

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

Факультет ТВШТСБ

Кафедра біотехнології та біоінженерії

Спеціальність 162– «Біотехнології та біоінженерія»

Ступінь вищої освіти «Бакалавр»

Допустити до захисту

Рекомендувати до захисту

Декан _____ Михайло ГИЛЬ

В.о. зав. кафедри _____ Олена КАРАТЄЄВА

“ ____ ” _____ 2026р.

“ ____ ” _____ 2026р.

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО СКРИНІНГУ
ШТАМІВ *SALMONELLA*, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ПРОДУКТІВ
ПТАХІВНИЦТВА**

04.02. – КР. 76-О. 26 05 19. 004

Виконавець:

здобувачка вищої

освіти IV курсу _____ **Софія КАРПЕНКО**

Науковий керівник:

доцентка _____ **Олена КАРАТЄЄВА**

Рецензент:

професор _____ **Віктор СТАБНІКОВ**

Миколаїв 2026

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Джерела контамінації продукції тваринництва та кормів	6
1.2. Біологічна характеристика та геномна організація <i>Salmonella</i>	10
1.3. <i>Salmonella</i> як об'єкт біотехнологічних досліджень	14
1.4. Методи виділення різних штамів <i>Salmonella</i>	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	22
2.1. Місце та об'єкт досліджень	22
2.2. Методика виконання роботи	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
3.1. Таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості	28
3.2. Виділення штамів <i>Salmonella Enteritidis</i> та <i>Salmonella Typhimurium</i> методом мікробіологічного скринінгу	31
3.3. Ідентифікація виділених штамів <i>Salmonella</i>	36
3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу виділення	39
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	47
ВИСНОВКИ	51
ПРОПОЗИЦІЇ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

РЕФЕРАТ

Впускна робота викладена на 57 сторінках та має логічну структуру, що охоплює огляд літератури, методик виконання експерименту, результати досліджень, отримані в лабораторних умовах, а також розділ з охорони праці. Робота ілюстрована 2 таблицями та 3 рисунками. Список літератури налічує 33 джерела, в тому числі 10 латиницею.

Тема дослідження – Мікробіологічний скринінг штамів *Salmonella*, ізольованих із продуктів птахівництва.

Об'єктом дослідження є ізольовані з продукції птахівництва (м'ясо птиці та яйця) мікроорганізми роду *Salmonella*.

Предмет дослідження процеси виділення, ідентифікації та порівняльної характеристики штамів *Salmonella Enteritidis* і *Salmonella Typhimurium*, їх морфологічні, культуральні та біохімічні властивості.

Мета дослідження – виділити та ідентифікувати штами *Salmonella spp.* із продукції птахівництва, а також провести їх порівняльну характеристику за основними мікробіологічними ознаками.

Для реалізації поставленої мети були сформовані наступні завдання: встановити таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості бактерій *Salmonella*; здійснити виділення штамів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* методом мікробіологічного скринінгу; провести ідентифікацію виділених штамів *Salmonella* за морфологічними, культуральними та біохімічними ознаками; описати поетапну блок-схему виділення штамів *Salmonella* із продуктів птахівництва; здійснити розрахунок обладнання для процесу виділення.

Практичне значення роботи полягає в тому що проведені дослідження підтверджують ефективність використання комплексного підходу до виявлення бактерій роду *Salmonella*, що базується на поєднанні селективних, диференційно-діагностичних та біохімічних методів. Це забезпечує надійну ідентифікацію збудника та підвищує ефективність ветеринарно-санітарного

контролю, що є важливим для забезпечення безпечності продукції тваринного походження.

ВСТУП

У сучасних умовах розвитку агропромислового комплексу особливого значення набуває забезпечення мікробіологічної безпечності продукції тваринництва та кормів. Однією з найбільш небезпечних груп патогенних мікроорганізмів, що становлять загрозу як для здоров'я тварин, так і для людини, є бактерії роду *Salmonella*. Вони широко поширені у навколишньому середовищі та здатні контамінувати сировину і готову продукцію на різних етапах виробництва, транспортування та зберігання [12].

Продукти тваринництва та корми є важливими ланками у передачі сальмонел, оскільки можуть виступати як резервуар і фактор поширення інфекції. Контамінація кормів патогенними мікроорганізмами сприяє інфікуванню тварин, що, у свою чергу, призводить до зниження продуктивності, економічних збитків та підвищення ризику виникнення зоонозних захворювань. Особливої актуальності ця проблема набуває в умовах інтенсифікації виробництва та глобалізації ринку харчових продуктів [24].

Сучасні біотехнологічні методи відкривають нові можливості для швидкого, точного та ефективного виявлення і дослідження патогенних мікроорганізмів. Поєднання класичних бактеріологічних підходів із молекулярно-генетичними методами, такими як полімеразна ланцюгова реакція, дозволяє не лише ідентифікувати збудника, але й здійснювати його детальну характеристику, включаючи визначення вірулентних властивостей та антибіотикорезистентності [30].

У зв'язку з цим особливої наукової та практичної значущості набуває дослідження, спрямоване на виділення та порівняльну характеристику штамів *Salmonella spp.*, ізольованих із продуктів тваринництва та кормів. Такий підхід дозволяє оцінити ступінь їх небезпеки, виявити джерела контамінації та обґрунтувати ефективні заходи контролю [2].

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Джерела контамінації продукції тваринництва та кормів

Контамінація продукції тваринництва та кормів бактеріями роду *Salmonella* є однією з ключових проблем сучасної ветеринарної медицини та харчової безпеки. Поширення цих мікроорганізмів відбувається внаслідок складної взаємодії біологічних, технологічних і екологічних факторів, що формують єдиний епізоотичний ланцюг. Джерела інфекції можуть мати як природне походження, так і бути наслідком порушень технології виробництва, транспортування та зберігання продукції [33].

Основним природним резервуаром *Salmonella spp.* є організм сільськогосподарських тварин і птиці, насамперед їхній шлунково-кишковий тракт. Інфіковані тварини, навіть за відсутності клінічних ознак захворювання, можуть тривалий час виділяти збудника у зовнішнє середовище з фекаліями, що спричиняє контамінацію підстилки, ґрунту, води та кормів. Безсимптомне носійство є одним із найважливіших факторів підтримання циркуляції *Salmonella* у тваринницьких господарствах, особливо у птахівництві [3].

Особливу небезпеку становить вертикальна передача інфекції, яка характерна для деяких сероварів, зокрема *Salmonella Enteritidis*. Збудник може проникати в яйце ще на стадії його формування, що призводить до інфікування ембріонів і поширення патогену серед молодняку. Такий механізм значно ускладнює контроль інфекції, оскільки навіть за дотримання санітарних норм зовнішня поверхня яйця може залишатися чистою [4].

Контамінація кормів є одним із провідних шляхів поширення *Salmonella spp.* у тваринництві. Кормова сировина може інфікуватися ще на етапі вирощування внаслідок контакту з ґрунтом, водою або органічними добривами. Подальше забруднення можливе під час збирання, транспортування та зберігання. Особливо високий ризик пов'язаний із

використанням білкових компонентів, таких як соєвий шрот або м'ясо-кісткове борошно. *Salmonella* здатна тривалий час зберігатися у сухих кормах, не втрачаючи життєздатності [5].

Важливим фактором є також вторинна контамінація кормів у процесі їх зберігання. Контакт із гризунами, комахами та дикими птахами значно підвищує ризик зараження, оскільки ці організми можуть виступати переносниками збудника. Недостатній контроль за біобезпекою кормових складів є однією з основних причин виникнення спалахів сальмонельозу [12].

На етапах переробки продукції тваринництва значну роль відіграє перехресна контамінація. Під час забою тварин можливе потрапляння вмісту кишечника на поверхню туші, що є одним із головних шляхів зараження м'яса. Аналогічні процеси можуть відбуватися при обробці молока, яєць та інших продуктів. Недостатня гігієна обладнання, інвентарю та рук персоналу сприяє поширенню збудника в межах виробничих приміщень [5].

Окрему роль у процесі контамінації відіграє здатність *Salmonella spp.* до утворення біоплівки. Біоплівки формуються на поверхнях технологічного обладнання, трубопроводів і ємностей, що створює умови для тривалого збереження бактерій навіть після проведення дезінфекції. Мікроорганізми у складі біоплівки демонструють підвищену стійкість до антимікробних засобів і факторів зовнішнього середовища, що значно ускладнює їх елімінацію [13].

Суттєвий вплив на рівень контамінації мають технологічні та організаційні фактори. До них належать висока щільність утримання тварин, порушення температурного режиму, підвищена вологість, а також недотримання принципів біобезпеки. Інтенсивні системи виробництва створюють сприятливі умови для швидкого поширення інфекції між тваринами [18].

Епідеміологічне значення контамінації продукції тваринництва *Salmonella spp.* є надзвичайно високим. Продукти тваринного походження, зокрема м'ясо птиці, яйця та м'ясні вироби, є основними джерелами інфікування людини. Більшість випадків сальмонельозу пов'язані саме зі

споживанням контамінованих харчових продуктів. Це підкреслює необхідність комплексного контролю на всіх етапах виробництва – від ферми до столу [18].

Аналіз літературних даних свідчить, що джерела контамінації *Salmonella spp.* у продукції тваринництва та кормах мають різну епідеміологічну значущість і впливають на формування ризиків на різних етапах виробництва. Водночас ці джерела не існують ізольовано, а утворюють взаємопов'язану систему, в якій кожен елемент може посилювати або, навпаки, обмежувати поширення збудника [22].

Первинні джерела інфекції, пов'язані з інфікованими тваринами, відіграють визначальну роль у запуску епізоотичного процесу. Саме на рівні ферми формується базовий рівень інфікованості стада, який у подальшому визначає ступінь контамінації продукції. Високий рівень носійства *Salmonella* серед тварин прямо корелює з частотою виявлення патогену в м'ясі та продуктах переробки. При цьому особливу небезпеку становлять латентні форми інфекції, які складно діагностуються та часто залишаються поза контролем [15].

Порівняльний аналіз показує, що корми виступають не лише фактором передачі, але й множителем інфекції, оскільки через них відбувається швидке інфікування значної кількості тварин. На відміну від інших джерел, контамінований корм здатний одночасно впливати на ціле поголів'я, що різко підвищує масштаб поширення патогену. Крім того, стійкість *Salmonella* у сухих кормових середовищах забезпечує тривале збереження інфекційного потенціалу, що робить корми одним із найбільш небезпечних факторів ризику [26].

Вторинна контамінація на етапах переробки має інший характер – вона не формує інфекцію, але значно підсилює її поширення. У цьому випадку ключову роль відіграє людський фактор і рівень організації виробництва. Навіть за відносно низького рівня інфікованості сировини порушення санітарно-гігієнічних норм може призвести до масового забруднення готової

продукції. Особливо це характерно для підприємств із високим ступенем автоматизації, де один контамінований вузол здатен стати джерелом зараження великих партій продукції [14].

Окремого значення набуває здатність *Salmonella spp.* до утворення біоплівки, що фактично переводить контамінацію з тимчасового у хронічний стан. У таких умовах виробниче середовище стає постійним резервуаром інфекції, незалежно від якості вхідної сировини. Це пояснює випадки, коли навіть при суворому контролі кормів і тварин спостерігається повторне виявлення патогену у продукції [5].

З позиції ризик-аналізу (НАССР) найбільш критичними контрольними точками є: якість і безпечність кормів; стан здоров'я та інфікованість поголів'я; процеси забою та первинної переробки; санітарний стан обладнання [27].

Саме на цих етапах формується найбільша ймовірність контамінації, і відповідно вони потребують найбільш жорсткого контролю [5].

Важливо підкреслити, що сучасні дослідження демонструють зміщення акценту від окремих факторів до комплексного підходу управління ризиками. Ефективний контроль *Salmonella* можливий лише за умов інтеграції заходів на всіх рівнях: від контролю кормів і біобезпеки ферми до впровадження сучасних біотехнологічних методів моніторингу [13].

У контексті даної роботи ці положення мають особливе значення, оскільки порівняльна характеристика штамів, ізольованих із різних джерел (продукції тваринництва та кормів), дозволяє не лише оцінити їх біологічні властивості, але й встановити можливі шляхи циркуляції патогену. Виявлення подібності або відмінностей між штамми може свідчити про спільність джерел контамінації або незалежність їх походження, що має важливе практичне значення для розробки профілактичних заходів [15].

Таким чином, аналіз джерел контамінації *Salmonella spp.* свідчить про їх комплексний і взаємозалежний характер. Найбільшу небезпеку становить поєднання кількох факторів – інфікованого поголів'я, контамінованих кормів

і недостатнього рівня біобезпеки, що створює умови для стійкого функціонування епізоотичного процесу. Це визначає необхідність системного підходу до контролю та використання сучасних біотехнологічних методів для своєчасного виявлення і запобігання поширенню збудника [31].

1.2. Біологічна характеристика та геномна організація *Salmonella*

Бактерії роду *Salmonella* належать до родини *Enterobacteriaceae* і є грамнегативними, факультативно анаеробними, паличкоподібними мікроорганізмами. Вони широко поширені в природі та здатні колонізувати кишечник людини, тварин і птахів. Більшість представників роду є рухливими завдяки наявності перитрихціальних джгутиків, за винятком окремих сероварів, таких як *Salmonella Gallinarum* та *Salmonella Pullorum*, які є нерухомими [31].

Згідно з сучасною класифікацією, рід *Salmonella* включає два види: *Salmonella enterica* та *Salmonella bongori*. Вид *S. enterica* поділяється на шість підвидів (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*), серед яких найбільше значення для ветеринарної медицини та харчової безпеки має підвид *enterica*. У межах цього підвиду описано понад 2500 сероварів, які розрізняються за антигенною структурою (О- та Н-антигени). Найбільш поширеними та епідеміологічно значущими є серовари *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* [1].

Найбільш значущі серовари:

- *S. Enteritidis* – часто асоційований із яйцями та продукцією птахівництва
- *S. Typhimurium* – широкий спектр господарів, поширений у кормах і м'ясі
- *S. Infantis* – характерний для птахівництва, часто резистентний
- *S. Gallinarum* та *S. Pullorum* – специфічні для птиці, викликають септичні захворювання
- *S. Dublin* – асоційований із великою рогатою худобою

- *S. Choleraesuis* – характерний для свиней

За специфічністю до господаря серовари поділяють на:

- гостро специфічні (наприклад, *S. Typhi*, *S. Gallinarum*)
- адаптовані до певних видів (*S. Dublin*, *S. Choleraesuis*)
- неспецифічні (широкого спектру) (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*) [3].

Salmonella spp. добре ростуть на універсальних поживних середовищах і формують гладкі колонії. Для їх диференціації використовують селективні середовища (Ендо, Плоскірева, XLD, SS-агар), де вони утворюють характерні колонії з чорним центром (через продукцію H_2S) [12].

Основні біохімічні властивості: ферментація глюкози з утворенням кислоти і газу; відсутність ферментації лактози (у більшості штамів); утворення сірководню; позитивна реакція на лізиндекарбоксилазу [15].

Біологічні властивості *Salmonella spp.* характеризуються здатністю рости на простих поживних середовищах, утворюючи гладкі (S-форми) колонії. Вони ферментують глюкозу з утворенням кислоти, але не ферментують лактозу (за винятком окремих штамів), що використовується для їх диференціації на селективно-діагностичних середовищах. Бактерії здатні продукувати сірководень, що також є важливою діагностичною ознакою [16].

Патогенність *Salmonella spp.* обумовлена наявністю комплексу факторів вірулентності, серед яких важливу роль відіграють адгезини, інвазійні білки, ендотоксин (ліпополісахарид клітинної стінки), а також здатність до внутрішньоклітинного виживання в макрофагах. Ці властивості забезпечують проникнення бактерій у клітини епітелію кишечника, їх розмноження та поширення в організмі. За способом проникнення в клітину та поширення в організмі поділяються на: ендотоксин (ЛПС) – викликає інтоксикацію; адгезини – забезпечують прикріплення до клітин; інвазійні білки – сприяють проникненню в епітелій; системи секреції III типу (Т3SS) – ключовий механізм патогенності; здатність до внутрішньоклітинного виживання [23].

Геном *Salmonella spp.* представлений кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК розміром приблизно 4,5–5,5 млн пар нуклеотидів. Він

характеризується високим рівнем консервативності, однак містить варіабельні ділянки, що визначають патогенність і адаптаційні властивості різних штамів. Особливу роль у формуванні вірулентності відіграють так звані «острови патогенності» (*Salmonella Pathogenicity Islands*, SPI), зокрема SPI-1 та SPI-2. Вони кодують білки системи секреції III типу, що забезпечують інвазію клітин господаря та виживання бактерій у фагоцитах [22].

Окрім хромосомної ДНК, у клітинах *Salmonella* можуть бути присутні плазмідні, які несуть гени вірулентності, антибіотикорезистентності та адаптації до несприятливих умов. Значну роль у генетичній мінливості відіграють мобільні генетичні елементи, такі як транспозони та інтегри, що сприяють горизонтальному переносу генів між бактеріями. Багато штамів містять плазмідні, які кодують: фактори вірулентності; антибіотикорезистентність; адаптацію до стресових умов. Мобільні елементи (транспозони, інтегри) забезпечують: горизонтальний перенос генів та швидке формування резистентності [15].

Штами *Salmonella* можуть суттєво відрізнятися за: вірулентністю, стійкістю до антибіотиків, здатністю до утворення біоплівки, адаптацією до різних середовищ. Це має важливе значення для епізоотології та контролю інфекцій [24].

Сучасні дослідження геному *Salmonella spp.* із використанням методів секвенування дозволяють детально вивчати еволюційні зв'язки між штамми, механізми формування патогенності та поширення резистентності до антибіотиків. Це має важливе значення для розробки ефективних методів діагностики, профілактики та контролю сальмонельозу [32].

Важливою особливістю бактерій роду *Salmonella* є їх екологічна пластичність, що дозволяє виживати як у зовнішньому середовищі (грунт, вода, корми), так і в організмі господаря. Вони здатні тривалий час зберігатися у висушеному стані, переносити низькі температури та формувати стійкі популяції у виробничих умовах [28].

Окрему увагу слід приділити здатності *Salmonella spp.* до утворення біоплівки. Біоплівки формуються на поверхнях обладнання, у водопровідних системах та на сировині, що значно ускладнює дезінфекцію та сприяє хронічній контамінації виробництва. Біоплівкові форми характеризуються підвищеною стійкістю до антимікробних препаратів і несприятливих факторів середовища [27].

Ще однією важливою рисою є наявність механізмів стрес-адаптації, зокрема відповіді на кислотний, осмотичний та оксидативний стрес. Це дозволяє бактеріям виживати у шлунково-кишковому тракті та під час технологічної обробки харчових продуктів [30].

На молекулярному рівні значну роль відіграє система регуляції експресії генів, зокрема регуляторні білки (PhoP/PhoQ, HilA, RpoS), які координують адаптацію до змін середовища та активацію факторів вірулентності. Завдяки цьому *Salmonella* здатна швидко змінювати свій фенотип залежно від умов існування [32].

Крім того, штами *Salmonella spp.* відрізняються за здатністю до кворум-сенсингу – механізму міжклітинної комунікації, що регулює щільність популяції та координацію поведінки, включаючи утворення біоплівки і експресію генів вірулентності [31].

Суттєве значення має також антигенна мінливість, яка дозволяє бактеріям уникати імунної відповіді організму господаря. Зміни в структурі поверхневих антигенів (O- та H-) сприяють тривалому персистуванню інфекції та ускладнюють її діагностику [15].

У контексті біотехнології важливим є використання генетичних маркерів *Salmonella* (наприклад, гени *invA*, *stn*, *hilA*), які застосовуються для швидкої ідентифікації патогенів методом ПЛР. Ці гени є висококонсервативними і специфічними для роду, що забезпечує високу точність діагностики [20].

Отже, рід *Salmonella* характеризується значною різноманітністю сероварів, високою генетичною пластичністю та складною системою факторів

вірулентності. Це зумовлює їх здатність адаптуватися до різних умов і робить їх важливим об'єктом дослідження у біотехнології, ветеринарній медицині та харчовій безпеці [20].

1.3. *Salmonella* як об'єкт біотехнологічних досліджень

Бактерії роду *Salmonella* займають важливе місце серед об'єктів сучасних біотехнологічних досліджень завдяки своїй значній поширеності, патогенності та високій генетичній пластичності. Їх вивчення має не лише фундаментальне, але й прикладне значення у ветеринарній медицині, харчовій промисловості, фармакології та біобезпеці [4].

Однією з ключових причин активного використання *Salmonella spp.* у біотехнології є добре вивчений геном та наявність широкого спектра генетичних інструментів для його аналізу. Молекулярно-генетичні дослідження дозволили ідентифікувати численні гени вірулентності, регуляторні системи та механізми адаптації, що робить ці бактерії зручною моделлю для вивчення взаємодії «патоген–господар». Зокрема, *Salmonella* широко використовується для дослідження внутрішньоклітинного паразитизму, механізмів інвазії та імунної відповіді [5].

У галузі діагностики *Salmonella spp.* виступає важливим об'єктом для розробки та вдосконалення біотехнологічних методів виявлення патогенів. Сучасні підходи включають застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), методів реального часу (qPCR), імуноферментного аналізу (ІФА), а також біосенсорних систем. Використання специфічних генетичних маркерів (наприклад, *invA*, *fimA*, *stn*) забезпечує високу чутливість і специфічність діагностики, що є критично важливим для контролю безпечності харчових продуктів і кормів [8].

Особливу увагу в біотехнології приділяють дослідженню антибіотикорезистентності *Salmonella spp.* У зв'язку зі зростанням поширення мультирезистентних штамів, ці бактерії використовуються як модель для

вивчення механізмів формування та передачі генів резистентності. Біотехнологічні підходи, зокрема секвенування геномів і аналіз мобільних генетичних елементів, дозволяють відстежувати еволюцію резистентності та розробляти стратегії її стримування [10].

Крім того, *Salmonella* є об'єктом досліджень у сфері розробки альтернативних методів боротьби з патогенами. Зокрема, активно вивчається застосування бактеріофагів, які здатні специфічно інфікувати та знищувати клітини *Salmonella*. Фаготерапія розглядається як перспективна альтернатива антибіотикам, особливо в умовах зростання резистентності мікроорганізмів [12].

У біотехнологічних дослідженнях також використовуються пробіотичні та антагоністичні мікроорганізми, які здатні пригнічувати ріст *Salmonella spp.* У кишечнику тварин і птиці. Це відкриває можливості для створення безпечних кормових добавок і зниження рівня контамінації продукції [15].

Цікавим напрямом є використання генетично модифікованих штамів *Salmonella* у медицині та фармакології. Ослаблені (атенуйовані) штами можуть застосовуватися як векторні системи для доставки антигенів або лікарських засобів, зокрема у розробці вакцин. Такі підходи базуються на здатності бактерій проникати в клітини організму та стимулювати імунну відповідь [13].

Сучасні методи геноміки, транскриптоміки та протеоміки дозволяють комплексно досліджувати функціонування клітини *Salmonella*, виявляти нові мішені для антимікробних препаратів та оцінювати взаємодію з різними середовищами. Використання технологій секвенування нового покоління (NGS) значно розширило можливості вивчення популяційної структури та епідеміології цих бактерій [16].

Бактерії роду *Salmonella* є одним із найбільш досліджених об'єктів сучасної біотехнології, що зумовлено їх значною роллю у виникненні харчових токсикоінфекцій та здатністю до швидкої адаптації в різних екологічних нішах. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO,

2020), *Salmonella spp.* входить до числа провідних причин бактеріальних гастроентеритів у світі, спричиняючи понад 90 млн випадків захворювань щорічно [20].

Високий інтерес до *Salmonella* у біотехнології пов'язаний із добре вивченим геномом і наявністю численних молекулярних маркерів. Зокрема, ген *invA* вважається універсальним для ідентифікації представників роду, оскільки присутній у всіх патогенних штаммах. Це дозволило широко впровадити методи ПЛР для швидкої діагностики сальмонельозу в харчовій та кормовій сировині [22].

Сучасні дослідження демонструють високу ефективність застосування методів реального часу (qPCR). qPCR дозволяє виявляти *Salmonella* з чутливістю до 10^2 – 10^3 КУО/мл, що значно перевищує можливості класичних бактеріологічних методів. Крім того, використання мультиплексної ПЛР дає змогу одночасно ідентифікувати кілька сероварів або генів вірулентності [24].

У контексті геномних досліджень важливе значення мають роботи, присвячені секвенуванню повного геному *Salmonella enterica*. Геном серовару *Typhimurium* містить понад 4500 генів, значна частина яких пов'язана з вірулентністю, метаболізмом та адаптацією до стресових умов. Використання технологій секвенування нового покоління (NGS) дозволило суттєво розширити уявлення про генетичну різноманітність штамів та їх еволюцію [29].

Особливе місце у біотехнологічних дослідженнях займає проблема антибіотикорезистентності *Salmonella spp.* За даними Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA, 2022), значна частка ізольованих штамів *S. Typhimurium* та *S. Infantis* демонструє мультирезистентність до антибіотиків, включаючи ампіцилін, тетрациклін і сульфаніламід. Генетичні дослідження показують, що гени резистентності часто локалізуються на плазмідах і можуть передаватися горизонтально [26].

Перспективним напрямом є застосування бактеріофагів для контролю *Salmonella*. Зокрема, ефективність фагів у зниженні контамінації харчових

продуктів без негативного впливу на їх якість. Фаги мають високу специфічність до бактерій і можуть використовуватися як альтернатива антибіотикам у тваринництві [17].

Не менш важливим є використання пробіотичних культур для пригнічення росту *Salmonella*. Представники родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* здатні знижувати рівень колонізації кишечника патогенними бактеріями шляхом конкуренції за рецептори та продукування антимікробних речовин [29].

У сучасній біотехнології також активно розвивається напрям використання *Salmonella* як векторної системи для створення вакцин. Ослаблені штами можуть застосовуватися для доставки антигенів і стимуляції імунної відповіді. Це відкриває нові можливості для профілактики інфекційних захворювань як у тварин, так і у людей [25].

Таким чином, *Salmonella spp.* є універсальним об'єктом біотехнологічних досліджень, що поєднує фундаментальні аспекти мікробіології та прикладні завдання діагностики, контролю та профілактики інфекцій. Використання сучасних молекулярних і геномних методів дозволяє глибше зрозуміти біологічні властивості цих бактерій і розробити ефективні підходи до забезпечення безпечності продукції тваринництва [23].

1.4. Методи виділення різних штамів *Salmonella*

Виділення бактерій роду *Salmonella* із різних об'єктів дослідження є ключовим етапом мікробіологічного контролю продукції тваринництва та кормів. Складність цього процесу зумовлена як різноманітністю сероварів і штамів, так і особливостями досліджуваних матриць, які часто містять супутню мікрофлору, що ускладнює ідентифікацію патогену. У зв'язку з цим у сучасній практиці застосовується комплекс методів, що поєднують класичні бактеріологічні підходи з новітніми біотехнологічними технологіями [3].

Класичні методи виділення *Salmonella spp.* базуються на поетапному процесі, який включає попереднє збагачення, селективне збагачення та висів на диференційно-діагностичні середовища. Попереднє збагачення проводять у неспецифічних поживних середовищах (наприклад, буферизована пептонна вода), що дозволяє відновити життєздатність пошкоджених клітин. Це особливо важливо при дослідженні кормів або термічно обробленої продукції, де бактерії можуть перебувати у стресовому стані (ISO 6579-1:2017) [28].

Наступним етапом є селективне збагачення, яке спрямоване на пригнічення супутньої мікрофлори та стимулювання росту *Salmonella*. Для цього використовують середовища Раппопорта-Василіадіса (RVS), тетратіонатний бульйон або селенітовий бульйон. Як показали дослідження, поєднання декількох селективних середовищ підвищує ймовірність виділення різних сероварів, оскільки окремі штами можуть мати різну чутливість до інгібуючих факторів [23].

Після збагачення проводять висів на селективно-диференційні середовища, такі як XLD-агар, SS-агар, агар Плоскірева або хромогенні середовища. Типовими ознаками колоній *Salmonella* є утворення безбарвних або червоних колоній із чорним центром внаслідок продукції сірководню. Однак морфологічна подібність до інших ентеробактерій потребує подальшої ідентифікації [20].

Біохімічна ідентифікація є наступним етапом і включає використання стандартних тест-систем (API 20E, Enterotest), які дозволяють визначити ферментативну активність штамів. *Salmonella spp.* характеризується ферментацією глюкози, відсутністю ферментації лактози (у більшості випадків), продукцією H_2S і позитивною реакцією на лізиндекарбоксилазу. Поєднання культуральних і біохімічних методів забезпечує високу точність первинної ідентифікації [18].

Для диференціації штамів за антигенною структурою застосовують серологічні методи, зокрема реакцію аглютинації з використанням

специфічних О- та Н-сироваток. Схема Кауфмана–Уайта дозволяє визначити серовар і має важливе епідеміологічне значення [16].

З розвитком біотехнології значного поширення набули молекулярні методи виділення та ідентифікації *Salmonella spp.*. Найбільш широко використовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка дозволяє виявляти специфічні гени навіть за низької концентрації збудника. Ген *invA* є одним із найбільш надійних маркерів. Методи ПЛР у реальному часі (qPCR) забезпечують не лише якісне, але й кількісне визначення бактерій [25].

Для виділення та порівняльного аналізу різних штамів використовують також методи генотипування, такі як PFGE (пульс-електрофорез у полі змінного струму), MLST (мультилокусне секвенування) та повногеномне секвенування (WGS). Ці підходи дозволяють оцінити генетичну спорідненість штамів і встановити джерела інфекції [27].

Сучасним напрямом є застосування MALDI-TOF мас-спектрометрії, яка забезпечує швидку ідентифікацію мікроорганізмів на основі білкового профілю клітини. Цей метод дозволяє значно скоротити час аналізу порівняно з класичними методами [26].

Особливу увагу приділяють використанню хромогенних середовищ і автоматизованих систем, які спрощують процес виділення та дозволяють диференціювати штами за ферментативною активністю. Це має важливе значення при роботі з великою кількістю зразків [31].

Важливим аспектом виділення *Salmonella spp.* є врахування фізіологічного стану клітин у досліджуваних зразках. У багатьох випадках бактерії можуть перебувати у так званому життєздатному, але некультивованому стані (VBNC), що виникає під впливом стресових факторів, таких як висушування, охолодження або дія дезінфектантів. У цьому стані клітини зберігають метаболічну активність, але не ростуть на стандартних поживних середовищах, що може призводити до хибнонегативних результатів при застосуванні лише класичних методів. Саме тому поєднання

культуральних і молекулярних підходів є критично важливим для підвищення ефективності діагностики [32].

Окрім традиційних методів, дедалі більшого значення набувають імунологічні підходи, зокрема імуноферментний аналіз (ІФА) та методи з використанням імуномагнітної сепарації (IMS). Імуномагнітні частинки, покриті специфічними антитілами до *Salmonella*, дозволяють селективно концентрувати клітини збудника із складних матриць, що значно підвищує чутливість подальшого виявлення. Такий підхід є особливо ефективним при дослідженні кормів і продуктів із високим рівнем супутньої мікрофлори [30].

У практиці сучасних лабораторій також широко застосовуються хромогенні та флуорогенні середовища, які дозволяють диференціювати штами *Salmonella* на основі специфічної ферментативної активності. Це значно спрощує первинний скринінг і зменшує кількість додаткових тестів. Використання таких середовищ підвищує точність виявлення та скорочує час аналізу [26].

Значного розвитку набули експрес-методи, зокрема ізотермічні ампліфікаційні технології (LAMP), які не потребують складного обладнання та можуть застосовуватися в польових умовах. Вони характеризуються високою швидкістю та чутливістю, що робить їх перспективними для оперативного контролю безпечності продукції [29].

При дослідженні різних штамів *Salmonella spp.* важливим є не лише їх виділення, але й подальша диференціація. У цьому контексті широко використовуються методи фаготипування, які дозволяють визначити чутливість штамів до специфічних бактеріофагів і застосовуються для епідеміологічного аналізу. Хоча цей метод поступово витісняється молекулярними технологіями, він залишається корисним для характеристики окремих сероварів [30].

Сучасні підходи також включають використання метагеномного аналізу, який дозволяє досліджувати мікробіоту без попереднього культивування. Це особливо актуально для складних об'єктів, таких як корми або ґрунт, де

Salmonella може бути присутня у низьких концентраціях. Метагеноміка відкриває можливості для виявлення некультивованих форм і оцінки взаємодії між мікроорганізмами [26].

Окрему увагу слід приділити впливу властивостей досліджуваного матеріалу на ефективність виділення. Наприклад, жировмісні продукти можуть інгібувати ріст бактерій або перешкоджати проведенню ПЛР через наявність інгібіторів. У таких випадках необхідне застосування спеціальних методів пробопідготовки, включаючи центрифугування, фільтрацію або використання сорбентів [28].

Таким чином, сучасні методи виділення *Salmonella spp.* характеризуються високим рівнем різноманітності та постійним удосконаленням. Найбільш ефективним є комплексний підхід, який поєднує класичні бактеріологічні, імунологічні та молекулярно-генетичні методи. Це дозволяє не лише підвищити точність і швидкість виявлення, але й забезпечити детальну характеристику різних штамів, що є необхідним для подальшого аналізу їх біологічних властивостей і епідеміологічного значення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Місце та об'єкт досліджень

Миколаївська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини є структурним підрозділом системи Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів та входить до складу Головного управління Держпродспоживслужби в Миколаївській області. Лабораторія розташована за адресою: м. Миколаїв, вул. Луначарського, 2-А [6].

Установа є провідним державним закладом регіону, що здійснює лабораторну діагностику хвороб тварин, контроль якості та безпеки продукції тваринного і рослинного походження, кормів, кормових добавок, а також організаційно-методичне забезпечення ветеринарної лабораторної діяльності в області [17].

Організаційна структура лабораторії включає 12 профільних відділів, серед яких: відділ відбору та реєстрації зразків, хіміко-токсикологічний, радіологічний, відділ ветеринарно-санітарної експертизи, бактеріологічний, вірусологічний, серологічний, паразитологічний, патоморфологічний, епізоотичний, лейкозний відділи, а також відділ діагностики хвороб риб [6].

Безпосередньою базою для виконання досліджень у даній роботі слугував бактеріологічний відділ лабораторії. Відділ оснащений сучасним лабораторним обладнанням, зокрема термостатами, автоклавами, анаеростатом, бактерицидними лампами, центрифугами, гомогенізаторами, водяними банями, рН-метрами, денситометрами, приладами для мембранної фільтрації, холодильним та морозильним обладнанням, а також комп'ютерною технікою. Матеріально-технічна база відповідає вимогам чинних нормативних документів та забезпечує проведення широкого спектра мікробіологічних досліджень [17].

Бактеріологічний відділ структурно поділений на два сектори: сектор мікробіологічних досліджень харчових продуктів, води та кормів і сектор досліджень інфекційних хвороб тварин. Перший сектор здійснює контроль показників безпечності продукції, зокрема визначення наявності *Salmonella spp.*, бактерій групи кишкової палички, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, сульфітредукуючих клостридій, дріжджів і плісневих грибів, а також інших умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів [6].

Другий сектор спеціалізується на діагностиці бактеріальних захворювань тварин, птиці, риб і бджіл, таких як сибірка, туберкульоз, сальмонельоз, пастерельоз, лістеріоз, колібактеріоз, бруцельоз та інші, а також проводить санітарно-гігієнічні дослідження об'єктів навколишнього середовища [17].

На території лабораторії функціонує віварій, у якому утримуються лабораторні тварини (білі миші, морські свинки, кролі), що використовуються для постановки біологічних проб з метою підтвердження діагнозу [6].

Важливим напрямом діяльності є участь лабораторії у міжлабораторних порівняльних випробуваннях, зокрема із залученням національних та міжнародних організацій (FAPAS, Велика Британія), що забезпечує контроль якості досліджень. Крім того, у відділі здійснюється перевірка якості поживних середовищ, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, а також визначення їх антибіотикочутливості [17].

Бактеріологічний відділ акредитований відповідно до вимог ДСТУ ISO 17025, що підтверджує компетентність лабораторії у проведенні випробувань. У роботі застосовуються сучасні вітчизняні та міжнародні методики, що входять до сфери акредитації Національного агентства з акредитації України [6].

Таким чином, матеріально-технічна база та організаційна структура Миколаївської регіональної державної лабораторії ветеринарної медицини забезпечують належні умови для проведення мікробіологічних досліджень,

зокрема виділення та ідентифікації штамів *Salmonella spp.*, що відповідає меті та завданням даної роботи [17].

2.2. Методика виконання роботи

Місцем проведення досліджень була Миколаївська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини Головного управління Держпродспоживслужби в Миколаївській області (м. Миколаїв). Експериментальні роботи виконувалися на базі бактеріологічного відділу, оснащеного сучасним обладнанням і акредитованого відповідно до вимог ДСТУ ISO 17025 [6].

Тема дослідження – Біотехнологічні підходи до скринінгу штамів *Salmonella*, ізольованих із продуктів птахівництва.

Об'єктом дослідження є ізольовані з продукції птахівництва (м'ясо птиці та яйця) мікроорганізми роду *Salmonella*.

Предмет дослідження процеси виділення, ідентифікації та порівняльної характеристики штамів *Salmonella Enteritidis* і *Salmonella Typhimurium*, їх морфологічні, культуральні та біохімічні властивості.

Мета дослідження – виділити та ідентифікувати штами *Salmonella spp.* із продукції птахівництва, а також провести їх порівняльну характеристику за основними мікробіологічними ознаками.

Для реалізації поставленої мети були сформовані наступні завдання: встановити таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості бактерій *Salmonella*; здійснити виділення штамів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* методом мікробіологічного скринінгу; провести ідентифікацію виділених штамів *Salmonella* за морфологічними, культуральними та біохімічними ознаками; описати поетапну блок-схему виділення штамів *Salmonella* із продуктів птахівництва; здійснити розрахунок обладнання для процесу виділення.

Загальна методика дослідження біологічного матеріалу на сальмонельоз передбачає застосування комплексу мікробіологічних та біотехнологічних методів діагностики. До основних із них належать мікроскопічний, бактеріологічний та серологічний методи (зокрема реакція аглютинації). Важливою складовою бактеріологічного дослідження є також вивчення ферментативних властивостей збудника із використанням біохімічних тестів, що дозволяє провести його точну ідентифікацію [5, 7].

Виявлення бактерій роду *Salmonella* здійснюється у кілька послідовних етапів, які відображені у загальноприйнятій схемі (рис. 1) [7].



Рис. 1. Загальноприйнята схема процедури виявлення збуднику *Salmonella* [7]

Повний цикл дослідження триває в середньому до 5–7 діб, що зумовлено необхідністю поетапного культивування мікроорганізмів та проведення пересівів через кожні 18–24 години [7].

Методика дослідження може варіювати залежно від виду біологічного матеріалу, що надходить до лабораторії. Зокрема, при посмертній діагностиці використовують патологічний матеріал (органи, тканини), тоді як при контролі харчових продуктів і кормів застосовують стандартизовані методи підготовки проб відповідно до вимог ISO 6887 (усі частини) [5, 7].

Слід враховувати, що *Salmonella* часто присутня у досліджуваному матеріалі в незначній кількості та супроводжується значною кількістю супутньої мікрофлори, зокрема представниками родини *Enterobacteriaceae*. У зв'язку з цим обов'язковим етапом є попереднє збагачення, яке забезпечує відновлення пошкоджених клітин збудника та підвищує ймовірність його виявлення [7].

Для проведення досліджень використовують стандартне мікробіологічне лабораторне обладнання відповідно до вимог ISO 7218. Допускається застосування як багаторазового скляного посуду, так і одноразових стерильних матеріалів, за умови їх відповідності встановленим стандартам [16].

На етапі попереднього збагачення досліджуваний матеріал інокулюють у забуферену пептонну воду (BPW) при кімнатній температурі, після чого інкубують при температурі 34–38 °C протягом 18 годин. У випадку використання великих об'ємів середовища (понад 1 л) його попередньо підігривають до зазначеної температури перед внесенням проби [7].

Наступним етапом є селективне збагачення, яке здійснюють шляхом пересіву культури з BPW у селективні поживні середовища. Для цього використовують бульйон Раппопорта–Василіадіса з соєю (RVS) або модифікований напіврідкий агар (MSRV), а також тетратіонатно-новобіоциновий бульйон Мюллера–Кауфмана (МКТТn). Інкубацію проводять

за диференційованими температурними режимами: RVS або MSR/V – при 41,5 °C протягом 24 годин, MKTTn – при 37 °C протягом 24 годин [7].

Після проведення селективного збагачення здійснюють висів культур на щільні селективно-диференційні поживні середовища. Отримані культури інокулюють щонайменше на два середовища, одним з яких обов'язково є ксилоза-лізін-дезоксихолатний агар (XLD-агар), а другим – інше селективне середовище аналогічного призначення (наприклад, SS-агар або агар Плоскірєва), що забезпечує додаткову диференціацію мікроорганізмів [7, 16].

Посіви на XLD-агарі інкубують при температурі 37 °C протягом 24 годин, після чого проводять оцінку росту та морфології колоній. Інкубацію на другому селективному середовищі здійснюють відповідно до рекомендацій виробника поживного середовища [7, 16].

На зазначених середовищах *Salmonella* формує характерні колонії, що дозволяє попередньо ідентифікувати збудника за культуральними ознаками. Після цього відбирають типові колонії для подальшого дослідження [5].

Заключним етапом є підтвердження належності виділених культур до роду *Salmonella*. Для цього підозрілі колонії пересівають на універсальні поживні середовища з метою отримання чистих культур, після чого за необхідності проводять їх ідентифікацію за допомогою комплексу біохімічних тестів (визначення ферментативних властивостей) та серологічних реакцій, зокрема реакції аглютинації. Застосування цих методів дозволяє остаточно підтвердити видову та сероваріальну приналежність збудника [7].

Таким чином, поєднання етапів попереднього та селективного збагачення створює оптимальні умови для накопичення *Salmonella* та пригнічення супутньої мікрофлори, що є необхідною передумовою для подальшого виділення чистої культури та її ідентифікації.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості

Відповідно до глобальної таксономії біологічних видів, Бактерії роду *Salmonella* належать до:

Домен: Бактерії (*Bacteria*)

Царство: Прокаріоти

Відділ: *Proteobacteria*

Клас: *Gamma**proteobacteria*

Порядок: *Enterobacterales*

Родина: *Enterobacteriaceae*

Рід: *Salmonella*

Вид: *Salmonella enterica*

Підвид: *S. enterica subsp. Enterica*

Серовар: (наприклад, *S. Enteritidis* / *S. Typhimurium* – вказується залежно від об'єкта дослідження)

Серологічна класифікація *Salmonella* базується на схемі Кауфмана–Уайта–Ле Мінора, відповідно до якої диференціація здійснюється за соматичними (O), джгутиковими (H) та, у деяких випадках, капсульними (Vi) антигенами. На сьогодні описано понад 2600 сероварів, серед яких найбільш поширеними є *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Choleraesuis* та інші. Різноманітність сероварів зумовлює значні відмінності у патогенності, екологічній стійкості та епідеміологічних характеристиках.

Морфологічно бактерії *Salmonella spp.* являють собою грамнегативні, прямі палички із закругленими кінцями, розміром приблизно $0,5\text{--}0,8 \times 1,0\text{--}3,0$ мкм. Вони не утворюють спор і, як правило, не формують капсул, за винятком окремих сероварів (наприклад, *S. Typhi*), які мають поверхневий Vi-антиген. Клітини є рухливими завдяки наявності перитрихіально розташованих

джгутиків, що забезпечує їх активну міграцію у рідких середовищах. Однак деякі штами можуть втрачати рухливість у процесі адаптації або під впливом несприятливих факторів.

Культуральні властивості *Salmonella spp.* характеризуються доброю здатністю до росту на простих поживних середовищах. Оптимальна температура культивування становить 35–37 °С, а оптимальне значення рН – 7,2–7,4. На м'ясо-пептонному агарі бактерії утворюють гладкі, блискучі, напівпрозорі колонії округлої форми діаметром 1–3 мм. Такі колонії відносять до S-форми, яка є типовою для вірулентних штамів. За тривалого культивування або під впливом несприятливих умов можливий перехід у R-форми (шорсткі колонії), що супроводжується зниженням вірулентності.

У рідких поживних середовищах (наприклад, м'ясо-пептонному бульйоні) спостерігається рівномірне помутніння з утворенням незначного осаду на дні пробірки, інколи з формуванням поверхневої плівки.

На селективно-диференційних середовищах *Salmonella spp.* проявляє характерні культуральні ознаки, що широко використовуються в лабораторній діагностиці. Зокрема:

- на середовищі XLD колонії мають червоне забарвлення з чорним центром (ознака утворення H₂S);
- на SS-агарі формуються безбарвні або прозорі колонії, часто з чорним осадом;
- на середовищі Плоскірева колонії безбарвні, оскільки бактерії не ферментують лактозу;
- на вісмут-сульфітному агарі утворюються темні або чорні колонії з металевим блиском.

Здатність до утворення сірководню є важливою диференційною ознакою більшості штамів *Salmonella*, хоча деякі серовари (наприклад, *S. Paratyphi A*) можуть не продукувати H₂S.

Біохімічні властивості *Salmonella spp.* є типовими для представників родини *Enterobacteriaceae*, але мають низку діагностично значущих

особливостей. Бактерії ферментують глюкозу з утворенням кислоти (часто з газом), але не ферментують лактозу і сахарозу (за винятком окремих штамів). Вони є позитивними за реакцією на лізиндекарбоксилазу, здатні відновлювати нітрати до нітритів, не продукують індол і, як правило, не утилізують уреазу. Метаболізм *Salmonella spp.* характеризується активним використанням вуглеводів. Вони ферментують глюкозу з утворенням кислоти, а у більшості випадків – і газу. Водночас більшість штамів не ферментує лактозу та сахарозу, що є важливою диференційною ознакою при використанні селективно-диференційних середовищ. Деякі серовари можуть повільно ферментувати інші вуглеводи, зокрема маніт або мальтозу. У середовищі Кліглера або трицукровому агарі (TSI) спостерігається характерна реакція: кислий стовпчик, лужний скіс та утворення H_2S .

Salmonella spp. мають позитивну реакцію на лізиндекарбоксилазу, що дозволяє відрізнити їх від деяких інших ентеробактерій. Вони здатні відновлювати нітрати до нітритів, що свідчить про активність ферментних систем анаеробного дихання. Більшість штамів не продукує індол і не має уреазної активності. Також характерною є негативна реакція на фенілаланіндезаміназу.

У середовищі трицукрового агару (TSI) або середовищі Кліглера *Salmonella spp.* дають типову реакцію: кислий стовпчик (жовтий) та лужний скіс (червоний) у поєднанні з утворенням H_2S і, часто, газу. Це пояснюється здатністю ферментувати лише глюкозу при відсутності ферментації лактози та сахарози.

Додатковою особливістю є здатність *Salmonella spp.* до виживання у широкому діапазоні умов зовнішнього середовища. Бактерії зберігають життєздатність у воді, ґрунті, кормах і продуктах харчування протягом тривалого часу, що обумовлює їх значну епідеміологічну небезпеку.

Важливою фізіологою ознакою є наявність ферментів, що забезпечують адаптацію бактерій до різних умов існування, зокрема ферментів

антиоксидантного захисту (каталаза, супероксиддисмутаза). Це сприяє виживанню збудника в організмі хазяїна та в умовах зовнішнього середовища.

Крім того, *Salmonella spp.* здатні утворювати біоплівки на поверхнях різних матеріалів (метал, пластик, скло), що підвищує їх стійкість до дії дезінфекційних засобів і сприяє контамінації харчових продуктів

Таким чином, таксономічний статус, морфологічні та культуральні властивості *Salmonella spp.* є важливою основою для їх ідентифікації та диференціації. Поєднання цих ознак із біохімічними та серологічними характеристиками дозволяє точно визначити видову та сероваріантну належність ізольованих штамів, що має ключове значення для проведення мікробіологічних досліджень і забезпечення безпеки продукції тваринництва.

3.2. Мікробіологічні методи виділення штамів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*

Для дослідження були обрані два найбільш поширені та епідеміологічно значущі серовари – *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium*, які часто виявляються у продуктах тваринного походження та кормах.

Матеріалом для дослідження слугували зразки продукції птахівництва (м'ясо птиці, яйця). Саме ці об'єкти є найбільш імовірними джерелами контамінації *Salmonella spp.* і становлять підвищений ризик у системі безпеки харчових продуктів.

Виділення зазначених штамів здійснювали класичним мікробіологічним методом, що включає декілька послідовних етапів.

На першому етапі дослідження проводили попереднє (неспецифічне) збагачення досліджуваного матеріалу з метою відновлення життєздатності клітин *Salmonella spp.*, які могли бути ушкоджені під впливом факторів зовнішнього середовища (висушування, температурні коливання, дія

консервантів тощо), а також для підвищення їх концентрації до рівня, достатнього для подальшого виявлення.

Для цього використовували буферизовану пептонну воду (BPW), яка є універсальним середовищем, що не містить селективних інгібіторів і забезпечує оптимальні умови для відновлення метаболічної активності бактерій. Середовище попередньо готували відповідно до вимог нормативної документації та стерилізували в автоклаві.

Підготовку зразків проводили з дотриманням асептичних умов. Зокрема, тверді зразки (м'ясо, комбікорм, зерно) подрібнювали до однорідної маси за допомогою стерильного гомогенізатора. Рідкі зразки (наприклад, яєчний вміст) ретельно перемішували. Далі відбирали аналітичну пробу масою 25 г (або об'ємом 25 мл) і вносили у стерильний посуд, після чого додавали 225 мл буферизованої пептонної води, дотримуючись співвідношення 1:10.

Отриману суміш гомогенізували протягом 1–2 хвилин до рівномірного розподілу мікроорганізмів у середовищі. Після цього зразки інкубували у термостаті при температурі (36–38) °C протягом 18–24 годин.

У процесі інкубації відбувається активізація клітин *Salmonella spp.*, їх адаптація до умов середовища та початкове розмноження. Водночас неспецифічний характер середовища забезпечує відновлення навіть сублетально ушкоджених клітин, що є критично важливим для достовірного виявлення збудника.

Після завершення етапу попереднього збагачення отриману культуру використовували для подальшого селективного збагачення на відповідних середовищах.

На другому етапі проводили селективне збагачення. Для цього використовували середовище Раппопорта–Василіадіса та селенітовий бульйон, які пригнічують супутню мікрофлору та сприяють росту *Salmonella*. Інкубацію здійснювали при температурі 37–42 °C протягом 18–24 годин.

Після збагачення проводили висів на селективно-диференційні середовища: XLD-агар, SS-агар, вісмут-сульфітний агар та на агарі Плоскірева. Чашки інкубували при температурі 37 °С протягом 24 годин.

Для *Salmonella Enteritidis* характерні чітко виражені культуральні ознаки на селективно-диференційних поживних середовищах, що широко використовуються для її первинної ідентифікації (рис. 2).

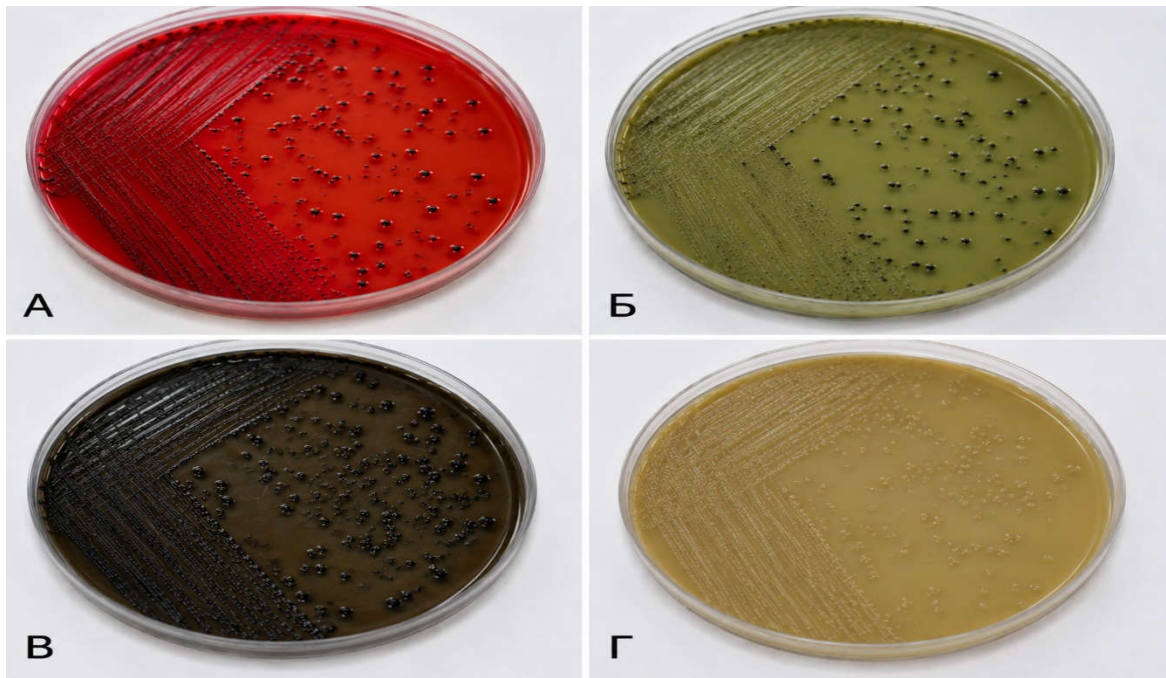


Рис. 2. Ріст *Salmonella Enteritidis* на селективно-диференційних поживних середовищах

- А – на XLD-агарі (червоні колонії з чорним центром);
- Б – на SS-агарі (безбарвні колонії з чорним осадом);
- В – на вісмут-сульфітному агарі (темні колонії);
- Г – на агарі Плоскірева (безбарвні або слабо прозорі колонії, лактозу не ферментують).

На XLD-агарі (*ксилозо-лізин-дезоксихолатному середовищі*) колонії *Salmonella Enteritidis* формуються округлі, середнього розміру (1–3 мм у діаметрі), з рівними краями та гладкою поверхнею. Первинно колонії можуть мати жовтувате забарвлення внаслідок ферментації ксилози, однак у подальшому, через декарбоксілювання лізину, середовище навколо колоній знову набуває червоного кольору. Типовою ознакою є наявність чорного центру, що утворюється внаслідок продукції сірководню (H_2S), який взаємодіє

з іонами заліза у середовищі з утворенням чорного сульфїду заліза. Таким чином, типові колонії мають вигляд червоних із чорним центром.

На SS-агарі (*Salmonella-Shigella agari*) *Salmonella Enteritidis* утворює безбарвні або злегка прозорі колонії, оскільки не ферментує лактозу. Колонії зазвичай гладкі, блискучі, діаметром до 2–3 мм. У центрі або по всій площі колонії часто спостерігається чорне забарвлення, що зумовлене утворенням H_2S . Навколишнє середовище при цьому залишається світлим, без змін кольору, що додатково підтверджує відсутність ферментації лактози.

На вісмут-сульфїтному агарі (*Bismuth sulfite agar*) *Salmonella Enteritidis* формує характерні темні колонії, колір яких варіює від темно-коричневого до чорного. Часто спостерігається наявність металевого блиску на поверхні колоній. Потемніння середовища навколо колоній зумовлене інтенсивним утворенням сірководню та його взаємодією з компонентами середовища. Колонії можуть мати щільну консистенцію та нерідко супроводжуються почорнінням прилеглої ділянки агару.

Salmonella Enteritidis на агарі Плоскірева формує дрібні або середнього розміру колонії, безбарвні або злегка прозорі, з гладкою поверхнею та рівними краями. Колонії мають блискучий вигляд і не викликають зміни кольору поживного середовища, що пов'язано з відсутністю ферментації лактози. Навколишнє середовище зберігає характерне рожево-червоне забарвлення. Відсутність забарвлення колоній є важливою диференційною ознакою, яка дозволяє відрізнити *Salmonella* від лактозопозитивних ентеробактерій (наприклад, *Escherichia coli*), що утворюють забарвлені колонії на даному середовищі.

Загалом, здатність *Salmonella Enteritidis* до утворення сірководню є однією з ключових діагностичних ознак, яка проявляється на всіх зазначених середовищах і дозволяє відрізнити її від більшості інших ентеробактерій.

Salmonella Typhimurium характеризується типовими для роду *Salmonella* культуральними ознаками, однак у порівнянні з *S. Enteritidis* часто відзначається більш інтенсивним утворенням сірководню (H_2S), що

обумовлює більш виражене почорніння колоній на відповідних середовищах (рис. 3).

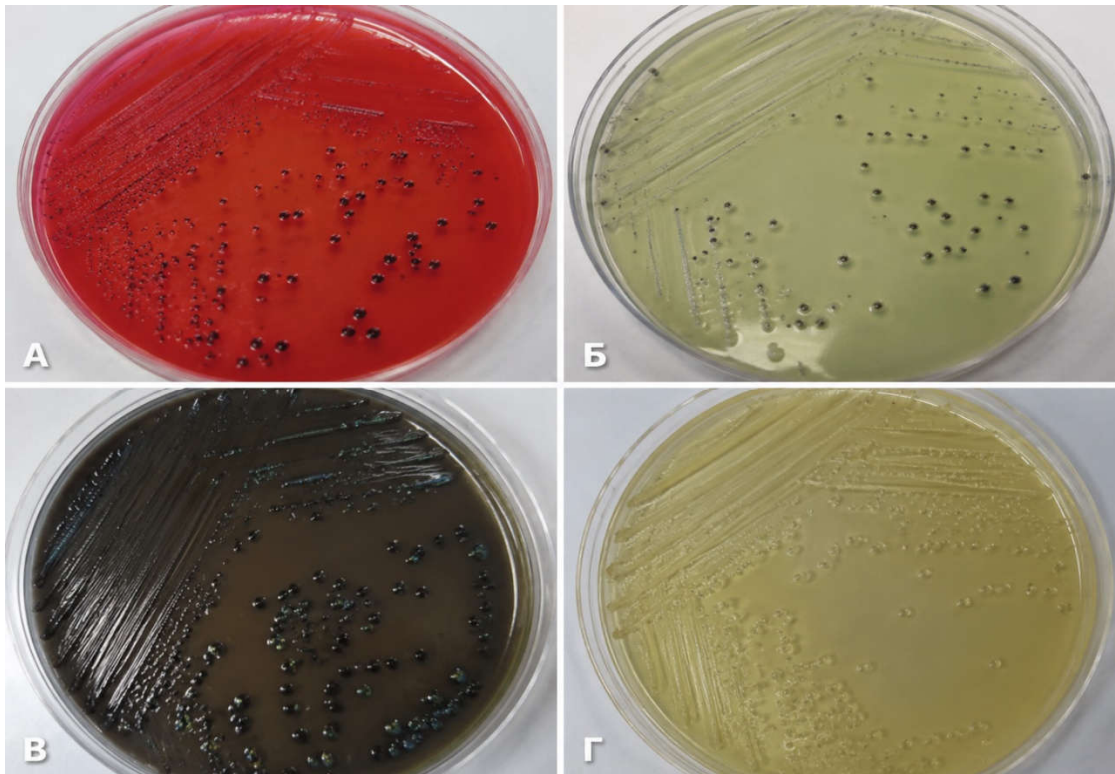


Рис. 3. Ріст *Salmonella Typhimurium* на селективно-диференційних поживних середовищах

- А – на XLD-агарі (червоні колонії з інтенсивним чорним центром – утворення H_2S);
- Б – на SS-агарі (безбарвні, прозорі колонії з вираженим чорним осадом);
- В – на вісмут-сульфітному агарі (чорні колонії з металевим блиском, потемніння середовища);
- Г – на агарі Плоскірева (безбарвні або слабо прозорі колонії, лактозу не ферментують).

На XLD-агарі (ксилозо-лізин-дезоксихолатному середовищі) *S. Typhimurium* утворює округлі колонії середнього розміру (1–3 мм), з гладкою поверхнею та рівними краями. Початково колонії можуть мати жовтуватий відтінок унаслідок ферментації ксилози, однак у подальшому, завдяки декарбоксілюванню лізину, відбувається повернення до червоного кольору середовища. Характерною ознакою є наявність добре вираженого чорного центру або повне почорніння колонії, що пов'язано з активним утворенням H_2S . Інтенсивність чорного забарвлення у *S. Typhimurium* зазвичай вища, ніж у *S. Enteritidis*.

На SS-агарі (*Salmonella-Shigella agari*) *S. Typhimurium* формує безбарвні або злегка прозорі колонії, оскільки не ферментує лактозу. Колонії гладкі, блискучі, діаметром 2–3 мм. У більшості випадків спостерігається інтенсивне утворення чорного осаду (FeS) у центрі колонії або по всій її поверхні. Чорний центр є наслідком продукції сірководню та його взаємодії з солями заліза у середовищі. У порівнянні з *S. Enteritidis*, чорне забарвлення часто більш виражене і може поширюватися на навколишнє середовище.

На вісмут-сульфітному агарі (*Bismuth sulfite agar*) *S. Typhimurium* утворює темні, щільні колонії чорного або темно-коричневого кольору, часто з характерним металевим блиском. Навколишнє середовище також темніє внаслідок інтенсивного утворення H₂S. Колонії можуть бути дещо більшими та більш пігментованими, ніж у *S. Enteritidis*, що полегшує їх візуальну диференціацію.

На агарі Плоскірева *S. Typhimurium* формує безбарвні або слабо прозорі колонії з гладкою, блискучою поверхнею. Відсутність зміни кольору середовища пов'язана з нездатністю ферментувати лактозу. Середовище навколо колоній зберігає рожеве забарвлення. За морфологією колонії подібні до *S. Enteritidis*, однак інколи можуть бути дещо більшими та щільнішими.

Отже для *Salmonella Enteritidis* характерним є утворення на XLD-агарі червоних колоній із чорним центром (ознака утворення сірководню), на SS-агарі – безбарвних або слабо забарвлених колоній з чорним осадом. На вісмут-сульфітному агарі колонії мають темне забарвлення. *Salmonella Typhimurium* проявляє подібні культуральні властивості, однак часто характеризується більш інтенсивним утворенням H₂S, що проявляється вираженим почорнінням колоній. На XLD-агарі колонії також червоні з чорним центром, на SS-агарі – безбарвні з чорним осадом. Незважаючи на значну подібність біохімічних властивостей, *S. Typhimurium* відрізняється більш активним метаболізмом сірковмісних сполук, що дозволяє використовувати дану ознаку для попередньої диференціації сероварів.

3.3. Ідентифікація виділених штамів *Salmonella*

Після відбору типових колоній проводили пересів на універсальні поживні середовища для отримання чистих культур. Ідентифікацію здійснювали за морфологічними (грамнегативні палички), культуральними та біохімічними ознаками.

Результати порівняльного аналізу біохімічних та морфологічних властивостей *Salmonella Enteritidis* і *Salmonella Typhimurium* свідчать про їх загальну належність до родини *Enterobacteriaceae*, що підтверджується грамнегативним забарвленням клітин, паличкоподібною формою та відсутністю оксидазної активності (табл. 1).

Таблиця 1

Ідентифікація *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* за результатами морфологічної оцінки та біохімічних тестів

Тест / показник	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	Діагностичне значення
Фарбування за Грамом	– (грамнегативні)	– (грамнегативні)	Належність до ентеробактерій
Морфологія	Палички	Палички	Типова форма
Рухливість	+	+	Наявність джгутиків
Ферментація глюкози	+ (кислота + газ)	+ (кислота + газ)	Основний метаболічний тест
Утворення H ₂ S	+ (помірне)	++ (інтенсивне)	Важлива диференційна ознака
Лізиндекарбоксилаза	+	+	Характерна ознака <i>Salmonella</i>
Цитрат Симонса	+	+	Використання цитрату
TSI (агар)	K/A + H ₂ S	K/A + H ₂ S (вираженіше)	Комплексна оцінка
Газоутворення	+	+	Продукція газу
Оксидаза	–	–	Віднесення до <i>Enterobacteriaceae</i>

Обидва серовари характеризуються рухливістю, що зумовлено наявністю перитрихіальних джгутиків, а також здатністю ферментувати глюкозу з утворенням кислоти та газу, що є типовою метаболічною ознакою представників роду *Salmonella*.

Важливою спільною властивістю є позитивна реакція на лізиндекарбоксилазу та здатність використовувати цитрат як єдине джерело вуглецю, що додатково підтверджує їх видові характеристики.

У середовищі TSI обидва серовари дають типовий результат – кислий стовпчик і лужний скіс (K/A), що свідчить про ферментацію лише глюкози, а також утворення сірководню. Водночас саме інтенсивність продукції H_2S є однією з ключових диференційних ознак: у *Salmonella Typhimurium* вона виражена значно сильніше, ніж у *Salmonella Enteritidis*, що проявляється більш інтенсивним почорнінням поживного середовища.

Основні відмінності між *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis* полягають не стільки у типі колоній, скільки в інтенсивності прояву окремих ознак. *S. Typhimurium*, як правило, характеризується більш активним утворенням сірководню, що проявляється більш темним забарвленням колоній і середовища. Крім того, колонії можуть бути дещо більшими та щільнішими.

Водночас обидва серовари мають спільні ключові діагностичні ознаки: відсутність ферментації лактози, утворення H_2S , подібні результати біохімічних тестів і типову реакцію у середовищі TSI. Саме тому для їх остаточної диференціації необхідне застосування серологічних або молекулярно-генетичних методів.

Крім того нами був проведений кількісний аналіз ізолятів *Salmonella* з продуктів птахівництва (табл. 2). У зразках м'яса птиці переважав серовар *Salmonella Typhimurium*, для якого було виділено 4 ізоляти, тоді як *Salmonella Enteritidis* виявлялася дещо рідше – 3 ізоляти. Водночас інтенсивність росту *S. Typhimurium* була вищою, що підтверджується більшою середньою кількістю колоній (33 ± 3 КУО/чашка) порівняно з *S. Enteritidis* (25 ± 2 КУО/чашка).

У зразках яєць спостерігалася протилежна тенденція: *Salmonella Enteritidis* виявлялася частіше (4 ізоляти), ніж *Salmonella Typhimurium* (2 ізоляти), що узгоджується з відомими літературними даними про асоціацію цього серовару з яєчною продукцією. При цьому *S. Typhimurium*, незважаючи на меншу кількість ізолятів, характеризувалася більш інтенсивним ростом – 37 ± 4 КУО/чашка, тоді як для *S. Enteritidis* цей показник становив 30 ± 3 КУО/чашка.

Таблиця 2

Кількісна характеристика ізолятів *Salmonella Enteritidis* та *Salmonella Typhimurium* у продукції птахівництва

Об'єкт дослідження	Серовар	Кількість виділених ізолятів, од.	Середня кількість колоній, КУО/чашка
М'ясо птиці	<i>Salmonella Enteritidis</i>	3	25 ± 2
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	4	33 ± 3
Яйця	<i>Salmonella Enteritidis</i>	4	30 ± 3
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	2	37 ± 4

Таким чином, встановлено, що *Salmonella Enteritidis* частіше асоціюється з яйцями, тоді як *Salmonella Typhimurium* – із м'ясом птиці. Водночас для *S. Typhimurium* характерна вища інтенсивність росту, що може свідчити про більш активні метаболічні процеси або кращу адаптацію до поживних середовищ.

3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу виділення

Поетапна блок-схема виділення штамів *Salmonella* із продуктів птахівництва наведена у графічній частині проєкту на презентації та у форматі А1.

Опис технологічної схеми

Процес виділення *Salmonella spp.* включає підготовчі (допоміжні) та основні етапи, спрямовані на отримання чистої культури збудника та її ідентифікацію.

ДР.1. Санітарна підготовка лабораторії

Санітарна підготовка лабораторії є обов'язковим етапом перед проведенням мікробіологічних досліджень і спрямована на забезпечення стерильних умов роботи, попередження контамінації досліджуваного матеріалу сторонньою мікрофлорою та отримання достовірних результатів.

ДР.1.1. Підготовка персоналу

Перед початком роботи лабораторний персонал проходить відповідну підготовку, яка включає дотримання правил особистої гігієни та асептики. Працівники одягають чистий лабораторний одяг (халат, шапочку, маску), використовують одноразові рукавички. Забороняється робота без засобів індивідуального захисту.

Перед виконанням маніпуляцій руки обробляють антисептичними засобами. Під час роботи суворо дотримуються правил асептики: не допускається торкання стерильних інструментів нестерильними поверхнями, робота проводиться у зоні стерильного поля (поблизу полум'я пальника або у ламінарній шафі). Після завершення роботи проводять утилізацію використаних матеріалів відповідно до санітарних вимог.

ДР.1.2. Підготовка лабораторного обладнання

Лабораторний посуд (чашки Петрі, пробірки, колби) та інструменти (петлі, шпатель, піпетки) підлягають обов'язковій стерилізації. Стерилізацію здійснюють у автоклаві при температурі 121 °С протягом 15–20 хвилин або сухожаровим методом при температурі 160–180 °С.

Робочі поверхні столів перед початком і після завершення роботи обробляють дезінфікуючими розчинами. Також проводять кварцування або використання бактерицидних ламп для знезараження повітря у лабораторному

приміщенні. Усе обладнання перевіряють на справність та відповідність вимогам експлуатації.

ДР.1.3. Підготовка поживних середовищ

Поживні середовища готують відповідно до інструкцій виробника або нормативної документації. Для дослідження використовують буферизовану пептонну воду (BPW) для попереднього збагачення, селективні бульйони (Раппопорта–Василіадіса, селенітовий) та щільні селективно-диференційні середовища (XLD-агар, SS-агар, вісмут-сульфітний агар, агар Плоскірева).

Середовища розчиняють у дистильованій воді, доводять до необхідного рН, після чого стерилізують в автоклаві. Після стерилізації їх охолоджують до відповідної температури та розливають у стерильні чашки Петрі або пробірки. Перед використанням середовища перевіряють на стерильність та придатність (відсутність стороннього росту, відповідний колір і консистенція).

ДР.1.4. Маркування та реєстрація зразків

Кожен досліджуваний зразок підлягає обов'язковому маркуванню, що включає зазначення номера проби, дати відбору, виду матеріалу (м'ясо, яйця, корм), а також умов дослідження. Маркування наносять на ємності із зразками та на відповідні чашки Петрі.

Реєстрацію зразків здійснюють у лабораторному журналі або електронній базі даних, де фіксують інформацію про походження зразка, дату надходження, методи дослідження та отримані результати. Це забезпечує простежуваність дослідження, контроль якості та можливість повторного аналізу у разі необхідності.

ОС.1. Відбір та підготовка проб

Відбір проб здійснювали відповідно до вимог чинних стандартів для мікробіологічних досліджень продукції птахівництва. Як об'єкти дослідження використовували м'ясо птиці та яйця. Проби відбирали асептично у стерильні контейнери та доставляли до лабораторії з дотриманням температурного режиму.

Перед дослідженням зразки піддавали підготовці: м'ясо подрібнювали стерильними інструментами, яйця досліджували окремо (вміст і, за потреби, змиви зі шкаралупи). Із кожного зразка формували аналітичну пробу масою 25 г (або 25 мл), яку переносили у стерильний посуд для подальшого дослідження.

ОС.2. Попереднє збагачення

Для відновлення життєздатності клітин *Salmonella*, зокрема пошкоджених унаслідок технологічної обробки продуктів, проводили попереднє збагачення. Аналітичну пробу вносили у буферизовану пептонну воду (BPW) у співвідношенні 1:10 (25 г продукту + 225 мл середовища).

Суміш ретельно гомогенізували та інкубували при температурі 37 °С протягом 18–24 годин. На цьому етапі відбувається відновлення та накопичення клітин *Salmonella* без значного пригнічення супутньої мікрофлори.

ОС.3. Селективне збагачення

Після попереднього збагачення здійснювали пересів у селективні поживні середовища, які пригнічують розвиток сторонньої мікрофлори та стимулюють ріст *Salmonella*. Для цього використовували бульйон Раппопорта–Василіадіса та селенітовий бульйон.

Інкубацію проводили при температурі 37–42 °С протягом 18–24 годин. Використання двох різних середовищ підвищує ймовірність виділення збудника, оскільки вони відрізняються механізмом селекції мікроорганізмів.

ОС.4. Виділення на щільних поживних середовищах

Після етапу збагачення проводили висів матеріалу на селективно-диференційні щільні середовища: XLD-агар, SS-агар, вісмут-сульфідний агар та агар Плоскірева.

Посіви інкубували при температурі 37 °С протягом 18–24 годин. На цих середовищах *Salmonella* формує типові колонії: безбарвні або червоні з чорним центром (утворення H₂S), що дозволяє попередньо диференціювати їх від інших представників мікрофлори.

ОС.5. Відбір типових колоній

Після інкубації проводили візуальну оцінку росту та відбір підозрілих колоній за морфологічними ознаками. До типових відносили колонії, які не ферментують лактозу та утворюють сірководень (наявність чорного осаду).

Відібрані колонії переносили на нові поживні середовища для подальшого очищення та ідентифікації.

ОС.6. Отримання чистої культури

З метою отримання чистих культур проводили пересів відібраних колоній на універсальні поживні середовища (м'ясо-пептонний агар). Інкубацію здійснювали при температурі 37 °С протягом 18–24 годин.

Чистоту культури контролювали за однорідністю колоній та мікроскопічною картиною. У разі необхідності проводили повторний пересів.

ОС.7. Ідентифікація штамів

Ідентифікацію ізольованих культур здійснювали за комплексом морфологічних, культуральних та біохімічних ознак. Мікроскопію проводили після фарбування за Грамом — виявляли грамнегативні палички.

Біохімічну ідентифікацію здійснювали з використанням стандартних тестів: середовище TSI, визначення утворення H₂S, реакції на індол, уреазу, цитрат та лізиндекарбоксилазу. За потреби застосовували серологічну ідентифікацію за схемою Кауфмана–Уайта.

ОС.8. Облік результатів та утилізація

Отримані результати фіксували у лабораторному журналі із зазначенням джерела зразка, використаних методів та кінцевих висновків. Проводили аналіз отриманих даних.

Після завершення досліджень усі використані матеріали та середовища підлягали знезараженню (автоклавування) та утилізації відповідно до вимог біобезпеки.

Розрахунок матеріалів для процесу виділення

Для проведення досліджень із виділення *Salmonella spp.* із продукції птахівництва було здійснено розрахунок необхідної кількості поживних

середовищ, реактивів та лабораторного посуду з урахуванням кількості досліджуваних зразків.

У дослідженні було використано 30 проб (15 – м'ясо птиці, 15 – яйця).

1. Розрахунок буферизованої пептонної води (BPW)

Для попереднього збагачення використовували співвідношення: 1:10, тобто на 25 г досліджуваного матеріалу вносили 225 мл BPW.

Загальний об'єм середовища визначали за формулою:

$$V = n \times V_1 \quad (1)$$

де:

V – загальний об'єм середовища, мл;

n – кількість проб;

V_1 – об'єм середовища на одну пробу, мл.

$$V = 30 \times 225 = 6750 \text{ мл}$$

$$6750 \text{ мл} = 6,75 \text{ л}$$

Отже, для попереднього збагачення необхідно 6,75 л BPW.

2. Розрахунок селективних бульйонів

Для кожної проби використовували: бульйон Раппопорта–Василіадіса – 10 мл; селенітовий бульйон – 10 мл.

Загальний об'єм розраховували:

$$V = n \times (V_1 + V_2) \quad (2)$$

де:

V_1 – об'єм бульйону Раппопорта–Василіадіса;

V_2 – об'єм селенітового бульйону.

$$V = 30 \times (10+10)$$

$$V = 30 \times 20 = 600 \text{ мл}$$

У тому числі:

$$V_1 = 30 \times 10 = 300 \text{ мл}$$

$$V_2 = 30 \times 10 = 300 \text{ мл}$$

Необхідно по 300 мл кожного селективного бульйону.

3. Розрахунок щільних поживних середовищ

Для висіву використовували 4 чашки Петрі на одну пробу: XLD-агар; SS-агар; вісмут-сульфітний агар; агар Плоскірева.

Кількість чашок:

$$N = n \times k \quad (3)$$

де:

N – кількість чашок;

k – кількість середовищ на 1 пробу.

$$N = 30 \times 4 = 120 \text{ чашок}$$

На одну чашку використовували приблизно 20 мл агару.

Загальний об'єм:

$$V = N \times 20$$

$$V = 120 \times 20 = 2400 \text{ мл}$$

$$2400 \text{ мл} = 2,4 \text{ л}$$

Для висіву необхідно 2,4 л щільних поживних середовищ.

4. Розрахунок універсального середовища (МПА)

Для отримання чистих культур використовували 40 чашок МПА та розраховували за формулю:

$$V = N \times V_1 \quad (4)$$

де:

N – кількість чашок;

V_1 – об'єм агару на 1 чашку.

$$V = 40 \times 20 = 800 \text{ мл}$$

$$800 \text{ мл} = 0,8 \text{ л}$$

Потрібно 0,8 л м'ясо-пептонного агару.

5. Визначення загальної потреба в середовищах

Загальний об'єм:

$$V_{\text{заг}} = V_{\text{ВРВ}} + V_{\text{селект}} + V_{\text{щільні}} + V_{\text{МПА}} \quad (5)$$

$$V_{\text{заг}} = 6,75 + 0,6 + 2,4 + 0,8$$

$$V_{\text{заг}} = 10,55 \text{ л}$$

Отже, загальна потреба у поживних середовищах становить 10,55 л.

6. Розрахунок чашок Петрі:

$$N_{заг} = 120 + 40 = 160 \text{ шт}$$

З урахуванням 10 % резерву:

$$N_{рез} = 160 \times 1,1 = 176 \text{ шт}$$

Необхідно 176 чашок Петрі.

7. Розрахунок біохімічних тестів

Кількість тестів визначають:

$$N_T = n \times m \quad (6)$$

де:

m – кількість тестів на одну пробу.

$$N_T = 30 \times 4 = 120$$

Отже, необхідно 120 біохімічних тестів.

За результатами проведених розрахунків встановлено, що для дослідження 30 проб продукції птахівництва необхідно підготувати 10,55 л поживних середовищ, 176 чашок Петрі, 120 біохімічних тестів, селективні бульйони та універсальні середовища, що забезпечує повний цикл мікробіологічного виділення та ідентифікації *Salmonella spp.*

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці в лабораторіях мікробіологічного профілю спрямована на забезпечення безпечних умов роботи персоналу, попередження виробничого травматизму, професійних захворювань та біологічних ризиків. Проведення досліджень із виділення *Salmonella spp.* пов'язане з потенційною небезпекою інфікування, тому всі роботи виконуються відповідно до чинних нормативних документів і санітарних правил [9].

Організація охорони праці в лабораторії здійснюється відповідно до чинного законодавства України та нормативних документів, зокрема: Закон України «Про охорону праці»; Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення»; Закон України «Про захист населення від інфекційних хвороб»; Кодекс законів про працю України (КЗпП); ДСанПіН 9.9.5-080-02 «Санітарні правила для мікробіологічних лабораторій»; ДСТУ ISO 17025:2019 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій»; НПАОП 0.00-4.12-05 «Типове положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці»; Правила пожежної безпеки в Україні (НАПБ А.01.001-2014); Інші галузеві інструкції та методичні рекомендації. Дотримання зазначених нормативних актів забезпечує безпечні умови праці та регламентує порядок виконання робіт у лабораторії [2].

До роботи допускаються особи, які пройшли інструктаж з техніки безпеки, ознайомлені з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії та забезпечені засобами індивідуального захисту. З метою забезпечення безпеки працівників у лабораторії проводяться такі види інструктажів [11]:

- 1. Вступний інструктаж.** Проводиться з усіма особами, які вперше потрапляють до лабораторії (студенти, практиканти, нові працівники). Містить загальні відомості про умови праці, основні небезпечні фактори, правила поведінки та дії у разі аварійних ситуацій [14].

2. Первинний інструктаж на робочому місці. Проводиться перед початком самостійної роботи. Включає ознайомлення з обладнанням, методиками досліджень, правилами роботи з біологічними матеріалами та дотриманням асептики [11].

3. Повторний інструктаж. Проводиться не рідше одного разу на 6 місяців з метою закріплення знань з охорони праці та контролю їх дотримання.

4. Позаплановий інструктаж. Проводиться у випадках змін у технологічному процесі, впровадження нового обладнання, порушень правил безпеки або після нещасних випадків [14].

5. Цільовий інструктаж. Проводиться при виконанні разових робіт, ліквідації аварій або виконанні робіт підвищеної небезпеки [11].

Усі види інструктажів реєструються у спеціальних журналах встановленого зразка з підписами осіб, які проводили та проходили інструктаж [9].

Під час проведення досліджень можливий вплив таких факторів:

- **Біологічні фактори** – патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми (*Salmonella spp.*);
- **Хімічні фактори** – дезінфікуючі засоби, реактиви, барвники;
- **Фізичні фактори** – підвищена температура (автоклави, сушильні шафи), ультрафіолетове випромінювання, робота з відкритим полум'ям;
- **Механічні фактори** – травмування скляним посудом, інструментами;
- **Психофізіологічні фактори** – напруженість уваги, тривала робота у вимушеному положенні [9].

Перед початком роботи в бактеріологічному відділі необхідно: одягнути лабораторний халат, шапочку, маску та рукавички; перевірити справність обладнання (автоклава, термостата, ламінарної шафи); підготувати робоче місце, обробити поверхні дезінфікуючими розчинами; перевірити наявність та придатність поживних середовищ і реактивів; ознайомитися з планом роботи та методикою дослідження [2].

Під час виконання мікробіологічних досліджень необхідно [14]:

- дотримуватись правил асептики та антисептики;
- працювати у стерильних умовах (біля пальника або у ламінарній шафі);
- уникати утворення аерозолів під час роботи з культурами;
- не допускати контакту біологічного матеріалу зі шкірою та слизовими оболонками;
- обережно працювати зі скляним посудом та гострими інструментами;
- не вживати їжу та напої у лабораторії;
- негайно повідомляти про аварійні ситуації (розлив культури, травмування) [14].

Після завершення досліджень необхідно: провести знезараження використаних матеріалів (автоклавування); обробити робочі поверхні дезінфікуючими засобами; зняти засоби індивідуального захисту та утилізувати одноразові матеріали; ретельно вимити та продезінфікувати руки; вимкнути обладнання та перевірити стан робочого місця [19].

Біобезпека при роботі з *Salmonella spp.* *Salmonella spp.* належать до патогенних мікроорганізмів, тому робота з ними повинна проводитися з дотриманням вимог біобезпеки (рівень BSL-2) [9]:

- використання ламінарних боксів при роботі з культурами;
- обмеження доступу сторонніх осіб до лабораторії;
- чітке маркування культур і зразків;
- ведення обліку штамів;
- обов'язкова дезінфекція та стерилізація відходів [2].

Пожежна безпека. У лабораторії необхідно дотримуватися правил пожежної безпеки: обережно працювати з відкритим полум'ям; не залишати увімкнені електроприлади без нагляду; знати місцезнаходження вогнегасників та правила їх використання; не допускати накопичення легкозаймистих матеріалів; у разі пожежі діяти згідно з інструкцією евакуації [21].

Надання першої допомоги. У разі нещасних випадків необхідно: при порізах – обробити рану антисептиком і накласти пов'язку; при опіках – охолодити уражене місце та звернутися до медичного працівника; при попаданні біоматеріалу на шкіру – негайно обробити дезінфікуючим засобом; при підозрі на інфікування – повідомити керівника та звернутися до лікаря [19].

Дотримання вимог охорони праці під час проведення мікробіологічних досліджень є необхідною умовою безпечної роботи та отримання достовірних результатів. Комплекс заходів із біобезпеки, санітарії та техніки безпеки дозволяє мінімізувати ризики для персоналу та навколишнього середовища [21].

Таким чином, система охорони праці в лабораторії базується на чинній нормативно-правовій базі та включає комплекс організаційних і профілактичних заходів, серед яких важливе місце займає проведення інструктажів. Це забезпечує належний рівень безпеки персоналу під час роботи з патогенними мікроорганізмами [2].

ВИСНОВКИ

1. Таксономічний статус, морфологічні та культуральні властивості *Salmonella spp.* є важливою основою для їх ідентифікації та диференціації. Поєднання цих ознак із біохімічними та серологічними характеристиками дозволяє точно визначити видову та сероваріантну належність ізольованих штамів, що має ключове значення для проведення мікробіологічних досліджень і забезпечення безпечності продукції тваринництва.

2. Для *Salmonella Enteritidis* характерним є утворення на XLD-агарі червоних колоній із чорним центром (ознака утворення сірководню), на SS-агарі – безбарвних або слабо забарвлених колоній з чорним осадом. На вісмут-сульфітному агарі колонії мають темне забарвлення. *Salmonella Typhimurium* проявляє подібні культуральні властивості, однак часто характеризується більш інтенсивним утворенням H_2S , що проявляється вираженим почорнінням колоній. На XLD-агарі колонії також червоні з чорним центром, на SS-агарі – безбарвні з чорним осадом. Незважаючи на значну подібність біохімічних властивостей, *S. Typhimurium* відрізняється більш активним метаболізмом сірковмісних сполук, що дозволяє використовувати дану ознаку для попередньої диференціації сероварів.

3. Основні відмінності між *S. Typhimurium* та *S. Enteritidis* полягають не стільки у типі колоній, скільки в інтенсивності прояву окремих ознак. *S. Typhimurium*, як правило, характеризується більш активним утворенням сірководню, що проявляється більш темним забарвленням колоній і середовища. Крім того, колонії можуть бути дещо більшими та щільнішими.

4. Водночас обидва серовари мають спільні ключові діагностичні ознаки: відсутність ферментації лактози, утворення H_2S , подібні результати біохімічних тестів і типову реакцію у середовищі TSI. Саме тому для їх остаточної диференціації необхідне застосування серологічних або молекулярно-генетичних методів.

5. Встановлено, що *Salmonella Enteritidis* частіше асоціюється з яйцями, тоді як *Salmonella Typhimurium* – із м'ясом птиці. Водночас для *S. Typhimurium* характерна вища інтенсивність росту, що може свідчити про більш активні метаболічні процеси або кращу адаптацію до поживних середовищ.

6. Процес виділення *Salmonella spp.* включає підготовчі (допоміжні) та основні етапи, спрямовані на отримання чистої культури збудника та її ідентифікацію.

7. За результатами проведених розрахунків встановлено, що для дослідження 30 проб продукції птахівництва необхідно підготувати 10,55 л поживних середовищ, 176 чашок Петрі, 120 біохімічних тестів, селективні бульйони та універсальні середовища, що забезпечує повний цикл мікробіологічного виділення та ідентифікації *Salmonella spp.*

ПРОПОЗИЦІЇ

1. Рекомендувати застосування швидких методів ідентифікації (ПЛР, імуноферментний аналіз) поряд із класичними мікробіологічними методами для скорочення часу отримання результатів.
2. Проводити постійний моніторинг сероварів *Salmonella* з метою виявлення домінуючих штамів (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) та оцінки їх епізоотичного значення.
3. Підвищувати кваліфікацію лабораторного персоналу, зокрема щодо сучасних методів діагностики та вимог біобезпеки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Благодатний В. М. Таксономічні різновиди мікроорганізмів роду *Salmonella*. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. ПЛ Шупика*. 2014. (23 (2)), 548-553.
2. Бондаренко М. Ю., Сидоренко А. П. Правові аспекти охорони праці: збірник наукових праць. Львів: Львівська політехніка, 2022. 380 с.
3. Бубало В., Віктор М. Актуальність ідентифікації біологічних властивостей доміантних популяцій сальмонел та вивчення їх впливу на епідемічний процес зоонозних сальмонельозів в Україні. In *The 12th International scientific and practical conference "Current challenges, trends and transformations" (December 13-16, 2022) Boston, USA. International Science Group. 2022. 673 p. (p. 344).*
4. Галабурда М., Панчук А. Оцінка безпечності харчових добавок в ЄС. Європейські виміри сталого розвитку : матеріали II Міжн. наук.-практ. конф., м. Київ, 26 черв. 2020 р. Київ, 2020. С. 97–98.
5. Дворська Ю. Є. Порівняння методів визначення рівня контамінації тушок бройлерів сальмонелою. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, 2012. (1), 89-92.
6. Держпродспоживслужба. Результати діяльності за 2023 рік Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби. URL: <https://dpss.gov.ua/news/rezultaty-diialnosti-za-2023-rik-mykolaiivskoi-rehionalnoi-derzhavnoi-laboratorii-derzhprodspozhyvsluzhby>.
7. ДСТУ 4769:2007 Бактеріологічне дослідження патологічного матеріалу від тварин. Методи виявлення сальмонел.
8. ДСТУ ISO 6887-1:2003. Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень.

[Чинний від 2014-10-01]. Вид. офіц. Київ : Держспоживстандарт України, 2003. 9 с.

9. Дяченко П. М., Іванова Л. В. Безпека праці в сучасних умовах: монографія. Одеса: Одеський національний політехнічний університет, 2021. 224 с.

10. Етіологічна структура сальмонельозу птиці в Хмельницькому регіоні. Світ наукових досліджень. 2022. № 13. С. 205–206. URL: <https://www.economy-confer.com.ua/full-article/3955/>

11. Зінченко І. В., Мельник Т. А. Система управління охороною праці на підприємствах: навчальний посібник. Дніпро: Дніпровський державний технічний університет, 2021. 298 с.

12. Івахнюк Т. В., Штайнбергер Р. М., Голубнича В. М. Інтегрований курс фундаментальних дисциплін. Розділ "Спеціальна, клінічна та санітарна мікробіологія" : конспект лекцій. Суми : Сумський державний університет, 2025. 193 с.

13. Коваленко Н. І., Замазій Т. М. Санітарна мікробіологія : метод. вказ. з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія» для студентів-магістрів II–III курсів за спеціальністю «Медицина», «Стоматологія» освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр». Харків : ХНМУ, 2021. 48 с.

14. Ковальчук В. М., Петренко О. І. Організація охорони праці на підприємствах: навчальний посібник. Харків: Харківський національний економічний університет, 2019. 312 с.

15. Козловська Г. В., Івченко В. М., Скибіцький В. Г. Ветеринарносанітарна мікробіологія / за ред. В. Г. Скибіцького. Київ : вид-во НУБІП України, 2019. 430 с.

16. Константиненко Л. А., Шуригін О. І. (Використання поживних середовищ в лабораторній діагностиці. *Актуальні проблеми лабораторної діагностики: матеріали першої регіональної науково-практичної конференції*, 2018. 32-37.

17. Миколаївська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини. Миколаївська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби. URL: <https://vetlab.gov.ua/>.
18. Про затвердження Параметрів безпечності м'яса птиці : Наказ МОЗ України від 06.08.2013 р. №695.
19. Про охорону праці : Закон України від 14.10.92 р. № 2695-XII : станом на 13 груд. 2022 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12#Text>.
20. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв : навч. посіб. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с.
21. Прядко О. С. Охорона праці: підручник. Київ: Видавничий дім "Київський університет", 2020. 456 с.
22. Рубленко О. І., Зоценко В. М. Загальна мікробіологія : метод. вказівки. Біла Церква : БНАУ, 2022. 20 с.
23. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. 312 с.
24. Assessment of Various Subtypes of *Salmonella* serotypes and *Salmonella enteritidis* as Important Human Pathogens According to Standard Microbiological Methods / Ragip Shabani et al. Journal of International Dental and Medical Research. 2019. Vol. 12, no. 3. P. 900–906. URL: https://www.researchgate.net/publication/336588539_Assessment_of_Various_Subtypes_of_Salmonella_serotypes_and_Salmonella_enteritidis_as_Important_Human_Pathogens_According_to_Standard_Microbiological_Methods.
25. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella* / Wallace H. Andrews et al. 2020. URL: https://www.knowthefactsmmj.com/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Microbial/1-Bacteriological-Analytical-Manual-BAM_Ch5_-Salmonella_-FDA.pdf.

26. Hao Tang, Ziyang Zhan, Xiucheng Liu, Ying Zhang, Xinxiang Huang, Min Xu, Propionate reduces the viability of *Salmonella enterica* Serovar Typhi in macrophages by propionylation of PhoP K102, *Microbial Pathogenesis*. 2023. 178. (106078).
27. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European union one health 2022 zoonoses report. *EFSA Journal*, 2023. 21(12), e8442.
28. ISO 6579-1:2017 Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод для виявлення, перерахування та серотипування *Salmonella*. Частина 1. Виявлення *Salmonella spp.*
29. Obe T., Nannapaneni R., Schilling W., Zhang L., McDaniel C., Kiess A. Prevalence of *Salmonella enterica* on poultry processing equipment after completion of sanitization procedures. *Poultry science*. 2020. 99(9), 4539-4548. doi: 10.1016/j.psj.2020.05.043.
30. *Salmonella enterica subsp. diarizonae* derived from ATCC® 12325. Microbiologics. URL: <https://www.microbiologics.com/01054K>.
31. Shu-Kee Eng et al. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 2015. Vol. 8, no. 3. P. 284–293. URL: <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>.
32. Wigley P. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: addressing fundamental questions in bacteriology sixty years on from the 9R vaccine. *Avian Pathology*. 2017. Vol. 46, no. 2. P. 119–124. URL: <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1240866>.
33. World Health Organization. *Measures for the control of non-typhoidal Salmonella spp. in poultry meat: meeting report*. World Health Organization. 2024.