень у яйці.

У таких місцях можна знайти темні (затримуючі світло) ділянки. Вони, можуть бути різні за формою, розмірами і являють собою колонії мікробів.

Проба із зануренням у воду. Яйце обережно занурюють тупим кінцем у склянку з водою. При цьому зіпсоване яйце стоїть на дні чи спливає, свіже – лягає на дно склянки.

Студенти роблять мазок із вмісту зіпсованого яйця, фарбують за Грамом і розглядають його під мікроскопом. За складом і кількістю мікробів судять про процеси, що відбуваються в яйці.

Рекомендована література

1. Асонов Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М. : Колос ; Колос-Прес, 2002. – 352 с.
2. Мікробіологія / [В. В. Власенко, І. Г. Власенко, І. В. Березовський та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2011. – 200 с.
3. Мікробіологія : практик. для лабор. робіт / [В. В. Власенко, І. Г. Власенко, В. В. Блащук та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2010. – 100 с.
4. Власенко В. В. Практикум з мікробіології / В. В. Власенко, І. В. Березовський. – Вінниця, 2005.
5. Мікробіологія м'яса та м'ясопродуктів : практикум / [В. В. Власенко, В. Г. Скибіцький, І. Г. Власенко та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2008. – 132 с.
6. Мікробіологія молока та молочних продуктів : підручник / [В. Г. Скибіцький, В. В. Власенко, М. В. Мельник та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2008. – 412 с.
7. Ветеринарна мікробіологія : підручник / [В. Г. Скибіцький, В. В. Власенко, Г. В. Козловська та ін.] ; за ред. В. Г. Скибіцького, В. В. Власенка. – К. : Біо-Тест-Лаб., 2013. – 421 с.
8. Харченко С. М. Мікробіологія / С. М. Харченко. – К. : Сільгоспосвіта, 1994. – 350 с.
9. Краткий определитель бактерий Берги / под ред.. Дж. Хоулта. – М. : Мир, 1985. – 495 с.
10. Харченко С. М. Ветеринарно-санітарна експертиза кормів / С. М. Харченко. – К. : Урожай, 1985. – 112 с.
11. Харченко С. М. Справочник по микозам и митоксикозам сельскохозяйственных животных / С. М. Марченко, В. П. Литвин, Н. М. Тарабара. – К. : Урожай, 1982. – 160 с.

Навчальне видання

МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладачі : **Кот** Стах Петрович,
Кириченко Віктор Анатолійович
Мельник Володимир Олександрович

Формат 60x841/16 Ум. друк. арк. 5,8

Тираж 10 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №4490 від 20.02.2013р.