

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

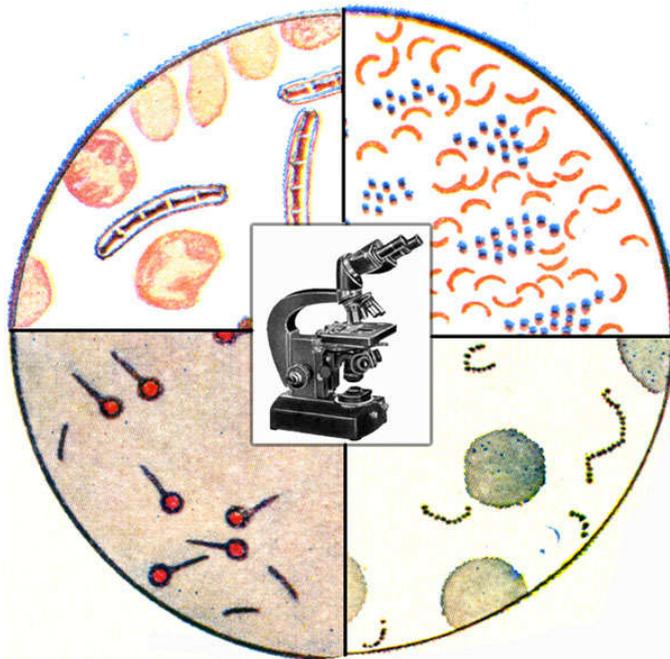
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології

Кафедра ветеринарної медицини та гігієни

# **ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ**

## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

**до лабораторно-практичних занять та самостійної роботи  
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня ОПП «Харчові технології» спеціальності 181 «Харчові технології» денної форми  
здобуття вищої освіти**



**Миколаїв  
2026**

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПШТСБ університету від Миколаївського національного аграрного 25.02.2026 р., протокол № 7.

#### **Укладачі:**

**С. П. Кот** – к. б. наук, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївського національного аграрного університету;

**А. В. Іовенко** - к. вет. наук, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївського національного аграрного університету.

#### **Рецензенти:**

**І. В. Наконечний** – д.-р. б. наук, професор кафедри екології та природоохоронних технологій Національного університету кораблебудування ім. адмірала Макарова;

**С. С. Крамаренко** – д.-р. б. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету.

## Зміст

Вступ	5
Заняття 1. Ветеринарна лабораторія. Мікроскопи та правила роботи з ними	6
Заняття 2. Морфологія бактерій. Простий метод фарбування	9
Заняття 3. Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування	12
Заняття 4. Фарбування спор, капсул, включень. Вивчення рухливості бактерій	15
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	26
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
Література	54

## Вступ

Лабораторні заняття з технічної мікробіології 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 майбутньому фахівцю правильно усвідомлено 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 загиблих 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.
- Дотримуватись 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 поводження 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 застосо-

вують 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'єктив малого збільшення х8 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'єктив переводять на імерсійний (х90). За допомогою макрогвинта занурюють фронтальну лінзу об'єктива 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'єктив піднімають, знімають препарат і протирають фронтальну лінзу об'єктива серветкою, а потім її зволожують спиртом і знову протирають. Чистити об'єктив від імерсійної олії ксилолом або бензином не рекомендується, вони можуть розчиняти речовини, що склеюють лінзи об'єктиву.

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'єктив 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'єктив, імерсійна система мікроскопа, імерсійна рідина?
4. Як за зовнішнім видом визначити імерсійний об'єктив?
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 замальовувати 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 послідуєчих 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 виростили 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 см<sup>2</sup>. 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, висушеними 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 спир-

тівки. 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 96<sup>0</sup>. 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.), метиленою 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 метахромазія (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 розчинів фарб. 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 роз-

чин 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 37<sup>0</sup>С, 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 поверх-

неві 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 підігрівують 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, підігрівують 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'єктив «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'єктивом "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. Плісеневі 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 дейтероміцети, 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 (субстратний), 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).

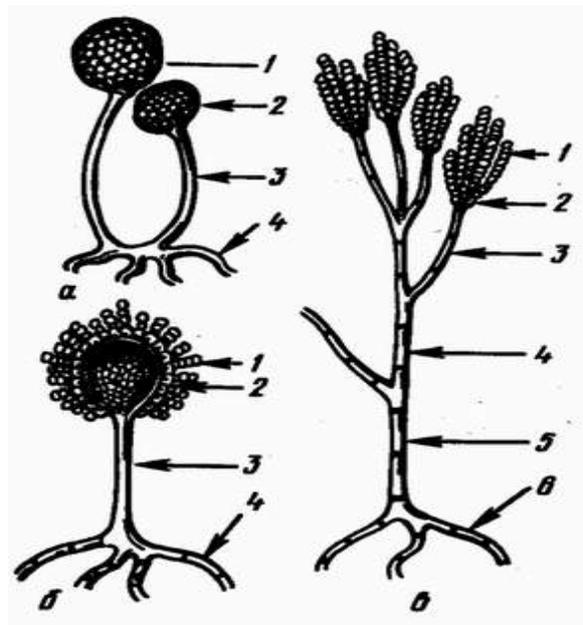


Рис. 1. Схема будови: а) мукора (клас зигоміцети): 1-ендоспори; 2-спорангій (плодове тіло); 3-спорангієносець; 4-міцелій; б) аспергилалесечна плісня (клас дейтероміцети): 1-конідії (екзоспори); 2-стерігми; 3-конідієносець; 4-міцелій; в) пеніцил (кістевик)-клас дейтероміцети: 1-конідії; 2-фіаліди; 3-метула;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

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.

### **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 нарізують 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 загорнути 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 лугу 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 100<sup>0</sup>С, дробову стерилізацію при температурі нижче, ніж 100<sup>0</sup>С, стерилізація паром під тиском з температурою вище 100<sup>0</sup>С, 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 теплоізоляційною 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<sup>0</sup>С, експозиція 2 год, при 165 - 170<sup>0</sup>С - 1-1,5 год, при 180<sup>0</sup>С – 1 год. По закінченні часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45<sup>0</sup>С, 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 дробної 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 паром 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 паром 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. Різке 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 дробної 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 дріт 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 дріт 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

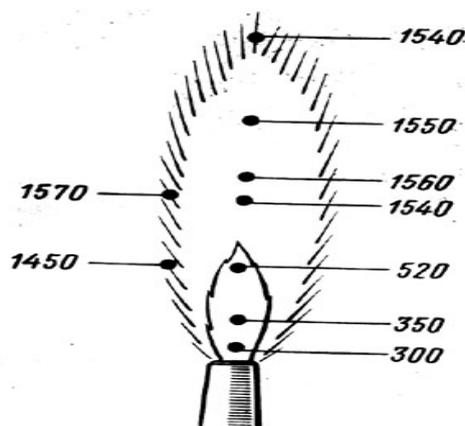


Рис.3. Значення температури (°C) в різних ділянках полум'я

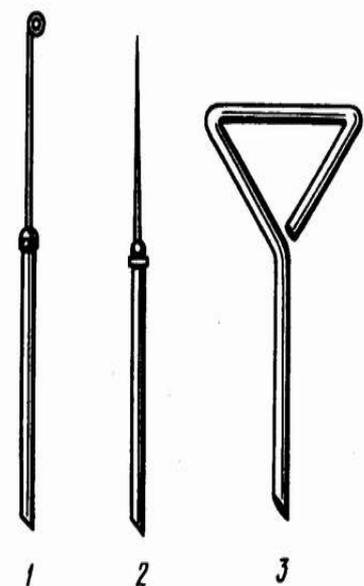


Рис.4. Інструменти для посіву і розсіву культур мікроорганізмів:  
1-мікробіологічна петля;  
2-мікробіологічна голка;  
3-шпатель

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.

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 вгору 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 ексікатор. З ексікатора 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 ро-

зтирають 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 *споривих форм від видів, які не утворюють спори*, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогрівають 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 метиленою синькою, 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.

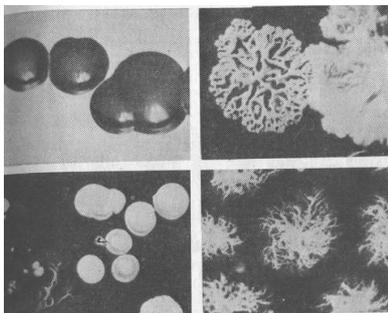


Рис. 5. Колонії різних мікроорганізмів на МПА

Зростання мікробів на щільних живильних середовищах (МПА) супроводжується утворенням колоній – скупчень мікробів (рис 5), що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини. Колонії характеризуються великою різноманітністю, можуть бути ізольованими і злитими. Вивчення їх проводять неозброєним оком і з допомогою мікроскопа або лупи. Звичайно заздале-

гідь 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-мікрометра 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 в рості в товщу середовища), крихка, крихка, ослизла (тягуча, прилипає до петлі), тістоподібна, олієподібна;

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

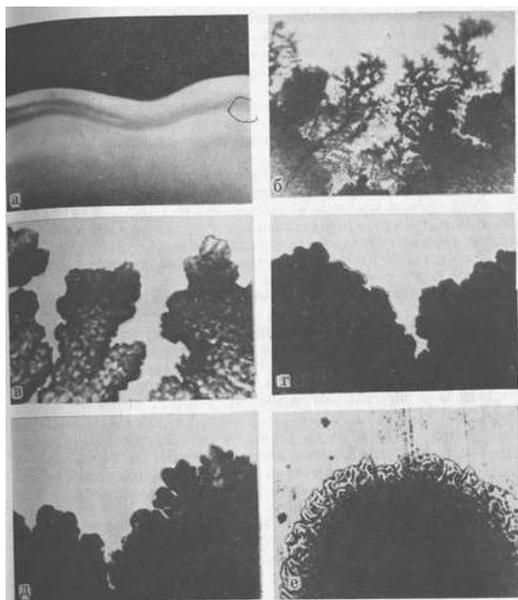


Рис.6. Край колоній мікробів:  
1-хвилястий; 2-гіллястий;  
3-розірваний; 4-різаний;  
5-лопасний; 6-локоноподібний

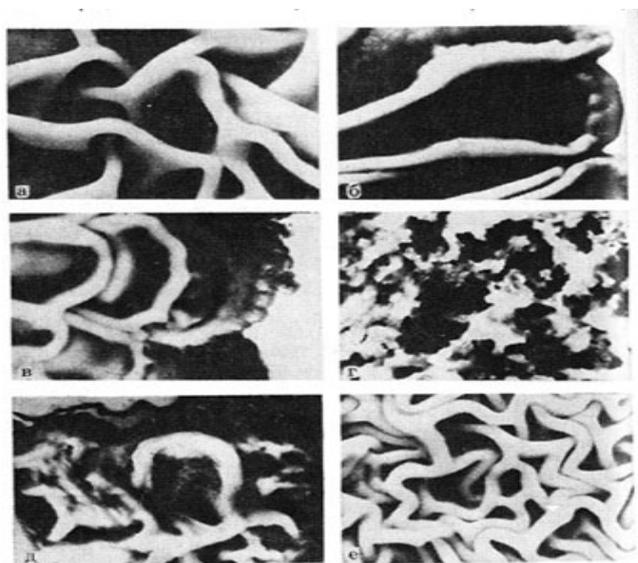


Рис.7. Поверхня колоній мікробів:  
1-складчаста; 2-радіально складчаста; 3-поперечно складчаста; 4-ніздrevата; 5-з кратероподібним центром; 6-мозковидна

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 ізольованих 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 - *СІ. perfringens*.

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

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

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

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

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

*катим 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 індолюотворення 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 уколком 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. Коричневе 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 бактеріо-логічного 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 центрі 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 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

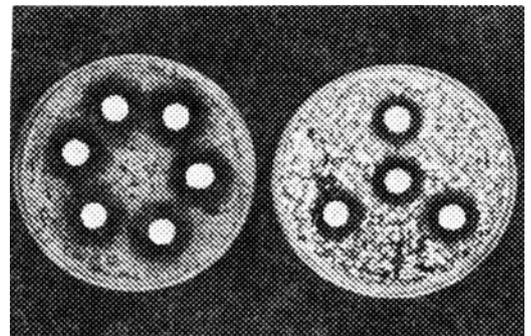


Рис.8 Визначення активності антибіотиків методом дифузії в агар з допомогою паперових дисків.

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 градузовані 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 бак-

теріологічного 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 виросли 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, мікроско-

пують. 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<sup>3</sup>.

*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<sup>3</sup>), його підраховують за формулою Омелянського. Правилком Омелянського передбачається, що на поверхні агару у чашці Петрі з площею 100 см<sup>2</sup> 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 пере-сівають для одержання чистої культури з наступною її ідентифікацією.

### **Санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту.**

Медично-ветеринарну службу цікавить виявлення патогенних мікроорганізмів, що потрапляють в ґрунт з трупами тварин, які загинули від інфекційних хвороб з виділеннями хворих тварин, з неззараженими стічними водами. В таких випадках ґрунт може виявитися чинником інфікування (сибірка, правець, злоякісний 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), колі-титру, перфрінгенс-титру, та в окремих випадках проби ґрунту досліджують на наявність певних патогенних мікробів. Таблиця 1.

*Відбір проб ґрунту.* На території що обстежується площею до 1000 м<sup>2</sup>, виділяють дві ділянки по 25 м<sup>2</sup> (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°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 кожену чашку додають ще по 15-20 мл розплавленого (і охолодженого) до 45°C МПА. Рівномірними обережними обертливими 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). Гази, що накопичуються 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.

Таблиця 1

### 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 аглютинації сироваток у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400; сироватки: бруцельозна на + + + + , + + + , ++ і — (негативна). Для крапельної реакції аглютинації: предметні скельця, випробувана (розведена на 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 (аглютининів) 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. Аглютинація — 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 кожен 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.** Мікропіпет-

кою 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 комплементу (РЗК).** За своєю чутливістю реакція зв'язування комплементу (РЗК) займає перше місце, що дозволяє виявити більшу кількість реагуючих. Сутність реакції полягає в тому, що комплемент, 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: досліджува-

ну 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 комплекменту, 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°С. 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 виймки 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 аглютининів 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-хутрянну 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 здрібноної 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 си-

ровини на сибірку застосовують апаратуру Флоринського. Реакція вважається позитивною, якщо на границі обох рідин з'являється преципітат – сіро-біле кільце. Прісно-суху, парну, морожену шкіряно-хутрянну 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 опалесцючі 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 молодняка, а також проти правця (антитоксична) і ін.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Безпека харчування: сучасні проблеми : посібник-довідник. / А. В. Бабюк, О. В. Макарова, М. С. Рогозинський, Л. В. Романів. Чернівці : Книги XXI, 2005. 456 с.
2. Грегірчак Н. М. Мікробіологія харчових виробництв. Лабораторний практикум. Київ : НУХТ, 2009. 302 с.
3. Грегірчак Н.М. Санітарно-гігієнічний контроль виробництв. Конспект лекцій. НУХТ, 2011. 175 с.  
URL:<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/999/3/69.02.pdf> 3. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія. Київ : НУХТ, 2004. 471 с.
4. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. 360 с.
5. Климнюк С. І., Ситник І. О., Творко М. С., Широбков В. П. Практична мікробіологія : посібник. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 440 с.
6. Люта В. А., Кононов О. В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник. Київ : Медицина, 2018. 576 с.
7. Мікробіологія : практикум для лабораторних робіт / В. В. Власенко та ін. Вінниця : Едельвейс і К, 2010. 100 с.
8. Мікробіологія з основами імунології : підручник / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук, І. І. Солонинко. Київ : Медицина, 2020. 384 с.
9. Мікробіологія молока і молочних продуктів з основами ветеринарно-санітарної експертизи : навч. посіб. / О. М. Бергілевич, В. І. Семанюк, В. В. Касянчук та ін. ; за ред. В. В. Касянчук. Суми : Університетська книга, 2023. 320 с.
10. Мікробіологія молока і молочних продуктів. Практикум : навч. посіб. / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, І. Г. Власенко та ін. ; за ред. В. В. Касянчук. Суми : Університетська книга, 2023. 205 с.
11. Мікробіологія харчових виробництв / Т. П. Пирог, Л. Р. Решетняк, В. М. Поводзинський, Н. М. Грегірчак. Вінниця : Нова книга, 2007. 463 с.

12. Мікробіологія харчових виробництв : навч. посіб. / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова та ін. Херсон : Видавець ФОП Грінь Д.С., 2016. 478 с.
13. Півоваров О. А., Ковальова О. С., Кошулько В. С. Інноваційні технології та обладнання бродильних виробництв : навчальний посібник. Дніпро : ФОП Обдимко О.С., 2025. 396 с. URL: <https://dspace.dsau.dp.ua/handle/123456789/11832>.
14. Ситник І. Д, Климюк С. І., Тварко М. С. Мікробіологія, вірусологія імунологія : підручник. Тернопіль : ТДМУ, 2017. 392 с.
15. Соломон А. М., Казмірук Н. М., Тузова С. Д. Мікробіологія харчових виробництв : підручник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». Вінниця : РВВ ВНАУ, 2020. 288 с.
16. Технічна мікробіологія : підруч. / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова та ін. ; під ред. Л. В. Капрельянца. Херсон : Олді-плюс, 2020. 432 с.
17. Технічна мікробіологія : практикум для здобувачів вищої освіти / В. В. Євлаш, Л. В. Газзаві-Рогозіна, А. С. Бикова, О. В. Циганков. Харків : НТУ «ХП», ХДУХТ, 2020. 180 с.
18. Хабленко А. Д., Яловенко О. І., Поліщук В. Ю. Біотехнологія пробіотиків. Лабораторний практикум : навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського ; Видво «Політехніка», 2025. 68 с. URI: <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/75684>.

Навчальне видання

## **ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

Укладачі :

**Кот Стах Петрович**

**Іовенко Артем Володимирович**

Формат 60x841/16 Ум. друк. арк. 3,4

Тираж 30 прим. Зам. № \_\_\_\_

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