

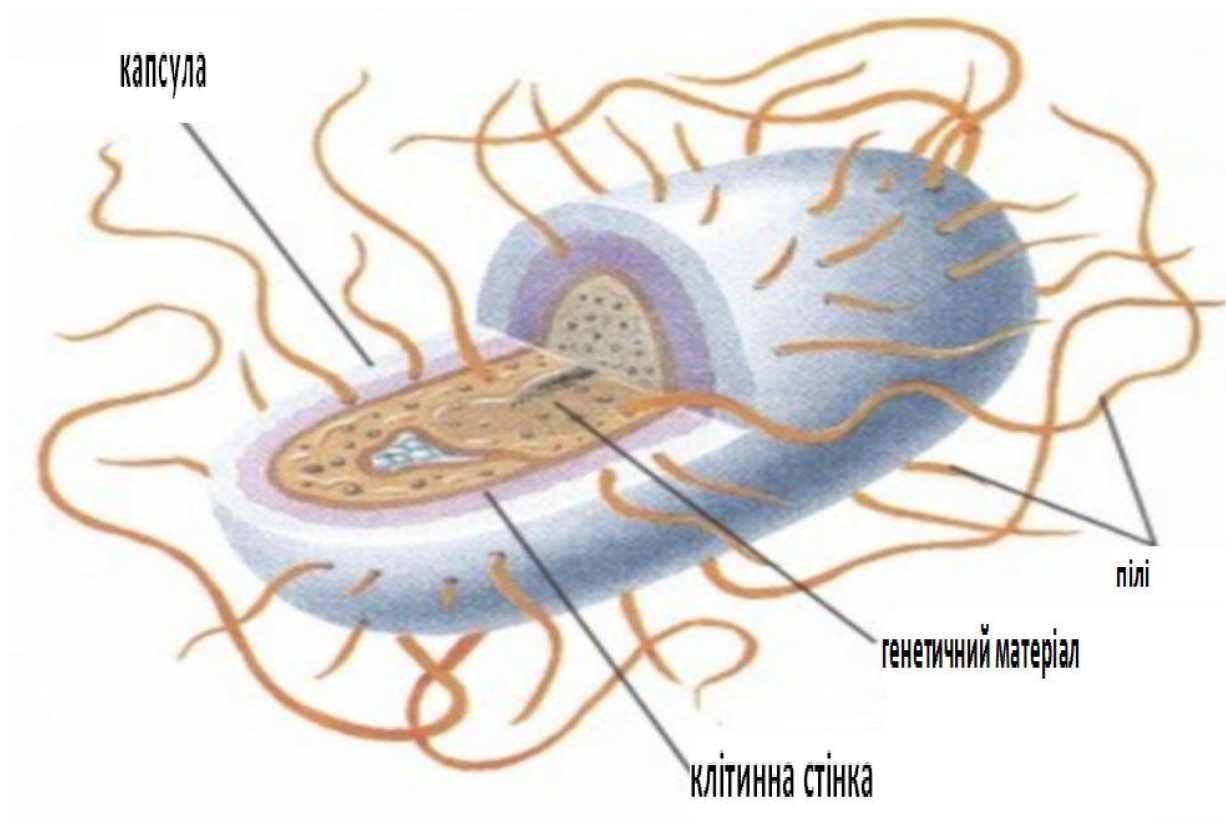
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
Кафедра мікробіології та вірусології

ВОДНА МІКРОБІОЛОГІЯ

методичні вказівки для забезпечення практичної роботи студентів



Біла Церква

2022

УДК 619:576.8(07)

Затверджено вченою радою екологічного
(Протокол № від 08.2022)

Укладачі: канд. **Рубленко І.О.** – доктор вет. наук, доцент, доцент; Рубленко
І.О.Чемеровська І.О., Зоценко В.М., Тарануха С.І., Островський Д.М.

Водна мікробіологія: Методичні вказівки для практичної роботи студентів
екологічного факультету, зі спеціальності 207 Водні біоресурси та аквакультура / Рубленко
І.О.Чемеровська І.О., Зоценко В.М. та ін-61с.

Рецензенти:

В. Скрипник, доктор вет. наук, генеральний директор громадської спілки Українська асоціація виробників і дистриб'юторів ветеринарних препаратів та кормових добавок.

ЗАНЯТТЯ 1

Тема: Мікробіологічний практикум, правила роботи в ньому та техніка безпеки. Мікроскопічне дослідження бактерій і робота з імерсійною системою мікроскопа. Морфологія бактерій

Мета заняття. Ознайомити студентів з обладнанням мікробіологічного практикуму, правилами роботи, технікою безпеки та особистої безпеки. Вивчити будову світлового мікроскопа, правила користування імерсійною системою та основні форми бактерій.

Обладнання та матеріали: мікроскопи, серветки, імерсійне масло, готові забарвлені мазки з культур мікроорганізмів, таблиці будови мікроскопа та основних форм мікроорганізмів.

Методика виконання заняття.

Студентський мікробіологічний практикум. Для проведення лабораторно-практичних занять з мікробіології на кафедрах мікробіології у вищих навчальних закладах повинні бути обладнані учбові практикуми, де студенти опановують методи мікробіологічних досліджень та проводять науково-дослідну роботу. Для них відводять просторі світлі кімнати з гладенькими стінами і підлогою, непроникними для вологи та придатними до застосування миючих засобів та дезінфектантів. Тому підлогу необхідно вкривати лінолеумом або гладенькою плиткою, а стіни – світлою масляною фарбою або облицювати висотою на 1,5 м світлим кахелем. У практикумі повинні бути холодна та гаряча вода, раковина з каналізацією, обов'язково педальне відро для сміття, дезінфікуючий розчин, мило, рушник.

У практикумах встановлюють лабораторні столи, вкриті пластиком так, щоб вони були максимально освітлені. Уздовж столів посередині ставлять штативи для пробірок, склянки з знежиреними предметними скельцями, флакони або крапельниці з барвниками у штативах-колодках, газові або спиртові пальники, зливні чашки з місточками та колби з водою. На столі також повинні бути мікроскопи, штучний освітлювач, імерсійна олива, бактеріологічні петлі та інше обладнання, необхідне для проведення бактеріологічних досліджень.

Для успішного забезпечення навчального процесу кафедра повинна мати культури мікроорганізмів, сучасну апаратуру, окремі кімнати для миття посуду, для приготування живильних середовищ, для обладнання приладів, стерилізаційну, препараторську, термостатну, бокс та віварій для утримання лабораторних тварин.

У мийній повинні бути столи, гаряча та холодна вода, раковини, сушильна і витяжна шафи. У стерилізаційній кімнаті мають бути стіл, автоклав, апарат Коха та добре обладнана вентиляція для відведення пари. У кімнаті для приготування живильних середовищ треба

мати газову плитку, столи, холодильні шафи для збереження реактивів, компонентів середовищ, м'ясної води та готових середовищ у колбах та шафа з відсіками для середовищ у пробірках. У препаратурській обслуговуючий персонал проводить підготовку до лабораторно – практичних занять, тому в ній розміщуються холодильники, дистилатор, ваги, центрифуги тощо.

Бокси використовуються для проведення посівів пат матеріалу та пересівів культур мікроорганізмів у більш-менш стерильних умовах. Вони бувають настільні та стаціонарні. Перші виготовляють у вигляді продовгуватого ящика із прозорими стінами з органічного скла, або каркас роблять із дерева, а стінки – із звичайного скла. У нижній частині передньої та задньої стінки роблять по два круглі отвори, до яких прикріплюють нарукавники, через які можна проводити всередині різні маніпуляції. Під верхньою стінкою закріплюють бактерицидну лампу для стерилізації, а у бокових стінках обладнують дверцята, через які всередину вкладають необхідні для дослідження матеріали.

Під стаціонарний бокс відводять цілу кімнату або відокремлюють в одному з кутків частину її розміром 2–3×5–6 м з перегородкою на 1/3 під передбоксік. Стіни боксу будують щільні, непроникливі для повітря, нижню частину яких на рівні вікна і верхню – роблять непрозорими. Середню частину боксу закривають віконними рамами зі склом, під якими всередині прибудовують пристінні столи для виконання мікробіологічних досліджень. Двері в передбоксіку та боксі краще робити розсувними, глухі стіни облицьовують світлим кахлем, або, як і стелю, покривають масляною фарбою світлого кольору, а підлогу – лінолеумом. Під стелею боксу та передбоксіка підвішують бактерицидні лампи.

У термостатній кімнаті встановлюють термостати з різною температурою: для вирощування грибів – на 26 °С, для культивування збудників бактеріологічних інфекцій – на 37 °С, для термофільних мікроорганізмів – на 40–45 °С. У віварії утримують лабораторних тварин: білих мишей та щурів, кролів, морських свинок та інших тварин, а також барана.

Правила роботи і техніка безпеки у студентських мікробіологічних практикумах.

Працюючі у студентських мікробіологічних практикумах та лабораторіях, обов'язково повинні дотримуватися певних санітарних правил, спрямованих на запобігання розповсюдженню збудників у зовнішньому середовищі та зараження працюючих викладачів і студентів. Тому всі співробітники кафедри мікробіології, аспіранти та студенти, які займаються в них, перед роботою та навчанням зобов'язані ознайомитися з правилами роботи і техніки безпеки, розписавшись у спеціальному журналі. Потрібно бездоганно дотримуватися наступних правил:

- заходити у приміщення практикумів та лабораторні кімнати і працювати в них дозволяється тільки у спецодязі (халат, шапочки або косинки);
- забороняється приносити з собою сторонні речі, продукти. Сумки та пакети складають у спеціально відведеному місці;
 - забороняється пити, їсти і палити;
 - за кожним студентом закріплюється робоче місце, мікроскоп та інші прилади;
 - забороняється запалювати один пальник від іншого;
 - не дозволяється вмикати електрообладнання в мережу без дозволу викладача;
 - склянки з досліджуваним матеріалом обробляють дезрозчином і ставлять у кювети;
- кожний матеріал, що використовується на заняттях, розглядати як особливо небезпечний;
- при дослідженні матеріалу і роботі з культурами мікроорганізмів слід дотримуватись загальноприйнятих у мікробіології правил, які виключають можливість зараження працюючого;
 - якщо інфікований матеріал потрапить на стіл, терміново приймають заходи по його знезараженню;
 - після закінчення роботи інфікований матеріал, культури мікроорганізмів, інструменти і поверхню стола знезаражують;
 - наприкінці заняття культури мікроорганізмів і патологічний матеріал студенти здають викладачу, на робочих місцях наводять порядок;
 - забороняється виносити з лабораторії пробірки з культурами, виготовлені препарати тощо;
 - після закінчення роботи студенти знімають спецодяг, миють руки, а у разі необхідності, обробляють їх дезрозчином.

Мікроскопія. Світлова мікроскопія. Мікроскопічне дослідження дозволяє виявляти морфологічні особливості мікроорганізмів, їх тінкторіальні властивості (реакція на барвники), наявність спеціальних структур (спор, капсул, включень) та рухливість. У нашій країні найбільш розповсюджені світлові мікроскопи. Окрім світлової, в мікробіології використовують також люмінесцентну мікроскопію, мікроскопію у темному полі та фазово-контрастну з використанням спеціальних пристроїв до світлового мікроскопу, або спеціальних мікроскопів. Вони можуть збільшувати досліджувані об'єкти до 2000 разів. Існують також електронні мікроскопи, які збільшують досліджуваний об'єкт у 50 000 разів і більше.

Будова мікроскопа. У світловому мікроскопі розрізняють дві частини – механічну й оптичну. До *механічної частини* належить штатив, який складається з основи і колонки, предметний столик з отвором посередині, клемми-затискачами та двома центруючими гвинтами, тубус, обертальний револьвер з отворами для об'єктивів та макро- і мікрогвинти для переміщення тубуса (рис.1). Макрогвинтом проводять грубу наводку, а

мікрогвинтом, повний оберт якого складає 0,1 мм, більш точну різкість. У деяких мікроскопів предметний столик буває рухомим у двох перпендикулярних напрямках горизонтальної площини за допомогою двох гвинтів, або нерухомий, а у інших може навіть обертатися навколо вертикальної осі. *Оптична частина* включає освітлювальний апарат, окуляр та об'єктив.

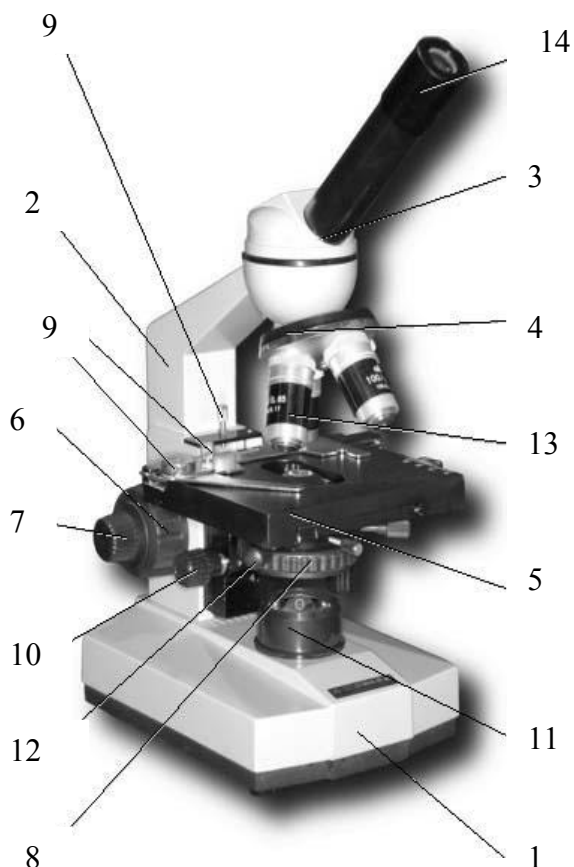


Рис. 1. Будова світлового мікроскопу:

1. Основа.
2. Колонка.
3. Тубус.
4. Револьвер.
5. Предметний столик.
6. Макрогвинт.
7. Мікрогвинт.
8. Гвинт вертикального переміщення конденсора.
9. Тримач препарата із гвинтами для горизонтального переміщення.
10. Гвинт.
11. Лінза освітлювача.
12. Конденсор із ірисовою діафрагмою.
13. Об'єктиви.
14. Окуляр.

Макрогвинтом проводять грубу наводку, а мікрогвинтом, повний оберт якого складає 0,1мм, більш точну різкість. У деяких мікроскопів предметний столик буває рухомим у двох перпендикулярних напрямках горизонтальної площини за допомогою двох гвинтів, або нерухомий, а у інших може навіть обертатися навколо вертикальної осі. *Оптична частина* включає освітлювальний апарат, окуляр та об'єктив.

Освітлювальний апарат знаходиться під предметним столиком і складається з дзеркала або електричної лампи з лінзою (у сучасних моделях мікроскопів), конденсора та ірисової діафрагми. Дзеркало кріпиться до колонки під конденсором, обертається в різних напрямках і має дві різні поверхні. Його рівна поверхня слугує для користування природним світлом, а увігнута слугує для штучного освітлення. Конденсор концентрує промені, що надходять від дзеркала, і фокусує на досліджуваній об'єкт, складається з двох лінз. Опускаючи та піднімаючи його з допомогою гвинта, можна зменшувати або збільшувати ступінь освітлення об'єкта. Під конденсором знаходиться ірисова

діафрагма, яка складається з напівкулястих металевих пластин. З її допомогою можна регулювати ступінь освітлення препарату, звужуючи або розширюючи діаметр отвору для проходження світлових променів.

Об'єктиви – це металеві циліндри, у які вмонтована система лінз, з яких передня – фронтальна і від неї залежить ступінь збільшення об'єкта, інші корегуючі. Об'єктиви поділяються на сухі та імерсійні. У сухих між фронтальною лінзою та препаратом знаходиться повітря, в імерсійних – шар олії (кедрової, касторової, гвоздичної) або води. Імерсійні об'єктиви характеризуються кращою роздільною та збільшуючою здатністю. Сухі об'єктиви позначаються 8x, 20x, 40x, імерсійні – 90x, 100x.

Окуляри знаходяться у верхній частині тубуса і складаються з двох лінз, також вмонтованих у металевий циліндр. Лінза, що спрямована в бік ока дослідника, називається очною, а щодо об'єкта - збираючою. Залежно від збільшення, окуляри позначаються 7x, 10x, 15x, 20x.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива та збільшення окуляра.

Робота з імерсійною системою. Починаючи працювати з мікроскопом, конденсор піднімають вгору до предметного столика і повністю відчиняють діафрагму. Встановлюють об'єктив малого збільшення (8x) на відстані 1,5 см від предметного столика і з допомогою дзеркала, дивлячись в окуляр, наводять рівномірне освітлення. На предметний столик кладуть препарат, закріплюють його клемами, наносять краплю імерсійної олії і переводять на імерсійний об'єктив (x90 або x100), який під контролем ока занурюють у краплю олії. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрогвинта повільно піднімають або опускають тубус до появи зображення, після чого мікрогвинтом встановлюють чітке зображення. Рухаючи предметний столик за допомогою двох гвинтів його переміщення, оглядають кілька полів зору і виявляють мікроорганізми.

Після закінчення роботи тубус піднімають, револьвер переводять у нейтральне положення і сухою серветкою (краще фланелевою) або змоченою бензином чи ксилолом, видаляють олію із фронтальної лінзи об'єктива. Зберігають мікроскоп у спеціальному дерев'яному футлярі або під скляним чи поліетиленовим ковпаком.

Мікроскопія у темному полі. Вона дозволяє досліджувати об'єкти, невидимі у звичайному світловому мікроскопі, шляхом використання спеціального конденсора (01–13). У ньому центральна частина затемнена, внаслідок чого поле зору лишається темним, а мікроорганізми та інші об'єкти освітлюються косими променями, які переломлюються ними і потрапляють в об'єктив. Внаслідок цього на фоні темного поля досліджувані об'єкти яскраво світяться.

Техніка проведення мікроскопії. Темнопольна мікроскопія використовується для вивчення рухливості мікроорганізмів та діагностики бактерій. Для вивчення рухливості мікроорганізму досліджують препарат "роздавлена крапля", виготовлений з молоді бульйонної культури в такій послідовності:

- препарат кладуть на предметний столик мікроскопа і фокусують з об'єктивом 8 х;
- замість звичайного конденсора встановлюють конденсор темного поля;
- повністю відкривають діафрагму, ставлять матовий світлофільтр, максимально включають реостат освітлення і за допомогою дзеркала встановлюють рівномірне освітлення поля зору;
- трохи опускають конденсор і на верхню лінзу наносять краплю імерсійної олії або дистильованої води;
- обережно піднімають конденсор доки імерсійна рідина не пошириться по нижній поверхні предметного скла;
- на малому збільшенні фокусують мікроскоп на препараті.

Після появи у полі зору світлої плями, інколи з темним центром, за допомогою гвинтів переміщення предметного столика переводять її до центру, а інтенсивність зображення регулюють підняттям або опусканням конденсора. Після цього встановлюють об'єктив бажаного збільшення – найчастіше 40 х і фокусують.

Фазово-контрасна мікроскопія використовується для дослідження малоконтрастних об'єктів, які майже не змінюють потік світлових променів, порівняно з фоном. Вони змінюють не амплітуду світлових променів, що проходять крізь них, а лише фазу останніх, що лишається непомітним для людського ока. Тому для посилення контрастності не зафарбованих об'єктів у мікробіологічну техніку введене фазово-контрастне пристосування КФ-4, до складу якого входять фазово-контрастний об'єктив, револьверний конденсор з діафрагмою і допоміжний мікроскоп.

Фазово-контрастний об'єктив має на одній із лінз фазову пластину у вигляді кільця, напиленого солями рідких металів. Вона напівпрозора і змінює фазу світлової хвилі на $1/4$, що й перетворює фазову різницю в амплітудну. Кільцева діафрагма – це непрозора пластина, яка має кільця для проходу світлових променів. Для одержання фазово-контрастного ефекту кільце фазової пластини повинно точно збігатися з кільцевою діафрагмою конденсора. Таке центрування проводять з допомогою допоміжного мікроскопа.

Люмінесцентна мікроскопія. Люмінесценція – це світіння об'єктів у тому числі і мікроорганізмів внаслідок наявності надмірної енергії, що трансформується у світло. Світіння об'єктів може бути власним і наведеним шляхом обробки їх флюорохромами (акридин оранжевий або жовтий, примулін, флуоресциїн, родамін та ін.). У мікробіологічній практиці явище люмінесценції широко використовується для видової ідентифікації мікроорганізмів шляхом обробки їх люмінофорами та дослідження з

допомогою спеціальних люмінесцентних мікроскопів або люмінесцентних приставок до звичайних мікроскопів.

У люмінесцентному мікроскопі використовується ртутно-кварцова лампа, яка випромінює потік світлових хвиль. З допомогою кварцового колектора хвилі концентруються у щільний пучок, з якого вилучаються теплові і селекціонуються тільки короткохвильові промені. Останні спрямовують на досліджуваній об'єкт і викликають його люмінесценцію. З потоку променів, що відходять від досліджуваного об'єкта, в окуляр пропускають довгохвильові, які спостерігаються оком і одночасно з допомогою роздільної пластини та замикаючого окулярного фільтра видаляють короткохвильові промені, шкідливі для ока людини. Це забезпечує кольорову флюоресценцію об'єктів (зелено-жовту) на темному полі зору.

Для люмінесцентної мікроскопії *готують препарат-мазок* з бульйонної або агарової культури бактерій, висушують на повітрі і фіксують ацетоном або сумішшю етиловий спирт-ефір на протязі 10–15 хвилин. Потім на мазок наносять розчин акридину оранжевого 1:10 000 на 1–5 хвилин, розчин флуорохрому зливають, мазок промивають дистильованою водою, висушують і досліджують.

Правила роботи з люмінесцентним мікроскопом:

- люмінесцентний мікроскоп встановлюють у затемненій кімнаті де немає яскравого світла і обов'язково заземлюють;
- після вмикання мікроскопа чекають 10–15 хвилин, щоб джерело енергії досягло оптимального режиму функціонування;
- на предметний столик мікроскопа покласти препарат і притиснути його клемами;
- нанести на препарат спеціальну не флуоресціюючу олію і занурити в неї фронтальну лінзу імерсійного об'єктива.
- решта маніпуляцій з мікроскопом як і при звичайній світловій мікроскопії;
- по закінченню роботи, мікроскоп вимикають з електромережі, чекають охолодження й накривають футляром.

Електронна мікроскопія. В електронному мікроскопі замість пучка світла використовується потік електронів, а скляні лінзи замінено на електромагнітні поля. Довжина хвилі електронних променів у багато разів менша за довжину хвиль світлових, внаслідок чого роздільна здатність електронних мікроскопів значно вища і становить близько 0,3–0,5 нм (3–5А), що дозволяє одержати значне збільшення і спостерігати об'єкти, невидимі у світловому мікроскопі.

Найпоширенішими є просвічуючі та растрові електронні мікроскопи різних модифікацій. Вони мають досить складні за конструкцією основні системи оптичну, вакуумну та енергопостачання, а також ряд додаткових пристосувань з системи охолодження лінз та нагріву пароолійних насосів, приладу для фотографування зображення тощо. Так оптична система . включає джерело електронів, електронно-оптичні лінзи, пристосування для корекції електронного мікроскопа просвічуючого типу (ЭВМ-100 Л). Джерелом електронів слугує катод

у вигляді тоненької вольфрамової нитки, розігрітої електричним струмом до 2500°C. Електрони рухаються у вакуумі до анода, що розміщується у верхній частині конденсорної лінзи, яка концентрує їх на досліджуваному об'єкті. Після об'єкта не розсіяні електрони проходять через отвір діафрагми і знову фокусуються об'єктивом променевої лінзи. І це сфокусоване та збільшене зображення проектується наступними лінзами на люмінесцентний екран або фотографується. Досліджувані об'єкти повинні бути прозорими для електронів і в той же час достатньо міцними, їх наносять на спеціальні металеві сітки, отвори яких закриті тоненькою плівкою з колодію в амілацетаті чи формварі. Мікроорганізми або уражені ними тканини просочують спеціальними речовинами, які згодом твердіють. З допомогою ультрамікроскопу з них одержують надтонкі зрізи товщиною 10–20 нм, які досліджують. Для досягнення контрастності зображення об'єкта їх напорошують металом /хромом та ін./

М о р ф о л о г і я бактерій. Бактерії – це живі, головним чином, одноклітинні істоти рослинного походження, які не мають хлорофілу і розмножуються простим поперечним діленням. За формою вони поділяються на три групи (рис. 2): *кулясті /коки/*, *паличкоподібні* та *звивисті*. Серед *кулястих* розрізняють: *монококи* – розміщені поодинокі, *мікрококи* – малі, *диплококи* – по два мікроорганізми, *тетракоки* – по чотири, *сарцини* – пакети з 8–16 та більше, *стрептококи* – у вигляді ланцюгів та *стафілококи* – скупчення мікроорганізмів у вигляді виноградного грона.

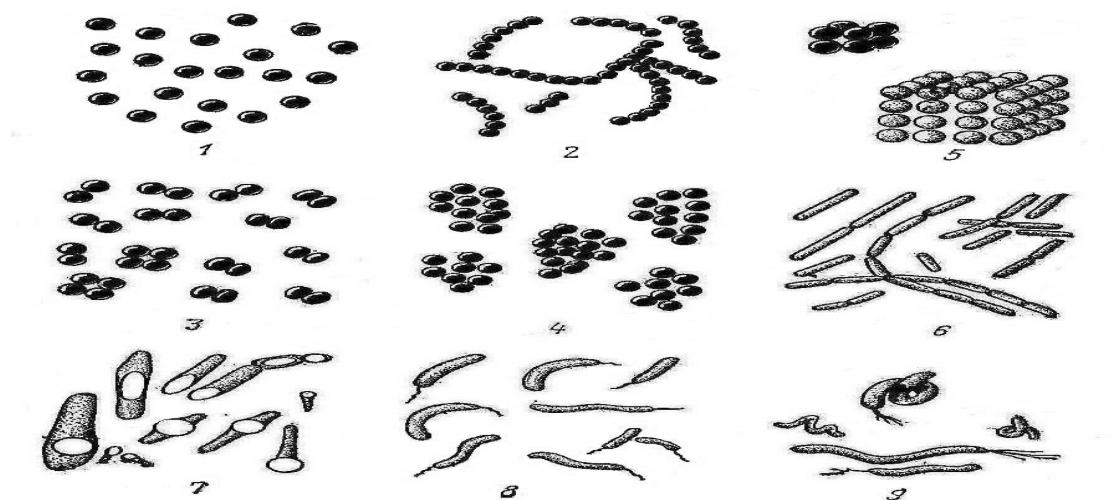


Рис. 2. Форми бактерій

Кулясті (коки):

- 1-монококи
- 2-стрептококи

Паличкоподібні:

- 6- власне бактерії (палички без спор)

Звивисті:

- 8- вібріони
- 9-спірили

Паличкоподібні форми поділяють на: *власне бактерії* – палички, *бацили* – палички зі спорами та *кlostридії* – палички зі спорами, діаметр яких перевищує діаметр мікроорганізму. Вони розміщуються поодинокі, парами, ланцюгами, під кутом або

скупченнями. Кінці паличок можуть бути заокругленими, прямокутними, загостреними чи потовщеними. Спори можуть розміщуватися (рис. 3) у центрі клітини (центрально), ближче до кінця (субтермінально) або на кінці (термінально). Деякі бактерії набувають розгалуженої форми, інші мають вигляд переплетених ниток.

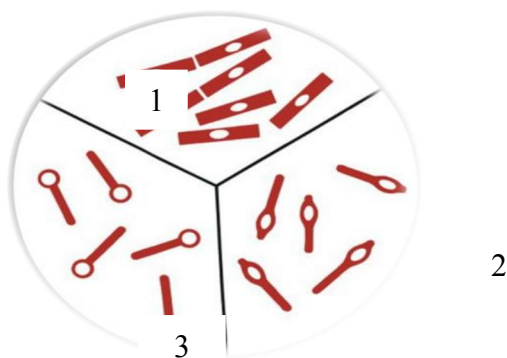


Рис. 3. Розміщення спор у бактерії:

- 1 – центральне;
- 2 – субтермінальне;
- 3 – термінальне.

Звивисті форми бактерій поділяють на три групи: *вібріони*, які мають форму коми, *спірили* – мають 2–4 великих завитки та *спірохети* – мають більше 5 завитків, штопороподібної форми.

ЗАНЯТТЯ 2

Тема 1. Виготовлення препаратів-відбитків з патологічного матеріалу та препаратів-мазків з культур мікроорганізмів. Головні барвники і прості методи фарбування

Мета заняття. Навчити студентів виготовляти препарати-мазки з культур мікроорганізмів та препарати-відбитки з патологічного матеріалу. Ознайомити студентів з головними аніліновими барвниками, виготовленням їх розчинів та простими методами фарбування.

Оснащення заняття: матеріал для виготовлення препаратів (культури стафілокока на МПБ і МПА та шматочки м'яса), пробірки з фізіологічним розчином, спиртівки, бактеріологічні петлі та пастерівські піпетки, знежирені предметні скельця, смужки фільтрувального паперу, зливні чашки з місточками, скальпеля, пінцети, набори розчинів фарб, маркер, мікроскопи, імерсійна олія, 3 % розчин карболової кислоти для використаних препаратів, штативи для пробірок, бутель з сифоном заповнена водою для промивання препаратів.

Тема 2: Складні методи фарбування

Мета заняття. Навчити студентів техніці фарбування мікроорганізмів за Грамом, Ціль-Нільсеном та спеціальними методами фарбування спор і капсул.

Оснащення заняття: знежирені предметні скельця, бактеріологічні петлі, спиртівки або газові пальники, пінцети, смужки фільтрувального паперу, зливні чашки з місточком, олівці для скла, розчини фарб (карболовий генціанвіолет, водний розчин фуксину та розчин метиленової синьки), 96 % спирт-ректифікат, 5 % розчин карболової кислоти, розчин Люголю; пробірки із суспензією суміші з одnodобових культур золотистого стафілокока та кишкової палички. Мікроскопи, імерсійна олія, серветки та таблиці зі споро- та капсулоутворюючими мікроорганізмами, забарвленими за Грамом.

Методика виконання завдання. При складних методах фарбування мікроорганізмів використовують два або більше контрастних барвників, які дозволяють більш детально вивчити особливості будови бактеріальної клітини, виявляти окремі структури, що сприяє диференціації видів. Найбільш поширеним складним методом фарбування у бактеріології є метод Грама.

Методика виконання завдання. Для мікроскопічного дослідження виготовляють препарати на предметному склі, дотримуючись правил асептики. З культур мікроорганізмів, вирощених на щільних та рідких живильних середовищах, молоці, крові та гною з допомогою бактеріальної петлі готують препарати-мазки, а з уражених тканин та органів (печінка, селезінка, лімфатичні вузли тощо) – препарати-відбитки. Бактеріологічна петля на кінці має заокруглення діаметром у 1,5–3 мм і виготовляється з матеріалу, що швидко розжарюється (червоніє) і швидко вистигає.

Предметні скельця для виготовлення препаратів повинні бути чистими і знежиреними, про що свідчить рівномірний розподіл води на їх поверхні. Тому нові скельця перед використанням кип'ятять впродовж 10 хв. у 1% розчині гідрокарбонату натрію, промивають у дистильованій воді з 0,5 % соляної кислоти, споліскують у дистильованій воді і висушують у сушильній шафі. При повторному використанні скельця обробляють розчином хромпіку (5% двохромовоокислий калій у сірчаній кислоті) 1–2 год., промивають в проточній воді і кип'ятять у 5% розчині соди 30 хв., споліскують у дистильованій воді і висушують. Скельця зберігають у скляних банках з притертою пробкою у суміші етилового спирту та ефіру порівну.

При **виготовленні препаратів-мазків** з культури, вирощеної у рідкому живильному середовищі, пробірку беруть у ліву руку, легенько струшують і розміщують її між вказівним та середнім пальцем, притримуючи зверху великим (рис. 4).

У праву руку беруть бактеріологічну петлю, обпалюють її у полум'ї пальника до почервоніння, мізинцем цієї ж руки біля полум'я виймають пробку з пробірки і вводять у пробірку петлю, заокруглений кінець якої занурюють у рідину. Краплю рідини з культурою переносять на середину поверхні скла і рівномірно розподіляють тонким шаром на площі у 4 см². Потім, залишки культури на петлі спалюють у полум'ї пальника. Якщо мазки виготовляють із культур, вирощених на щільному середовищі, то спочатку на скло наносять краплю стерильного фізіологічного розчину або дистильованої води, яку вносять невелику кількість мікробної маси, знятої петлею з поверхні культури, перемішують і розподіляють тонким шаром.

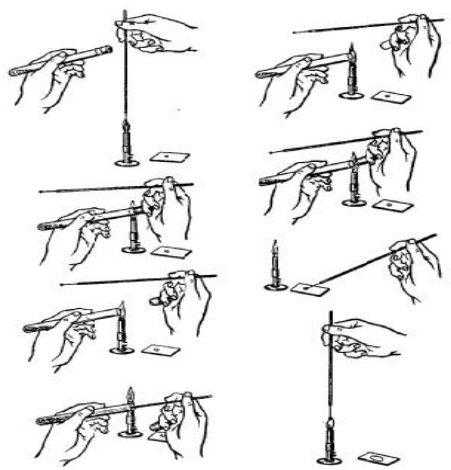


Рис. 4. Виготовлення препарата-мазка

При *виготовленні препаратів-відбитків* з уражених тканин та паренхіматозних органів поверхню їх стерилізують нагрітим шпателем, розрізають простерилізованим скальпелем, вирізають шматок матеріалу, беруть пінцетом й доторкуються до предметного скла в декількох місцях або проводять по скла. З досліджуваної крові мазки готують звичайними правилами. Гній, ексудат або мокроту наносять на середину предметного скла, накривають перпендикулярно другим, притискають та рознімають у протилежні боки і таким чином утворюється два препарати.

Виготовлені препарати *висушують* на повітрі при кімнатній температурі або в теплому повітрі над полум'ям пальника на висоті 20 см. Після цього їх *фіксують*, проводячи 3–4 рази над полум'ям пальника (тримаючи мазком угору) і торкаючись кожного разу шкіри руки. Якщо при цьому відчуваються ознаки припікання, то вважають, що мазок зафіксований. Можна використовувати і хімічні методи фіксації: етиловим спиртом (96%) — 10–15 хв., ацетоном – 5, метанолом – 2–3 хв., парами формаліну. Фіксація препаратів проводиться з метою прикріплення мікроба до скла, знешкодження його і сприяє кращому проникненню фарб в оболонку.

Головні барвники. Для фарбування бактеріальних клітин використовують частіше основні та нейтральні анілінові фарби: фіолетові (генціанвіолет, кристалвіолет, метилвіолет), червоні (основний фуксин, сафранін), зелені (малахітовий або брильянтовий зелений) та сині (метиленовий синій). З деяких фарб спочатку готують насичені спиртові розчини, з яких потім отримують робочі розчини, з інших – водні розчини. Найбільш часто використовують карболовий розчин генціанвіолету, карболовий розчин фуксину (фуксин Ціля) та його робочий розчин (фуксину Пфейффера), лужний розчин метиленового синього (за Леффлером), водні розчини – 2 % сафраніну, 1 % малахітової зелені та фарбу Романовського-Гімзи.

Прості методи фарбування. У простих методах використовують одну фарбу внаслідок чого бактерії забарвлюються в один колір. Вони дозволяють виявити форму мікроорганізму, інколи – зернистість; іноді може спостерігатись явище метахромазії (розщеплення кольору). Для цього фіксований мазок кладуть на "місток" над зливною чашкою і наносять розчин однієї фарби: карболовий генціанвіолет (обов'язково через смужку фільтрувального паперу), робочий розчин фуксину, або розчин сафраніну на 1-2 хв, а лужний розчин метиленової синьки – на 3–5 хв. Потім фарбу зливають, промивають водою, висушують і оглядають під імерсійною системою.

Тема 2: Складні методи фарбування

Техніка фарбування за Грамом. На фіксований полум'яз мазок, вкритий смужкою фільтрувального паперу, наливають на 2–3 хв розчин карболового генціанвіолету. Потім папір знімають, залишки барвника зливають і наливають на мазок розчин Люголя на 1–2 хв, після чого його зливають і наносять на 30–40 с 96° етиловий спирт. Препарат ретельно промивають водою і додатково фарбують водним розчином карболового фуксину (1–2 хв). Потім препарат промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійною системою. Грампозитивні (Гр+) бактерії забарвлюються у фіолетовий колір, а грамнегативні забарвлюються у рожево-червоний.

Неоднакове забарвлення бактерій пояснюється різною будовою та хімічним складом клітинної стінки (рис. 5).

Грампозитивні клітини

Грамнегативні клітини

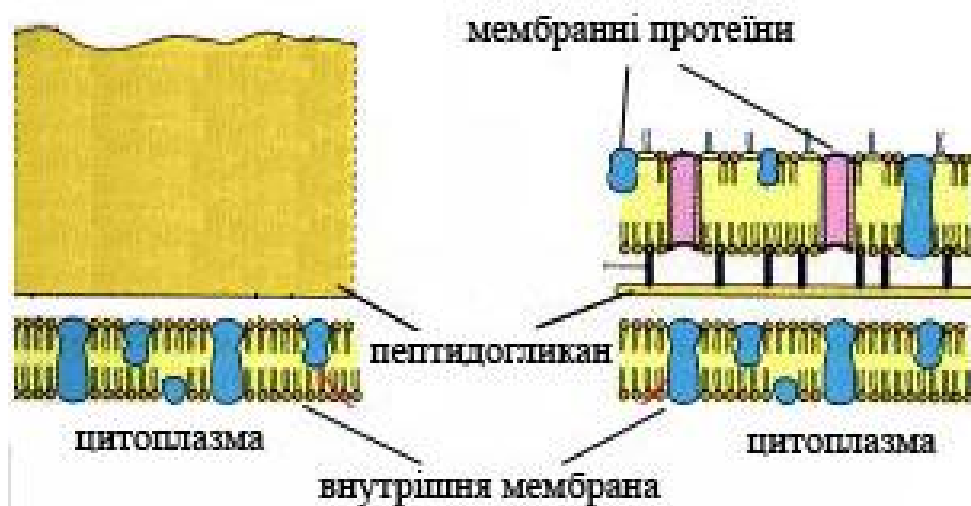


Рис. 5. Будова клітинної стінки бактерій

У грампозитивних клітинна стінка товста, містить багато (до 80 %) пептидоглікану, мікрофібрили якого утворюють густу сітку, що міцно утримує комплекс із генціанвіолету, і він не видаляється під дією спирту. У грамнегативних бактерій клітинна стінка значно тонша, містить мало пептидоглікану (від 1 до 10 %), мікрофібрили останнього утворюють більші "пори", які не втримують генціанвіолет, і він видаляється під дією спирту. Тому після дофарбування розчином фуксину вони сприймають рожево-червоний колір.

Фарбування кислотостійких бактерій. У природі існують мікроорганізми, які містять у клітинах підвищену кількість жироподібних речовин (до 40 %). Вони наділяють їх гідрофобними властивостями, що утруднює проникнення фарб у клітини, тому погано фарбуються звичайними методами. Їх називають кислотостійкими і фарбують за *методом Ціль-Нільсена*. Фіксований мазок накривають смужкою фільтрувального паперу і наливають карболовий фуксин Ціля, підігрівають до утворення пари і витримують 5–7 хв, потім папір знімають, залишки фарби зливають і мазок обробляють 5 % розчином сірчаної кислоти 5–7 с. Після ретельного промивання водою препарат фарбують розчином метиленової синьки за Леффлером 3–5 хв, знову промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійною системою. Кислотостійкі мікроорганізми фарбуються в рубіново-червоний колір, а інші і фон – у синій.

Фарбування спор. Деякі бактерії утворюють спори, що спрямоване на збереження мікроорганізму, коли він потрапляють у несприятливі умови зовнішнього середовища (висушування, нестача поживних речовин). Форма їх *сферична* або *овальна*, і в клітині розміщуватися вони можуть *центрально*, на кінці (*термінально*) або біля кінця (*субтермінально*). Процес спороутворення супроводжується значним зменшенням вмісту води в бактеріальній клітині, підвищенням в'язкості цитоплазми та появою багат шарової оболонки. Це забезпечує значну стійкість їх до висушування, нагрівання та дії багатьох розчинів дезінфікуючих речовин, антибіотиків та бактеріальних фагів.

Завдяки наявності щільних оболонок у спор фарби дуже погано проникають у них. Тому для їх забарвлення застосовують спеціальні методи, спрямовані на розпушування оболонок під дією кислот, фенолу або нагрівання. Оболонка спор розм'якшується і збільшується під дією кислоти. У той же час вегетативні клітини знебарвлюються і сприймають колір додаткового контрастного фарбника. Існує кілька способів фарбування спор.

ЗАНЯТТЯ 3

Тема 1: Дослідження бактерій у живому стані. Вивчення рухливості бактерій

Мета. Навчити студентів вивченню рухливості бактерій шляхом дослідження препаратів "роздавлена крапля" та "висяча крапля", методом Шукевича та культивуванням у напівтвердому середовищі. Ознайомити з рухом мікроорганізмів у світловому мікроскопі, з конденсором темного поля та фазово-контрастним.

Оснащення заняття: добові культури сінної палички та сальмонел для приготування препаратів "роздавлена" та "висяча" краплі; скельця предметні та покривні, скельця з лунками, пастерівські піпетки, фізрозчин, вазелін; мікроскопи світлові, темнопольні і фазово-контрастні; таблиці з розташуванням джгутиків у мікроорганізмів.

Методика виконання завдання. У природі існують рухомі та не рухомі мікроорганізми, тому вивчення рухливості бактерій проводять як з метою ідентифікації так і диференціації схожих індивідуумів. Органами руху у бактерій є джгутики, які мають вигляд спірально зігнутих ниткоподібних утворень і, завдяки гвинтоподібним обертам, зумовлюють хаотичний рух уперед, хоча здатні і до таксису. Вони є похідними цитоплазматичної мембрани, відходять від її базального тільця і складаються з субодиноць білку флагеліну, який є повноцінним антигеном, що відрізняється від соматичного. Побудовані із спіральної нитки, гачка і базального тільця і мають вигляд тонких (діаметр 12–18 нм) та довгих циліндрів, які інколи можуть значно перевищувати довжину мікроорганізму – від 10 до 20 мкм, а в деяких випадках навіть до 80–90 мкм. Тому їх не видно у звичайному світловому мікроскопі і для фарбування використовують методи імпрегнації, спрямовані на нашарування фарб або реактивів з метою штучного збільшення діаметру.

Кількість джгутиків та їх розташування характерні для окремих видів мікроорганізмів. Залежно від цього, бактерії поділяють (рис. 6) на: *монотрихи*, що мають один полярний джгутик, *амфітрихи* – джгутики є на обох кінцях клітини, по одному чи по кілька; *лофотрихи* – пучок джгутиків розташований на одному кінці клітини; *перитрихи* – джгутики знаходяться на всій поверхні клітини.

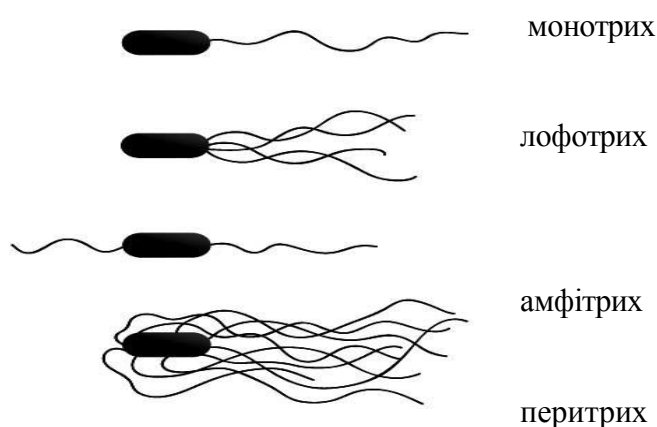


Рис. 6. Розміщення джгутиків на поверхні бактерій

Для визначення руху мікробів використовують молоді 18–24 годинні бульйонні культури або конденсати з агарових культур; та змив у фізіологічному розчині з поверхні добових культур на МПА.

Метод "роздавленої краплі". На середину предметного скла наносять краплю досліджуваної культури, накривають покривним скельцем так, щоб не утворилися пухирці повітря.

Метод "висячої краплі". Для виготовлення цього препарату використовують спеціальні предметні скельця з лункою в центрі, краї якої змазують вазеліном. Краплю досліджуваної культури наносять на середину покривного скельця, накладають зверху скельце з лункою і швидко перевертають. Крапля знаходиться в центрі герметично закритої порожнини, що захищає її від висихання.

Спочатку виготовлені зазначеними методами препарати мікроскопують під малим збільшенням (8x) у трохи затемненому полі зору, для чого дещо приспускають конденсор. Знаходять край краплі у вигляді ломаної лінії, зміщують поле зору до центру, встановлюють об'єктив середнього збільшення (x40) і переконуються, що бактерії рухаються в різних напрямках з неоднаковою швидкістю.

Рухливість мікроорганізмів краще спостерігається при дослідженні роздавленої краплі під мікроскопом з конденсором темного поля та фазово-контрастним. Під мікроскопом з конденсором темного поля, внаслідок освітлення бактерій на темному фоні боковими променями, останні відбиваються від них і потрапляють в об'єктив, тому вони яскраво світяться. При такому дослідженні частіше користуються сухими об'єктивами середнього збільшення (x40), що й дозволяє переконатися в рухливості бактерій чи в її відсутності. Взагалі ж треба мати на увазі, що бактерії здатні рухатися в різних напрямках і з різною швидкістю і для визначення рухливості використовують також фазово-контрастну мікроскопію.

Метод Шукевича. Він передбачає посів досліджуваного мікроорганізму у конденсат скошеного МПА у пробірці і культивування у термостаті за оптимальної температури. Рухомі бактерії розмножуються в конденсаті і розповсюджуються далі по поверхні агару, а нерухомі - ростуть тільки в конденсаті.

Об'єктивні результати з вивчення рухливості отримують при **посіві уколом у стовпик напіврідкого агару**: нерухомі мікроорганізми ростуть тільки по уколу у вигляді стержня, а рухомі ростуть ще й дифузно по боках стержня, зумовлюючи помутніння середовища.

Тема 2: Морфологія грибів та актиноміцетів

Мета. Ознайомити студентів з морфологічними особливостями мікроскопічних грибів, дріжджоподібних організмів та актиноміцетів.

Оснащення заняття: культури грибів родів *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Candida* та актиноміцетів на щільних поживних середовищах у пробірках; предметні та покривні скельця, мікологічні гачки, фізіологічний розчин, мікроскопи і таблиці з малюнками морфології грибів.

Методика виконання завдання. Морфологія грибів. Гриби – це надзвичайно велика група нижчих безхлорофільних організмів (близько 100 тис видів), які є еукаріотами, а за типом живлення – гетеротрофами, бо використовують тільки готові органічні речовини. Вони поділяються на макроміцети (їстівні) та мікроміцети. Вегетативне тіло останніх – грибниця, або міцелій, складається з окремих розгалужених ниток – гіфів товщиною від 5 до 50 мкм і більше. Міцелій може бути субстратним, що контактує з поживним середовищем і повітряним (поверхневим). Залежно від будови міцелію, гриби поділяють на нижчі (фікоміцети), у яких гіфи не мають перетинок, їх міцелій розгалужений, несептований і є великою багатоядерною клітиною; та вищі (мікроміцети), міцелій яких з перетинками – септований, багатоклітинний.

Гіфи грибів нарощуються своїми кінцями і розгалужуються радіально від центру, утворюючи колонію. Здебільшого молоді гіфи безбарвні, а з віком часто стають забарвленими. Деякі гриби для прикріплення до субстрату й одержання поживних речовин утворюють коренеподібні вирости – ризоїди, інші – апресорії – короткі, розширені лопатні вирости, які при паразитуванні на рослинах утворюють власні відгалуження – гаусторії. До видозмін міцелію належать склероції – округлі або продовгуваті тіла щільної консистенції; які складаються з переплетених гіфів. Клітини верхніх шарів їх темно забарвлені, містять мало води та багато поживних речовин, особливо жиру.

Розмножуються гриби вегетативним, статевим і безстатевим способами. Вегетативне розмноження здійснюється ділянками міцелію та спорами, що утворюються внаслідок розпаду міцелію (хламідоспори, оїдії, артроспори та бластоспори). Хламідоспори – це розрощення міцелію з потовщеною оболонкою, оїдії – це окремі клітини овальної форми з тонкою оболонкою в результаті розпаду кінцевої ділянки гіфів. Артроспори – це прямокутні або багатогранні спори, бластоспори утворюються шляхом брунькування міцелію, кулеподібної форми.

Безстатеве розмноження відбувається за рахунок спеціалізованих клітин – спор ендогенного (спорангіоспори, зооспори) та екзогенного (конідії) походження.

Статеве розмноження – це результат злиття ядер двох клітин з подальшим їх редукційним поділом, що призводить до утворення спеціалізованих гіфів, на яких утворюються органи статевого спороутворення (аски, базидії). У середині асків (сумок) розвиваються аскоспори, а базидіоспори знаходяться на поверхні базидії.

Гриби, що можуть розмножуватися поряд з іншими способами і статевим, називаються досконалими, а ті які не мають статевого розмноження – недосконалими.

Типовим представником нижчих грибів (фікоміцетів) є мукові гриби, зокрема мукор (рис. 7), або головчата цвіль, її міцелій несептований, плодонесучі органи – спорангієносці з плодовими тілами – спорангіями на кінцях, усередині яких знаходяться спорангіоспори. Після дозрівання спорангії розриваються і спори розповсюджуються у зовнішньому середовищі. Розмножуються усіма способами, на агарі Чапека мукор утворює пухкий сірий наліт. Серед вищих грибів найбільше розповсюдження і значення мають недосконалі гриби, особливо гіфоміцети родів пеніциліум, аспергилус, фузаріум, трихофітон та ін.

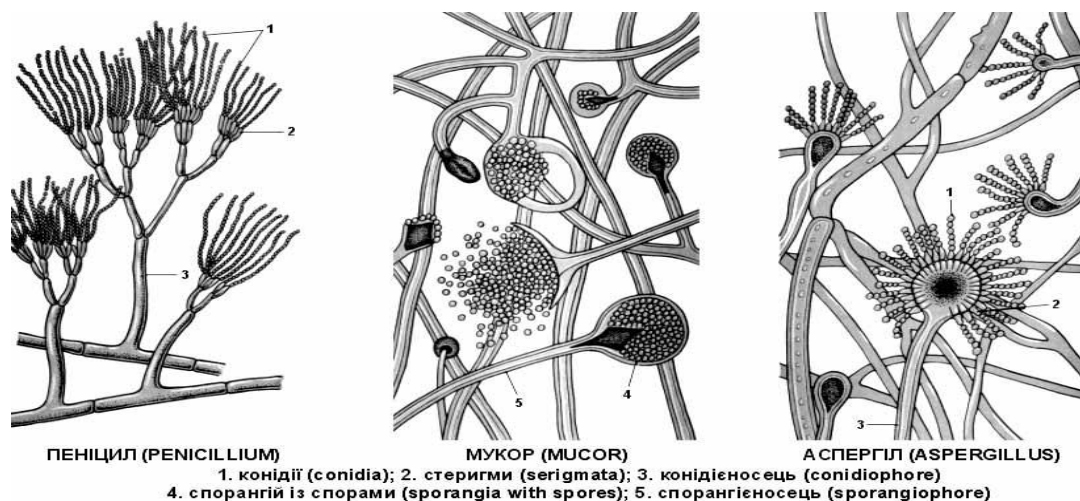


Рис. 7. Морфологія пеніциліїв, аспергилів та мукаральних грибів

У *пеніциліїв* (китичкова цвіль) міцелій та конідієносці септовані (рис. 7), розгалужені, на верхівці утворюють китички з ланцюгами одноклітинних конідій.

В *аспергилів* (лійкова пліснява) міцелій має перетинки (рис.5), конідієносці не септовані і на кінцях утворюють розширення у вигляді кулі, груші або продовгуватої форми, навколо якого розмішуються одно – або двоярусні *стеригми* із ланцюгами спор, що утворюють разом голову або колонку.

Аспергілли широко розповсюджені у зовнішньому середовищі і як цвілеві гриби псують корми та продукти харчування. Серед них є патогенні види, які викликають захворювання моллюсків, птиці, тварин та людей на аспергильоз. Деякі види розвиваються на кормах, продукують мікотоксини, що призводять до розвитку отруєнь, інші – використовуються для промислового одержання лимонної та щавлевої кислот.

Для *фузарій* характерний добре розвинутий повітряний міцелій (рис. 8) червоного, рожевого, білого, фіолетового або іншого кольору. Фузарії утворюють конідії двох типів – макро- та мікроконідії.

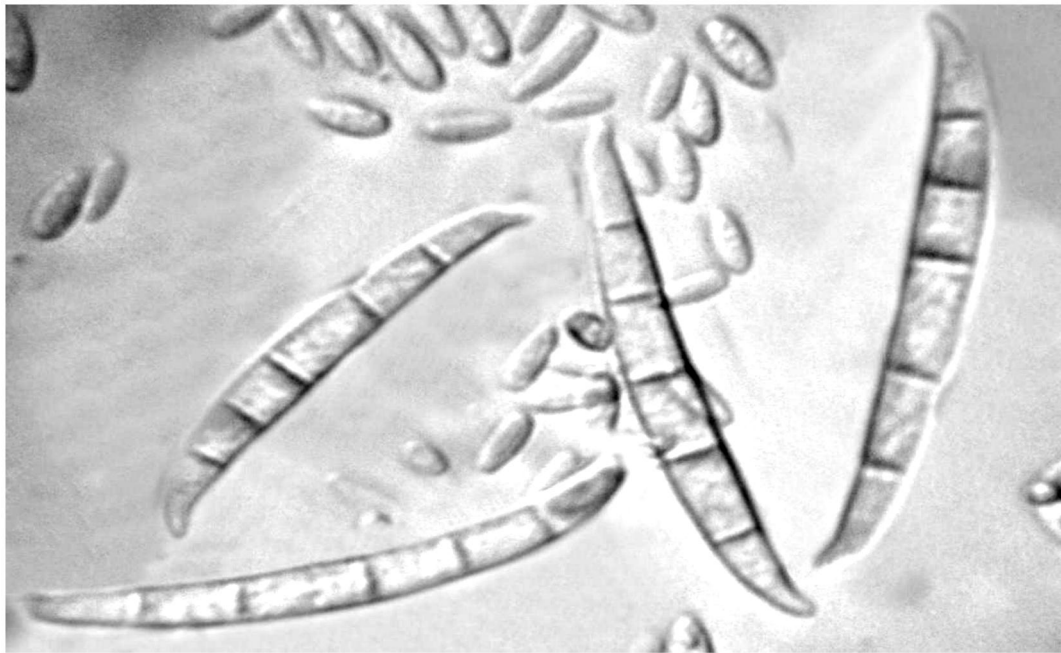


Рис. 8. Мікро- та макроконідії *Fusarium*

Серед них є патогенні види, що викликають фузаріози рослин, а також токсигенні види, що продукують різні фузаріотоксини, які викликають отруєння людей і тварин, інші виробляють стимулятори росту тварин і рослин (раггро, гібереліни).

У деяких вищих грибів (*дріжджі та дріжджоподібні організми*) міцелій відсутній, а їхнє вегетативне тіло представлено окремими клітинами овальної форми розміром близько 10 мкм (рис. 9).

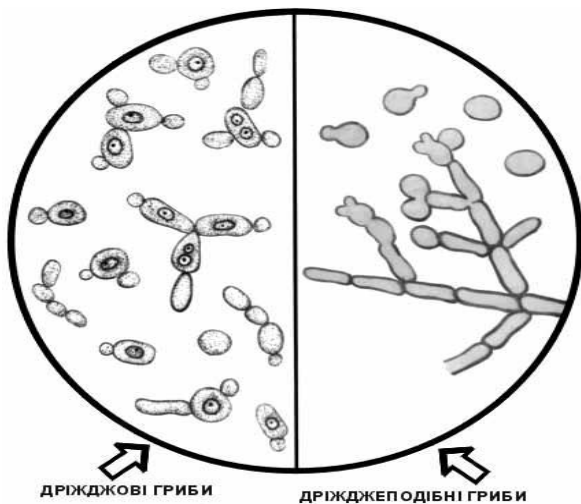


Рис. 9. Морфологія дріжджів та дріжджоподібних грибів

При *розмноженні* таких грибів *брунькуванням* або простим діленням дріжджові клітини можуть не розходитися і формують так званий *псевдоміцелій*. Істинні дріжджі можуть розмножуватися статевим способом, утворюючи спори в сумках, тому їх відносять до класу аскоміцетів.

Актиноміцети, або променеві гриби, займають проміжне місце між бактеріями і грибами, мають розгалужений тонкий одноклітинний міцелій, який розростається на субстраті у вигляді променів, і розмножуються спорами.

Методи дослідження грибів. Культивують гриби головним чином на середовищах агар Чапека, агар Сабуро та сусло агар з оптимальною рН 6,8–4,5 та оптимальною температурою для більшості 24–26°C, а деяких за 30 °C впродовж неділі. Мікроскопічно досліджують молоді культури грибів, вирощені головним чином на щільних поживних середовищах після спороутворення. Під малим збільшенням (x8) можна оглядати краї колоній, що іноді дозволяє визначити родову належність гриба. Більш детально морфологічні особливості вдається виявити шляхом мікроскопічного дослідження спочатку під малим (x8), а потім під середнім збільшенням (x40) незабарвлених препаратів – "роздавлена крапля".

Тема 3: Основні методи стерилізації

Мета. Ознайомити студентів з основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням, а також з існуючою апаратурою.

Оснащення заняття: стерилізатори (електричний, простий), ножиці, скальпелі, апарат Коха, водяна баня, сушильна шафа (піч Пастера), автоклав, бактерицидні ультрафіолетові лампи, азбестові фільтри Зейтца, мембранні, керамічні (Шамберлена, Беркефельда), насос Комовського, вата, папір, піпетки пастерівські та градуйовані, бактеріологічні чашки з МПА, культури сапрофітів в МПБ, колби, ватно-марлеві пробки, бікси, скальпелі, ножиці, бактеріологічні петлі.

Методика виконання завдання. Студенти самостійно готують до стерилізації різний лабораторний посуд: загортають у папір градуйовані піпетки, пробірки та пастерівські піпетки. Знайомляться з обладнанням автоклава, апарата Коха та іншими стерилізуючими приладами У мікробіологічних лабораторіях стерилізують живильні середовища, скляний посуд (колби, пробірки, бактеріологічні чашки тощо), інструменти (пастерівські піпетки, ножиці), ватно-марлеві пробки, тампони.

Стерилізація (знепліднювання, неплідність) – це знищення усіх живих істот у будь-якому матеріалі. Використовують різні фізичні і хімічні методи, при яких дотримуються двох основних вимог: досягнення повного знепліднення та збереження фізико-хімічних властивостей у стерилізуючому матеріалі. До фізичних методів відносять: фламбування, стерилізацію гарячим повітрям, кип'ятіння, парою, ультрафіолетовими променями, ультразвуком, бактеріальними фільтрами. В їх основі лежить згубна дія на мікроорганізми високої температури, УФ променів, ультразвуку та здатність бактеріальних фільтрів затримувати бактерії.

Фламбування використовують для стерилізації бактеріологічних петель, пастерівських піпеток, інколи ножиців, пінцетів.

Стерилізація кип'ятінням проводиться у електричних стерилізаторах.

Гарячим повітрям (сухим жаром) стерилізують чистий скляний посуд, бактеріологічні чашки, пастерівські піпетки, градуйовані піпетки, пробірки у спеціальних сушильних шафах (під Пастера).

Стерилізація парю (потоковою без тиску або насиченою під тиском). Стерилізацію *потоковою парю без тиску* проводять в апараті Коха.

Тиндалізація – це роздрібнена стерилізація за температур від 56 °С до 80 °С, яку застосовують для стерилізації термонестійких речовин (сироватки крові, білкововмісні речовини). Її проводять у водяній бані: за 70–80 °С – протягом трьох днів, 60–65°С 5 днів, 56–58 °С 6–7 днів.

Стерилізацію парю під тиском в автоклаві. Вітчизняна промисловість випускає вертикальні та горизонтальні автоклави (рис. 10), хоча існують і інші типи, але принципи їх будови та роботи однакові.



Рис. 10. Горизонтальний автоклав.

Для контролю якості теплової стерилізації використовують спеціальні «біотести» – смужки хроматографічного паперу просочені спорами *Bacillus stearothermophilus* у кількості біля 1 млн.

Стерилізація фільтруванням полягає у пропусканні рідини через бактеріальні фільтри, в стінках пор яких затримуються й адсорбуються мікроорганізми. Фільтри використовують щільні – керамічні у вигляді "свічок" (Шамберлена, Беркефельда), азбестові (Зейтця) та мембранні або колодієві мембрани.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. Застосовується для знезараження приміщень (кімнат–боксів, операційних) і поверхні предметів, що руйнуються під дією високої температури (плексигласових пластини з лунками, пробки). Джерелами УФ-променів слугують спеціальні бактерицидні лампи. Ефективність стерилізації залежить від інтенсивності випромінювання, відстані від джерела УФ-променів та експозиції.

Стерилізація ультразвуком. Згубна дія ультразвуку пов'язана з утворенням у цитоплазмі мікроорганізмів кавітаційних пухирців, заповнених парю під тиском близько

10 атм, внаслідок чого відбувається руйнування внутрішніх структур мікробних клітин. Метод використовують для знезараження води, молока та деяких продуктів.

Стерилізація хімічними речовинами. Застосовується в біологічній промисловості для консервування живильних середовищ, вакцин, лікувальних та діагностичних сироваток з метою попередження їх забруднення. При культивуванні вірусів, та ізоляції грибів застосовують **біологічну стерилізацію**, для чого в поживні середовища додають антибіотики, що стримують розвиток бактерій.

Але хімічні речовини використовують найчастіше в лабораторіях для **дезінфекції** приміщень, інвентарю (розчини хлораміну, спирту, фенолу), яка полягає у знищенні патогенних мікроорганізмів у зовнішньому середовищі.

Пастеризація – це метод часткового знезараження продуктів (молоко від хворих тварин, різні консерви, вино), який запропонував Л.Пастер. Для цього продукти нагрівають одноразово до 65–90 °С, з наступним їх охолодженням до 4 °С. На практиці використовують кілька варіантів пастеризації: тривалу – продукти нагрівають при 65 °С 30 хв, короткочасну – при 72–78 °С 15–20 с. та миттєву – проводять при 85–90 °С 1–2 с. При цьому відбувається загибель тільки вегетативних форм бактерій, а спорові форми не розвиваються за низької температури, тому її не можна вважати методом стерилізації.

ЗАНЯТТЯ 4

Тема 1. Живильні середовища для культивування мікроорганізмів.

Мета заняття. Вивчити призначення та виготовлення живильних середовищ і ознайомити з апаратурою для культивування мікроорганізмів.

Оснащення заняття: компоненти для приготування живильних середовищ - МПБ, агар-агар, желатина, пептон, хімічно чистий хлористий натрій, картопля, молоко, крейда, цукрі (глюкоза, лактоза, сахароза, левульоза), пробірки з ватними пробками, штативи, пінцети, підставки до газових пальників, ваги, колби (250, 100, 50 см³), мірні циліндри та стаканчики, пробірки, бактеріологічні чашки, градуйовані піпетки (1, 5, 10 см³), дистильована вода, рН- метр, папір, шпагат.

Методика виконання завдання Студенти готують живильні середовища, перевіряють і встановлюють оптимальну рН, фільтрують, розливають у пробірки та чашки.

Мікроорганізми культивують у лабораторних умовах на спеціально виготовлених *живильних середовищах*. За походженням їх поділяють на *природні* (молоко, картопля, морква, горох, пивне сусло тощо) та *штучні*, виготовлені за певними рецептами. Вони бувають рослинного і тваринного походження, за *консистенцією* – рідкі, тверді та напіврідкі, а за *призначенням* – звичайні (основні) або *універсальні*: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), на яких ростуть різні види мікроорганізмів, та *спеціальні*. Останні

поділяються на елективні, на яких ростуть тільки окремі види, диференційно-діагностичні – для диференціації бактерій за протеолітичними, цукролітичними, гемолітичними та іншими властивостями та збагачувальні (середовища нагромадження). До диференційних відносяться середовища нового покоління – хроматогенні. Їх використовують для виявлення високоспецифічних ферментів у досліджуваного мікроорганізму. До складу середовища входять хромогенний субстрат, що дозволяє виявляти візуально забарвлення різного кольору колоніє утворювальних одиниць. Більшість хроматогенних середовищ містять селективні добавки, які затримують ріст сторонньої мікрофлори (рис. 11).



Рис. 11. Ріст на середовищі Chromacult Coliform Agar (Merck): *E. coli* (сині), *Klebsiella pneumoniae* (червоні) та *Pseudomonas aeruginosa* (жовтуваті).

Живильні середовища повинні відповідати таким вимогам: бути стерильними, ізотонічними, мати достатню кількість речовин-джерел азоту та вуглецю, вуглеводів та вітамінів, мати оптимальний рН. Рідкі середовища повинні бути прозорими (окрім молока), а тверді – мати достатню вологість.

Важливе значення мають диференційно-діагностичні середовища Левіна, Плоскірева, вісмут-сульфітний агар тощо, які дають можливість визначати рід бактерій. Широко використовують також спеціальні живильні середовища: бульйон та агар Мартена, бульйон (перевар Хоттінгера), середовища накопичування (збагачення) Шустової, Раппопорта, Кілліана та синтетичні середовища для культивування грибів Ван-Ітерсона, Чапека, агар Сабуро.

Сухі живильні середовища. Сучасна біологічна промисловість випускає багато середовищ в готовому вигляді, або в сухому. Їх використання в лабораторній практиці значно полегшує роботу з виділення та ідентифікації мікроорганізмів. Зокрема широко використовується поживний бульйон на основі гідролізату ківки, поживний агар на основі ферментативного гідролізату кормових дріжджів та багато інших різноманітних середовищ. Їх приготування завжди детально наведене на упаковках кожного живильного середовища.

Тема 2. Техніка посіву та культивування мікроорганізмів в аеробних і анаеробних умовах

Мета заняття. Освоїти техніку посіву і пересіву мікробів на тверді і рідкі живильні середовища та культивування мікроорганізмів в аеробних та анаеробних умовах.

Обладнання та матеріали: термостат, анаеростат, ексікатор, стерильні МПБ, МПА та напіврідкий МПА у пробірках та чашках Петрі, культури непатогенних стафілокока та кишкової палички, патматеріал, газові пальники, металеві та скляні шпателі, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки.

Методика виконання завдання. Мікроорганізми культивують на стерильних живильних середовищах здебільшого у пробірках та бактеріологічних чашках. Посіви з досліджуваного матеріалу або пересіви вирощених культур проводять бактеріологічною петлею, пастерівською піпеткою, голкою або шпателем.

У мікробіології відпрацьована техніка проведення цих маніпуляцій, яка спрямована на проведення посівів і пересівів без забруднення їх сторонніми мікроорганізмами й одночасно запобігає розповсюдженню їх у зовнішньому середовищі. Ці маніпуляції проводять у стерильних стаціонарних або настільних боксах біля факела. Інструменти для проведення посіву використовують стерильні: бактеріологічні петлі обпалюють, ножиці, скальпелі, шпателі, шприци кип'ятять, а пастерівські піпетки обгортають папером і стерилізують автоклавуванням.

Первинний посів матеріалу для виділення аеробних мікроорганізмів проводять найчастіше на звичайні поживні середовища (тверді і рідкі) – МПБ і МПА. Якщо ж деякі мікроорганізми не ростуть на них, то використовують спеціальні живильні середовища. Для стимуляції росту мікроорганізмів на живильних середовищах посіви культивують при постійній температурі у термостатах і враховують тип дихання їх. Мікроорганізми, що виростають на поживних середовищах, називають мікробними або бактеріальними культурами.

Постійний рівень оптимальної температури забезпечують термостати або термостатні кімнати. *Лабораторний термостат* має вигляд шафи з подвійними металевими стінками, між якими може знаходитися або вода або повітря з тепло утримуючим матеріалом. У нижній частині вмонтовані електронагрівальні елементи, є також терморегулятор, який автоматично включає і виключає нагрівальні елементи, а в робочій камері – сітчасті полиці. На панелі розміщений показник встановленого температурного режиму з регулятором, а також термометр, що показує температуру робочої камери.

Посів на косий МПА. Пробірку із середовищем беруть у ліву руку і розмішують скошеною поверхнею догори між вказівним і середнім пальцями. Бактеріологічну петлю тримають правою рукою вертикально, ретельно обпалюють полум'ям і набирають петлею досліджуваний матеріал. Для цього поверхню органа або тканини припалюють розігрітим металевим шпателем, роблять розріз тканини профламованим скальпелем, краї розрізу розтягують пінцетом і з середини набирають петлею матеріалу для посіву. Потім мізинцем

правої руки біля полум'я пальника виймають пробку з пробірки, обпалюючи її краї, і петлю вводять усередину пробірки, не торкаючись стінок. Матеріал занурюють у конденсат, що знаходиться у нижній частині косяка агару, суспензують і зигзагоподібними рухами, обережно виймаючи петлю, розподіляють по середовищу, не руйнуючи його поверхню. Після цього петлю виймають з пробірки, краї знезаражують полум'ям і закривають пробкою, проводячи її через полум'я, а петлю стерилізують фламбуванням.

При пересівах мікроорганізмів пробірки з культурою та живильним середовищем утримують у лівій руці скошеною поверхнею догори між вказівним та безіменним пальцями трохи роз'єднуючи середнім та притримуючи обидві зверху великим пальцем. Обидві пробірки відкривають одночасно, захвачуючи пробки мізинцем і безіменним пальцями правої руки, в якій утримують і бактеріологічну петлю. Останню після фламбування вводять у пробірку з культурою, охолоджують, торкаючись поверхні агару, потім знімають біомасу мікроорганізму з поверхні культури, переносять у пробірку із живильним середовищем, занурюють у конденсат і висівають штрихом.

Посів на агар у бактеріологічній чашці. Чашки із живильним середовищем розміщують якомога ближче до пальника. Кришку чашки піднімають лівою рукою, утворюючи щілину з боку пальника настільки, щоб можна було ввести бактеріологічну петлю або пастерівську піпетку з посівним матеріалом і провести посів, а при необхідності – навіть шпатель. У випадку пересіву культур з пробірки на чашки без помічника пробірку з культурою фіксують середнім пальцем лівої руки на поверхні вказівного та середнього пальців, що дозволяє після зняття бактеріальної маси негайно переносити її на поверхню посіву «штрихом» (рис.12).

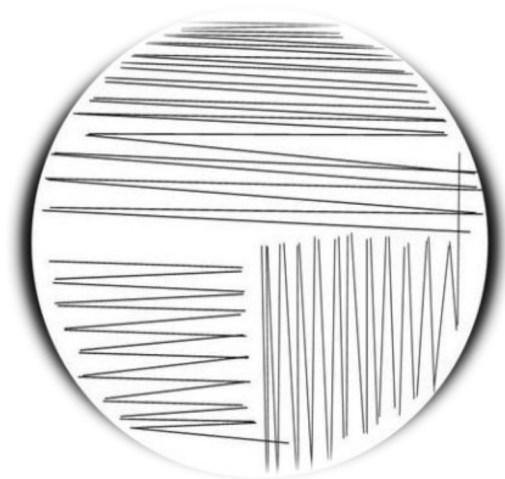


Рис. 12. Схема посіву «штрихом»

Посів уколom у стовпчик живильного середовища. Пробірку з МПА беруть у ліву руку мізинцем правої виймають пробку і пробірку перевертають догори. У пробірку вводять петлю або голку з досліджуваним матеріалом і роблять укол по центру до дна пробірки. Петлю стерилізують, пробірку закривають пробкою і ставлять у термостат.

Посів у рідке живильне середовище. Техніка посіву така ж, як і при посіві на косяки МПА. Бактеріологічну петлю з матеріалом трохи занурюють у живильне середовище і розтирають на стінці, а з пастерівської піпетки матеріал видувають у середовище, сколочуючи її. Використані піпетки знезаражують, занурюючи їх у дезрозчин.

Для культивування анаеробних мікроорганізмів використовують спеціальні живильні середовища або створюють для їх росту анаеробні умови (рис. 13).

Техніка посіву для їх культивування така ж, як і для культивування аеробів, але для виділення культур треба висівати більшу кількість досліджуваного матеріалу. Найчастіше використовують середовище Кітта-Тароцці (м'ясо-пептонний печінковий бульйон зі шматочками печінки під вазеліновою олією), а також напівтвердий МПА високим стовпчиком, середовище Вільсона-Блера. Для культивування анаеробів створюють умови анаеробіозу фізичними, хімічними та біологічними методами. Фізичний метод полягає у видаленні повітря з ексика

Рис. 13. Анаеростат для

культивування мікроорганізмів в анаеробних умовах

Анаеростат герметичною кришкою, кранами для видалення повітря видалають з допомогою вакуумного насоса. Промисловість випускає також термоанаеростат, що представляє анаеростат з пристосуванням у нижній частині для електропідігріву та терморегулятор для підтримки постійної температури.

Хімічний метод базується на поглинанні кисню при хімічній реакції, для чого на дно ексикатора кладуть суміш пірогалолу та їдкового натру або гідросульфату натрію та вуглекислої соди. При біологічному методі в бактеріологічні чашки одночасно висівають на одній половині аеробні мікроорганізми, а на другій – анаеробні і герметизують скотчем або заливаючи парафіном. У процесі росту аероби поглинають кисень і створюють умови для росту анаеробів.

Після посіву на пробірках і чашках пишуть номери експертиз, або назви органів чи інвентарні номери культур, дату посіву і для покращення росту

мікроорганізмів їх ставлять у термостат з оптимальною температурою. Пробірки у більшості випадків ставляють у штативах, чашки розміщують на полицях кришкою донизу.

Тема 3: Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методами і технікою виділення чистих культур мікроорганізмів, пересіяти чисті культури бактерій на МПБ та МПА і провести мікроскопічне дослідження забарвлених препаратів-мазків, виготовлених з них.

Обладнання та матеріали: термостат, чашки Петрі, розплавлений МПА, пробірки з косяками МПА, з МПБ, та з стерильним фізрозчином по 10 мл, культури мікроорганізмів у пробірках, бактеріологічні петлі, шпателі, набори барвників.

Методика виконання завдання. В посівах матеріалів, що досліджують у лабораторіях, часто виявляють по декілька видів бактерій. Щоб їх ретельно вивчити, потрібно спочатку одержати чисті культури мікроорганізмів, тобто такі, які складаються з одного виду.

Метод розведень запропонований свого часу ще Пастером, який згодом був удосконалений. Досліджуваний матеріал поступово розводять у 7–10 пробірках зі стерильним МПБ (по 10 см³). Для цього у першу пробірку вносять 0,1 см³ матеріалу, перемішують, 0,1 см³ суміші переносять у другу пробірку і після перемішування такий же об'єм переносять з другої у третю, іноді до 10 пробірок, одержуючи розведення 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ і т.д. Пастер вважав, що із збільшенням ступеню розведення досліджуваного матеріалу концентрація мікроорганізмів зменшується і в останній пробірці можливий ріст одного виду мікроорганізмів. Проте, це маловірогідно, тому для отримання чистої культури по 1 см³ виготовлених розведень останніх пробірок висівають на тверде живильне середовище у бактеріологічні чашки (рис. 14). Після термостатування окремі колонії відсівають на косяки агару, з яких мікроорганізми ростуть у вигляді чистої культури.

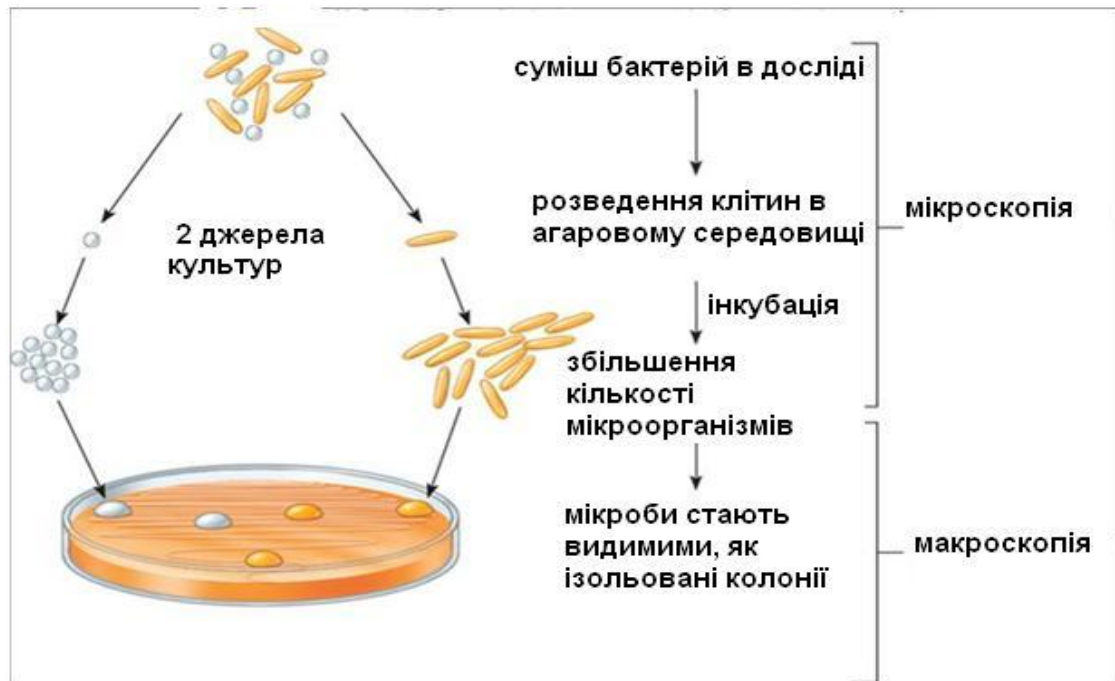


Рис. 14. Отримання чистої культури в агаровому середовищі

Останнім часом цей метод в дещо модифікованому вигляді використовується як для виділення чистих культур так і для одночасного визначення кількісного вмісту тих чи інших мікроорганізмів. У ньому розведення досліджуваного матеріалу проводять у стерильному фізрозчині або дистильованій воді і посіви проводять як на поверхню так і в товщу агару (в розплавлений і охолоджений до 45 °С МПА. Підрахувавши ті чи інші однотипні колонії і знаючи ступінь(рис. 15) розведення досліджуваного матеріалу вираховують їх кількісний вміст.

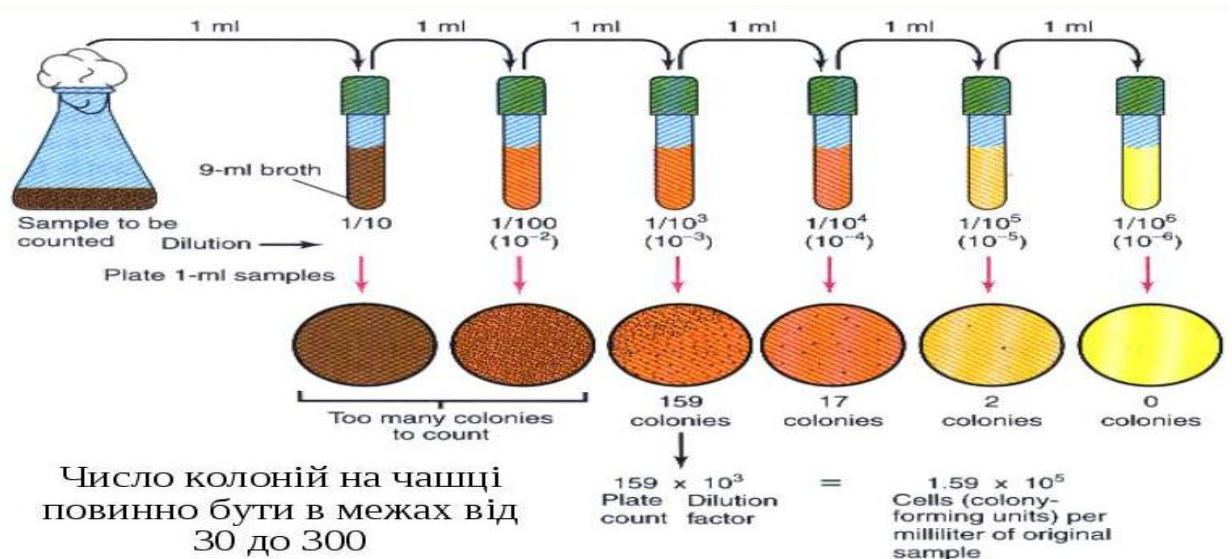


Рис. 15. Схема проведення розведення

Метод Коха базується на принципі Пастера, але досліджуваний матеріал розводять у 4–5 пробірках з 10–15 см³ розплавленого та охолодженого до 45–50 °С МПА.

Метод Дригальського дозволяє отримати ізольовані колонії. Беруть 3–5 чашок з щільним живильним середовищем і на поверхню першої чашки наносять краплю досліджуваного матеріалу, яку розподіляють стерильним шпателем штрихом по її поверхні. Потім, не обпалюючи шпатель, рештки матеріалу, що залишилися на ньому, розподіляють по поверхні другої, третьої, четвертої і п'ятої чашок і ставлять їх у термостат. Ізольовані колонії можна отримати цим методом навіть використовуючи одну бактеріологічну чашку з щільним середовищем, в якій посів штрихами здійснюють по секторам (рис. 16).

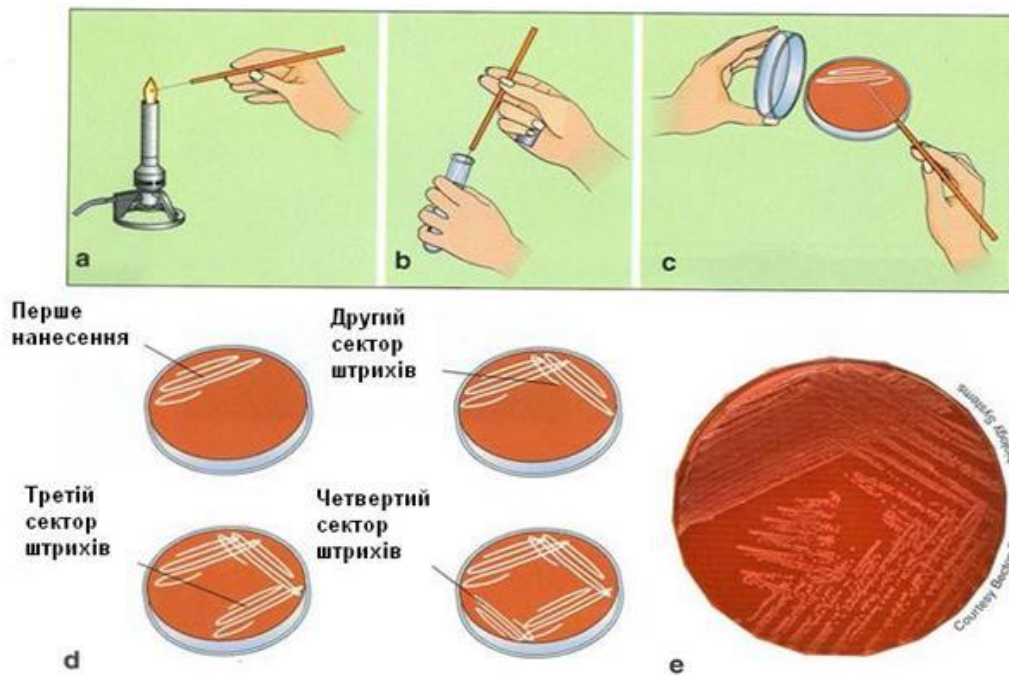


Рис. 16. Посів штрихами

Виділення чистої культури анаеробів. Для цього застосовують ті ж методи, що і для виділення чистої культури аеробів, але із використанням спеціальних живильних середовищ. Для отримання чистої культури за методом Дригальського посів проводять на глюкозо-кров'яний агар Цейслера і культивують в анаеробних умовах. З цією метою використовують середовище Вільсона-Блера, на якому анаеробні мікроорганізми утворюють колонії чорного кольору, які пересівають на середовище Кітта-Тароцці. Використовують також біологічний метод, для чого сприйнятливих

лабораторних тварин заражають суспензією досліджуваного матеріалу або мішаною культурою. Після загибелі тварин їх розтинають і посіви проводять у середовище Кітта-Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на агар Цейслера. Для отримання чистої культури спороутворюючих анаеробів із суміші мікроорганізмів перед посівом її прогривають у водяній бані при 80 °С 20–30 хв.

ЗАНЯТТЯ 5

Тема 1: Культуральні властивості мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методикою вивчення і описування основних ознак росту мікроорганізмів у рідких, напіврідких і щільних живильних середовищах.

Обладнання та матеріали: пробірки і чашки Петрі з культурами сінної палички (*Bac.subtilis*), кишкової палички (*E.coli*) та стафілокока (*Staph. saprophiticus*) у МПБ, на МПА, та середовищі Ендо, а також анаеробного мікроорганізму (*Cl.perfringens*) у напіврідкому МПА . Пробірки і бактеріологічні чашки з МПБ та МПА з посівами попереднього заняття.

Методика виконання завдання. Культуральні властивості мікроорганізмів – це характер росту мікробів на твердих, рідких і напіврідких середовищах. Вони використовуються поряд з іншими показниками при визначенні родової або видової належності мікроорганізмів. Для кожного мікроорганізму характерні певні ознаки росту на поживних середовищах, які в них з часом можуть змінюватися. Тому прийнято характеризувати їх в більшості у 16–18 годинних культурах, за виключенням деяких (збудники бруцельозу та туберкульозу) з повільним ростом впродовж 1–2 міс. Ознаками росту мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі є утворення каламуті , поверхневої плівки, пристінного кільця та осаду. Помутніння може бути інтенсивним, помірним, слабким або у вигляді опалесценції, а деякі види (лептоспіри) взагалі не викликають його. Після осідання каламуті утворюється осад, який може бути багатий, незначний, щільний, пухкий, зернистий, у вигляді шматочка вати, пластівцевий, крихкий, слизовий, сіруватого, білого жовтого або зеленуватого кольору. Певне діагностичне значення має поведження осаду при струшуванні пробірки: він може утворювати рівномірне помутніння, великі та дрібні пластівці , підніматися вгору у вигляді "муарових хвиль", "косичок", "шматочка вати", з помутнінням середовища або без нього. Деякі мікроорганізми можуть утворювати поверхневу

плівку, яка буває тоненькою, сітчастою, грубою, складчастою, пухнастою, крихкою, слизовою та різного кольору, а інші ростуть на поверхні у вигляді пристінного кільця.

На щільних середовищах мікроорганізми ростуть утворюючи колонії або у вигляді суцільного нашарування. Колонії бувають поверхневими, придонними та в товщі агару. Колонії мікробів на МПА (у чашках чи пробірках) спочатку розглядають неозброєним оком, а потім із допомогою лупи. Звертають увагу на :

- характер росту: пишний, помірний, бідний;
- форму колоній : округла, овальна, коренеподібна, зіркоподібна;
- розмір колоній: великі – діаметр перевищує 4 мм; середні – діаметр 2–4 мм; дрібні – діаметр 1–2 мм та мізерні (росинки – діаметр менше 1 мм);
- краї: рівні, зубчасті, кучероподібні, хвилясті, бахромчасті;
- поверхню: гладенька, зморшкувата, складчаста, горбиста, матова, борошниста, борозниста;
- рельєф (профіль): плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний;
- прозорість: прозора, непрозора, каламутна, блискуча, флуоресціююча;
- колір: сірувато-білий, блакитний, золотистий, червоний, оранжевий, зелений, синій або безбарвний;
- консистенція: тверда, крихка, слизувата, тістоподібна, масляниста;
- структура: однорідна, волокниста, плівчаста, зерниста.

Колонії з рівними краями та гладенькою поверхнею відносять до S-форм, з нерівними краями та шорсткою поверхнею – до R-форм, а слизові – до M-форм (рис. 17).

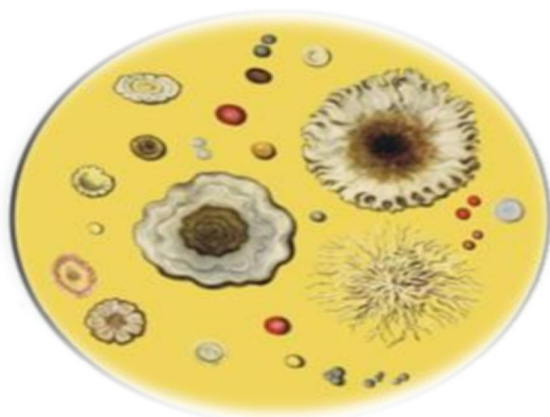


Рис. 17. **Форми колоній на поживному середовищі**

Окрім ізольованих колоній, при посіві штрихом мікроорганізми можуть утворювати суцільний наліт з рівними, хвилястими або шорсткими краями. Іноді він буває перистим, дифузним, деревоподібним. У напіврідкому МПА та МПЖ нерухомі мікроорганізми ростуть по уколу у вигляді білуватого стержня, а рухливі – ще викликають помутніння середовища різної інтенсивності у вигляді хмаринок. Наявність протеолітичних ферментів у деяких мікроорганізмів

призводить до розрідження желатини з різною інтенсивністю і формою, що залежить від виду мікроба (суцільне, пошарове, у вигляді лійки, кратера та панчохи). Аероби ростуть у верхній частині середовища, анаероби – у нижній, а факультативні анаероби – уздовж всього середовища. Враховують також газоутворення.

Тема 2: Біохімічні властивості мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методами вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів і на прикладі стафілококів, кишкової палички та сальмонел показати значення цих властивостей при ідентифікації даних мікробів.

Обладнання та матеріали: культури стафілококів, сальмонел та кишкової палички, середовище Гісса з вуглеводами та багатоатомними спиртами і зануреними поплавками, МПБ, МПЖ, кров'яний МПА, напіврідкий МПА з цукрами та індикатороммолоко з метиленовим синім та лакмусом, агар Ендо, Левіна, вісмут-сульфітний агар. Пробірки з посівами минулого заняття. Смужки індикаторного паперу, смужки просочені 12% розчином щавлевої кислоти та 10% розчином оцтовокислого свинцю.

Методика виконання завдання. Життєдіяльність мікроорганізмів пов'язана з наявністю в них ферментів, які беруть участь у різних біохімічних реакціях, забезпечуючи процеси живлення, дихання, росту і розмноження. У певних умовах кожний вид мікробів виробляє постійні групи ферментів, що розкладають білки і вуглеводи з утворенням кінцевих та побічних продуктів, а деякі окислюють або відновлюють різні субстрати. Тому вивчення біохімічних властивостей дозволяє проводити найбільш точну диференціацію мікроорганізмів.

Вивчення цукролітичних властивостей. Цукролітичні властивості – це здатність мікроорганізмів розщеплювати вуглеводи та багатоатомні спирти. Вивчають їх здебільшого шляхом культивування на середовищі Гісса, основою якого є пептонна вода, а також один з цукрів або багатоатомних спиртів (глюкоза, мальтоза, сахароза, левульоза, дульцит, маніт, сорбіт та ін.) та індикатора Андресе, до якого входить фуксин, знебарвлений лугом.

Вивчення протеолітичних властивостей Протеолітичні властивості – це здатність мікроорганізмів розщеплювати білки. Вивчають їх здебільшого шляхом культивування на МПЖ та молоці, а ступінь протеолізу – визначенням кінцевих продуктів (індолу, сірководню та аміаку).

Визначення каталази. Каталаза – фермент, що розкладає перекис водню на воду та водень. Для її визначення на поверхню добової культури мікроорганізму на МПА у чашці наносять тонкий шар 1%-ного розчину

перекису водню. При наявності каталази утворюються пухирці газу. Можна також використовувати культуру в МПБ: до 1 см³ добової бульйонної культури додають 1 см³ 10% розчину перекису водню і за наявності каталази утворюються пухирці газу.

Визначення редуруючих властивостей. Методи основані на здатності зміни кольору органічних фарб (метиленовий синій, малахітовий зелений тощо) під дією мікробного ферменту редуктази.

Визначення гемолітичних властивостей. Деякі види бактерій виробляють речовини, які руйнують оболонку еритроцитів, що призводить до гемолізу останніх. Для визначення гемолітичної здатності культури мікроорганізмів висівають на МПА з 5% дефібринованої крові. Мікроорганізми, що володіють гемолітичними властивостями, утворюють навкруг колоній прозорі зони (β -гемоліз) або зафарбовані в сіро-зелений колір (α -гемоліз).

Нині розробляються численні комерційні тест-системи для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів, які виготовляються на основі різноманітних диференційно-діагностичних середовищ (API-20 для ідентифікації стафілококів, коринебактерій, ентеробактерій, анаеробних мікробів, Enterotest пластина біохімічна диференційна для ідентифікації ентеробактерій, рис. 18). Інші варіанти подібних тест-систем передбачають адсорбцію диференціюючих субстратів на паперових або полімерних носіях.



Рис. 18. Тест-система API для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів

Тема 3. Визначення виду мікроорганізмів

Мета заняття. Набуття студентами навичок користування визначниками.

Обладнання та матеріали: визначники Ціона, Бергі; задачі визначення видів мікроорганізмів; таблиці.

Методика виконання завдання. Роботу з ідентифікації мікроорганізму проводять за схемою: визначення виду мікроорганізмів проводять на підставі вивчення тинкторіальних, культуральних, морфологічних, біохімічних властивостей та антигенної будови чистої культури досліджуваного мікроба і для цього використовують визначники Р.А.Ціона (1948), Бергі (Bergey, 1984).

Роботу з визначником Бергі починають із ознайомлення з розділом "Техніка ідентифікації", потім за розділом "Ключ до 19 частин визначника" визначають номер частини, до якої належить мікроб, вивчають її ключі й таблиці і вирішують, які ще властивості мікроорганізму необхідно вивчити, щоб скористатися схемою ідентифікації.

ЗАНЯТТЯ 6

Тема : Санітарно-бактеріологічне дослідження води

Мета заняття. Ознайомити студентів з правилами відбору проб води для лабораторного дослідження та оволодіння методами визначення мікрофлори води.

Обладнання та матеріали: колба з пробною водопровідної води на кожне робоче місце і три пробірки з 9 см³ стерильної води в кожній, колба з пробною води з відкритого водоймища і 9 пробірок з 9 см³ стерильної води в кожній, 2 стерильні піпетки на 2 см³, пробірки з 10 см³ розплавленого й остудженого до 45 °С агару, стерильні чашки Петрі.

Пробірки зі стерильною водою по 9 см³ в кожній стерильні піпетки на 1 мл, пробірки зі стерильним середовищем Кеслера.

Методичне виконання завдання. Санітарно-мікробіологічне дослідження проб води. У воді може знаходитись велика кількість різних мікроорганізмів, у тому числі і патогенних, тобто через неї можуть розповсюджуватись інфекційні захворювання. Для санітарної оцінки якості води визначають мікробіологічне число (кількість мікроорганізмів у 1 мл), наявність бактерій кишкової палички (колі-титр та коли-індекс) та інколи наявність патогенних мікроорганізмів.

Відбір проб води. Проби води об'ємом близько 500 см³ для аналізу відбирають, дотримуючись правил асептики з допомогою спеціального приладу – батометру. Із відкритих водоймищ її відбирають на відстані 10–15 см³ від поверхні та дна. Водопровідну воду спочатку зливають на протязі 10–15 хв, а потім кран

обпалюють. Воду з колодязів відбирають до початку забору її або через 10–12 год. після закінчення користування нею. Дослідження води проводять не пізніше 2 год. після взяття, але при температурі 1–5 °С можна зберігати її упродовж 6 год.

Визначення мікробного числа. Проби води з артезіанських колодязів центрифугують для концентрації бактерій, а з відкритих водоймищ, навпаки, готують 3–7 послідовних розведень. Для цього беруть кілька пробірок з 9 см³ стерильної води в кожній. У першу додають 1 см³ досліджуваної води, перемішують і 1 см³ з неї переносять у другу, і теж після перемішування 1 мл переносять у третю, і так далі, одержуючи розведення 1:10, 1:100, 1:1000 і т.д.

Починаючи з найбільшого розведення, по 1 мл води вносять у бактеріологічні чашки та додають по 12–15 см³ розплавленого й охолодженого до 45 °С МПА і перемішують. Після застигання МПА ставлять на 1 добу в термостат, після чого підраховують кількість колоній. Для визначення кількості мікроорганізмів кількість колоній у кожній чашці перемножують на ступінь розведення, а потім виводять середній результат. Загальна кількість мікробів у водопровідній воді не повинна перевищувати 100, у криницях – 300–400, а у відкритих водоймищах – не більше 1000.

Визначення вмісту кишкової палички. Кишкову паличку вважають цінним санітарним індикатором, тому що її наявність пов'язують із фекальним забрудненням води. Ступінь забрудненості нею води виражають колі-титром – найменшим об'ємом води, у якому виявляють цей мікроорганізм, та колі-індексом – кількістю кишкової палички в 1 л води.

Найбільш поширеним і простим методом є **метод мембранних фільтрів**. Певний об'єм води пропускають через нітроцелюлозні фільтри №3, які накладають на поверхню агару Ендо в бактеріологічних чашках і витримують одну добу у термостаті при температурі 37 °С. Після цього підраховують кількість колоній малинового кольору. Для підтвердження кишкової палички типові колонії висівають на глюкозопептонне середовище Ейкмана, де цей мікроорганізм утворює газ і кислоту

Для постановки цієї проби воду з водопроводів фільтрують в об'ємі 300 см³, з артезіанських колодязів – 500 см³, чистої з відкритих водоймищ – 100, 10, та 0,1 см³, а забруднену спочатку розводять стерильною водою.

Для визначення колі-титру об'єм профільтрованої води поділяють на кількість колоній, а для визначення колі-індексу кількість колоній ділять на об'єм

пропущеної через фільтр води та помножують на 1000 . Вважають, що коли-індекс водопровідної води повинен бути не більше 3, колодязної – не більше 10, а коли-титр відповідно не менше 300 та 100.

Колі-титр визначають також методом бродильної проби, для чого певні об'єми води висівають на концентроване середовище Гісса, з наступним пересівом на тверді середовища Ендо та Левіна. Типові колонії кишкової палички мікроскопують і ставлять пробу на оксидазу. На смужку фільтрувального паперу, змочену розчином *a*-нафтол-діетил-*n*-фенілендіаміну наносять бактеріологічною петлею мікробну масу. Кишкова паличка не змінює колір паперу. Загальна оцінка якості води мікробіологічними методами (ГОСТ 17.13.07–82) наведена в таблиці 2.

Таблиця 2. Загальна оцінка якості води мікробіологічними методами

Клас якості і оцінка води	Загальна кількість бактерій, 10 ⁶ КУО	Кількість сапрофітних бактерій, 10 ³ КУО	Відношення загальної кількості бактерій до сапроф.
Дуже чиста	<0,5	<0,5	<10 ³
Чиста	0,5–1	0,5–5	>10 ³
Помірно заб-на	1–3	5,1–10	10 ³ -10 ²
Забруднена	3–5	10,1–50	<10 ²
Брудна	5,1–10	50,1–100	<10 ³
Дуже брудна	>10	>100	<10 ³

Норовіруси. Норовіруси (NoV) визнані новим емерджентним збудником захворювань із харчовим шляхом передачі, який викликає більшу кількість спалахів, ніж всі інші відомі бактеріальні, вірусні та протозойні разом узяті. У зв'язку з високою контагіозністю, низькою інфікуючою дозою і здатністю персистувати у зовнішньому середовищі вони класифікуються як потенційні біологічні агенти (БПА) – об'єкти біотероризму групи Б [6].

Назва норовірусів (*Norwalk virus*) походить від спалаху гастроентериту 1968 р в початковій школі м. Норволк штату Огайо в США. Штами, виділені при цьому спалаху, стали прототипом для цілої групи під назвою "Norwalk-like віруси". Вони також називалися по географічній локалізації, де викликалися спалахи, наприклад: "Гаваї вірус", "Брістоль вірус", "Мінерва вірус". Надалі, норовірусам було запропоновано назвати за формальної схемою: вид інфекції / рід вірусу / геногрупи / найменування вірусу / місце виділення штаму / рік детекції / країна [6, 7].

Норовірус (рис. 1.1) містить одноланцюгову молекулу РНК (рис. 1.2), відносяться до сімейства *Caliciviridae*. Рід норовірусів включає в себе більше 40 різних штамів, які поділяються на 7 геногрупи. Віруси геногрупи III і V викликають ураження шлунково-кишкового тракту у великої рогатої худоби і

деяких видів гризунів. Геногрупи VI, VII включають поки тільки поодинокі ізоляти, виділені від людини. Віруси, що входять до складу геногрупи I, II, IV, викликають захворювання у людини. Геногрупи II зустрічається в 10 разів частіше за інших, в її складі ідентифікують 23 генотипу [7, 9].

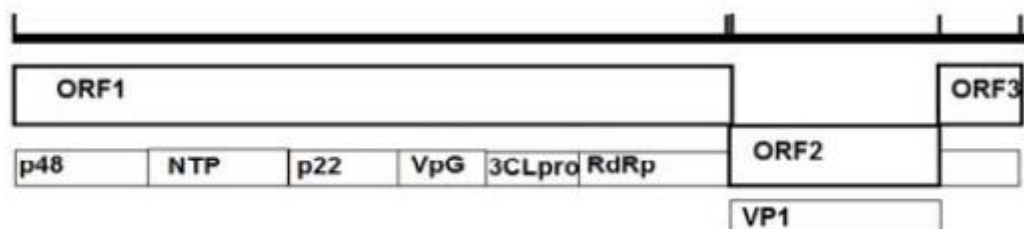


Рис. 1.1. Діаграма геномної організації Норовірусу

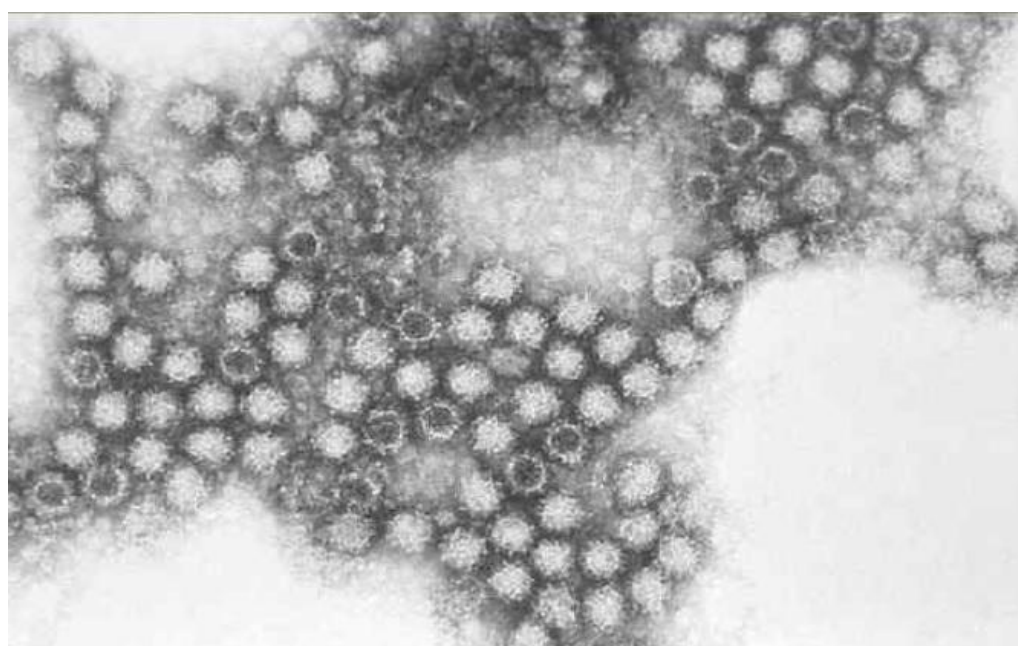


Рис. 1.2. Фотографія Норовірусу, яка була зроблена за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа

Інфекції, що викликаються норовірусами (НВІ), характеризуються коротким інкубаційним періодом і клінічними симптомами, властивими для більшості кишкових вірусів: сильною блювотою, нудотою, діареєю, спазмами, ознобом, болем у м'язах і головним болем [10].

Норовірусна інфекція передається, в першу чергу, фекально-оральним шляхом, або безпосередньо від людини до людини, а також через контаміновані їжу і воду. Вірус може існувати протягом декількох днів на різних поверхнях, в тому числі на одязі, шкірних покривах, обладнанні та інших предметах, що контактують із носіями інфекції. Повітрянокрапельний шлях передачі пов'язаний із присутністю вірусу в блювотних масах і відіграє істотну роль у забрудненні середовища, особливо в замкнутих колективах і приміщеннях, наприклад: на пасажирських судах, у готелях, клініках, військових казармах, дитячих таборах і ін. [10, 11].

Норовірусні спалахи часто бувають пов'язані з вживанням інфікованої сирової їжі і готових до вживання продуктів, заражених шляхом вторинної

контамінації при контакті з персоналом підприємств, де готується їжа, або від випадкових вірусоносіїв. З інших джерел інфікування найбільш відомі питна вода, іригаційні системи поливу фруктів і овочів, а також заражені в акваторіях молюски та інші морепродукти [9, 11].

Інфекції, що викликаються норовірусами, – це антропозоонозні гострі захворювання з убіквітарним поширенням і високою природною сприйнятливістю людей будь-якого віку; при спалахах захворюють від 20 до 90 % людей, які контактували зі збудником і зазнали ризику зараження. З огляду на високу контагіозність норовірусів, санітарно-гігієнічні заходи слід здійснювати в суворій відповідності з діючими правилами для попередження поширення гострих кишкових інфекцій [10].

Незважаючи на відкриття норовірусів людини більше чотирьох десятиліть тому, до цих пір немає схвалених вакцин і антивірусних препаратів проти цієї інфекції. У даний час триває розробка вакцин, проте вона сильно утруднена через швидку генетичну мінливість норовірусів і їх схильності до «ухилення» від імунної відповіді, що сприяє низькій імуногенності вакцини [12].

1.1. Молюски, як один із варіантів зараження Норовірусом

Норовіруси, також відомі як Норволкподібні віруси та каліцивіруси людини, є генетично різноманітною групою вірусів РНК родини *Caliciviridae* і є найбільш поширеними причинами епідемічного гастроентериту в розвиненому світі [13].

У більшості спалахів норовірусу поширюються від людини до людини, але забруднені продукти харчування та вода також є важливими засобами передачі. Основною причиною спалахів норовірусної інфекції, що переноситься харчовими продуктами, є передача від харчових продуктів, але забруднені водопровід та молюски (зокрема, устриці) також були пов'язані з великими спалахами [13, 14].

Згідно з даними ФАО ООН (Food and Agriculture Organization of the United Nations) двостулкові молюски, які харчуються шляхом фільтрації води, такі як, наприклад, устриці, мідії і гребінці однозначно брали участь в ряді спалахів вірусних захворювань харчового походження. Ряд вірусів людини був виявлений у цих гідробіонтів в кишковому тракті (рис. 1.3) [13, 15].

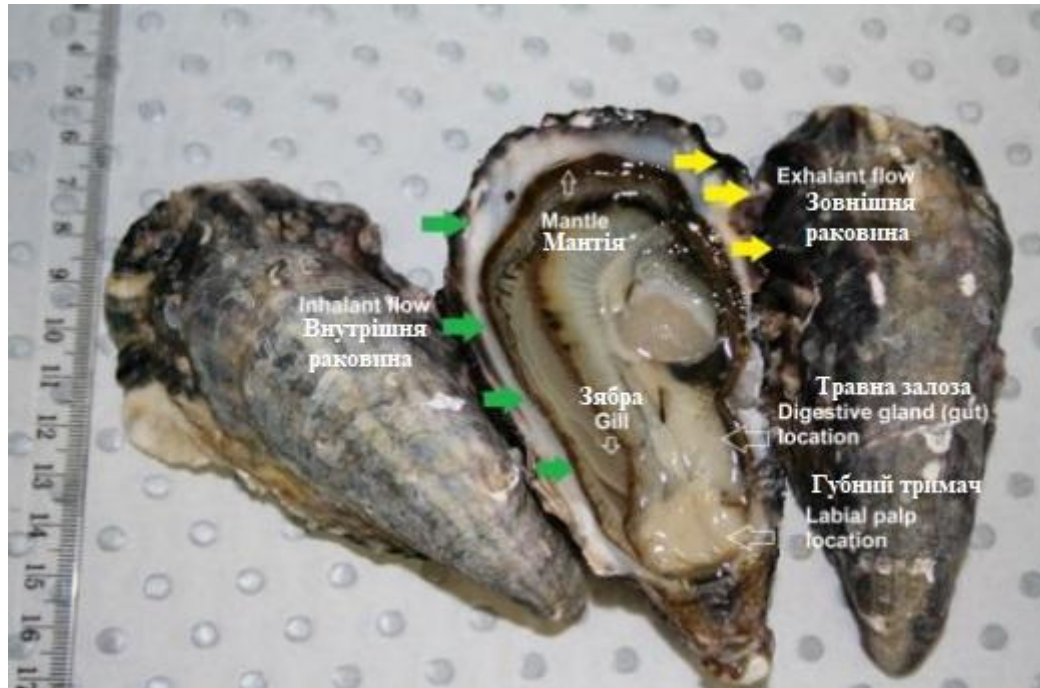


Рис. 1.3 Анатомічний склад Тихоокеанської устриці

Вірусні патогени можуть накопичуватися в устрицях (рис. 1.4), коли вони адсорбуються на їжу устриць або зважені частинки і переносяться в травну систему устриць під час харчування цих молюсків шляхом фільтрації морської води [15, 16].

На характеристики процесу біоаккумуляції можуть впливати такі фактори навколишнього середовища, як температура і солоність, або фізіологічний стан устриць, наприклад, розмір і вік. Великі устриці здатні фільтрувати великі об'єми води, таким чином потенційно такі устриці можуть накопичити в собі більшу кількість патогенних вірусів із забруднених вод [17].



Рис. 1.4. Шляхи зараження марикультури двостулкових

моллюсків на різних стадіях розвитку: товщина ліній вказує на кореляцію з частотою зараження вірусами на тій чи іншій стадії розвитку марикультури

Устриці є фідерними живильниками і, отже, можуть концентрувати віруси, якщо їх вирощують у фекально забруднених водах. Спалахи норовірусної інфекції, пов'язані із споживанням устриць, спричинені харчовими продуктами, трапляються у багатьох країнах, незважаючи на стратегію запобігання зараженню районів, які вирощують устриці. Більшість спалахів були наслідком споживання сирих устриць, хоча також були причетні варені устриці [18].

Відомо, що віруси, які заражають людини, не заражають моллюсків і не реплікують в них, але зберігаються в їх зябрах і травному тракті досить тривалий час, залишаючись в інфекційному стані протягом багатьох днів і навіть тижнів. Устриці – це не просто пасивні фільтри, але вони використовують специфічні ліганди для вибіркового накопичення NoV. Вважається, що штами GI та GII NoV зв'язуються з А-подібними антигенами в травній тканині, що полегшує їх накопичення в устрицях. Це специфічне зв'язування може допомогти пояснити їх тривале утримання, як це спостерігалось у дослідженнях по очищенню та повторному дослідженню на сьогоднішній день, та врахування спалахів хвороби, що відносяться до очищених устриць. Одним з основних факторів, що сприяють зараженню людини патогенними для нього вірусами, є вживання в їжу моллюсків в сирому або слабо термічно обробленому вигляді. На цю обставину звертають увагу практично всі автори, в чиїх роботах обговорюються проблеми інфікування людей вірусами, що передаються через морепродукти, перш за все, моллюсків [19, 20].

Контамінація водного середовища збудниками хвороб відбувається різними шляхами (рис. 1.5): при спуску у водойми стічних вод каналізації, пранні білизни, водопої худоби, при інтродукції в акваторію і прибережну зону інфікованих тварин і птахів [17].

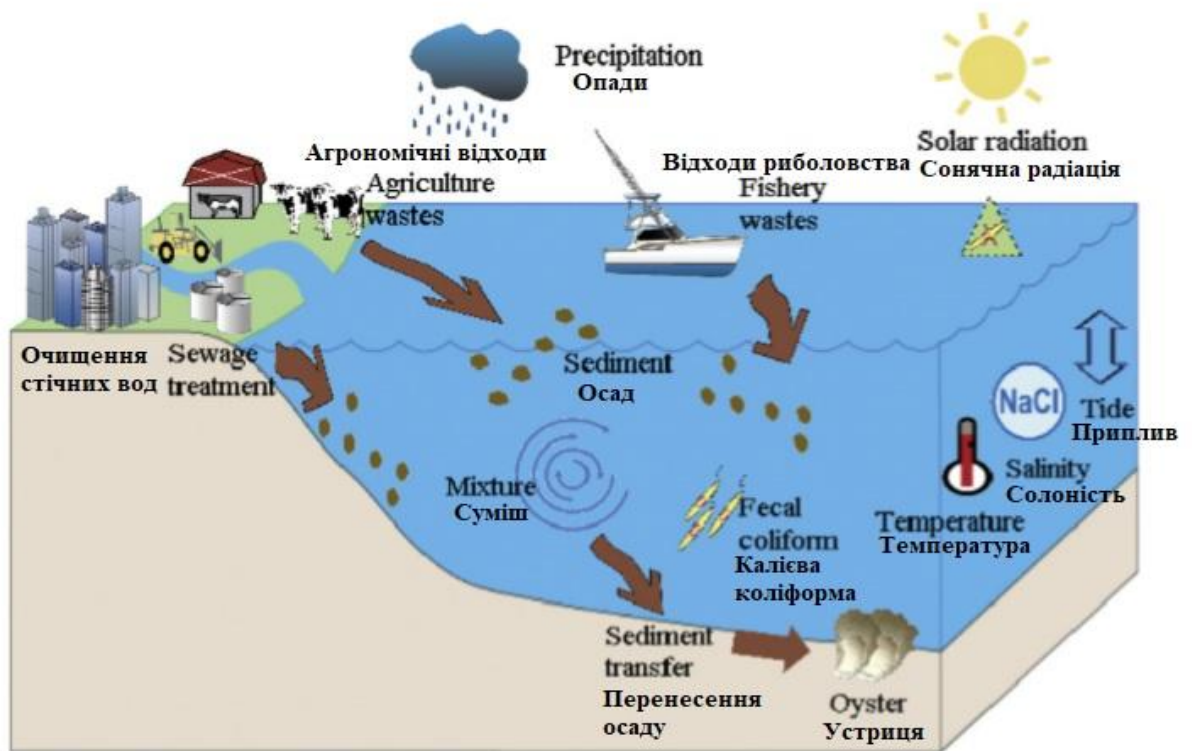


Рис. 4. Потенційні джерела, шляхи та вплив екологічних процесів на забруднення устриць у прибережних водах

Крім цього, верховими водами збудники захворювань змиваються з поверхні ґрунтів, контамінованих вірусами і бактеріями. Дощ тримає в облозі віруси з повітря. Потрапивши у воду, мікроорганізми зберігаються різний час, а деякі навіть розмножуються. Швидкість самоочищення залежить від біологічних особливостей збудника, хімічного складу і температури води, ступеня аерації, дії світла, сапрофітної флори та інших чинників [20, 24].

Зміни клімату також провокують зміни гідрологічного стану територій, що позначається на формуванні нових ризиків виникнення і поширення інфекційних хвороб [24].

Методи санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту

Ґрунт є важливим середовищем для розвитку і накопичення мікроорганізмів. У ґрунті живуть представники усіх царств і класів мікроорганізмів: бактерії, актиноміцети, гриби, водорості, найпростіші, віруси. Їх кількість і видовий склад залежить від хімічного складу ґрунту, реакції середовища, вологи, температури, аерації, географічного розташування, інтенсивності інсоляції, пори року.

Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту проводиться з метою контролю за методами знешкодження, а також за епізоотичними даними для визначення факторів передачі збудників інфекційних захворювань. У прикореневій зоні рослин бактерій дуже багато: вони утворюють зону інтенсивного розмноження і підвищеної активності, що називається *ризосферою*. Мікрофлора ризосферної зони ґрунту значно багатша, різноманітніша і відрізняється специфічністю для кожного виду рослин.

Кількість бактерій у ґрунті досягає декілька мільярдів в 1 г. На поверхні ґрунту мікроорганізмів мало, оскільки вони гинуть внаслідок висихання і дії сонячних променів – ультрафіолету і висушування. Найбільша кількість мікроорганізмів знаходиться на глибині 10–30 см, тому цей шар найбільш родючий. Мікроорганізми ґрунту спроможні розмножуватися за температури від 25 до 45 °С, термофільні – за більш високих температур.

До типових форм ґрунтової мікрофлори, окрім коків, належать: спороутворюючі аероби (*Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*), спороутворюючі анаероби, термофільні (*Bac. termophilus*, температурний оптимум 60 °С), пігментні (*Bac. flavum*, *Bac. fluorensens*), непігментні неспороутворювальні бактерії (*Proteus*, *Bac. aquatilis*). Непігментні неспороутворюючі бактерії у деяких ґрунтах складають 80–96 % від усієї мікрофлори. Із сапрофітних кулястих найбільш поширені: *Micrococcus albus*, *Micrococcus candidans*, *Micrococcus roseus*. Крім перерахованих, у ґрунті знаходяться азотофіксуючі і денітрифікуючі, нітрофікуючі, сіркобактерії, целюлозорозщеплювальні мікроби. У складі мікрофлори ґрунту прийнято виділяти так звані *фізіологічні групи* бактерій, які беруть участь в різноманітних процесах і на різних етапах поступового розщеплення органічних речовин.

1. *Бактерії-амоніфікатори*, які є гнильними мікроорганізмами, вони спричиняють гниття залишків рослин, трупів тварин, розщеплення сечовини. У процесі гниття беруть участь аеробні бактерії – *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Serratia marcescens*, бактерії роду *Proteus*, гриби роду *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*; анаероби – *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum*; уробактерії – *Urobacillus pasteurii*, *Sarcina ureae*, що розкладають сечовину.

2. *Нітрофікуючі бактерії*: *Nitrosomonas* і *Nitrobacter*. *Nitrosomonas* володіють властивістю окисляти аміак (який утворюється як результат життєдіяльності амоніфікуючих бактерій) до азотистої кислоти. У разі діяльності *Nitrobacter* азотиста кислота окислюється до азотної кислоти, утворюючи нітрати. Нітрофікуючі бактерії були відкриті вченим ґрунтової мікробіології С.Н. Виноградським у 1899 р, який встановив, що процес нітрифікації відбувається двома процесами, і що нітрифікуючі бактерії володіють автотрофними властивостями і специфічною дією.

3. *Азотофіксуючі бактерії*. Коринебактерії і вільноживучі азотофіксуючі бактерії володіють внятковою властивістю засвоювати із повітря атмосферний азот, і в процесі життєдіяльності утворюють із молекулярного азоту білки та інші органічні сполуки азоту, які використовуються рослинами.

4. *Целюлозолітичні бактерії*, що розкладають клітковину, зумовлюють різні види бродінь під час розщеплення органічних сполук вуглецю (маслянокисле, оцтове, пропіонове).

5. *Бактерії, що беруть участь у кругообігу сірки, заліза, фосфору – сіркобактерії, залізобактерії*, різноманітні види яких утворюють окиснення і відновлення цих сполук у природі.

Із виділеннями тварин, людей, із промисловими, щоденними, сільськогосподарськими відходами у ґрунт потрапляє велика кількість різноманітних бактерій. Так, встановлено, що у фекаліях людини знаходиться 60 видів бактерій, що належать до 8–10 різних родин. Переважаючою мікрофлорою є анаероби, до 96 % усіх видів: біфідобактерії, лактобактерії,

катенобактерії, бактероїди; в меншій кількості зустрічаються ешеріхії, ентерококи, протей, клостридії, кандіда та ін. мікроорганізми. Біологічне забруднення ґрунту досить велике у неканалізованих ґрунтах і на території тих підприємств, де можуть накопичуватися органічні відходи (бойні), на сільськогосподарських подвір'ях, на тваринницьких комплексах, на пляжах, на прилеглих до них територіях. Зі стічними водами мікроорганізми потрапляють у мулові осади. Після зрошення відбувається інфікування ґрунту, а потім овочів, фруктів, сільськогосподарських культур. Бактерії, що адсорбуються на поверхні частинок і осадів стічних вод, можуть деякий час зберігати свою життєздатність і вірулентність. Мікроорганізми проникають досить глибоко, до 30–40 см, що залежить від структури і поверхневого шару ґрунту.

До **першої групи** патогенних мікроорганізмів, постійно перебуваючих у ґрунті, відносять невелику кількість мікроорганізмів. Серед них особливої уваги заслуговують клостридії ботулізму, які потрапляють у ґрунт із випорожненнями людей, тварин, утворюючи спори, які залишаються у ньому досить довго. Про це слід завжди пам'ятати під час консервування овочів, грибів, продуктів (особливо домашніх), які можуть містити рештки ґрунту, а тим самим і спори клостридії ботулізму.

Друга група включає спороутворювальні патогенні мікроорганізми (бацили сибірки, клостридії правцю, газової гангрени), які потрапляють у ґрунт із фекаліями тварин, людей, із трупами загиблих тварин. Ґрунт для них є другорядним резервуаром, тому що за сприятливих умов клостридії можуть розмножуватися і тривалий час зберігатися у вигляді спор. Наприклад, спори бацил сибірки знаходяться у ґрунті “проклятих полів” (берега, луки, поля забруднені спорами цього збудника) через 50 років, причому *Bac. anthracis* може ще й вегетувати у ґрунті. Вегетація збудника відбувається за температури не нижче 12 °С, достатньої вологості і наявності гумусу і мікроелементів.

У **третьою групу** включені патогенні мікроорганізми, що потрапляють у ґрунт із виділеннями тварин, людей і зберігаються протягом декількох тижнів або місяців. Усі ці мікроорганізми – сальмонели, шігели, вібріони, бруцели, франсісели, мікобактерії, лептоспіри, збудники сапу – ті що не утворюють спор і тому гинуть в результаті дії різноманітних фізичних і біологічних факторів. На цьому і побудоване підвищення антибіотичних властивостей ґрунту. Просте озеленення травами територій населених пунктів сприяє розмноженню антагоністів-актиноміцетів, покращує антибактеріальні властивості і підвищує активність самоочищення ґрунту. Патогенні мікроорганізми і представники нормальної мікрофлори, в тому числі ешеріхії, що знаходяться в навколишньому середовищі, де умови їх існування різко змінюються, часто змінюють свої властивості.

Загибель бактерій групи кишкової палички (БГКП) і деяких сапрофітних форм сприяє посиленню процесів нітрифікації – кінцевому процесу розщеплення органічних речовин. Показником активності самоочищення ґрунту вважається збільшення мікрофлори ґрунту, що бере участь в процесі нітрифікації.

Важливим для санітарної оцінки є мікробіологічне дослідження ґрунту, яке проводиться за здійснення попереджувального і поточного санітарного нагляду.

Попереджувальний нагляд здійснюється: під час планування, будівництва і реконструкції ділянок і приміщень для утримання тварин і птиці; вибору ділянок для будівництва закладів з переробки тваринницької сировини; будівництва водосховищ; вирішення питань водопостачання; за санітарної оцінки землі на полях зрошування, де використовується гній, стоки тваринницьких комплексів; визначення санітарного стану ґрунту, забрудненого різними отрутохімікатами.

Поточний санітарний нагляд здійснюється: для оцінки санітарного стану поверхневих шарів ґрунту для встановлення ступеня впливу біологічної контамінації на здатність ґрунту до самоочищення; для контролю за ґрунтовими і біотермічними методами знешкодження стічних вод і відходів; для з'ясування шляху передачі збудників інфекційної хвороби через ґрунт; термінів виживання в ньому патогенних мікроорганізмів; можливості зараження води, овочів (під час зрошування).

Залежно від поставленої мети дослідження ґрунту може бути проведене у вигляді короткого або повного аналізу. *Короткий аналіз* рекомендується для здійснення поточного санітарного нагляду і включає визначення бактерій групи кишкових паличок, загального числа сапрофітних бактерій, титру анаеробів і термофільних бактерій, які вказують на характер контамінації (гноєм, фекаліями, стічними водами, компостом), нітрифікуючих бактерій.

До *повного санітарно-мікробіологічного аналізу*, що проводиться під час попереджувального санітарного нагляду, входять додаткові дослідження, які визначаються конкретними завданнями. У повний аналіз може включатися визначення загальної чисельності сапрофітів, чисельності і процентного співвідношення спор і загальної кількості мікроорганізмів, кількість актиноміцетів, грибів, целюлозолітичних мікроорганізмів, основних груп ґрунтового мікробіоценозу (багато грибів у північних ґрунтах, що мають кислу рН: аспергіли, пеніциліум, фузарій, мукор). У разі виникнення захворювання проводяться виявлення та ідентифікація патогенних мікроорганізмів – сальмонел, збудників правця, ботулізму, бацил сибірки (до 100 років і більше), туберкульозу, бешихи, пастерельозу.

Вивчення мікрофлори ґрунту дає надійні результати тільки в тому випадку, якщо відбір проб проводиться правильно. Перед взяттям зразків слід зробити опис місцевості, в якому вказується характер рельєфу, рослинність, клімат, наявність каналізації, відомості про використовану агротехніку та ін.

Оцінка санітарного стану ґрунту проводиться за результатами аналізу ґрунту на об'єктах підвищеного ризику і в санітарно-захисних зонах за такими індикаторними показниками:

1) опосередковані показники, що характеризують інтенсивність біологічного навантаження на ґрунт. Це санітарно-показові мікроорганізми БГКП – загальні колі-формні бактерії (ЗКБ) і фекальні ентерококи (індекс ентерококів). На свіже фекальне забруднення ґрунту вказує наявність високого індексу БГКП за низьких титрів нітрифікаторів, термофілів, а також відносно високий вміст вегетативних форм *Cl. perfringens*. Виділення ентерококів завжди свідчить про свіже забруднення, якими б не були інші показники;

2) прямі санітарно-бактеріологічні показники епізоотичної небезпеки ґрунту – виділення збудників кишкових інфекцій (патогенні ентеробактерії, ентеровіруси).

У разі відсутності прямого визначення у ґрунті ентеробактерій і ентеровірусів оцінка безпеки може бути проведена за індикаторними мікроорганізмами. Ґрунт оцінюють як чистий без обмежень за санітарно-бактеріологічними показниками у разі відсутності патогенних бактерій та індексу санітарно-показових мікроорганізмів до 10 клітин на 1 г ґрунту. У разі забруднення ґрунту сальмонелами індекс санітарно-показових мікроорганізмів БГКП і ентерококів сягає 10 клітин на 1 г ґрунту і більше. Концентрація колифагу в ґрунті на рівні 10 БУО/г і більше також свідчить про забруднення ґрунту.

Показники біологічної активності ґрунту. Дослідження біологічної активності ґрунту проводять за необхідності поглибленої оцінки санітарного стану ґрунту і можливості до самоочищення. Основними показниками біологічної активності є: загальна кількість мікроорганізмів, кількість основних груп ґрунтових мікроорганізмів (ґрунтових сапрофітних бактерій, актиноміцетів, ґрунтових міксоміцетів) та інші показники.

Методи відбору проб ґрунту залежать від мети дослідження. Проби ґрунту скотомогильників відбирають з 25 см і нижче, з глибини закопування трупів до поверхні ґрунтових вод. Під час відбору поверхневий шар ґрунту товщиною 1–2 см знімають та викидають.

Для вивчення дії хімічних речовин на мікрофлору ґрунту відбір проб проводять у точці, яка являє собою центр вибраного для дослідження 1м² території, викопується розміром у плані 0,3х0,3 м і глибиною 0,2 м. Стерильним ножом із широким лезом відбирають пробу ґрунту, розмір якого обумовлений запланованою наважкою. Наприклад, якщо необхідно взяти 200 г ґрунту, розмір зразка буде 20х3х3 см; якщо потрібно 500 г – 20х5х3 см.

Проби ґрунту відбирає лікар ветеринарної медицини, який попередньо складає схематичний план обстежуваної території. Для дослідження території 100 м² виділяють дві ділянки по 25 м²: одну – поблизу джерела забруднення, а другу – контрольну. Відбирають у 5 точках по діагоналі за типом “конверта”. Із 5 проб по 200–300 г, відібраних на одній ділянці, готують середній зразок, який кладуть у стерильну колбу з ватно-марлевым корком. Обробку проби бажано проводити в день дослідження, зберігання допускається за температури 4–5 °С протягом 24 год. Стерильним, профламбованим ножом зрізують землю, ніж знову фламбують. Зразки орних ґрунтів беруть на всю глибину орного шару. Із глибоких шарів проби забирають буром Некрасова.

Проби ґрунту звільняють від різних домішок (скла, коренів рослин та ін.). Ґрунт на листку розгортають тоненьким шаром у вигляді квадрата і діагоналями ділять на 4 трикутники. Ґрунт із 2-х протилежних трикутників викидають, а те, що залишилося, знову розгортають тонким шаром у вигляді квадрата і ділять діагоналями, викидають з двох протилежних трикутників до тих пір, поки не залишиться близько 200 г ґрунту. Перед посівом ґрунт диспергують. З цією метою з дотриманням умов стерильності ґрунт просівають через сито з діаметром пор 3 мм. Під час просіювання сито накривають зверху стерильним папером.

Для обліку ґрунтових мікроорганізмів береться наважка від 1 до 10 г, для

санітарно-показових мікроорганізмів – від 1 до 30 г, для патогенних – 50–60 г. Перше розведення наважки ґрунту роблять у стерильному посуді, додаючи стерильну водопровідну воду в співвідношенні 1:10.

Основним методом попередньої обробки ґрунту є 10-хвилинне вертикальне струшування ґрунтової суспензії першого розведення в пляшечці зі скляними кульками та 3-хвилинна обробка ґрунтової суспензії першого розведення на мішалці механічного диспергатора (подрібнювач тканин марки РТ-2) – за наважки ґрунту більше 1 г. Ґрунтову суспензію, що має в 1 мл 0,1 г ґрунту, через 30 хв після попередньої обробки використовують для приготування наступних 10-кратних розведень ґрунту (1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000; 1:1000000), використовуючи для приготування кожного розведення окремі піпетки.

Визначення мікробного числа ґрунту. По 1 мл приготовлених розведень ґрунтової суспензії вносять у бактеріологічні чашки, заливають розплавленим і охолодженим до 45 °С МПА, культивують за температури 28–30 °С протягом 48 год. Підрахунок колоній проводять за загальноприйнятим методом. Враховують лише ті розведення, за посіву яких на чашці виросло від 30 до 300 колоній. Якщо кількість колоній на бактеріологічних чашках із посівами послідовних розведень (1:10, 1:100) майже рівна, або мала між ними різниця, то це наслідок недостатнього перемішування посівного матеріалу під час розведення.

Якщо виросло більше 300 колоній на чашці, то проводять повторне дослідження, або ж допускається проводити підрахунок за допомогою пластинки з сіткою і лупи за сильного бокового освітлення. Проводять підрахунок 20 квадратів площею 1 см², потім виводять середнє арифметичне число, яке перемножують на площу чашки. Результат виражається кількістю бактерій у 1 г досліджуваного ґрунту з врахуванням посіяного об'єму.

Мікробне число ґрунту – середнє арифметичне на двох чашках або різних розведень.

Дослідження ґрунту на наявність БГКП. Для дослідження ґрунту на наявність БГКП за невисокого ступеня фекального забруднення використовують титраційний метод, для аналізу слабозабрудненого ґрунту – метод мембранних фільтрів. У разі високого ступеня фекального забруднення проводять прямий посів ґрунтової суспензії (1:10) на середовище Ендо.

Титраційний метод. Із приготовлених розведень проводять посіви у пробірки та флакони у рідке середовище Кеслер (10 мл розведення 1:10 – у 50 мл середовища Кеслер; по 1 мл з наступних розведень – у 9 мл даного середовища). Культивують протягом 48 год за температури 37 °С. У разі відсутності росту на середовищах – результат негативний (відсутнє помутніння та газоутворення). За позитивного результату проводять посів на бактеріологічні чашки із середовищем Ендо, чи в пробірки із розоловим агаром. Культивують протягом 24 год за температури 37 °С. Типові БГКП мають червоні або рожеві з металевим блиском колонії на середовищі Ендо, а на розоловому середовищі є жовті, помаранчеві колонії. Результат досліджень виражається колі-титром або колі-індексом.

За використання середовища лактозного МПБ – із першого розведення (1:10) ґрунтової суспензії беруть 10 мл і висівають у пляшечки з 50 мл середовища, що відповідає 1 г ґрунту. Посіви менших кількостей (0,1; 0,01 і т.д.)

роблять по 1 мл із відповідних розведень. Перед посівом у кожен пробірник з лактозним МПБ доливають по 0,3 мл 2 % водного розчину трифенілтетразолінхлориду, а у кожен пляшечку – по 1,5 мл того ж розчину. *E.coli* відновлює безбарвну сполуку трифенілтетразолінхлориду в трифенілформазаң, що випадає у вигляді осаду і надає середовищу цегляно-червоного забарвлення. *E.coli* резистентна до формазаңу, тоді як розвиток іншої мікрофлори затримується. Якщо на лактозному МПБ через 24 год колір середовища не змінився, відповідь негативна.

У разі посівів на середовище Кесслера-Свенертона до 1 л дистильованої води додають 10 г пептону і 50 мл жовчі. Середовище кип'ять, фільтрують і додають 2,5 г лактози, доводять об'єм до 1 л і визначають рН 7,8–8,2. Потім додають 4 мл 1 % водного розчину генціанвіолету, розливають у пробірки, стерилізують при 0,5 атм – 15 хв, вирощують 48 год за температури 43 або 37 °С. За наявності в середовищі газоутворення і помутніння, або лише помутніння, роблять пересів на середовище Ендо. Із посівів МПБ з лактозою для пересіву на Ендо відбирають ті посиви, у яких змінився колір на цегляно-червоний. Чашки з пересівами ставлять у термостат на 24 год за температури 37 °С. У подальшому дослідження проводяться аналогічно дослідженню води.

Метод мембранних фільтрів. Через стерильні мембранні фільтри №3 фільтрують 5–10 мл суспензії ґрунту розведенням 1:10. Попередньо суспензію центрифугують при 2000 об/хв протягом 5 хв для осадження частинок ґрунту. Потім фільтр кладуть на середовище Ендо (можна на середовище Ендо із додаванням розолової кислоти), культивують протягом 18–24 год за температури 37 °С.

Прямий поверхневий посів на агаризовані живильні середовища (прямий посів ґрунту). За інтенсивного фекального забруднення пропонується проводити прямий поверхневий посів шпателем ґрунтової суспензії у кількості 0,2–0,1 або 0,05 мл на поверхню підсушеного середовища Ендо за допомогою шпателя.

Для дослідження порівняно чистих ґрунтів проводять посиви із розведень від 1:10 до 1:1000 (тобто від 10^{-1} до 10^{-3}), а коли досліджуються значно забруднені ґрунти, тоді посиви роблять із розведення 1:1000000 (10^{-6}). Посиви культивують за температури 30 °С протягом 24 год. Потім ідентифікують колонії за загальноприйнятою методикою.

Визначення *Cl. perfringens* ґрунту. Наявність *Cl. perfringens* у ґрунті вказує на фекальне його забруднення і має певне індикаторне значення щодо групи патогенних кластридій (*Cl. tetani*, *Cl. botulinum*), які потрапляють із випорожненнями тварин та людей. Визначення перфрінгенс-титру – санітарна оцінка ґрунту і його самоочищення, адже за фекального забруднення ґрунту через 4–5 міс. ешеріхії зникають, а *Cl. perfringens* виділяють у титрі 0,01 г. Проте комплексна оцінка санітарного стану ґрунту за перфрінгенс-титру дає можливість говорити про давність фекального забруднення.

Для визначення пропонується два методи. З усіх приготовлених розведень ґрунту (до 1:1000000) відбирають 1 мл і вносять у два ряди пробірок. Один ряд пробірок прогривають за температури 80 °С протягом 15 хв, або 90 °С – 10 хв і швидко охолоджують. Потім у всі пробірки наливають по 9–10 мл середовища залізо-сульфітного агару (підігрітий до 70–80 °С), приготовленого *ex tempore*. Посиви інкубують протягом 16–18 год за температури 44 °С. У разі росту чорних великих колоній (грампозитивні, каталазонегативні) – результат позитивний.

У разі посіву на середовище Вільсон-Блера, посіви вирощують за температури 37 °С протягом 24 год. Клостридії (переважно *Cl. perfringens*) утворюють колонії чорного кольору. Замість середовища Вільсон-Блера можна користуватися сульфит-поліміксин-неоміциновим середовищем. До 1000 мл МПА додають 50 мл 20 % розчину сульфиту натрію, 10 г глюкози і 10 мл 8 % розчину сульфату заліза. Приготовлені розведення ґрунту по 1 мл розливають у чашки і додають до них 9–10 мл розтопленого і охолодженого до 50–55 °С живильного середовища, перемішують круговими рухами. Після затвердіння середовища чашки ставлять в анаеростат на 24 год. За росту *Cl. perfringens* на середовищі виростають колонії чорного кольору.

Використання середовищ накопичення. Загальноприйнятий метод вирощування *Cl. perfringens* на середовищі Вільсон-Блера має суттєвий недолік – це середовище затримує їх ріст, тому пропонується по 1 мл прогрітих і нативних розведень ґрунту висівати у пробірки з рідким середовищем Клодницького, бульйон Мартена з ватою, Кітта-Тароцці попередньо регенерованим. Після культивування за температури 37 °С протягом 18–20 год проводиться пересів по 0,5–1 мл із помутнілих пробірок у середовище Вільсон-Блера або сульфит-поліміксин-неоміцинове середовище. Визначення *Cl. perfringens* методом фільтрації у пробірках і в бактеріологічних чашках проводять аналогічно дослідженню води. Присутність патогенних клостридій у ґрунті – потрапляння їх з фекаліями людей чи тварин.

Визначення патогенних ентеробактерій. Суть визначення сальмонел – використання методів накопичення патогенних бактерій на середовищах накопичення із подальшим пересівом на щільні селективні і диференційні середовища з вивченням біохімічних і антигенних властивостей виділених культур.

Використовують не менше двох середовищ накопичення із перерахованих: Мюллера-Кауфмана, селенітовий бульйон, магнієве середовище. Для індикації сальмонел використовують кілька методів:

1) **метод коагуляції з центрифугуванням.** У дослідний об'єм (500 мл) суспензії ґрунту додають 2 мл 10 % розчину вуглекислого натрію для підлужування, що сприяє процесу коагуляції, і 1,7 мл 10 % розчину сірчаноокислого заліза. Суспензію ретельно перемішують і на 1 год ставлять у холодильник до утворення пластівців. Надосадову рідину центрифугують 5 хв при 5000 об/хв., виливають, а до осаду додають 5 мл 25 % розчину виннокислого калію і перемішують. Завись, що утворилася, висівають по 0,1–0,5 мл на декілька чашок з вісмут-сульфитним агаром, Левіна, Плоскірева. До тієї зависі, що залишилася, додають 50 мл 10–20 % жовчного МПБ. Культивують за температури 37 °С 5–6 год. Із середовища накопичення проводять перший пересів, а через 18–20 год – другий. Подальші дослідження проводяться за загальноприйнятою методикою;

2) **звичайними методами** приготовлені суспензії ґрунту висівають у середовища накопичення (магнієве середовище, Мюллера, селенітовий бульйон) у звичайних прописах та 2–4-разовій концентрації, а потім культивують і пересівають на диференційно-діагностичні середовища (переважно вісмут-сульфитний агар). Наступні дослідження ведуться за звичайною схемою.

Визначення кількості актиноміцетів та грибів у ґрунті. Актиноміцети (променеві гриби) – факультативні анаероби, займають проміжне місце між

грибами і бактеріями. На субстраті тонкий одноклітинний міцелій у вигляді променів. Добре розвиваються за температури 25–30 °С (оптимальна температура 25–27 °С) на щільних середовищах. Ростуть з утворенням щільних гладеньких, складчастих, бугристих, бархатистих, мучнистих колоній, які зростаються із середовищем і важко знімаються бактеріальною петлею. Актиноміцети можуть бути безкольоровими або пігментними (чорні, фіолетові, жовті, червоні, сині, зелені), на щільних середовищах часто виникає повітряний міцелій, на кінцях якого утворюються спори, що і надають колір колоніям. Широко розповсюджені у навколишньому середовищі, беруть участь у ґрунтоутворенні. Патогенні форми актиноміцетів спричиняють у тварин та людей захворювання на актиномікоз.

Серед грибів зустрічаються як паразити, так і сапрофіти. Серед них найбільше значення мають представники аскоміцетів (*Ascomycetes*), ооміцетів (*Oomycetes*), базидіоміцетів (*Basidiomycetes*), дейтеромицетів (*Deuteromycetes*). У молодих клітин форма кругла, яйцеподібна, продовгувата, у зрілих – веретеноподібна, грушоподібна, амебоподібна. Гіфи (міцелій) у вигляді безкольорових ниток.

Для рахування ґрунтових актиноміцетів і грибів використовують ті ж розведення ґрунтової зависі, що і для підрахунку загальної кількості мікроорганізмів. Як правило, для рахування ґрунтових грибів проводять розведення ґрунтової зависі 1:10 – 1:100, а врахування актиноміцетів – 1:100–1:10000 (від 10^{-2} до 10^{-4}). Посів проводять поверхневим методом, наносячи на щільне агаризоване середовище 0,1–0,05 мл суспензії. Для рахування актиноміцетів застосовують частіше всього крохмалоаміачний агар для рахування грибів – сусло-агар або мінеральне середовище Чапека.

Визначення ентерококів у ґрунті. Ентерококи (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) – поліморфні мікроорганізми кулястої дещо сплющеної, витягнутої форми, із загостреними краями, розташовуються поодинокі, попарно, короткими ланцюжками, фарбуються грампозитивно, не утворюють каталазу. На рідкому лактозопептонному середовищі та лужно-поліміксіновому середовищі спостерігається ріст у вигляді дифузного помутніння, з утворенням осаду.

Метод мембранних фільтрів. Фільтри, через які фільтрували 2–3 об'єми розведень досліджуваного ґрунту, викладають на азидне середовище або на середовище ЖСТ. Культивують протягом 24–28 год. Кількість колоній, що вирости на середовищі, перемножують на розведення профільтрованої суспензії досліджуваного ґрунту та ділять на кількість чашок для визначення загальної кількості мікроорганізмів у 1 г ґрунту.

На азидному середовищі ентерококи ростуть у вигляді випуклих рожевих, світло-рожевих із темно-червоним центром колоній із рівними краями. На ЖСТ середовищі – великі, білі, малинові, ледь рожеві, ледь кремові, плоскі колонії.

Титраційний метод. 10 мл зависі ґрунту висівають у 50 мл рідкого середовища накопичення ЛПС або ЛЕС. Культивують за температури 37 °С протягом 24 год. Потім пересівають на середовище МІС або ЖСТ. Культивують протягом 24–48 год за температури 37 °С. На середовищі МІС – колонії випуклі чорного кольору, із металевим блиском – *Enterococcus faecalis* та дрібні, плоскі, сірі – *Enterococcus faecium*. Підтвердження належності колоній до ентерококів проводять за допомогою тесту на редукцію – виявлення окисно-відновних властивостей ентерококів (із додаванням 3 % перекису водню до досліджуваної колонії).

Тест на редукцію. 18-годинну агарову або бульйонну культуру висівають тонким штрихом на бактеріологічні чашки на середовище із ЕДДС (для визначення редукції), культивують протягом 18–24 год за температури 36 °С. *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* колонії є вишнево-червоного кольору.

Визначення нітрофікуючих бактерій. Одним із показників самоочищення ґрунту є нітрофікуючі бактерії (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*), що беруть участь у перетворенні амонійних сполук в азотисту і азотну кислоти (табл. 10).

Таблиця 10 – Критерії оцінки забруднення ґрунту

Об'єкт дослідження	Колі-титр	Перфрінгенс-титр	Титр нітрофікуючих бактерій	Кількість термофілів (у 1 г)
Сильно забруднений ґрунт	0,009 і нижче	0,00009 і нижче	0,0009 і нижче	100001–4000000
Чистий ґрунт	1 і вище	0,01 і вище	0,1 і вище	100–1000

Титр нітрофікаторів визначається посівом розведень суспензії ґрунту від 1:100 до 1:10000 у флакони із середовищем Виноградського. Як контроль використовують два стерильних флакони із середовищем. Посіви культивують за температури 28 °С протягом 14–15 діб. На 5–7-му добу можна перевірити на утворення азотистої чи азотної кислоти за допомогою дифеніламіну. За наявності нітратів під час додавання по одній краплі дифеніламіну середовище набуває синього кольору. У контрольних флаконах колір середовища за додавання дифеніламіну не повинен змінюватися.

Методи санітарно-мікробіологічного дослідження повітря. На відміну від ґрунту і води, повітря є несприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів. У ньому немає достатньої кількості поживних речовин, відсутня волога, через повітря проходять промені (звичайне світло, ультрафіолетові промені), які згубно діють на мікроорганізми. Джерелом мікрофлори повітря є ґрунт, вода, рослинність, тварини, люди. Мікроорганізми потрапляють у повітря разом із пилом під час вітру, руху транспорту та живих організмів, а також із краплинами рідин та потоками води. Життєдіяльність мікроорганізмів у повітрі забезпечується знаходженням в ньому парів води, слизу, пилу.

Умовно мікрофлору повітря можна розділити на *постійну* – тобто ту, що більш часто знаходиться в повітрі, і *змінну* – менш стійку до дії різних чинників навколишнього середовища. З різних мікроорганізмів, що є у повітрі, найбільшу кількість становлять сапрофіти, але можуть зустрічатися і патогенні для тварин, людей, рослин.

До постійної мікрофлори, що формується за рахунок мікроорганізму ґрунту, належать пігментні коки, палички, спороутворюючі бацили, гриби, дріжджоподібні гриби. Найчастіше із повітря виділяють *Micrococcus roseus*, *Micrococcus flavum*, *Micrococcus candidans*, *Sarcina flava*, *Sarcina alba*, *Sarcina*

rosea, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, Bacillus mesentericus, Actinomyces, Penicillium, Aspergillus, Mucor.

Атмосферні осаді сприяють осіданню мікроорганізмів, очищаючи тим самим повітряне середовище, тоді як вітер, піднімаючи пил в повітря, сприяє обміненні. Контамінація повітря мікроорганізмів відбувається в більшості крапельним шляхом – під час розмови, кашлю, чхання. Від хворих тварин, людей, або носіїв збудників інфекційних хвороб уражаються поверхнево-дихальні шляхи, у повітря потрапляють патогенні мікроорганізми.

Можливе потрапляння мікроорганізмів у повітря зі злущеного епідермісу шкіряних покривів, із пилом, із забрудненим ґрунтом. Кожна тварина і людина, навіть за звичайного дихання, виділяє так званий аерозоль. Аерозоль представляє собою колоїдну систему, яка складається із повітря, краплин рідини або частин твердої речовини, включаючи велику кількість мікроорганізмів.

Розміри краплин аерозолів можуть бути різними – від 10–100 до 2000 нм. У процесі акту чхання у разі сильної експірації утворюється до 40000 крапель. Залежно від розміру краплин, їх електричного заряду, швидкості руху у повітрі розрізняють краплинну, пилову фазу аерозолу і краплинні ядрця. Краплинна фаза аерозолу характеризується наявністю у повітрі дрібних крапель, що тривало утримуються у повітрі і висихають, перш ніж вони встигають осісти. Великі краплини швидко осідають в силу свого тяжіння, висихають, утворюють пил, які за певних умов піднімається у повітря – це так звана пилова фаза аерозолу. Дрібні краплі аерозолу (100 нм), висихаючи, залишаються у повітрі в завислому стані і утворюють аеродисперсну систему – краплинні ядрця, які можуть переноситись на великі території. У краплинних ядрцях часто зберігається волога, що обумовлює життєздатність у них мікроорганізмів. Найбільшу небезпеку для зараження представляють мікроорганізми у дрібних частинках (до 100 нм), які можуть проникати глибоко в альвеоли легень, проходячи захисні бар'єри верхніх дихальних шляхів.

Метод седиментаційний (осідання, метод Коха) – осідання мікробів на поверхні твердого поживного середовища (МПА, МПЖ, розрізану варену картоплю) під дією сили тяжіння. Використовують чашки Петрі з середовищем – відкривають на 5–10 хв (для визначення загального обмінення повітря – за цей період частинки пилу разом з мікробами під дією своєї маси осідають на поверхню середовища, де і будуть проростати (рис. 9). Для цього чашки ставлять у термостат для інкубації за температури 28–30 °С на 48 год. Кількість колоній, що вирости на середовищі, підраховують і проводять розрахунок за визначенням кількості мікроорганізмів на 1 м³. Прийнято, що на площу в 100 см² за 5 хв осідає скільки мікробів, скільки їх є в 10 л повітря). Для визначення кокових форм відкривають чашки на 40 хв потім витримують 24 год у термостаті за температури 37 °С, після чого – 24 год за кімнатної температури. Седиментаційний метод застосовується зазвичай для якісної характеристики мікробного забруднення повітря.



Рис. 9. Осідання мікроорганізмів на поверхню поживного середовища

Вміст бактерій у 1 м^3 повітря вираховують за формулою:

$$C = \frac{a \cdot 1000}{b}$$

де C – кількість бактерій у 1 м^3 ; a – вміст бактерій в досліджуваному об'ємі повітря; b – кількість досліджуваного повітря (швидкість, з якою надходить повітря через щілину, помножена на час, протягом якого відбиралась проба).

Аспіраційний метод (засмоктування) проводять за допомогою апарата Кротова, ПУ–1Б, бактеріовловлювач Речменського, приладу ПОВ–1, ПАБ–1, прилади Кіктенка, Андерсена Дьяконова, МБ, бактерійно-вірусного електропреципітатора (БВЕП–1).

В апарат Кротова ставлять бактеріологічну чашку з поживним середовищем і накривають кришкою із отвором, через який всмоктується 100–125 л повітря, яке ж і потрапляє на поверхню чашки з середовищем, де і осідають мікроорганізми. Аспіратор ПУ–1Б (рис. 10) за своєю схемою роботи подібний до апарату Кротова. Прилад автоматично проводить відбір 100 і 250 л повітря, діапазон концентрації, що визначає дорівнює 25×10^4 КУМ у м^3 .



Рис. 10. Аспіратор ПУ–1Б для відбору проб повітря

Після інкубації чашок у термостаті, через 48 год, підраховують кількість колоній і роблять перерахунок на загальну кількість мікробів у 1 л повітря. За використання щільних середовищ, слід контролювати, щоб кількість вирослих колоній не перебільшувала 60–100 г на чашці. Перед посівом середовище у бактеріологічних чашках потрібно підсушити в термостаті. Під час відбору проб повітря на мембранні фільтри №4 і вирощування їх на МПА, кількість колоній на одному фільтрі має складати 50–70.

Аспіраційні методи дають можливість визначити якісний склад мікрофлори повітря в певному його об'ємі та її кількість. За дослідження мікрофлори

повітря необхідно пам'ятати про те, що кількість колоній, які виростатимуть на чашках Петрі, не перевищувала 150–200 за рівномірного їх розподілу.

Під час використання приладу ПАБ-1 (пробовідбірника аерозольного бактеріологічного) частинки дослідного повітря осаджуються на електрод з протилежним знаком. На електрод ставлять прямокутні металеві піддони з 20 мл щільного живильного або 15–20 мл рідкого живильного середовища. За допомогою приладу ПАБ-1 можна за 1 год дослідити 5–6 м³ повітря на різних живильних середовищах, пропонується для виявлення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (сальмонел, клебсіел, ешерихій), у великих об'ємах повітря. Принцип роботи бактерійно-вірусного електроприціпетатору базується на аспіраційно-іонізуючій дії. Мікроорганізми заряджаються й осідають на позитивному електроді, на якому знаходиться середовище МПБ, 0,5 % МПА, а за мінусових температур – суміш 66,7 % гліцерину з 33,3 % МПБ.

У бактеріовловлювачі Речменського використовують 3–5 мл вловлювальної рідини (води, МПБ, ізотонічного розчину натрію хлориду). Швидкість відбору проб повітря – 10–20 л/хв. Після відбору проб проводять висів вловлювальної рідини в об'ємі 0,2 мл на щільне середовище.

На приладі Дяконова проводиться дослідження повітря в рідкому середовищі. Прилад – скляний циліндр із двома трубками: одна занурена у вловлювальну рідину, а друга закінчується трохи нижче корка. Повітря проходить через шар рідини. Для визначення загальної бактеріальної забрудненості проводять посів частини вловлювальної рідини на поверхню МПА, тому за наступних перерахунків умісту бактерій в 1 м³ повітря слід враховувати розведення та кількість висіяної рідини.

Прилад для відбору проб повітря (ПОВ-1) подібний до приладу Речменського. Швидкість відбору проб повітря – 20–25 л/хв. Цей прилад використовується для дослідження повітря закритих приміщень на загальне мікробне число, для виявлення патогенних бактерій і респіраторних вірусів. Прилад ПОВ-1 застосовується для дослідження повітря закритих приміщень на загальну забрудненість, для виділення патогенних мікроорганізмів (мікобактерій, туберкульозу), респіраторних вірусів. Повітря робочої зони повинно відповідати ГОСТ 12.1.005, згідно якого ступінь забруднення: А зони – відсутність мікроорганізмів; В – до 5 мікроорганізмів в 1 м³; С – 100 мікроорганізмів в 1 м³; D – 500 мікроорганізмів в 1 м³.

Визначення загальної кількості сапрофітних бактерій. Загальне бактеріальне обсіменіння повітря або мікробне число – це сумарна кількість мікроорганізмів, що міститься в 1 м³. Для визначення загального числа мікроорганізмів у повітрі закритих приміщень відбирають дві проби на бактеріологічні чашки із МПА за допомогою пристроїв для відбору повітря об'ємом по 100 л кожна. Кількість колоній, що вирости, не повинна перебільшувати 200–250. Найбільш сприятливі умови для підрахунку і наступної характеристики – ріст 100–150 колоній. Чашки із посівами поміщають у термостат на добу для підрощування і потім на 48 год залишають за кімнатної температури. Кількість колоній підраховують на обох бактеріологічних чашках, вираховують середнє арифметичне і проводять перерахунок на кількість мікроорганізмів у 1 м³ повітря. Якщо колонії дуже дрібні, їх дуже багато, то проводять підрахунки за допомогою лупи.

Витримування чашок на світлі дає можливість підрахувати роздільно кількість пігментних колоній (білих, чорних, жовтих, рожевих), кількість бацил,

грибів, актиноміцетів. Бацили утворюють колонії, як правило, великі, круглі, з нерівними краями, сухі, зморшкуваті. Колонії грибів із повітряним міцелієм (мукор, аспергі) і щільні – зелені або сірі (пеніциліни). Актиноміцети утворюють білуваті колонії, що врастають в агар.

Кількість колоній кожної групи (пігментних, безпігментних, бацил, актиноміцетів) виражають у процентах до загальної кількості. Для визначення мікробного числа методом Коха (седиментаційним) – підраховують кількість колоній, що виростили на 15 мл МПА і перераховують за Омелянським (на бактеріальну чашку площею 100 см² за 5 хв осідає скільки мікроорганізмів, стільки їх міститься у 10 л повітря).

Прилад МБ призначений для визначення загальної кількості мікробного обмінення, для відбору проб повітря із аерозольними частинками різних розмірів. Для даних цілей використовується 6 горизонтальних смужок, на кожен з яких поміщують бактеріальні чашки з МПА. Пристрій розрахований на вловлювання частин аерозолі розміром 1 мкм за швидкості відбору проб повітря 30 л/хв. Для вловлювання ще менших частин можна додати додатково фільтр із фільтруючого матеріалу. Також для вивчення мікрофлори повітря використовують мембранні фільтри № 4, через які повітря проходить за допомогою приладу Зейтца.

Визначення стафілококів. Стафілококи – це найбільш поширені мікроорганізми у повітрі закритих приміщень. Виділення патогенних стафілококів у повітрі закритих приміщень має важливе санітарно-показове значення і свідчить про епідемічне неблагополуччя. Відбір проб проводиться за допомогою апарата Кротова у кількості 250 л на 2–3 бактеріологічні чашки із молочно-жовтково-солевим агаром (або молочно-сольовим, жовточно-сольовим) і на одну чашку із кров'яним агаром. Культивують посіви протягом 48 год за температури 37 °С. Патогенні стафілококи на кров'яному агарі утворюють колонії розміром 2–3 мм, із прозорою зоною гемолізу. На молочно-жовтково-сольовому агарі колонії володіють протеолітичною властивістю (навколо них зона просвітління) і мають фермент лецитовителазу, що проявляється в утворенні райдужного (веселка) вінчика. Із підозрілих колоній готують мазки, фарбують за Грамом. Із колоній, що мають грам-позитивні коки (розміщуються у вигляді „виноградного грона”), проводять пересів на скошений МПА для виділення чистої культури. Культивують протягом 24 год за температури 37 °С, потім перевіряють наявність плазмокоагуляції даної культури шляхом посіву у пробірці з 0,5 мл цитратної плазми (кролячої або людської) у розведенні 1:4. Патогенні стафілококи коагулюють плазму протягом 20–24 год в умовах термостату. Результат ураховують через 1, 2, 4 год і потім через 24 год після утворення невеликого желеподібного згустку на дні пробірки. Після виділення стафілококи підлягають фаготипуванню за необхідності встановлення джерела внесення стафілококової інфекції і шляхів розповсюдження. Окрім якісної характеристики певних колоній, підраховують кількість виростилих колоній стафілококів у 1 м³ повітря.

Визначення стрептококів. Стрептококи є санітарно-показовими мікроорганізмами повітря, в яке вони потрапляють від хворих (або носіїв) тварин, людей. Відбір проб повітря для визначення наявності *d*- і *β*-гемолітичних стрептококів проводять за допомогою апарата Кротова на бактеріологічні чашки із кров'яним агаром із глюкозою, середовищем Гарро і Турецького. Відбирають 200–250 л повітря, культивують у термостаті протягом 48 год за температури 37 °С, потім проводять підрахунок і характеристику

колоній, після чого ці посіви витримують 18–24 год за кімнатної температури. На кров'яному агарі стрептококи утворюють дрібні сірі колонії із β -зоною гемолізу (прозорою) і колонії з зеленкувато-бурим відтінком із d -зоною гемолізу.

Повітря як шлях передачі збудників інфекційних захворювань. Роль повітря у передачі збудників інфекційних захворювань вперше експериментально довів Л. Пастер. Через повітря передається група захворювань, яка так і називається „інфекції дихальних шляхів із повітряно-крапельним і повітряно-пилевим механізмом передачі”. Тварини та люди із ураженими збудниками інфекційних захворювань дихальними шляхами виділяють у повітря велику кількість збудників під час чхання, кашлю, спілкування (табл. 11). До них належать віспа, Ку-рекітсіози, мікози туберкульоз та ін. Так, наприклад, коринебактерії у повітрі вірулентні протягом доби, а мікобактерії туберкульозу – до 18 діб, у пилу – до 1 місяця.

Таблиця 11 – Критерії оцінки повітря жилих приміщень

Оцінка повітря	Загальна кількість мікроорганізмів у 1 м ³	Кількість стрептококів у 1 м ³
Літо: чисте	до 1500	до 16
забруднене	до 2500	до 36
Зима: чисте	до 4500	до 36
забруднене	до 7000	до 124

Визначення у повітрі стрептококів, стафілококів, синьогнійної палички, протея, сальмонел. Відбір проб проводять за допомогою приладу ПАБ–1 на відповідні елективні середовища.

Визначення мікобактерій туберкульозу у повітрі проводиться за допомогою приладу ПОВ–1, із використанням середовища Школьнікової. Дане середовище обробляють 3 % розчином сірчаної кислоти і центрифугують, а осад сіють у пробірки на яєчні середовища. Культивують протягом 3 років за температури 37 °С. Первинний перегляд росту проводять через 3 тижні, а потім через кожні 10 діб. Після виділення та ідентифікації культуру обов'язково перевіряють на морщака, на вірулентність, а потім визначають стійкість до лікарських препаратів.

Для визначення коагулазопозитивних стафілококів використовують молочно-сольовий агар, жовтково-сольове середовище; для гемолітичних стрептококів – кров'яний агар з глюкозою.

Виявлення спор грибів. Проби відбирають за допомогою приладу Кротова, на середовище сусло-агар, Сабуро або Чапека, для виділення пліснявих грибів – сусло-агар, для виявлення дріжджоподібних грибів – метабісульфіт-натрій-агар (МБС-агар) (рис.11, 12). Посіви культивують протягом 3–4-х діб під час культивування пліснявих грибів (рис.) і 2–3 доби – грибівпродуцентів та дріжджоподібних за температури 26–27 °С. Вважають, що 500–600 клітин у 1 м³ робочого повітря є максимально допустимою, а у разі перевищення їх кількості у людей можливе виникнення алергічних проявів.



Рис. 12. Ріст пліснявих грибів на продуктах харчування

Для визначення у повітрі коринебактерій посіви проводять на бактеріальні чашки із середовищем Клауберга. Для визначення сальмонел із повітря використовують вісмут-сульфітний гар, а проби відбирають за допомогою приладу Кротова.

Поширеність зараження устриць Норовірусом в країнах ЄС. Згідно з дослідженням, більше третини зразків сирих устриць з виробничих районів Європи були позитивними на норовірус. Поширеність на виробничих площах оцінювалася в 34,5 відсотка, в той час як для партій з диспетчерських центрів вона становила 10,8 відсотка.

За результатами досліджень вченого Марка Ертса "Представлені результати більш ніж однієї з трьох ймовірностей забруднення виробництва устриць ЄС на NoV, причому таке забруднення більш ніж в одній із 10 партій, відправлених для споживання людиною, підкреслює потенційну небезпеку NoV при виробництві устриць для споживання в якості живих двостулкових молюсків", – йдеться в доповіді.

Двостулкові молюски є джерелом норовірусної інфекції, так як вони накопичують і концентрують частинки NoV шляхом фільтрації води, забрудненої фекаліями. Імовірність зараження зростає зі збільшенням дози, але залежить від особливостей організму, харчової матриці і факторів-господарів.

Відбір проб проводився в 12 державах-членах в період з листопада 2016 року по жовтень 2018 року, в 172 виробничих зонах і 207 диспетчерських центрах. Норвегія брала проби тільки з виробничих зон. В цілому 2180 дійсних зразків надійшли з виробничих зон і 2129-з диспетчерських центрів.

Кількісні рівні забруднення показали в середньому близько 337 копій на грам (срг) у зразках виробничої зони і приблизно вдвічі менше – 168 срг в партіях з диспетчерських центрів.

Половина позитивних партій (17,15% в пробах виробничих площ і 5,59%

в партіях відвантаження) мали значення понад 200 срг, в той час як ті, хто перевищував 500 срг, становили 8,71% і 1,17% відповідно. Значення нижче 100 срг навряд чи викличуть спалахи, але існує підвищений ризик, коли рівні перевищують 500 срг.

"Такий ступінь забруднення може розглядатися як проблема громадського здоров'я, що підкреслює особливі ризики, пов'язані з цією системою виробництва харчових продуктів, підтримуючи необхідність активних стратегій управління ризиками для зниження ризиків у цьому харчовому ланцюжку на додаток до тих, які існують в даний час", - йдеться в дослідженні.

У ході дослідження був застосований метод ПЛР в реальному часі на основі ISO (15216–1:2017) для виявлення і кількісної оцінки NoV. Ця методологія потенційно може ампліфікувати РНК з життєздатних і нежиттєздатних вірусів.

Аналізи показали сильний сезонний ефект, з більш високим рівнем забруднення в листопаді-квітні, а також більш низьким рівнем забруднення для районів класу А в порівнянні з іншими класами.

В цілому 60 % проб з виробничих майданчиків були взяті з районів класу В, 39 % – з районів класу А і менше 1 % – з районів класу С. Устриці з районів класу А не вимагають післязбиральної обробки. Ті, хто належить до класу В, повинні пройти через очищення або ретрансляцію, перш ніж бути виставленими на ринок для безпосереднього споживання людиною в якості живих тварин. Було несподівано виявлено, що обумовленість пов'язана з більш низькими рівнями поширеності захворювання.

Існуючі два мікробіологічних критерії, що застосовуються до двостулкових моллюсків, що поставляються на ринок в якості живих харчових продуктів, можуть бути доповнені новим критерієм для операторів диспетчерських центрів. Будь-який мікробіологічний критерій повинен бути врахованим в ланцюжку виробництва устриць, на якій він буде застосовуватися, і сезонні коливання впливу.

Норовірус є основною причиною спалахів гастроентериту в усьому світі. Дані зі Сполучених Штатів і європейських країн показали, що норовірус відповідальний приблизно за 50 % всіх зареєстрованих спалахів гастроентериту. Хоча спалахи норовірусу відбуваються протягом усього року, існує сезонна

картина підвищеної активності норовірусу в зимові місяці, причому пік спалаху зазвичай припадає на Грудень в США і Квітень в Європі. Це сезонне явище спалахів устричного норовірусу можна пояснити кількома факторами, включаючи підвищену вологість, низькі температури, зниження сонячної інактивації, низьку солоність і сильні дощі. Норовірус важко виділити та ідентифікувати. Таким чином, фекальна кишкова паличка зазвичай використовується в якості ідеального індикаторного мікроорганізму.

Оскільки спалахи норовірусу залежать від факторів навколишнього середовища, для прогнозування спалахів устричного норовірусу можуть бути розроблені різні математичні моделі, що включають фактори навколишнього середовища в якості незалежних вхідних змінних. Зазвичай використовувані моделі включають байєсівські моделі, регресійні моделі, штучні нейронні мережі та моделі, засновані на процесах. Розуміння механізмів, відповідальних за спалахи норовірусу устриць, має важливе значення для розробки ефективних моделей, що зв'язують змінні середовища з норовірусом. Щоб вибрати правильну модель, необхідно враховувати точність моделі, можливості моделі, гнучкість моделі, вимоги до даних і простоту використання.

Ефективне виявлення та ефективне прогнозування спалахів норовірусу устриць вимагає комбінованого застосування інструментів моделювання та даних у режимі реального часу. Дані в реальному часі можуть бути отримані за допомогою різних методів, включаючи мультиплексну ПЛР, семінестровану ПЛР, ПЛР в реальному часі, кількісну ПЛР і дистанційне зондування супутників. Зростає інтерес до радіолокаційних супутників з активними датчиками, які можуть отримувати зображення без спотворень через атмосферні умови.

Методи, засновані на мікрочіпах ДНК, також можуть забезпечити можливість швидкого і великомасштабного аналізу вірусів. Необхідні додаткові зусилля в поєднанні з сенсорними моделями моніторингу / виявлення в реальному часі і прогнозування.

Отже, на сьогоднішній день норовірус займає друге місце в етіологічній структурі гострих кишкових інфекцій, але, на жаль, в Україні ця проблема тільки починає вивчатись, тому досліджень щодо вивчення розповсюдження норовірусної інфекції надзвичайно мало. Тому роль норовірусів у виникненні гострого гастроентериту потребує подальшого вивчення.

ЗМІСТ

1	Заняття 1. Тема: Мікробіологічний практикум, правила роботи в ньому та техніка безпеки. Робота з імерсійною системою світлового мікроскопу. Морфологія бактерій.	3
2	Заняття 2. Тема: Виготовлення препаратів-мазків із культур мікроорганізмів та препаратів-відбитків із досліджуваного матеріалу. Головні барвники та прості методи фарбування. Тема 2: Складні методи фарбування.	9
3	Заняття 3. Тема 1: Вивчення бактерій у живому стані. Рухливість мікроорганізмів. Тема 2: Морфологія грибів та актиноміцетів. Тема 3: Методи стерилізації.	16
4	Заняття 4. Тема 1: Живильні середовища для культивування мікроорганізмів. Тема 2: Техніка посіву та культивування мікроорганізмів в аеробних та анаеробних умовах. Тема 3: Методи виділення чистої культури мікроорганізмів.	23
5	Заняття 5. Тема 1: Культуральні властивості мікроорганізмів. Тема 2: Ферментативні властивості мікроорганізмів. Тема 3: Визначення виду мікроорганізмів.	31
6	Заняття 6. Тема: Санітарно-бактеріологічне дослідження води.	35
	Зміст	60

Навчальне видання

ВОДНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Рубленко І.О.