

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.15 Санитарная микробиология

Направление подготовки: 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

Профиль образовательной программы: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения: очная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Конспект лекций	3
1.1	Лекция №1 Предмет и задачи санитарной микробиологии	3
1.2	Лекция №2 Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО).....	6
1.3	Лекция №3 Особенности санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов	10
1.4	Лекция №4 Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов	15
1.5	Лекция №5 Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов.....	24
1.6	Лекция №6 Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов	28
1.7	Лекция №7 Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов	34
1.8	Лекция №8 Пищевые отравления микробной этиологии.....	40
1.9	Лекция №9 Санитарно-микробиологическое исследование воды	47
1.10	Лекция №10 Санитарно-микробиологическое исследование воздуха	51
1.11	Лекция №11 Санитарно-микробиологическое исследование почвы	59
2.	Методические указания по выполнению лабораторных работ	64
2.1	Лабораторная работа №1 Определение СПМО	64
2.2	Лабораторная работа №2 Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов.....	66
2.3	Лабораторная работа №3 Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов.....	69
2.4	Лабораторная работа №4 Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов.....	70
2.5	Лабораторная работа №5 Санитарно-микробиологическое исследование яиц... ..	72
2.6	Лабораторная работа №6 Коллоквиум	73
2.7	Лабораторная работа №7 Санитарно-микробиологическое исследование воды..	74
2.8	Лабораторная работа №8 Санитарно-микробиологическое исследование воздуха.....	78
2.9	Лабораторная работа №9 Санитарно-микробиологическое исследование почвы	80

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

Лекция №1 (2 часа)

Тема: «Предмет и задачи санитарной микробиологии»

1. Вопросы лекции:

1. Исторический очерк.
2. Предмет санитарной микробиологии, её место и роль в современной микробиологии.
3. Задачи и методы санитарной микробиологии.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Исторический очерк.

В бурном XX в. и пришедшем ему на смену XXI в. развитие глобальной экологической катастрофы приобрело необратимый характер, превратив охрану здоровья населения в проблему выживания популяции людей. Отмечен рост заболеваемости нозологическими формами, характерными для промышленно развитых стран, однако, в условиях экономической нестабильности, локальных войн и военных конфликтов сохраняется высокая опасность массовых вспышек инфекционных болезней. Последнее обстоятельство требует проведения глубоких научных исследований. Для разработки обоснованных мероприятий по защите окружающей среды от загрязнения патогенными микроорганизмами, а также для изучения влияния микрофлоры внешней среды на здоровье человека была создана самостоятельная профилактическая дисциплина – санитарная микробиология.

Санитарная микробиология – наука, которая изучает микрофлору (микробиоту) окружающей среды и её вредное влияние на организм человека.

Началом развития данной науки можно считать 1888 г., когда французский врач Е. Массе впервые предложил считать кишечную палочку показателем фекального загрязнения воды. Первоначально наука имела чисто созерцательный характер и все её выводы и предложения являлись констатацией существующего положения в области общих гигиенических норм. На ранних этапах своего развития она являлась частью медицинской микробиологии, выполняя роль прикладной дисциплины, разрешавшей задачи общей гигиены и эпидемиологии. Формирование санитарной микробиологии как науки произошло главным образом в середине 1930-х гг.

Её возникновение связано с именами А.А. Миллера, И.Е. Минкевича, В.И. Тэца, которые впервые создали учебники по этому предмету. Профессор И.Е. Минкевич, заложил вместе с другими сотрудниками кафедры в 30—40 г. XX в. научные основы санитарной микробиологии в нашей стране. Работы И.Е. Минкевича о бактериях группы кишечных палочек, как санитарно-показательных микроорганизмах фекального загрязнения внешней среды, получили всеобщее признание в России и за рубежом. Первый учебник по санитарной микробиологии, написанный А. А. Миллером, вышел в нашей стране в 1935 г.

Первая санитарно-эпидемиологическая станция в нашей стране была организована в 1873 г., а уже в 1881 г. – первая Московская санитарная станция, в состав которой входили три основных отдела: санитарно-гигиенический, эпидемиологический и дезинфекционный. С сентября 1922 г. началось создание сети специализированных санитарно-эпидемиологических станций (СЭС).

2. Предмет санитарной микробиологии, её место и роль в современной микробиологии.

Сейчас санитарная микробиология — самостоятельная наука, находящаяся на стыке трех дисциплин: микробиологии, гигиены и эпидемиологии (эпизоотологии), в равной степени необходимая специалистам, разных профилей. Выделение санитарной микробиологии в самостоятельную дисциплину связано с особенностями проблем,

разрабатываемых ею, а также своеобразием используемых методических приемов и особыми задачами, которые она призвана решать.

В середине XX в. в недрах микробиологии и вирусологии сформировалась новая отрасль медицинской науки — санитарная вирусология.

Возникновение и развитие санитарной вирусологии обусловлено требованиями времени: количество вирусных болезней растет, поэтому на сегодняшний день исследование появления и развития вирусов в окружающей среде, их индикация и идентификация, а также разработка методов профилактики вирусных болезней стали насущной проблемой.

В 1963 г. в нашей стране было утверждено «Положение о государственном надзоре», в котором были указаны основные задачи по организации деятельности санитарно-эпидемиологической службы, определены пути дальнейшего совершенствования санитарно-правового законодательства, определена структура его органов и учреждений.

Упомянутое Положение в дальнейшем было пересмотрено и добавлено, что основной задачей государственного санитарного надзора является наблюдение за проведением санитарно-гигиенических и санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение и ликвидацию загрязнения окружающей среды, а также повышение их уровня и качества с учетом научно-технических достижений в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия страны.

Основная роль в совершенствовании санитарно-гигиенических нормативов, правил и ГОСТов, а также контроля за их правильным практическим применением принадлежит санитарно-эпидемиологической службе — различным подразделениям СЭС, осуществляющих государственный санитарный надзор на подведомственных территориях.

3. Задачи и методы санитарной микробиологии.

Основные задачи дисциплины:

1. Гигиеническая и эпидемиологическая оценка объектов внешней среды по микробиологическим показателям.

2. Разработка нормативов, определяющих соответствие микрофлоры исследуемых объектов гигиеническим требованиям.

3. Разработка и экспертиза методов микробиологических и вирусологических исследований разнообразных объектов внешней среды с целью оценки их санитарно-гигиенического состояния.

4. Разработка рекомендаций по оздоровлению объектов внешней среды путём воздействия на их микрофлору и оценка эффективности проводимых мероприятий.

5. Изучение закономерностей жизнедеятельности микрофлоры окружающей среды, как в самой экосистеме, так и во взаимоотношениях с человеком.

Главная задача санитарной микробиологии — раннее обнаружение патогенных микроорганизмов во внешней среде. Однако в настоящее время задачи санитарной микробиологии весьма усложнились вследствие чрезмерной антропогенной нагрузки на экосистему.

Объектами санитарно-микробиологического исследования служат вода, воздух, почва, объекты окружающей среды, а также пищевые продукты, оборудование пищеблоков и др.

Санитарная микробиология располагает двумя методами, с помощью которых можно определить санитарно-эпидемиологическое состояние внешней среды:

1. Прямое обнаружение патогенных микроорганизмов во внешней среде.

2. Косвенная индикация возможного их присутствия во внешней среде.

Прямой метод более надёжный, но трудоёмкий и недостаточно чувствительный. Трудности выделения патогенных микроорганизмов из внешней среды обусловлены их незначительной концентрацией, неравномерностью распределения, конкуренцией между

патогенными микроорганизмами и сапрофитной микрофлорой. Огромное значение имеет изменчивость возбудителя во внешней среде. Необходимо вести исследования в широком диапазоне, в том числе и по обнаружению условно-патогенных микроорганизмов, так как выделение одного вида возбудителя не свидетельствует об отсутствии других. Поэтому прямое выделение патогенных микроорганизмов проводят только по эпидемиологическим показаниям.

Косвенный метод более прост и доступен. Этот метод располагает двумя показателями-критериями: общее микробное число и концентрация СПМО.

Общее микробное число (ОМЧ) - число всех микроорганизмов в 1 мл или в 1 г субстрата. При этом исходят из предположения, что чем больше микроорганизмов обнаружено во внешней среде, тем вероятнее загрязнение патогенными микроорганизмами. В связи с этим ОМЧ даёт представление об эпидемиологической обстановке.

Существуют три метода определения ОМЧ:

- Оптический метод прямого подсчёта бактерий под микроскопом в камере Горяева.
- Бактериологический метод (менее точный).
- Измерение биомассы.

Оптический метод обычно используют на водопроводных станциях при оценке эффективности работы очистных сооружений, но он не позволяет отличить живые бактерии от мёртвых. Исследование можно выполнить в течение 1 ч, поэтому метод незаменим в аварийных ситуациях.

Бактериологический метод выявляют определённую физиологическую группу бактерий, растущих при данных условиях. *Например, обнаружение вегетативных форм микроорганизмов в прошедшем термическую обработку пищевом продукте свидетельствует о повторном заражении продукта после термической обработки или же о Неэффективности последней. Обнаружение спор подтверждает удовлетворительное качество термической обработки.*

Измерение биомассы осуществимо только в специализированных лабораториях путём взвешивания остатков бактериальной массы, определения показателей клеточного обмена и др. В практике этот метод не применяют.

СПМО - такие микроорганизмы, которые постоянно обитают в естественных полостях тела человека (животных) и постоянно выделяются во внешнюю среду общими путями с патогенами. Для признания микроорганизма санитарно-показательным он, должен соответствовать следующим требованиям:

- постоянное обитание в естественных полостях человека и животных и постоянное выделение во внешнюю среду.
- отсутствие размножения во внешней среде.
- длительность выживания и устойчивость во внешней среде не меньше или даже выше, чем у патогенных микроорганизмов.
- отсутствие «двойников», с которыми СП МО можно перепутать.
- относительно низкая изменчивость во внешней среде.
- наличие простых в исполнении и вместе с тем надёжных методов индикации.

Чем выше концентрация СПМО, тем больше вероятность присутствия патогенных микроорганизмов. Их количество выражают в титрах и индексах.

Титр — минимальное количество субстрата (в кубических сантиметрах или граммах), в котором ещё обнаруживают СПМО.

Индекс — количество СПМО, которое содержится в 1 л воды или в 1 см³ другого субстрата.

Лекция №2 (2 часа)

Тема: «Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО)»

1. Вопросы лекции:

1. Общая характеристика СПМО
2. Первая, вторая и третья группы СПМО.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Общая характеристика СПМО.

Основным источником распространения большинства инфекционных заболеваний являются сами люди, а также теплокровные животные. Наиболее массивное выделение ими микроорганизмов в окружающую среду происходит воздушно-капельным и фекальным путями.

Санитарно-микробиологическое исследование объектов окружающей среды обязано решить вопрос о наличии или отсутствии в них опасных для человека микроорганизмов. Непосредственное обнаружение возбудителя инфекционных болезней в объектах окружающей среды (несмотря на то что в настоящее время разработаны методы прямого, ускоренного и количественного их определения) имеет целый ряд трудностей.

Во-первых, патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде постоянно. Сравнительно легко их можно обнаружить в период эпидемий, но очень трудно в межэпидемические периоды. Основная же деятельность санитарных микробиологов направлена на предупреждение возникновения эпидемий, и поэтому вся работа ведется в межэпидемические периоды.

Во-вторых, количество патогенных микроорганизмов, попавших в окружающую среду, значительно уступает непатогенным и распространение их в загрязненных объектах неравномерно. Трудности возникают и при выделении патогенных микробов при посевах на питательные среды, даже ингибиторные, поскольку они неизбежно страдают от конкуренции сапрофитной микрофлоры. Отрицательные результаты индикации патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорят с достоверностью об их отсутствии. Поэтому приходится оценивать различные объекты косвенным путем, устанавливая факт загрязнения их выделениями человека или теплокровных животных. И чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Сообщающиеся с внешним миром полости тела людей и животных обильно заселены нормальной микрофлорой довольно постоянной по качественному составу и сравнительно мало изменяющейся при инфекционных заболеваниях.

Для многих видов микроорганизмов (обитателей тела здорового человека) полость рта или кишечник являются биотопами — единственной средой обитания. Поэтому обнаружение таких микробов вне организма свидетельствует о загрязнении соответствующими выделениями. Находя в исследуемом материале представителей микрофлоры полости рта, мы вправе думать о попадании слизи из дыхательных путей, в которой могут содержаться и возбудители скарлатины, туберкулеза и др., а, обнаруживая нормальных обитателей кишечника, мы можем сделать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей кишечных инфекций.

Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, и поэтому названы «санитарно-показательными». Однако не все микробы, входящие в состав нормальной флоры тела человека или животных, могут быть признаны таковыми.

На основании многочисленных исследований были сформулированы требования, которым должны отвечать санитарно-показательные микроорганизмы:

1. Они должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах.

2. Они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных.

3. После выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями.

4. Они не должны размножаться в окружающей среде.

5. Они не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.

6. Они должны быть достаточно типичными, с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда.

7. Индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легкодоступными и экономичными микробиологическими методами.

Поскольку два первых признака считались решающими, то длительное время кишечную палочку признавали индикатором фекального загрязнения, а зеленеющий стрептококк — показателем воздушно-капельного загрязнения.

2. Первая, вторая и третья группы СПМО.

БГКП. В действующих нормативных документах по контролю за санитарно-бактериологическими показателями воды, пищевых продуктов, почвы предусмотрен учёт БГКП. Следует отметить, что понятие БГКП - утилитарное (санитарно-бактериологическое и экологическое), но не таксономическое. Эта группа представлена микроорганизмами родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, экологические особенности которых определяют их индикаторную значимость.

Группа кишечных палочек - грамотрицательные, не образующие спор, короткие палочки, сбраживающие глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 ч, не обладающие оксидазной активностью. В некоторых официальных документах (по воде, почве, пищевым продуктам) имеются особенности формулировки БГКП, не имеющие, однако, принципиального значения.

Эшерихии. Род *Escherichia*, включающий типовой вид *E. coli* - показатель свежего фекального загрязнения, возможная причина пищевых токсикоинфекций. Для идентификации используют биохимические тесты, учитывая способность к ферментации лактозы при температуре $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и отсутствие роста на цитратсодержащих средах. Представителей рода, находящихся в воде, трактуют как термотолерантные колиформные бактерии, в лечебных грязях - как фекальные колиформные бактерии, в пищевых продуктах - как *E. coli*.

Цитробактерии. Этиологическая роль бактерий рода *Citrobacter* доказана при эпидемических вспышках, клинически протекающих с явлениями диспепсии, гастроэнтероколита, пищевых токсикоинфекций.

Кишечная палочка не является идеальным СПМО. К недостаткам кишечной палочки как СПМО относятся следующие:

- обилие аналогов во внешней среде;
 - изменчивость во внешней среде;
 - недостаточная устойчивость к неблагоприятным воздействиям;
 - недостаточно длительное выживание в продуктах по сравнению с шигеллами
- Зоне (возбудитель дизентерии), сальмонеллами, энтеровирусами;
- способность к размножению в воде;
 - нечёткий индикатор даже в отношении присутствия сальмонелл.

Все эти факты обусловили поиск замены кишечной палочки.

Энтерококки. В 1910 г. на роль СПМО предложены энтерококки.

(*Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*).

Преимущества энтерококка как СПМО.

- Постоянно находится в кишечнике человека и постоянно выделяется во внешнюю среду. При этом *E. faecalis* в основном обитает в кишечнике человека, поэтому обнаружение его свидетельствует о загрязнении фекалиями людей. В меньшей степени у человека встречается *E. faecium*. Последний в основном обнаруживается в кишечнике животных, хотя сравнительно редко также отмечается и *E. faecalis*.
- Не способен размножаться во внешней среде, в основном размножается *E. faecium*, но он имеет меньшее эпидемиологическое значение.
- Не изменяет своих свойств во внешней среде.
- Не имеет аналогов во внешней среде.
- Устойчив к неблагоприятным воздействиям внешней среды.
- Для индикации энтерококков разработаны высокоселективные среды.

Энтерококкометрия узаконена в международном стандарте на воду, как показатель свежего фекального загрязнения. При обнаружении в воде атипичных кишечных палочек, присутствие энтерококков становится главным показателем свежего фекального загрязнения. К сожалению, в СанПиН 2.1.4.1074-01 на питьевую воду определение энтерококка не предусмотрено.

Энтерококкометрия молока, мясных изделий (котлет) проводится в целях выяснения эффективности их термической обработки.

Бактерии рода *Proteus* встречаются в 98% случаев в выделениях кишечника человека и животных, из них в 82% случаев - *P. mirabilis*. Обнаружение протей в воде и продуктах указывает на загрязнение объектов разлагающимися субстратами и свидетельствует о крайнем санитарном неблагополучии. При обнаружении протей в пищевых продуктах их бракуют, а воду не разрешают употреблять для питья. Протеометрия воды официально признана в США.

Клостридии. *Clostridium perfringens* - другой СПМО со своими достоинствами и недостатками:

- непостоянно обнаруживается в кишечнике человека;
- длительно сохраняется во внешней среде за счёт спорообразования, поэтому не свидетельствует о свежем фекальном загрязнении;
- *C. perfringens* может служить косвенным показателем наличия в воде энтеровирусов;
- для прорастания спор клостридий необходим температурный шок (прогревание при температуре +75 °С в течение 15-20 мин). В МУК 1.2.1018-01 по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды температурная проба воды является обязательной.

Определение титра этого СПМО рекомендовано при текущем санитарном надзоре за состоянием территории. Тесты на обнаружение сульфитредуцирующих клостридий в воде предусматривают стандарты России, США и других странах. Определение *C. perfringens* проводят в воде открытых водоёмов, почве, лечебных грязях, мясных продуктах.

Термофилы. Это целая группа СПМО, в основном споровых, растущих при температуре 55-60 °С. Обитают во внешней среде и служат показателем загрязнения навозом и компостом. При гниении навоза или компоста температура поднимается более 60°С, и термофилы бурно размножаются. О степени загрязнения судят по количеству термофилов. В России их определяют при исследовании почвы, а также в консервах как индикатор термической обработки, особенно при хранении в условиях жаркого климата.

Бактериофаги. В качестве СПМО используют бактериофаги кишечной палочки - коли-фаги, фаги сальмонелл и шигелл. Их обнаруживают там, где есть соответствующие бактерии, к которым эти фаги адаптированы. Фаги выживают во внешней среде более 9 мес.

Сальмонеллы. В 30-х г. XX века У. Вильсон и Э. Блер предложили сальмонелл в качестве СПМО.

Преимущества сальмонелл как СПМО:

1. Сальмонеллы - наиболее распространенные микроорганизмы, вызывающие острые кишечные заболевания (ОКЗ), могут служить индикатором других ОКЗ с аналогичными патогенезом и эпидемиологией. Количество носителей сальмонелл среди людей и животных значительное. Их довольно часто обнаруживают даже в сточных водах.

2. Поступают во внешнюю среду только с фекалиями человека и животных.

Недостатки:

1. Размножаются в почве при наличии в ней большого количества органических веществ, однако, могут размножаться даже в чистой воде.

При определении сальмонелл в воде следует вычислять не только процент положительных обнаружений, но и НВЧ. По этому показателю можно оценить эпидемиологическую ситуацию.

Бактероиды. Бактероиды обнаруживают в 1 г фекалий в высоких концентрациях. Это грамотрицательные палочки, строгие анаэробы, подвижные и неподвижные, образуют мелкие колонии, требовательны к питательным средам. Они - постоянные обитатели кишечника человека, их количество значительно превышает все другие СПМО. Преимущества:

- Бактероидов много, они в больших количествах выделяются во внешнюю среду.
- Не имеют двойников.
- Не размножаются во внешней среде.
- Отмирают во внешней среде быстрее, чем кишечные палочки, поэтому служат показателями свежего фекального загрязнения.

Однако имеются определённые трудности с их выращиванием, так как необходимы специальные питательные среды и особые условия культивирования.

Синегнойная палочка. Недостатки синегнойной палочки как СПМО.

- Обнаруживается в фекалиях здоровых людей в 11%, а у животных в 7% (т.е. непостоянно).
- Способна размножаться во внешней среде.
- Методы индикации просты, но только в отношении пигментных форм, а во внешней среде преобладают беспигментные формы, которые распознать трудно.
- Обнаруживается в 90% случаев в сточных водах, больничных палатах. Наличие синегнойной палочки свидетельствует о неблагоприятном санитарном состоянии лечебного учреждения.

Роль её выросла в связи с распространением антибиотикорезистентных штаммов и появлением большого количества носителей.

Грибы рода *Candida* постоянно присутствуют в организме человека: в фекалиях в 10-90% случаев, в слизи верхних дыхательных путей - в 15-50%, на коже - в 1-100%. Они обнаруживаются везде, где есть сахаросодержащие вещества. Первоисточником в природе служат человек и животные. Грибы рода *Candida* очень устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды, даже более, чем патогенные бактерии. Их можно использовать в качестве индикаторов эффективности дезинфекции.

Вторая группа СПМО.

Представителей второй группы СПМО определяют в воздухе, молочных продуктах, воде. К ним относится зеленающий стрептококк (*S. salivarius*). У него есть двойники, такие как *S. lactis*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. cremoris*. Но эти двойники редко обнаруживаются в жилых помещениях. Зеленающими могут быть и энтерококки, но они сами являются СПМО.

Другой санитарно-показательный стрептококк - гемолитический стрептококк. Его обнаруживают в 80% у людей, страдающих в основном воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. Он обладает гемолитическими свойствами.

Показателем санитарного неблагополучия считается и золотистый стафилококк. Именно этот вид стафилококка связан с присутствием людей и некоторых животных. В среднем у здоровых людей золотистый стафилококк обнаруживают в 30% случаев, а у медицинского персонала до 96%. Этот вид стафилококка отличается длительностью выживания и устойчивостью во внешней среде. Он может быть косвенным индикатором загрязнения воздуха вирусами. Использование золотистого стафилококка, как наиболее информативного СПМО, рекомендовано при исследовании воздуха жилых помещений, жилых отсеков космических кораблей, подводных лодок, лечебно-профилактических учреждений.

На роль СПМО выдвигаются также антибиотикорезистентные стафилококки и микрококки, 5-6-кратное превышение указанных СПМО в воздухе больничных помещений по сравнению с воздухом небольших помещений следует оценивать как плохой прогностический признак.

Третья группа СПМО

Бделловибрионы предложены в качестве СПМО в 1962 г. Это аэробные грамотрицательные палочки, размером 0,25-1,2 мкм, подвижные, имеют жгутики, по отношению к другим бактериям - хищники, поражающие только грамотрицательные палочки. На одном из полюсов бделловибрионов есть та, где скапливаются экзотоксин и липолитический фермент, который растворяет клеточную стенку бактерий. Отличают их друг от друга по литической активности: одни лизируют только псевдомонады, а другие только юнады. Бделловибрионы применяют для биологической очистки воды, однако выпускают в воду плавательных бассейнов), используют и как СПМО по загрязнению воды. В местах сброса сточных вод количество бделловибрионов достигает 3000 КОЕ/см³, в отдалении от сброса - 10 КОЕ/см³.

Определяют бделловибрионы по методу Грация, но для постановки пробы им индикаторный штамм *E. coli* K-12. Количество их выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/см³).

Аэромонады. В 1969 г. предложено использовать в качестве СПМО ромонады. Они в больших количествах содержатся в сточных водах обладают большой энергией размножения. Служат показателем нагрузки сточных вод на водоём и имеют такое же значение, как ОМЧ. При большой концентрации аэромонад в воде может наступить пищевое отравление.

Лекция №3 (2 часа)

Тема: «Особенности санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов»

1. Вопросы лекции:

1. Нормативные документы.
2. Правила отбора, пересылки и исследования проб пищевых продуктов.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Нормативные документы.

Исследование пищевых продуктов - один из самых сложных разделов санитарной микробиологии. Это обусловлено разнообразием и обилием микрофлоры в них, использованием микроорганизмов в приготовлении ряда пищевых продуктов и отсутствием полноценных методов выявления микроорганизмов. Многие инфекционные заболевания бактериальной и вирусной природы передаются через пищевые продукты

(брюшной тиф, сальмонеллёзы, дизентерия, эшерихиозы, ботулизм, холера, бруцеллёз, полиомиелит и др.). Пища содержит большое количество факторов роста и витаминов, способствующих размножению микроорганизмов. Микрофлора, которая там встречается, может быть специфической (производственной) и неспецифической. К первой относят микроорганизмы, искусственно вносимые в продукт для придания ему определенных свойств. Такая микрофлора в виде заквасок вносится в пищевые продукты при приготовлении всех молочнокислых продуктов, хлеба. К специфической относится микрофлора, формирующаяся в отдельных продуктах на определенных этапах технологии их получения - квашение капусты и других овощей, приготовление колбасных изделий, пива, вина и т.д. Являясь обязательным технологическим звеном получения указанных продуктов, микроорганизмы обеспечивают определенные органолептические свойства этих продуктов и по ряду параметров их химический состав. Формируемая в процессе созревания этих продуктов микрофлора обеспечивает определенные сроки и условия хранения продуктов питания. Таким образом, специфическая микрофлора оказывает положительное влияние на пищевые продукты.

Неспецифическая микрофлора представлена случайно попавшими в пищевые продукты микробами из внешней среды. Некоторые из них не оказывают влияния на пищевые продукты, другие делают их непригодными для употребления и даже опасными. Санитарно-показательные и патогенные микробы тоже относятся к неспецифической микрофлоре. Неспецифическая микрофлора может быть представлена микробами-сапрофитами, микробами, вызывающими порчу пищевых продуктов, потенциально патогенными и патогенными микроорганизмами. Необходимо учитывать, что полностью освободить пищевые продукты от микроорганизмов без изменения их пищевых качеств, как правило, невозможно. Несоблюдение санитарных правил получения, транспортировки, хранения или приготовления готовых блюд может приводить к загрязнению продуктов микробами и токсинами, что служит предпосылкой возникновения пищевых отравлений. Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов отличается от исследований других объектов окружающей среды тем, что в продуктах микробы интенсивно размножаются.

В последние годы ухудшилось состояние здоровья населения, что связано, в том числе и с неполноценным питанием. Одной из основных причин складывающейся ситуации считают изменение структуры производства и потребления продуктов питания, снижение их качества. Реорганизация и реструктуризация отечественных предприятий пищевой промышленности, появление значительного числа мелких производителей продуктов питания, применение устаревших технологий производства привело к появлению на рынке низкокачественных продуктов питания. Серьёзной проблемой выступает отсутствие надлежащего контроля и надзора за пищевыми продуктами, ввозимыми из-за рубежа.

Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 1999 г. подчеркивает, что пищевые продукты, пищевые добавки, продовольственное сырьё, а также контактирующие с ними материалы и изделия в процессе их производства, хранения, транспортировки и реализации населению должны соответствовать санитарным правилам.

В данном законе даны определения таким понятиям, как качество и безопасность пищевых продуктов:

качество пищевых продуктов - совокупность их характеристик, способных удовлетворять потребности человека в пище при обычных условиях их использования;

безопасность пищевых продуктов - обоснованная уверенность в том, что пищевые продукты при обычных условиях их использования не вредны и не представляют опасности для здоровья нынешнего и будущих поколений.

Закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 2000 г. регулирует отношения в области обеспечения качества пищевых продуктов и их безопасности для

здоровья человека. Уточнены требования к обеспечению этих параметров при хранении, перевозке и реализации пищевых продуктов.

Статья 19 «Требования к обеспечению качества и безопасности пищевых продуктов, материалов и изделий при их хранении и перевозках» включает следующие положения:

- Хранение и перевозки пищевых продуктов, материалов и изделий должны осуществляться в условиях, обеспечивающих сохранение их качества и безопасность.

- Индивидуальные предприниматели и юридические лица, осуществляющие хранение, перевозки пищевых продуктов, материалов и изделий, обязаны соблюдать требования нормативных документов к условиям хранения и перевозок пищевых продуктов, материалов и изделий и подтверждать соблюдение таких требований соответствующими записями в товарно-сопроводительных документах.

- Хранение пищевых продуктов, материалов и изделий допускается в специально оборудованных помещениях, сооружениях, которые должны соответствовать требованиям строительных, санитарных и ветеринарных правил и норм.

- Для перевозок пищевых продуктов должны использоваться специально предназначенные или специально оборудованные для таких целей транспортные средства, имеющие оформленные в установленном порядке санитарные паспорта.

В случае, если при хранении, перевозках пищевых продуктов, материалов и изделий допущено нарушение, приведшее к утрате пищевыми продуктами, материалами и изделиями соответствующего качества и приобретению ими опасных свойств, индивидуальные предприниматели и юридические лица, осуществляющие хранение, перевозки пищевых продуктов, материалов и изделий, обязаны информировать об этом владельцев и получателей пищевых продуктов, материалов и изделий. Такие пищевые продукты, материалы и изделия не подлежат реализации, направляются на экспертизу, в соответствии с результатами которой они утилизируются или уничтожаются.

Общие требования к методам санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов изложены в следующих документах:

ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы обработки проб для микробиологических анализов»;

ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов»;

ГОСТ 26670-91 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы культивирования микроорганизмов»;

ГОСТ Р 51446-99 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

В СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» микроорганизмы, количество которых нормируется в продуктах питания, подразделяются на следующие категории:

- санитарно-показательные, к которым относят количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МAM и ФАнМ), БГКП (коли-формы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки;

- условно-патогенные микроорганизмы, к которым относят *E. coli*, *S. aureus*, бактерии рода *Proteus*, *B. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*, бактерии рода *Yersinia*;

- микроорганизмы порчи - дрожжи и плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы;

- микроорганизмы заквасочной микрофлоры и пробиотические микроорганизмы: молочно- и пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии,

ацидофильные бактерии и другие (в продуктах с нормируемым уровнем пробиотической микрофлоры и в пробиотических продуктах).

2. Правила отбора, пересылки и исследования проб.

Все результаты микробиологического анализа пищевых продуктов могут быть получены не ранее 48-72 ч, т.е. когда продукт уже может быть реализован. Поэтому контроль по этим показателям носит ретроспективный характер и служит целям санитарно-гигиенической оценки предприятия, производящего или реализующего пищевые продукты.

Обнаружение повышенной общей микробной обсеменённости, колиформных бактерий позволяет предположить нарушение температурного режима при приготовлении и/или хранении готового продукта. Обнаружение патогенных микроорганизмов расценивают как показатель эпидемиологического неблагополучия столовой или предприятия торговли.

Микробиологический анализ пищевых продуктов проводится в плановом порядке в целях определения соответствия продукта требованиям ГОСТ, временным техническим условиям и другим установленным кондициям, а также по эпидемиологическим показаниям: при пищевых отравлениях, обнаружении недоброкачества продукта.

Регламентирование по показателям микробиологического качества и безопасности пищевого сырья и продуктов питания осуществляется следующим образом: нормируется масса продукта, в которой не допускается бактерии группы кишечных палочек, большинство условно-патогенных микроорганизмов, а также патогенные микробы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях нормативы отражают количество колониеобразующих единиц в 1 г (мл) продукта (КОЕ/г, мл). При получении неудовлетворительных результатов анализа хотя бы по одному из микробиологических показателей проводят повторный анализ удвоенного объёма выборки, взятой из той же партии.

В продуктах массового потребления, для которых в таблицах СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» отсутствуют микробиологические нормативы, не допускается присутствие патогенных микроорганизмов (в том числе сальмонелл) в 25 г продукта.

Санитарное обследование с отбором проб для лабораторных исследований проводят представители соответствующего органа Роспотребнадзора. Отбор проб проводят в присутствии представителей продовольственной службы. Предварительное оповещение о проведении проверки недопустимо.

Проведённое обследование оформляют актом (два экземпляра) установленной формы, который подписывают контролирующее лицо и представитель службы.

Результаты каждого обследования должны быть доведены до сведения руководителей продовольственной службы и персонала предприятия не позднее трех дней после завершения исследований.

Объектами санитарно-бактериологического обследования, как правило, служат готовые блюда, кулинарные изделия, скоропортящиеся и особо скоропортящиеся пищевые продукты в столовых, предприятиях торговли, а в отдельных случаях сырьё и полуфабрикаты (по ходу технологического процесса) - по эпидемиологическим показаниям, при высокой бактериальной обсеменённости готовых продуктов, блюд и др. Горячие блюда исследуют на наличие остаточной микрофлоры с целью проверки эффективности термической обработки, а также вторичного обсеменения в процессе реализации.

При исследовании холодных блюд определяют общее количество микроорганизмов и титр БГКП с целью установления вторичного обсеменения в процессе приготовления или реализации этих блюд.

Представитель органа Роспотребнадзора должен:

- ознакомиться с документацией на данную партию продукта (накладные, сертификаты и др.);
- провести наружный осмотр всей партии, обращая внимание на состояние тары (исправность, деформации, загрязнение и др.), внешний вид продукта, условия транспортировки, хранения и реализации;
- при обнаружении неисправности тары, способной повлиять на качество продукта, проводят вскрытие каждой неисправной единицы упаковки. Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, устанавливают, руководствуясь действующими стандартами.

При отборе проб пищевых продуктов, методики исследования которых предусмотрены соответствующими методическими указаниями (МУ, МУК), ГОСТами (ОСТ, ТУ), руководствуются рекомендациями раздела «Отбор проб», а в случае отсутствия последних — специальным стандартом по правилам отбора проб и «Методическими указаниями по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами» (№2657 от 31.12.1982 г.). Кроме того, учитывают конкретные обстоятельства на исследуемом объекте. Отбор проб для исследования в лаборатории проводят отдельно по каждой группе, установленной на основании осмотра соответствующих партий продуктов:

- нормальные по внешнему виду, без признаков микробной порчи;
- подозрительные - с признаками отклонений, которые могут возникать как вследствие микробной порчи, так и вследствие химических или биохимических реакций в продукте;
- испорченные - с проявлениями брожения, гниения, ослизнения, прокисания, плесенью;
- консервные банки с признаками бомбажа, хлопуш и др.

Отбор проводят стерильными приспособлениями в стерильную посуду. Пробы пломбируют и снабжают сопроводительной документацией, в которой указывают дату и время отбора пробы, номер и размер партии, номер образца, наименование и сорт продукта, объём необходимых исследований, должность и фамилию лица, проводившего отбор проб, и направившего должностного лица.

Транспортируют образцы в кратчайший срок, при этом целесообразно использовать сумки-холодильники. К исследованиям приступают не позднее, чем через 4 ч. Если это невозможно, отмечают причину задержки, а пробы хранят до анализа при температуре +4°C (замороженные продукты — не выше -2°C).

Жидкие и полужидкие продукты тщательно перемешивают и в случае резко кислой реакции подщелачивают 10% стерильным раствором натрия бикарбоната до pH 7,2-7,4, проверяя реакцию по универсальной индикаторной или лакмусовой бумажке. Крем, мороженое, сливочное масло растапливают на водяной бане при температуре 43°C. Исходным материалом для посевов продуктов плотной консистенции служит 10% взвесь. Для её приготовления из разных мест средней пробы берут навеску 15 г (средний образец). Средний образец гомогенизируют или растирают в фарфоровой ступке. К навеске добавляют 135 см³ стерильной водопроводной или 0,1% пептонной воды.

Жидкий продукт или полученную взвесь продукта используют для получения десятикратных разведений в зависимости от характера продукта и от предполагаемого загрязнения кишечными палочками и сапрофитной флорой. В 9 см³ стерильной воды переносят 1 см³ 10% взвеси и т.д. Для каждого разведения используют свежую стерильную пипетку, погружая её ниже поверхности не более чем на 3 мм, чтобы не перенести жидкость с предыдущего разведения. При отборе проб в раздаточной в банку переносят всю порцию с тарелки. При сборе образцов от больших продуктов (из кастрюли, от большого куска мяса) берут пробу массой около 200 г, от жидких блюд берут пробу после тщательного перемешивания, с плотных — из разных мест в глубине

куска. Минеральные, безалкогольные и слабоалкогольные напитки отбирают в количестве 1 бутылки заводской упаковки и 200 см³ напитка, изготовленного в столовой (на предприятии).

Лекция №4 (2 часа)

Тема: «Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов.»

1. Вопросы лекции:

1. Микрофлора парного, охлаждённого, замороженного мяса.
2. Пороки мяса микробного происхождения.
3. Правила отбора проб и подготовка к исследованию.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Микрофлора парного, охлаждённого, замороженного мяса. Микроорганизмы, контаминирующие мясо на различных стадиях технологического процесса, делятся на четыре группы:

- патогенные (возбудители ящура, туберкулеза, лептоспироза, листериоза, бактериальных токсикоинфекций и интоксикаций, микотоксикозов, энтеровирусных заболеваний);
- условно-патогенные;
- санитарно-показательные (кишечная палочка, стрептококки группы О);
- сапрофиты. Сапрофитная микрофлора мяса включает около 30 типов различных бактерий.

Мясо животных может быть обсеменено двумя путями. В живом организме всегда находятся микроорганизмы, которые при определенных условиях могут проникать в кровь и в мускулатуру. Этот путь называется **эндогенным**, то есть происходящим при жизни животного. Посмертное обсеменение туши, связанное с попаданием микроорганизмов из окружающей среды, называют **экзогенным**.

Эндогенный путь

Экзогенный путь

Мясо и мясопродукты являются хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. Поэтому в целях сохранения качества мяса и мясопродуктов их подвергают посолу, холодильному хранению и другим видам консервирования.

На холодильниках и мясокомбинатах мясо и мясопродукты хранят при низких температурах в охлажденном и замороженном виде.

Микрофлора охлажденного мяса. Микрофлора мяса, поступающего на хранение в камеры охлаждения, разнообразна по составу и обычно представлена мезофилами, термофилами и психрофилами, т.е. микроорганизмами, имеющими неодинаковые температурные пределы роста.

К концу охлаждения в глубоких слоях мяса температура должна достигать 0-4°C. Следовательно, на охлажденном мясе в процессе хранения могут развиваться только психрофильные микроорганизмы.

Термофильные и большинство мезофильных микроорганизмов после охлаждения мяса полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. В процессе последующего хранения продукта их количество уменьшается. Но некоторые патогенные и токсигенные бактерии из группы мезофилов (сальмонеллы, токсигенные стафилококки и др.) длительное время сохраняют жизнеспособность при низких температурах и не отмирают при хранении охлажденного мяса.

Размножение микроорганизмов в мясе при низких температурах проходит несколько фаз (лаг-фазу, логарифмическую фазу, максимальную стационарную фазу и фазу отмирания). В начальный период хранения охлажденного мяса

психрофильные микроорганизмы, находясь в лаг-фазе (фазе задержки роста), некоторое время не размножаются или их размножение происходит в очень незначительной степени. При резком и быстром охлаждении, более низкой температуре и влажности лаг-фаза увеличивается. При соблюдении установленного температурно-влажностного режима (относительная влажность 85-90%, температура воздуха от -1 до 1°C) на охлажденном мясе, полученном в результате убоя здоровых, отдохнувших животных с соблюдением всех основных санитарных правил и имеющем обычно незначительную микробную обсемененность, размножение микроорганизмов задерживается на 3-5 дней и более. При высокой степени загрязнения мяса микроорганизмами фаза задержки роста микроорганизмов сокращается до 1 сут., а иногда составляет всего несколько часов.

По истечении лаг-фазы начинают усиленно размножаться психрофильные микроорганизмы (логарифмическая фаза) и их число резко возрастает. На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспорообразующие грамотрицательные бактерии рода псевдомонас и ахромобактер, а также плесневые грибы и аэробные дрожжи, преимущественно родов родоторула (*Rodotorula*) и торулопсис.

В условиях пониженной влажности и более низких температур, наблюдается активный рост плесневых грибов и аэробных дрожжей.

При активном размножении микроорганизмов в результате их жизнедеятельности в конце стационарной фазы может наступить порча охлажденного мяса.

Микрофлора мороженого мяса. Во время замораживания мяса отмирает значительное количество микроорганизмов, содержащихся в охлажденном мясе. Губительно действуют высокая концентрация растворенных в продукте веществ и пониженная влажность, создающиеся в результате вымерзания воды, изменение содержащихся в клетках белков и механическое действие льда.

Микроорганизмы отмирают и в процессе его последующего хранения в замороженном состоянии. Чем ниже температура (-18...-20°C) и выше скорость замораживания, тем больше погибает микроорганизмов.

В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется. Полного отмирания микроорганизмов в мороженом мясе не происходит. Даже после длительного хранения мороженого мяса оно не становится стерильным и может содержать много живых сапрофитных микроорганизмов — возбудителей порчи, а иногда и патогенных бактерий. Большинство плесневых грибов и дрожжей на мороженом мясе при -18°C не погибают в течение 3 лет. **В соответствии с этим по действующей в нашей стране технологической инструкции мороженое мясо рекомендуется хранить при -12°C и ниже, что позволяет сохранять его практически неограниченное время без признаков порчи.**

2. Пороки мяса микробного происхождения.

На скорость размножения микроорганизмов, а следовательно, порчи мяса влияют температура, относительная влажность воздуха, а также степень первоначальной обсемененности мяса микроорганизмами.

1. Гниение мяса (распад белков). Этот вид порока вызывается действием как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов и представляет собою многостадийный процесс разложения белковых и других азотсодержащих веществ. Многостадийность процесса обусловлена неодинаковой ферментативной активностью гнилостной микрофлоры по отношению к различным веществам, в результате чего появляющиеся при распаде белков аминокислоты при дезаминировании и декарбоксилировании образуют летучие жирные кислоты или амины, большинство из которых не только обладает дурным запахом, но и ядовиты.

Высокотоксичными для человека являются и образующиеся при гниении мяса птомаины (органические основания). Среди аэробов, наиболее эффективно разлагающих белки мяса, выделяют *B. pyocyaneum*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, стафилококки и стрептококки, а из анаэробов – *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum* и других представителей рода. Образующиеся аминокислоты активно разлагают *B. faecalis alcaligenes*, *B. aminoliticus*, *E. coli* и др. В процессах гниения мяса участвуют и плесневые грибы.

Подвергнутое этому виду порчи мясо в зависимости от органолептических, физико-химических и бактериологических показателей после проварки допускается на кормовые цели (в корм пушным зверям) или подвергается технической утилизации.

2. Закисание (кислотное брожение). Чаще всего этот вид порчи мяса наблюдается в мясных продуктах, богатых гликогеном, в том числе в печени, где он превращается в молочную кислоту. Мясо приобретает кислый вкус, бледно-серую окраску и мягкую консистенцию. Образующаяся кислота создает благоприятные условия для развития плесневых грибов, психрофильных лактобактерий, дрожжей. Продукты жизнедеятельности последних – NH_3 и азотистые основания, нейтрализуют среду и тем самым способствуют развитию гнилостных микроорганизмов.

3. Плесневение. Вызывается плесневыми грибами родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. Грибы плохо развиваются при -10°C и ниже. С целью профилактики плесневения необходимо проводить дезинфекцию холодильных камер, способствующую уничтожению спор, а мясо рекомендуется хранить в замороженном виде при низкой влажности и при недостатке O_2 .

4. Загар. Появляется в результате развития ферментативных процессов, иногда приводящих к тому, что мясо становится непригодным к употреблению. При этом в тканях накапливаются H_2S , масляная кислота и другие дурно пахнущие вещества. В связи с этим мясо приобретает дряблую консистенцию, а его цвет становится серовато-коричневым. Оценка пригодности такого мяса зависит от степени загара. С этой целью мясо в виде небольших кусков развешивают в холодильной камере с интенсивной циркуляцией воздуха и, если через 24 ч неприятный запах не исчезает, его считают непригодным в пищу.

5. Пигментация – это развитие на поверхности мяса бактерий, образующих пигменты. Мясо приобретает красный цвет при развитии *Serratia marcescens*, желтый – *Sarcina flava*, синий – *Pseudomonas aeruginosa*, зеленый – *Pseudomonas fluorescens*. Пигментированное мясо может употребляться в пищу при удалении с его поверхности пигментных пятен.

6. Свечение. Этот вид порчи вызывается фотобактериями (неспорообразующими Грам- и Грам+ палочками, кокками и вибрионами), попадающими в мясо с рыбы и рыбопродуктов при их совместном хранении. Фотобактерии не вызывают изменений мяса, так как используют энергию солнца, а не органических соединений, поэтому служат показателем свежести продукта - с появлением гнилостных микроорганизмов их жизнедеятельность обычно прекращается.

7. Ослизнение – процесс порчи мяса, связанный с развитием микроорганизмов, способных образовывать слизь: молочнокислых бактерий, дрожжей, микрококков. Причины порчи: недостаточное охлаждение туш, хранение при повышенной влажности и при температуре $2-10^{\circ}\text{C}$.

3. Правила отбора проб и подготовка к исследованию.

Проникновение бактерий в глубину мяса сопровождается снижением его качества. На этом основано бактериоскопическое исследование, позволяющее быстро установить степень его свежести (ГОСТ 23392-78). Количество бактерий и степень распада мышечной ткани определяют микроскопированием окрашенных по Граму мазков-отпечатков. Микроскопическое исследование мяса основано на определении количества бактерий в мазках-отпечатках и степени распада мышечной ткани.

Доброкачественность мяса определяют в сомнительных, спорных случаях оценки т.е. при первых признаках порчи (ослизнение, гнилостное разложение, загар и т.д.) При этом свежесть мяса устанавливают с помощью комплекса исследований — органолептических, биохимических и микроскопических.

Отбор проб для определения свежести мяса. От каждой туши или полутуши сомнительной свежести отбирают для исследования 3 образца массой не менее 200 г каждый целым куском из мышц бедра, лопатки и области 4-5-го шейных позвонков. В образцах кроме мышечной ткани должны быть сухожилия и жир. Образцы, взятые от одной туши, упаковывают в пергаментную бумагу (каждый отдельно), подписывают и отправляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают дату, место взятия проб, вид животного, номер туши, причину и цель исследования, подпись отправителя. Микробиологическое исследование мяса проводят также во всех случаях, когда предполагается наличие возбудителей зооантропонозов или возбудителей пищевых токсикозов и токсикоинфекций.

Согласно Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов предусмотрено проводить бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов при подозрении на сибирскую язву, рожу свиней, листериоз и другие инфекционные болезни в целях решения вопроса о возможности и порядке использования мяса и других продуктов убой животных.

Микробиологическое исследование также проводят в следующих случаях:

1. при вынужденном убое животных независимо от причины убоя и принадлежности животных, в том числе при отравлениях и подозрении в отравлении ядами;
2. при желудочно-кишечных заболеваниях, при тяжело протекающих заболеваниях дыхательных органов, при септико-пиемических заболеваниях;
3. при обнаружении серозных и фибриновых перикардитов у свиней, при обширных ожогах и во всех других случаях при подозрении на наличие сальмонелл или токсигенных кокков;
4. при удалении кишечника из туши позднее 2 ч с момента обескровливания животного;
5. при наличии сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить его пригодность в пищу путём ветеринарно-санитарного осмотра;
6. при недостаточном обескровливании туши;
7. при затруднении в определении пригодности мяса в пищу по данным санитарного анамнеза и осмотра на месте;
8. при расхождении результатов органолептической оценки и химических исследований;
9. при подозрении на то, что мясо или субпродукты послужили источниками пищевых отравлений.

В зависимости от конкретной ситуации показания могут быть расширены. Мясо, забракованное по органолептическим показаниям, микробиологическому исследованию, как правило, не подвергают, если не возникает необходимость выявления и идентификации патогенной микрофлоры (возбудителей сибирской язвы, БГКП, листереллёза, клостридиозов и др.).

Подготовка проб к исследованию. Каждый образец (мышцы, лимфатические узлы, паренхиматозные органы) перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в этиловый спирт-ректификат, 3 раза обжигают с поверхности. Затем стерильными ножницами из каждого образца (с различной глубины) вырезают кусочки. Лимфатические узлы разрезают пополам. Все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами.

Для последующих исследований готовят две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных

органов (печени, почек, селезёнки). Каждую пробу помещают в стерильный стакан (колбу) гомогенатора, добавляют по 135 см³ 0,9% раствора натрия хлорида и готовят взвеси в течение 2-5 мин. Полученные взвеси отстаивают 10 мин, и для исследований берут надосадочную жидкость. Выделение и идентификацию патогенных микроорганизмов проводят по общепринятым тестам.

В «Гигиенических требованиях к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (СанПиН 2.3.2.1280-03) к мясу, как важнейшему сырьевому ресурсу пищевой промышленности, предъявляются жесткие санитарно-микробиологические требования.

1. Способы консервирования мяса и мясопродуктов

Физические способы:

1. *Консервирование мяса низкой температурой.* Замораживание мяса целесообразно осуществлять при использовании поваренной соли. Наиболее чувствительны к понижению температуры патогенные микроорганизмы: при температуре ниже 10⁰С они вообще не развиваются.

2. *Консервирование мяса высокой температурой.* Осуществляют путем стерилизации в автоклавах при температуре 112–120⁰С. При наличии возбудителей происходит бомбаж. Различают 3 типа бомбажа:

- физический, который происходит в результате нагревания продукта, при охлаждении банок обычно исчезает;

- химический (или водородный) – результат взаимодействия содержимого банки с металлом, что сопровождается образованием H₂;

- микробиологический, являющийся результатом жизнедеятельности чаще всего анаэробных микроорганизмов, выделяющих газы, а также спор аэробов (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*) и термофильных кокков. Под влиянием проросших спор изменяется консистенция содержимого банок, вследствие чего развиваются протеолитические аэробы. В герметично укупоренных банках развиваются только анаэробы, среди которых самым опасным считается *Cl. botulinum*, чаще обнаруживаемый в растительных и рыбных консервах, реже – в мясных. Банки консервов, в которых обнаружен ботулинический токсин, уничтожают или перерабатывают на технические цели.

3. *Сушка.* Существуют различные способы сушки, но наиболее совершенным из них является *сублимация* (обезвоживание мяса под вакуумом, вследствие чего лед переходит в парообразное состояние, минуя жидкую фазу). Сублимационную сушку заканчивают после установления в мясопродуктах 2–3 %-ной влажности.

4. *Ультрафиолетовое облучение (УФО).* Осуществляют с помощью ламп БУВ-15 и БУВ-30. Лучший режим работы – 20–25⁰С, расстояние от лампы до продукта – 0,5–3,5 м. Мясо после облучения ультрафиолетом сохраняют 12 суток при температуре 17⁰С. Кроме консервирующего действия УФО способствует ускорению процесса созревания мяса, а также обеззараживанию воздуха в производственных помещениях, снижению обсемененности воды, рассолов, специй и др.

Химические способы:

1. *Посол.* Способ основан на свойствах NaCl повышать осмотическое давление, провоцировать эффект плазмолиза и тем самым ингибировать микробные процессы. В состав рассола помимо NaCl могут использоваться нитраты, фосфаты, глютаминат и аскорбинат натрия и сахар.

Посол мяса осуществляют, используя сухой, мокрый и смешанный методы. Сухой посол применяют в отношении мясопродуктов, содержащих большое количество жира. Посол шпика проводят в ящиках, на дно которых насыпают 1–1,5 см NaCl. Шпик укладывают шкуркой вниз, пересыпая каждый ряд солью. Продолжительность посола 14–16 суток при температуре в помещении 4–5⁰С.

Мокрый посол заключается в помещении мяса в крепкий (22,5–24,7 %) или слабый (18,0–10,4 %) рассол NaCl. Преимущества способа: быстрота приготовления солонины и равномерность распределения соли в продукте; недостатки: повышение потерь белков и фосфатов, высокая влажность, влекущие за собою недостаточную стойкость солонины при хранении.

Смешанный посол сочетает в себе два первых вида посола. Применяют для получения солонины с длительным сроком хранения и при изготовлении свинокопченостей. Куски мяса сначала натирают солью, а через 3–4 дня заливают таким же рассолом, как при мокром посоле.

2. *Копчение.* Кроме обезвоживания, мясо при копчении подвергается воздействию продуктов сухой перегонки древесины (фенола, крезола, скипидара, древесного спирта, формальдегида, смолы, муравьиной, уксусной и пропионовой кислот и др.).

Горячий способ, осуществляемый при температуре 43–53⁰С, применяют при копчении нежирных продуктов. Наиболее эффективно холодное копчение, применяемое для жирных мясoproductов и осуществляемое при 18–22⁰С в течение 3–7 суток. Консервирующие вещества за этот период глубоко проникают в толщу мяса. При копчении мясoproductов важно учитывать качество дыма. Так, лучшее качество достигается при использовании сырых и твердых пород деревьев, особенно дуба или ольхи. Для этой цели малопригодна береза и совсем непригодны ель и сосна.

3. *Использование газовой среды.* Существует способ сохранения мяса в специальных герметических камерах в атмосфере CO₂. Концентрация CO₂ 10–20% в среде обитания микроорганизмов угнетает жизнедеятельность многих из них даже в глубоких слоях мяса. При этом замедляется окисление жиров.

2. Санитарный контроль в колбасном производстве.

Колбасные и кулинарные изделия достаточно быстро становятся непригодными для употребления. Существует группа скоропортящихся мясных продуктов: студни, зельцы, ливерные колбасы, кровяные изделия, паштеты.

В процессе приготовления колбасных изделий колбасный фарш обсеменяется микроорганизмами, попадающими в него из различных источников. Степень исходной микробной контаминации колбасного фарша зависит от санитарно-гигиенических условий производства и соблюдения технологических режимов.

Контаминация колбасного фарша микроорганизмами. В колбасный фарш микроорганизмы могут попадать из различных источников на всех основных этапах технологического процесса его приготовления: из сырья, при подготовке мяса (разрубке туш, обвалке, жиловке), посоле, составлении колбасного фарша, наполнении колбасной оболочки фаршем.

Сырье. К сырью в колбасном производстве предъявляют высокие санитарные требования, поскольку оно является одним из источников микробного обсеменения.

Контаминация микроорганизмами сырья, благополучного в санитарном отношении (т. е. полученного от здоровых животных), также может быть различной в зависимости от санитарно-гигиенических условий его получения, хранения, транспортирования и предварительной обработки, а также температурных режимов. В несвежем и ослизшем, а также с загрязненной поверхностью (кровь, содержимое желудочно-кишечного тракта и др.) сырье микроорганизмы содержатся в большом количестве. В производство такое сырье допускают только после предварительной тщательной санитарной обработки (зачистка, промывание и т. д.).

Подготовка мяса. Количество микроорганизмов в мясе резко увеличивается при разрубке туш, обвалке, жиловке, так как эти операции выполняют вручную. В процессе разрубки, обвалки и жиловки мышечная ткань обнажается и измельчается, вследствие чего увеличивается площадь ее соприкосновения с внешней средой и становится неизбежным попадание в мясо различных гнилостных не спорообразующих и споровых бактерий, энтерококков, актиномицетов, плесневых

грибов, дрожжей, кишечной палочки, бактерий рода протеус, стафилококков и других сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов, а иногда и патогенных бактерий (сальмонелл и др.). Микроорганизмы попадают в мясо с рук рабочих, со спецодежды, инструментов, обвалочных столов, инвентаря, тары, из воздуха производственных помещений и др. Происходит также перераспределение микроорганизмов, имеющих на поверхности туши, на обнажаемые при разрезе новые (внутренние) участки мышечной ткани. Степень обсеменения мяса зависит от размеров кусков, на которые разделяют тушу: чем больше отношение поверхности к объему куска (т.е. меньше его величина), тем больше степень контаминация микроорганизмами. В целях максимального снижения степени микробного обсеменения сырья необходимо, чтобы процесс подготовки был кратковременным (не более нескольких часов) и проводился при пониженной температуре производственных помещений. Кроме того, следует строго соблюдать санитарно-гигиенический режим производства (тщательная санитарная обработка помещений, обвалочных столов, инструментов, тары, спецодежды, соблюдение правил личной гигиены рабочими и т. д.).

Посол. Дальнейшее увеличение количества микроорганизмов в мясе происходит главным образом в результате попадания вместе с посолочной смесью (или рассолом) различных солеустойчивых и солелюбивых гнилостных бацилл, пигментных кокков, дрожжей, спор плесневых грибов, актиномицетов и др. Для исключения этого источника дополнительного загрязнения мяса микроорганизмами рекомендуется для посола применять стерильную посолочную смесь.

Использование стерилизованных специй позволяет устранить этот источник микробного загрязнения фарша.

Наполнение колбасной оболочки фаршем. При набивке колбасных батонов в фарш из шприцев могут попадать микроорганизмы. Поэтому шприцы необходимо тщательно мыть и дезинфицировать. После набивки фарша в оболочку какое-либо дополнительное микробное обсеменение извне исключено. При последующих технологических операциях в зависимости от способа изготовления колбас происходят определенные изменения микрофлоры фарша.

Изменение микрофлоры фарша. При выработке вареных и полукопченых изделий после наполнения фаршем колбасные батоны подвергают осадке, обжарке, варке и охлаждению. Полукопченые колбасы дополнительно коптят и сушат.

Осадка. При соблюдении технологического режима (температура не выше 2°C, относительная влажность 85-95% и продолжительность не более 2-4 ч) состав микрофлоры фарша почти не изменяется. Повышение температуры и увеличение продолжительности осадки может привести к размножению микроорганизмов (в том числе иногда *C. perfringens* и других токсигенных бактерий) и увеличению общей микробной контаминации.

Обжарка. При обработке горячим дымом температурой 80-110°C в течение 0,5-2 ч оболочка (а частично и сам фарш с краев) пропитывается составными частями дыма и подсушивается. В результате этого создаются условия, неблагоприятные для размножения микробов на поверхности колбасных батонов. Под влиянием горячего дыма фарш нагревается. В колбасных батонах небольшого диаметра (3-5 см) температура в центре повышается до 40-50°C, а батонов большого диаметра (от 5-15 см и больше) — до 30-40°C. Следовательно, в батонах большого диаметра создаются условия, благоприятные для размножения микробов.

Варка. К концу процесса варки в глубине батонов температура в зависимости от вида колбас достигает 68-75°C. При таком температурном режиме погибает до 90 % и более микробов, содержащихся в сырых колбасах. При этом отмирают все не споровые патогенные и условно-патогенные бактерии: кишечная палочка и палочка протей, большинство сапрофитных не спорообразующих микроорганизмов (кокки,

молочнокислые бактерии, дрожжи и др.), вегетативные формы и часть спор спорообразующих бактерий. Под влиянием высокой температуры в процессе варки резко изменяется количественный и групповой состав микрофлоры колбасного фарша.

Копчение и сушка. Групповой состав микрофлоры полукопченых колбас после копчения и сушки не изменяется. Общее количество микроорганизмов несколько уменьшается, поскольку часть микробов, выживших при варке, отмирает в процессе дополнительной обработки.

При соблюдении всех санитарных норм и технологических режимов производства общая микробная контаминация (КОЕ) вареных и полукопченых колбас I и II сортов должна быть не выше 1000 и колбас III сорта не выше 2000 микробных клеток в 1 г.

В колбасах не должны содержаться патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (кишечная палочка и палочка протей).

Изменение микрофлоры фарша при выработке копченых колбас

При изготовлении сырокопченых колбас колбасные батоны подвергают длительной (5-7 сут.) осадке, холодному копчению (при 18-25°C) и сушке (до 1,5 мес.).

В ходе технологического процесса изготовления сырокопченых и вяленых колбас создаются условия замедляющие, но не исключающие жизнедеятельности микроорганизмов в продукте. Поэтому в фарше этих колбас размножаются некоторые группы микроорганизмов.

При созревании колбас их микрофлора изменяется не только количественно, но и качественно. Основную массу микрофлоры составляют грамотрицательные бактерии, в том числе из группы кишечных палочек и рода протейс, гнилостные спорообразующие, аэробные бациллы, анаэробные клостридии, энтерококки, стафилококки, а также в небольших количествах дрожжи, микрококки и молочнокислые бактерии.

В процессе созревания колбас состав микрофлоры становится более однородным: постепенно увеличивается количество молочнокислых бактерий, микрококков, а в некоторых колбасах и дрожжей.

В процессе копчения продукт пропитывается антисептическими веществами копильного дыма, подавляющими развитие микроорганизмов. Существенное воздействие на развитие микроорганизмов в сырокопченых и вяленых колбасах оказывают обезвоживание продукта и повышение вследствие этого концентрации соли. Обезвоживание и повышение концентрации соли происходит по всей толще продукта неравномерно. Поэтому в центральных, менее обезвоженных участках колбасных батонов благоприятные условия для размножения микроорганизмов сохраняются дольше, чем в поверхностных слоях.

Существенно влияют на изменение состава микрофлоры при созревании колбас антагонистические взаимоотношения между различными микроорганизмами. Многие штаммы молочнокислых бактерий, выделяемых из копченых колбас, обладают выраженным антагонизмом в отношении тест-культур кишечной палочки, обыкновенного протей, гнилостных аэробных бацилл, стафилококков. Активное размножение молочнокислых бактерий и микрококков объясняет факт постепенного увеличения общего количества микроорганизмов в первый период созревания колбас, когда значительная часть других микроорганизмов фарша отмирает под влиянием обезвоживания, повышенной концентрации соли, действия копильных веществ и антагонизма микробов.

Основная микрофлора сырокопченых и вяленых колбас (молочнокислые бактерии, микрококки, дрожжи) влияет на созревание и формирование специфических запаха, вкуса, цвета и других органолептических свойств продукта.

Варено-копченые колбасы подвергают менее длительной осадке (1-2 сут.), горячему копчению (при 50-60°C), варке, вторичному копчению (при 32-45°C) и менее продолжительной сушке (7-15 сут.).

Во время осадки и горячего копчения размножаются микрококки и молочнокислые бактерии, количество микробов в фарше увеличивается. При варке значительная часть микрофлоры фарша погибает.

Состав микрофлоры варено-копченых колбас в конце сушки (созревания): преобладают микрококки, молочнокислые бактерии, жизнедеятельность которых играет определенную роль в процессе формирования цвета, специфических запаха и вкуса продукта.

3. Отбор проб и пробоподготовка.

Для бактериологических исследований пробы отбирают с помощью стерильного ножа или других стерильных инструментов. Из выбранных единиц продукции берут разовые пробы и из них составляют общую пробу, а именно:

- от колбасных изделий - не менее двух разовых проб, ломтики по 15 см толщиной от края батона;
- от сосисок и сарделек - из разных мест, не нарушая целостности единиц продукции;
- от языков - с двух единиц продукции;
- от продуктов из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц - пробы по всей толщине, ломтики шириной не менее 10 см от двух единиц продукции;
- от окороков - срез по всей толщине, отбирают образцы шириной не менее 10 см;
- от изделий без оболочки (студней, паштетов и др.) - разовые пробы не менее, чем от трёх единиц изделий массой 200—250 г каждая.

Колбасные изделия – мясопродукт, предназначенный для употребления в пищу без дополнительной термической обработки. Поэтому к процессу приготовления колбас и готовому продукту предъявляются особо жесткие санитарные требования.

В зависимости от способа приготовления колбасные изделия делятся на группы: вареные, варено-копченые, полукопченые, сырокопченые, фаршированные, ливерные и др. Приготовление колбас сопровождается уменьшением исходного числа микроорганизмов на 95–98 %. В колбасных изделиях с повышенным содержанием жиров выживает большее количество бактерий, так как жир сам по себе создает так называемую защитную зону. Среди бактерий чаще всего выживают бациллы и кокки.

В связи с этим в колбасном производстве стараются использовать мясо и субпродукты только высокого качества, с удовлетворительными санитарными свойствами. В колбасном производстве следует придерживаться основных правил:

- мясо, жиры, специи и соль должны отвечать строгим санитарным требованиям;
- изготовление колбас должно проводиться в условиях, исключающих их обсеменение микроорганизмами;
- качество сырья и готовой продукции следует определять, руководствуясь требованиями нормативно-технической документации.

Колбасные изделия и мясные копчености необходимо направлять на техническую утилизацию при обнаружении в них патогенных микроорганизмов, плесеней и сопутствующих им видимых признаков недоброкачественности – гниения и кислотного брожения. Технической утилизации подлежат колбасные изделия, в которых выявляются бактерии группы кишечных палочек или рода *Proteus*, а также колбасы с измененными органолептическими показателями.

Переработке подлежат:

- вареные или полукопченые колбасы с сохранением нормальных органолептических показателей;

- сырокопченые колбасы, обсемененные сальмонеллами, но сохранившие нормальные органолептические свойства.

При обнаружении в колбасных изделиях и копченостях сапротрофитных аэробов (р. *Bacillus*) и патогенных спорообразующих анаэробов (р. *Clostridium*) на фоне сохранения ими благоприятных органолептических показателей их выпускают без ограничения. Заплесневевшие копченые колбасы также выпускают без ограничения после удаления плесеней с их оболочек.

Лекция №5 (2 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов»

1. Вопросы лекции:

1. Микрофлора свежей рыбы
2. Изменение микрофлоры рыбы во время ее хранения.
3. Отбор проб.
4. Микробиология рыбных продуктов

2. Краткое содержание вопросов:

1. Микрофлора свежей рыбы.

Рыба является ценным пищевым продуктом. В пищу используется морская рыба и рыба пресных водоемов. Температура тела рыбы существенно зависит от воды, в которой она обитает. Поэтому и микрофлора на поверхности рыбы также зависит от этой воды: в теплых морях значительная часть микроорганизмов приходится на мезофильные микроорганизмы, в умеренных и холодных регионах преобладают психрофильные микроорганизмы.

В воде могут находиться и патогенные микроорганизмы, прежде всего во внутренних водных бассейнах и в прибрежных морских водах из-за сброса неочищенных или плохо очищенных сточных вод. В воду могут попасть кишечные палочки, энтерококки, сальмонеллы, шигеллы, *Clostridium botulinum*.

Мясо рыбы по химическому составу близко к мясу животных. Оно содержит много белков, жира и воды, имеет более рыхлую консистенцию, так как в мышцах содержится меньше соединительной ткани, чем в мясе животных. Это способствует более быстрому распространению микроорганизмов в теле рыбы. Мышечная ткань рыб, как и мясо животных, в обычных условиях не содержит микроорганизмов. На поверхности чешуи, жабрах свежельвленной рыбы обнаруживается микрофлора родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*) и др. Контаминация рыбы начинается очень быстро после улова, преимущественно психрофильными микроорганизмами. Поэтому рыба — продукт, еще более подверженный порче, чем мясо животных. Мышечный сок и мышечная ткань свежельвленной рыбы считаются стерильными. Значительное число бактерий обнаруживается в покровной слизистой оболочке, на наружных жабрах и в желудочно-кишечном тракте. Число бактерий на 1 см² поверхности тела рыбы может составлять до $1 \cdot 10^6$.

Степень обсеменения зависит от окружающей среды, географического положения водоема, времени года, орудий лова и от рыбы. Например, в свежей морской рыбе, выловленной тралом, содержится в 10...100 раз больше бактерий, чем в свежельвленной на удочку. Причиной является завихрение морского унта (ила) при буксировке трала.

На поверхности свежельвленной морской рыбы содержится больше всего бактерий семейства *Achromobacteriaceae*, которые оставляют 60% всей микрофлоры, из них 35...40% бактерий относится к роду *Alcaligenes*. Менее 10 % всей естественной микрофлоры на поверхности рыб приходится на следующие роды: *Flavobacterium*,

Micrococcus, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Bacillus*. Иногда на поверхности рыбы встречаются пигментообразующие бактерии родов *Sarcina*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* или светящиеся виды *Photobacterium phosphoreum*.

Микрофлора пресноводных рыб в средней полосе России в первую очередь состоит из психрофильных микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*.

2. Изменение микрофлоры рыбы во время ее хранения.

После того как рыба попадет на борт судна, она поступает на хранение в бункеры, склады, ящики из дерева или пластмассы. Рыбу либо перерабатывают, либо замораживают. Гнилостная микрофлора рыбы, которая вызывает основную часть процессов разложения, развивается очень быстро при температуре 15-20⁰С. Эта микрофлора является естественной микрофлорой рыбы. Порча морской рыбы происходит в результате разложения белков, жиров и углеводов.

На поверхности уснувшей рыбы насчитывается 10⁵-10⁸ клеток гнилостных бактерий, среди которых выявляют множество спорообразующих анаэробов (*C. sporogenes*, *C. putrificum*). Наряду с ними обнаруживают микроорганизмы — возбудители пищевых отравлений: *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и даже палочки ботулизма (особенно в кишечнике осетровых рыб). На морской рыбе, выловленной в некоторых районах промысла, встречается галофильный вибрион (*Vibrio parahaemolyticus*) - возбудитель пищевых отравлений по типу токсикоинфекций.

Значительное количество добываемой рыбы перед хранением подвергают обработке: мойке, потрошению, разделке на филе. Мойка снижает численность микробов на поверхности рыбы, так как при этом удаляют богатую бактериями слизь. При потрошении рыбы неизбежно вскрытие кишечника, что ведёт к обсеменению гнилостными бактериями, поэтому после потрошения рыбу тщательно промывают. Увеличивается обсеменённость рыбы и при её разделке из-за инфицирования извне (с рук работников, с инвентаря, из воздуха). Для охлаждения рыбы нередко используют лёд, который по содержанию микроорганизмов должен соответствовать санитарным требованиям, предъявляемым к питьевой воде.

Свежая охлаждённая рыба - продукт кратковременного хранения (несколько дней), даже при температуре около 0⁰С. При этом мелкая рыба портится быстрее крупной. Порча наступает тем быстрее, чем выше температура хранения и чем больше на рыбе содержалось бактерий.

Развитие микроорганизмов сопровождается гнилостными процессами. Главными возбудителями порчи охлаждённой рыбы служат бактерии рода *Pseudomonas*. Псевдомонады не только быстрее других бактерий размножаются, но и обладают более высокой биохимической активностью по отношению к белковым веществам и жиру. В порче охлаждённой рыбы также принимают участие, хотя и в значительно меньшей степени, бактерии родов *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*.

Для более длительного хранения рыбу замораживают или подвергают другим способам консервирования: посолу, копчению, маринованию, вялению.

Замороженная рыба может длительно (месяцами) храниться при температуре не выше -12-15⁰С без признаков порчи.

В процессе замораживания многие микроорганизмы, содержащиеся на рыбе, погибают, но некоторые выживают. Одни из них в процессе последующего хранения постепенно отмирают, другие - длительно сохраняют жизнеспособность, при этом микробов сохраняется больше, чем ниже температура хранения. На замороженной рыбе обнаруживают преимущественно различные микрококки, а также палочковидные спорообразующие и неспорообразующие бактерии; споры плесеней встречаются в небольших количествах.

При размораживании, особенно медленном, происходит гибель некоторых микробов, но сохранившиеся начинают быстро размножаться.

3. Отбор проб.

Отбор проб для исследования осуществляют по общим правилам (ГОСТ 26668-85).

Рыбу охлаждённую, мороженую, солёную, пряную, маринованную, вяленую, сушёную и копчёную; солёные балычные полуфабрикаты и балычные изделия берут в количестве нескольких экземпляров.

Для гигиенических исследований отбирают по 3 куска массой до 100 г каждый:

- рыбу жареную, отварную, печеную;
- рыбные рулеты, котлеты, сосиски, колбасы;
- фаршированную рыбу;
- студень, зельц;
- заливную рыбу;
- изделия из икры и др.

Отбор средней пробы всех кулинарных изделий для микробиологических исследований проводят с соблюдением правил асептики стерильным ножом, ложкой, скальпелем в стерильные банки общей массой не менее 300 г от трёх единиц (упаковок).

Поверхность оболочечных изделий протирают спиртом. Из трёх батонов фаршевых изделий, соблюдая правила асептики, вырезают поперечные куски, затем разрезают их продольно и вырезают кусочки из центральной части и из-под оболочки.

Замороженную рыбу, рыбо- и морепродукты размораживают при температуре 18-20⁰С в течение 1-2 ч и затем отбирают пробу, так же как при исследовании незамороженных кулинарных изделий. Мелкую рыбу и мелкие нерыбные объекты морского промысла в количестве 10 шт. отбирают из разных мест обследуемой партии. Печёную рыбу обследуют целиком. Крупную рыбу или куски порционной рыбы и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не менее 3 шт. Из разных мест каждого образца стерильным скальпелем вырезают по 2-3 кусочка площадью 4 см², толщиной 4-5 см и переносят во взвешенную стерильную колбу.

Отобранную среднюю пробу измельчают в асептических условиях. Готовят десятикратные разведения.

4. Микробиология рыбных продуктов.

Посолю подвергают те виды рыбы, которые способны «созревать», т.е. приобретать специфические вкусовые качества и более мягкую консистенцию в результате превращения белков и липидов, происходящего под влиянием собственных ферментов. Различают три вида посола: мягкий, средний и сильный.

При мягком посоле в мышечной ткани рыбы содержание подваренной соли не должно быть выше 10%. Хранят такую рыбу при 2⁰С в течение 2 мес. При среднем посоле в мышечной ткани рыбы содержание поваренной соли составляет 10...12 %. Такая сельдь может храниться при 10⁰С в течение 3 мес. Кроме соли добавляют ещё сахар.

При сильном посоле в мышечной ткани рыбы содержание поваренной соли составляет 14%. Такая сельдь может храниться при 15⁰С в течение 6 мес.

Соленая рыба содержит мезофильные микроорганизмы, которые могут размножаться даже при температуре 5⁰С. Чаще всего микробной порче подвергается сельдь мягкого посола или сельдь, не закрытая рассолом. Основными *видами порока* соленой рыбы являются окрашивание в розово-красный цвет, появление коричневых пятен, бактериальное гниение.

Окрашивание сельди в розово-красный цвет чаще всего происходит на наружной поверхности рыбы, но оно не ведет к изменению органолептических свойств рыбы и может быть просто смыто водой. Окрашивание же внутренних мышечных слоев рыбы приводит к изменению органолептических свойств рыбы: появляется кисловатый запах. Возбудителями окрашивания сельди являются разные виды микроорганизмов, среди которых есть как палочковидные бактерии, так и кокки. Это галофильные бактерии. Рост их можно задержать, если снизить рН рассола до 5,1-5,5 путем добавления 0,01 % лимонной или винной кислоты.

Причиной появления коричневых пятен на поверхности служат плесневые грибы рода *Sporendonema*. Рост плесневых грибов подавляется при температуре хранения 5°C.

Бактериальное гниение обнаруживается при мягком посоле сельди. При сильном посоле обычные возбудители гниения не могут размножаться.

Маринованная рыба. Рыбу маринуют в маринаде, содержащем 6% уксуса и 13% поваренной соли при pH 2,8. Завершение процесса созревания определяется по помутнению мяса рыбы. Содержание микроорганизмов на рыбе при мариновании уменьшается в 10-1000 раз. Погибают грамотрицательные психрофильные микроорганизмы, сальмонеллы и стафилококки. Выживают лактобациллы, бактериальные споры.

Для маринования наиболее подходит уксусная кислота, которая отличается наиболее высокой эффективностью: она тормозит развитие лактобацилл, быстро проникая в мышечную ткань рыбы. При мариновании протеолитические ферменты рыбы расщепляют белок до аминокислот, что является важным фактором созревания рыбы. В маринад добавляют пряности (перец, горчичное семя). Хранят маринованную рыбу в герметично закрытой таре.

Основными возбудителями порчи маринованной рыбы являются гетероферментативные молочнокислые бактерии *Lactobacillus muchneri*, *Lactobac. brevis*. В результате жизнедеятельности бактерий выделяется газ, что приводит к бомбажу банок.

Рыба, приготовленная сухим посолом (треска, сайда). Перед посолом отделяют голову рыбы, удаляют внутренности. Рыбу укладывают в бочки, где ее выдерживают в рассоле в течение 48-72 ч, после чего высушивают. В конце процесса сушки мясо рыбы содержит 35% воды и 12% поваренной соли (NaCl), иногда 25% NaCl. Соленую рыбу сушат таким образом, чтобы могла втекать вода, поглощаемая поваренной солью. Сушится рыба несколько месяцев. Развитие микроорганизмов тормозится высоким содержанием NaCl и процессом сушки.

Копченая рыба. Существуют два вида копчения: горячее и холодное.

Перед горячим копчением рыбу солят, затем обрабатывают в коптильной печи при 85- 95°C. Копчение способствует уменьшению на 25-35% влаги в мясе рыбы. Внутри рыбы температура должна подняться до 65°C в течение 30 мин. Такая температура гарантирует уничтожение психрофильных и мезофильных микроорганизмов, особенно патогенных. После обработки дымом мясо рыбы становится стерильным еще и потому, что в дыме содержится целый ряд веществ, обладающих бактерицидными свойствами. При этом химические вещества дыма не проникают внутрь мяса рыбы.

Холодное копчение производится дымом при 18-26°C в течение 2-4 сут. При этом происходит удаление воды и проникновение составных частей дыма в мясо рыбы.

Видами порчи копченой рыбы являются влажное гниение, сухое гниение и плесневение.

Влажное гниение вызывают психрофильные бактерии, которые вызывают изменения в мышечной ткани копченой рыбы: она становится влажной, липкой, издает острый гнилостный запах.

Сухое гниение вызывают микрококки и аэробные спорообразующие бактерии, которые сохранили жизнеспособность во время копчения, дрожжи и сарцины. Рыба приобретает матовый оттенок, мышечная ткань становится рыхлой.

Рыба горячего копчения хранится ограниченное время.

Плесневение наиболее часто встречается на поверхности рыбы, возбудителями являются плесневые грибы, которые попадают на рыбу как во время копчения, так и после него.

Отравления копченой рыбой могут возникнуть из-за содержания на ней сальмонелл, чаще всего *S. typhimurium*. Отравления может вызывать также *C. botulinum* — возбудитель ботулизма.

Лекция №6 (2 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов»

1. Вопросы лекции:

1. Источники обсеменения молока посторонней микрофлорой. Динамика развития микроорганизмов в молоке при хранении.
2. Санитарно-микробиологическая характеристика молока.
3. Пороки молока микробного происхождения.
4. Возбудители инфекционных болезней, передаваемые через молоко.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Источники обсеменения молока посторонней микрофлорой. Динамика развития микроорганизмов в молоке при хранении.

Молоко – ценнейший продукт питания, в нем содержится более 200 различных питательных и биологически активных веществ. В составе белков молока содержится 20 аминокислот, в том числе, незаменимые – лизин, метионин, триптофан и др. В молоке присутствуют жирные кислоты, большинство из которых являются непредельными, а поэтому очень легко усваиваются организмом человека. В молоке присутствуют как жирорастворимые витамины (А, D, Е, К), так и практически весь спектр водорастворимых, в том числе С, Р, В₁, В₂, В₆, В₁₂.

Молоко служит хорошей питательной средой для микроорганизмов. При благоприятных условиях они размножаются в молоке, ухудшая его качество. К специфической микрофлоре молока и молочных продуктов относят возбудителей молочнокислого, спиртового и пропионовокислого брожения. Процессы, обеспечиваемые жизнедеятельностью этих микроорганизмов, лежат в основе приготовления кисломолочных продуктов (творога, кефира, простокваши, ацидофилина и др.).

Бактерии молочнокислого брожения считаются нормальной микрофлорой молока и молочных продуктов. Главную роль при скисании молока и молочных продуктов играют молочнокислые стрептококки *S. lactis*, *S. cremoris* и др. Менее активные виды молочнокислых стрептококков (*S. citrovorus*, *S. lactis subsp. diacetylactis*) продуцируют летучие кислоты и ароматические вещества и поэтому широко используются при получении сыров. В группу молочнокислых бактерий также входят молочнокислые палочки: (*L. acidophilus*, *L. casei* и др.). Спиртовое брожение молока и молочных продуктов вызвано в основном дрожжами (*Saccharomyces lactis* и др.).

Неспецифическую микрофлору молока составляют гнилостные бактерии (род *Proteus*), аэробные и анаэробные бациллы (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *C. putrificum*) и многие другие. Эти микроорганизмы разлагают белок молока, участвуют в молочнокислом брожении и придают молоку неприятный вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов плесенью родов *Mucor*, *Oidium*, *Aspergillus* и др. придаёт им вкус прогорклого масла. БГКП, попадая в молоко, вызывают изменение вкуса и запаха молока. Другие виды грамотрицательных бактерий (*B. fluorescens*, *P. putrificiens* и др.) обладают различной степенью протеолитической активности и придают молоку и молочнокислым продуктам прогорклый горький вкус и гнилостный запах.

Основными источниками обсеменения молока служат кожа и вымя животного, загрязненные навозом, кормами.

Источником микрофлоры молока может быть сухой корм, при раздаче которого образуется много пыли. В этом отношении применение доильных машин значительно уменьшает возможность попадания микроорганизмов из воздуха. Плохой силос, корма, загрязненные почвой, способствуют обсеменению продуктов маслянокислыми бактериями.

Болезнетворные бактерии и кишечная палочка могут попасть в молоко с рук и одежды обслуживающего персонала.

При централизованном вывозе молока предусматриваются его охлаждение и временное хранение на ферме в течение 12–20 ч. В молоке, поступившем на молокосборные пункты с задержкой или оставленном на хранение, развиваются микроорганизмы, проходя несколько фаз.

Бактерицидная (антимикробная) фаза. В молоке после его получения бактерии не размножаются, иногда их количество даже уменьшается. Это объясняется тем, что в свежем молоке содержатся вещества, подавляющие развитие бактерий. Это - антитела (антитоксины, агглютинины, бактериолизины и др.), иммуноглобулины, лизоцим, ферменты (пероксидазы) и др. Они синтезируются в молочной железе или поступают из крови. Продолжительность бактерицидной фазы зависит от количества бактерий (чем меньше бактерий в молоке, тем длительнее бактерицидная фаза), температуры хранения (с понижением температуры бактерицидная фаза увеличивается), индивидуальных свойств животного (молоко разных животных обладает неодинаковыми бактерицидными свойствами).

Чтобы продлить бактерицидную фазу, молоко после его получения нужно немедленно охладить. При нагревании до температуры пастеризации (выше 60°C) молоко теряет бактерицидные свойства, так как разрушаются антимикробные вещества.

Фаза смешанной микрофлоры. С инаktivацией лизоцима, и других веществ заканчивается антимикробная фаза, начинается развитие всех групп микроорганизмов (если молоко хранится при температуре выше 10°C), попавших в молоко и способных развиваться при данной температуре. В конце этой фазы преобладают молочнокислые бактерии, которые образуют молочную кислоту. Они подкисляют среду и подавляют развитие психрофильных микроорганизмов - флуоресцирующих и других бактерий (микрококков, споровых палочек, бактерий группы кишечной палочки), разлагающих белки, жиры, выделяющих продукты жизнедеятельности и ухудшающих качество молока.

При охлаждении молока от 8 до 0°C молочнокислые бактерии не развиваются. Молоко несколько суток остается без видимых изменений, однако при его длительном хранении численность психрофильных микроорганизмов постепенно нарастает. Поэтому хранение и транспортировку молока на завод необходимо осуществлять без задержки, подвергая его там механической и термической обработке.

Фаза молочнокислых бактерий. Начинается при температуре хранения молока выше 10°C. Начало этой фазы - нарастание кислотности и преобладание молочнокислых стрептококков (свыше 50% от общей численности бактерий). В разгар данной фазы преобладают молочнокислые бактерии, главным образом молочнокислые стрептококки, увеличивается кислотность молока до 60°Т и выше, происходит его сквашивание. Когда кислотность молока становится предельной для стрептококков (120°Т), они начинают отмирать, продолжают развиваться молочнокислые палочки, как более кислотоустойчивые. После увеличения кислотности до 250-300°Т погибают и молочнокислые палочки.

Фаза развития дрожжей и плесеней. На поверхности кислого молока первоначально развиваются молочная плесень, пенициллы и дрожжи. В результате жизнедеятельности плесеней кислотность молока снижается вследствие частичного потребления ими молочной кислоты и нейтрализации ее щелочными продуктами, образующимися при распаде белка. При снижении кислотности создаются благоприятные условия для развития гнилостных бактерий, которые еще более ускоряют разложение белков молока. При хранении молока в естественных условиях проявляются такие типы взаимоотношений, как антагонизм и метабиоз. Молоко постепенно разлагается.

2. Санитарно-микробиологическая характеристика молока.

К молоку как к сырью для производства высококачественных молочных продуктов предъявляют требования по органолептическим, физико-химическим и санитарно-ветеринарным показателям согласно ГОСТ Р 52054–2003.

С 1970 г. по настоящее время в РФ ГОСТ на сырое молоко менялся трижды: при этом требования к композиционным свойствам молока, то есть органолептическим показателям, степени чистоты, кислотности, плотности оставались без изменения; но повышались требования к технологическим свойствам молока и его безопасности. Основным показателем сортности молока во всех случаях является его общая бактериальная обсемененность.

Выявление соматических клеток в молоке является важным диагностическим фактором его качества. Европейский стандарт допускает их наличие в количестве не более 250 тыс./см³, а по ГОСТ РФ от 2003 г. – не более 500 тыс. в 1 см³. Примесь 5–10% молока от больных скрытым маститом коров делает все молоко непригодным для переработки на сыры и молочные продукты. Молоко, идущее на выработку продуктов детского питания, сычужных сыров, стерилизованных продуктов, должно отвечать требованиям высшего и первого сортов, но с содержанием соматических клеток не более 500 тыс./см³. Молоко от больных или подозреваемых в заболевании животных, использование которого разрешается ветеринарным надзором только после тепловой обработки, принимается как несортное и перерабатывается отдельно.

На молочных заводах молоко подвергают пастеризации. Пастеризованным называют молоко, нагретое до температуры 63⁰С и выше, но ниже точки кипения, немедленно охлаждаемое и разлитое в тару. Для всех видов пастеризованного молока степень чистоты по эталону должна быть не ниже I группы, кислотность – 21⁰Т; для молока повышенной жирности – 20⁰Т, а для белкового – 25⁰Т. В зависимости от бактериальной обсемененности пастеризованное молоко делят на 2 группы: общее количество бактерий в 1 мл пастеризованного молока группы А (разлитое в бутылки или пакеты) должно быть не более 75 тыс. в мл, титр *E. coli* – 3 мл; в молоке группы Б – соответственно 100 тыс./мл и 0,3 мл. ОМЧ пастеризованного молока во флягах и цистернах не более 300 000 КОЕ в мл, титр кишечной палочки – 0,3 мл.

Молоко, предназначенное для детских учреждений, должно иметь кислотность не более 19⁰Т и по микробиологическим показателям соответствовать молоку группы А. Пастеризованное коровье молоко не должно содержать патогенных микроорганизмов.

Сливки согласно ТУ 10.02.02.789.08 вырабатывают с содержанием жиров 10, 20, 35% из коровьего молока путем его сепарирования. В основном их используют для производства масла и сметаны. В зависимости от бактериальной обсемененности их делят на две категории: пастеризованные сливки группы А, содержащие не более 100 тыс. бактерий в 1 мл, титр *E. coli* – 3 мл; пастеризованные сливки группы Б, содержащие не более 300 тыс. бактерий в 1 мл, титр *E. coli* – не более 0,3.

3. Пороки молока микробного происхождения.

Различают несколько видов пороков молока, вызываемых различными микроорганизмами:

- горький вкус придают молоку гнилостные микроорганизмы, в частности сенная и картофельная палочки, дрожжи;

- прогорклость возникает при длительном хранении молока на холоде в связи с гидролизом жиров, происходящим под воздействием бактериальной липазы, выделяемой представителями родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*;

- сильное газообразование, появляющееся при брожении за счет развития в сыром молоке *E. coli* и других представителей БГКП, а также дрожжей-сахаромицетов, а в пастеризованном молоке – за счет развития маслянокислых бацилл. Сыр, выработанный из такого молока, пронизан большим количеством пузырьков, при слиянии которых образуются полости. Такой продукт быстро теряет свою питательную ценность и товарный вид;

- «тягучее молоко», которое образуется при размножении в нем так называемой палочки тягучего молока (*Bact. lactis viscosum*);

- изменение цвета вызывают пигментные бактерии, образующие колонии синего, красного и оранжевого цвета.

4. Возбудители инфекционных болезней, передаваемые через молоко.

Молоко и молочные продукты могут становиться причиной серьезных заболеваний человека.

К болезням, общим для человека и животных, возбудители которых передаются через молоко, следует в первую очередь отнести зоонозы:

- туберкулез – хроническое заболевание животных. Выделяясь с молоком, микобактерии туберкулеза способны долго сохраняться во внешней среде. В обычных условиях они выживают в течение 10 дней, в сливочном масле, хранящемся на холоде, – до 300 дней, в сырах – до 200. Молоко из неблагополучного по туберкулезу хозяйства пастеризуют непосредственно на ферме при температуре 85⁰С в течение 30 минут или при температуре 90⁰С в течение 5 мин. Обеззараженное таким способом молоко, полученное от животных оздоравливаемых групп, отправляется на молокозавод, где его повторно пастеризуют и принимают вторым сортом. Молоко животных, положительно реагирующих на туберкулин, обеззараживают кипячением, после чего используют при откорме молодняка. Молоко, полученное от животных с клиническими признаками туберкулеза, используют в рационе откормочных животных после 10-минутного кипячения. Молоко уничтожается при туберкулезе вымени.

- Бруцеллез – хроническая болезнь животных. Выявляется в молоке кольцевой пробой, основанной на обнаружении соответствующих антител. Бруцеллы способны сохраняться в масле и сыре до 40–60 дней. Они чувствительны к высоким температурам и при 70⁰С погибают через 30 минут, а при 85–90⁰С – через 20 сек. В хозяйствах, неблагополучных по бруцеллезу, запрещается вывоз молока оздоравливаемого стада в необеззараженном виде. Такое молоко пастеризуют и либо вывозят на молокозавод, либо используют внутри хозяйства. Молоко коров, положительно реагирующих на бруцеллез, кипятят и используют на внутрихозяйственные нужды.

- Лейкоз. Молоко клинически больных лейкозом коров подлежит обязательному уничтожению. Молоко животных, подозреваемых в заболевании лейкозом, может быть использовано в пищу только после соответствующего обеззараживания: кипячения в течение 5 мин или пастеризации в течение 30 мин.

- Мастит – воспаление вымени дойных коров, вызываемое стафилококками (*S. aureus*, *S. saprophhyticus*), стрептококками (*Str. pyogenes*), синегнойной палочкой (*Ps. aeruginosa*). Из молока больных маститом животных невозможно приготовить качественные молочные продукты. Небольшая примесь такого молока в сборном молоке, полученном от группы коров, значительно ухудшает качество сыров и уменьшает выход этого продукта. Если в молоке животных, больных маститом, не обнаруживаются органолептические изменения, его пастеризуют. Но если в молоке обнаруживаются гной и хлопья, его уничтожают.

1. Источники первичной микрофлоры кисло-молочных продуктов.

Кисло-молочные продукты существенно различаются между собой, так как при их производстве используют чистые культуры разных молочнокислых бактерий, продукты жизнедеятельности которых обуславливают качество продуктов и предохраняют их от развития сапрофитных и патогенных микроорганизмов.

Различают три источника первичной микрофлоры кисло-молочных продуктов: микрофлора молока или сливок; микрофлора закваски; микроорганизмы, попадающие с оборудования в пастеризованное молоко и в продукты в процессе их производства.

Микрофлору молока, используемого для кисло-молочных продуктов, определяют микроорганизмы, оставшиеся в нем после пастеризации. Применяют достаточно

эффективные режимы пастеризации молока. Например, для получения обыкновенной простокваши молоко пастеризуют при температуре 85...90⁰С в течение 5...10 мин, а для получения творога — при температуре 78...80⁰С в течение 20...30 с. При этом уничтожаются почти все микроорганизмы в виде вегетативных клеток, в том числе патогенные и токсигенные бактерии. В пастеризованном молоке остаются в жизнеспособном состоянии споры бацилл и клостридий, термофильные молочнокислые палочки и стрептококки. Общее число этих микроорганизмов в 1 мл превышает нескольких сотен или тысяч.

Микроорганизмы с оборудования попадают в молоко после пастеризации и в процессе производства кисло-молочных продуктов (до 500 тыс. в 1 мл) в зависимости от санитарно-гигиенических условий на производстве. Среди них обнаруживаются энтерококки, микрококки, стафилококки, кишечные палочки, гнилостные и молочнокислые бактерии. Общее число посторонних микроорганизмов пастеризованного молока и микробов, попадающих с оборудования, примерно в 1000 раз меньше числа микроорганизмов, вносимых с закваской. Однако они могут ухудшить качество продукта, а в случае попадания патогенных микробов представляют опасность для здоровья человека.

Основным источником первичной микрофлоры кисло-молочных продуктов является микрофлора закваски.

При приготовлении заквасок применяют комбинации чистых культур различных молочнокислых бактерий: активных кислотообразователей - молочнокислого и сливочного стрептококков (*Str. lactis*, *Str. cremoris*), болгарской и ацидофильной палочек (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*), ароматобразующих бактерий (*Str. diacetylactis*, *Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*).

Жидкие закваски готовят на свежем обезжиренном молоке, которое стерилизуют в течение 10 мин. Для закваски берут смесь культур, входящих в состав ее микрофлоры. С этой целью небольшое количество стерильного обезжиренного молока подогревают до температуры развития молочнокислых бактерий. Заквашивают 2-3% смеси культур и помещают в термостат для развития данных бактерий. Как только образуется сгусток, колбу вынимают из термостата и хранят при 10⁰С. Срок годности жидкой закваски 2-3 недель, затем образуется молочная кислота, которая постепенно подавляет развитие молочнокислых бактерий.

Сухие закваски получают из жидких заквасок, подвергнув после сквашивания высушиванию одним из следующих способов: смешиванием с крахмалом в сушильном шкафу, распылительной сушкой или методом сублимации (вымораживание). Закваски, высушенные методом сублимации, наиболее активны.

Число клеток микроорганизмов закваски составляет от 50 до 500 млн. в 1 мл молока. По методу ферментации кисло-молочные продукты делятся на:

1. Молочно-кислые (простокваша, йогурт, сметана, творог). В качестве специфической микрофлоры используют культуры бактерий.
2. Продукты смешанной ферментации (кефир, кумыс), когда в качестве закваски используют смесь бактерий и дрожжей (молочно-кислая и спиртовая ферментация).
2. Отбор проб и санитарно-микробиологическое исследование кисло-молочных продуктов.

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТом 26809-86 «Молоко и молочные продукты. Правила приёмки, методы отбора и подготовки проб к анализу». Пробы для микробиологических анализов молока и молочных продуктов отбирают до взятия образцов для изучения физико-химических и органолептических признаков. Пробы жидких и полужидких продуктов отбирают после тщательного перемешивания стерильным черпаком и переносят около 50-60 см³ в стерильную посуду. От молока, расфасованного в бутылки, пакеты, кисломолочных продуктов отбирают по 2 образца (количество образцов в выборке может достигать 4-5 в зависимости от величины партии). Пробы сливочного масла, творога,

сыра отбирают с помощью профламбированного шупа из разных мест тары. Поверхность сыра в том месте, где будет взята проба, прижигают раскалённым ножом или шпателем. Отобранные точечные пробы переносят в посуду и тщательно перемешивают, составляя объединённую пробу, предназначенную для анализа: молоко - 1 л; масло, сыры — в среднем 100—150 г. Молочные консервы отбирают по 2 банки от партии. Сухое молоко, сухие сливки отбирают из разных мест с помощью стерильной ложки - всего около 200 г продукта.

Все отобранные пробы помещают в стерильные банки или бутылки с хорошо закрывающимися крышками. Пробы пломбируют или опечатывают и немедленно отсылают в лабораторию. Разрешённое время транспортировки скоропортящихся продуктов до начала исследования (при температуре не выше 6 °С) составляет не более 4 ч.

Подготовка проб к исследованию

Молоко и сливки тщательно перемешивают. Из твёрдых продуктов (сыр, творог) готовят навеску 10 г. Затем продукт тщательно растирают и изготавливают 10% взвесь в 0,9% растворе натрия хлорида (90 см³). Масло и мороженое предварительно растапливают на водяной бане при температуре 30±2⁰С. Для приготовления разведений используют нижний слой получившейся суспензии. Действующий ОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа» предусматривает определение МАМ, ФАМ и БГКП (КОЕ/г), коагулазоположительного *S. aureus*.

Дополнительным методом ориентировочной характеристики микрофлоры кисломолочных продуктов служит микроскопия мазка, приготовленного из цельного или разведённого материала. Мазки фиксируют и окрашивают 10% метиленовым раствором.

3. Пороки кисло-молочных продуктов бактериального происхождения.

К порокам творога относятся излишняя кислотность, тягучесть сгустка и вспучивание.

Кислый вкус обусловлен интенсивным развитием термоустойчивых молочнокислых палочек из-за замедления процесса сквашивания, вызванного ингибиторным действием содержащихся в молоке антибиотиков, остатков моющих-дезинфицирующих средств. Для предупреждения возникновения этого порока надо выявить и устранить его причину.

Тягучесть сгустка вызывается мезофильными молочнокислыми стрептококками закваски, которые под влиянием мало изученных причин приобретают способность образовывать слизистые сгустки. Иногда из этих сгустков выделяют уксуснокислые бактерии, которые тоже являются возбудителями этого порока. Тягучесть сгустка приводит к замедленному, а иногда и полному прекращению отделения его от сыворотки.

Вспучивание вызывают дрожжи, которые попадают в творожный цех с кефирной закваской или кефиром. Вспучивание может происходить и при развитии в твороге кишечной палочки, которая попадает с оборудования. Сметана готовится при использовании закваски, состоящей в основной доле из мезофильных (*Str. lactis*) и термофильных (*Str. thermophilus*) стрептококков.

Основными видами порчи сметаны являются вспучивание, кислый вкус, тягучесть сгустка и плесневение. *Вспучивание* происходит в результате развития дрожжей, попадающих в сметану с оборудования, рук работников, из воздуха. Повышенные температуры хранения сметаны способствуют возникновению этого порока.

Кислый вкус связан с развитием термоустойчивых молочнокислых палочек, попадающих в сливки с оборудования. Развитию палочек способствует также повышение температуры сквашивания и большое количество вносимой закваски.

Тягучесть, или излишняя вязкость сгустка, обусловлена способностью молочнокислых стрептококков образовывать слизистые сгустки с комочками жира и белка. Чтобы избежать этого порока, необходимо сменить закваску.

Плесневение вызывает белая молочная плесень *Oidium lactis*, развивающаяся при длительном хранении сметаны при низких положительных температурах.

Лекция №7 (4 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование консервов»

1. Вопросы лекции:

1. Понятие консервирования. Классификация консервов.
2. Особенности производства консервов.

2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие консервирования. Классификация консервов.

Консервы (от лат. *conserve* — сохранять) - пищевые продукты, приготовленные из предварительно обработанного животного или растительного сырья, помещённые в жестяную или стеклянную тару и подвергнутые стерилизации в целях предохранения их от порчи при длительном хранении.

Консервы подразделяют на три основные группы:

1. собственно консервы (полные консервы);
2. полуконсервы;
3. пресервы.

К первой группе относят консервы, микробиологическая стабильность которых не зависит от продолжительности хранения при температуре, рекомендованной для данного вида продукции. В этом случае стерилизацию осуществляют автоклавированием, гарантирующим полное освобождение от микрофлоры.

Полуконсервы — это пищевые продукты в герметичной таре, подвергнутые тепловой обработке, которая обеспечивает:

- гибель нетермостойкой неспорообразующей микрофлоры;
- снижение количества спорообразующих микроорганизмов;
- микробиологическую стабильность и безопасность продукта в течение ограниченного срока годности при температуре 6°C и ниже.

Мясные, ветчинные полуконсервы, шпик, сосиски стерилизуют при температуре 100-110°C. Содержание при температуре 2-15°C гарантирует их сохранность и безопасность.

Продукты, законсервированные без применения термической стерилизации, называют пресервами (от франц. *preserver* - предохранять). Их можно хранить лишь короткое время и только при температуре 0—5°C.

На основании принятого в нашей стране порядка санитарно-гигиенического контроля консервы делят на несколько групп. При этом принимают во внимание величину pH консервируемого продукта, рецептуру консервов, режим термической обработки и условия реализации в торговой сети.

Выделяют следующие группы консервов:

- **группа А** — консервированные пищевые продукты, имеющие pH 4,2 и больше, а также овощные, мясные, мясорастительные, рыбно-растительные и рыбные консервированные продукты с нерегулируемой кислотностью, приготовленные без добавления кислоты; компоты, соки и пюре из абрикосов, персиков и груш с pH 3,8 и больше; сгущённые стерилизованные молочные консервы; консервы со сложным сырьевым составом (плодово-ягодные, плодово-овощные и овощные с молочным компонентом);

- **группа Б** — консервированные продукты, содержащие томаты:

- неконцентрированные продукты (цельноконсервированные томаты, томатные напитки) с содержанием сухих веществ менее 12%;
- концентрированные продукты, с содержанием сухих веществ 12% и более (томатная паста, томатные соусы, кетчупы и др.);

• **группа В** — консервированные слабокислые овощные маринады, соки, салаты, винегреты и другие продукты с рН 3,7-4,2, в том числе огурцы консервированные, овощные и другие консервы с регулируемой кислотностью;

• **группа Г** — консервы овощные, фруктовые и плодово-ягодные пастеризованные с рН меньше 3,7; консервы для общественного питания с сорбиновой кислотой и рН 4,0 и меньше; консервы из абрикосов, персиков и груш с рН меньше 3,8; овощные, фруктовые (из цитрусовых), плодово-ягодные, в том числе с сахаром, натуральные с мякотью, концентрированные, пастеризованные соки с рН меньше 3,7; соки консервированные из абрикосов, персиков и груш с рН 3,8 и меньше; напитки и их концентраты на растительной основе с рН 3,8 и меньше, фасованные методом асептического розлива;

• **группа Д** - пастеризованные мясные, мясорастительные, рыбные и рыбно-растительные консервированные продукты (шпик, солёный и копчёный бекон, сосиски, ветчина и др.);

• **группа Е** - пастеризованные газированные фруктовые соки и газированные фруктовые напитки с рН 3,7 и меньше.

Консервированные продукты групп А, Б, В, Г и Е относят к полным консервам, а группы Д - к полуконсервам.

2. Особенности производства консервов.

Обязательные условия производственного процесса — доброкачественное сырьё и строгое соблюдение технологии и санитарного режима. Сырые продукты тщательно сортируют, очищают и моют в проточной воде. Подготовленный полуфабрикат укладывают в чистые банки и при необходимости заливают рассолом, соусом или сиропом.

Способы консервирования:

- термическая стерилизация;
- пастеризация;
- замораживание;
- сушка;
- копчение;
- соление;
- маринование;
- квашение;
- добавление сахара;
- использование антибиотиков, антисептиков и др.

Высокая температура - один из наиболее распространённых способов консервирования пищевых продуктов. Стерилизации обычно подвергают консервы мясные, мясорастительные, рыбные, консервы для диетического питания, соки овощные и др. Такие консервы при правильном режиме стерилизации и герметичности тары могут сохраняться годами.

Стерилизацию консервов проводят в автоклавах под давлением. В целях освобождения от кислорода для предотвращения окисления металла и недопущения развития аэробных микроорганизмов перед герметизацией из банок удаляют воздух. Кроме того, этот приём, называемый экстастированием, улучшает условия стерилизации, снижая давление внутри банки. Уровень температуры и длительность её воздействия устанавливают в зависимости от размеров тары, вида продукта, его кислотности, жирности, консистенции и других факторов. Большое значение имеет микробная обсеменённость консервируемого продукта, которая перед стерилизацией не должна быть больше допустимой. Консервы в стеклянных банках стерилизуют при меньшей температуре, но дольше, чем консервы в жестяной таре. В кислой среде стерилизация проходит быстрее. Жиры, белки, сахара и ряд других веществ в определённой мере защищают микробы от действия высокой температуры, поэтому продукты, содержащие их в больших количествах, стерилизуют дольше. Чем выше температура, тем полнее будет стерилизующий эффект, однако, при этом возможно денатурирование белка в продукте,

что снизит его вкусовые качества и испортит внешний вид. Обычно стерилизацию проводят в течение 40—90 мин при температуре 108—120°C. Другие способы консервирования направлены либо на уничтожение микроорганизмов, либо на временное прекращение их жизнедеятельности (например, путём высушивания, добавления соли, сахара).

Степень влажности продукта выражают понятием «активность воды» (A_w), которое позволяет оценить доступность содержащейся в продуктах воды для метаболизма микроорганизмов.

1. Санитарно-гигиенический контроль качества консервов.

Контроль качества консервов регламентируют следующие нормативные документы: «Инструкция о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания» (№ 01-19/9-11 от 21.07.92) и ГОСТ 30425-97 «Консервы. Метод определения промышленной стерильности».

Критерием безопасности (промышленной стерильности) консервированных пищевых продуктов служит отсутствие:

- микроорганизмов, способных развиваться при температуре хранения, установленной для конкретного вида консервов;
- микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья человека (см. Приложение 8 к СанПиН 2.3.2.1078-01).

В части банок после проведения стерилизации может сохраняться небольшое количество так называемой остаточной микрофлоры. В таких консервах обнаруживают, главным образом, спорообразующие формы микробов. Среди них чаще всего встречаются как аэробные микроорганизмы — *B. subtilis*, *B. mesentericus*, так и анаэробные — *C. sporogenes*, *C. putrificus* и др. Значительную долю остаточной микрофлоры консервов составляют термофильные микробы. Некоторые из них в процессе своей жизнедеятельности образуют газообразные продукты и вызывают порчу консервов, сопровождающуюся вздутием банок. Другие не дают газообразования и вызывают так называемую плоскокислую порчу.

Высокая температура в значительной степени ослабляет остаточную микрофлору, однако, последняя может возобновить жизнедеятельность через некоторое время, особенно при неправильном хранении консервов. Поэтому в доброкачественных, правильно простерилизованных консервах должны отсутствовать микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания или представляющие опасность для здоровья человека. Определение патогенных микроорганизмов проводят в случаях возникновения пищевых отравлений либо при сомнении в качестве продукции и необходимости решения вопроса о возможности её реализации.

В банках с сохранившимися жизнеспособными микроорганизмами при неправильном хранении происходит их размножение и порча консервов, выявляемая наружным осмотром. Возникает так называемый бомбаж - вздутие банок. Следует различать бомбаж биологического, химического и физического происхождения.

Биологический бомбаж вызывают газы, образующиеся в результате размножения микроорганизмов. В результате их жизнедеятельности разлагаются белки, жиры и углеводы с образованием газов (H_2S , NH_3 , CO_2), которые давят на стенки и доньшки банки и вызывают её вздутие. Биологический бомбаж чаще всего вызывают спорообразующие анаэробы и некоторые термофильные бактерии. Иногда в этом процессе принимают участие факультативные анаэробы *E. coli*, *P. vulgaris* и др. Бомбаж фруктовых и молочных консервов нередко бывает обусловлен дрожжами. Биологический бомбаж с санитарно-гигиенической точки зрения наиболее опасен. Консервы с биологическим бомбажем непригодны в пищу и подлежат обязательному уничтожению, независимо от вида микроорганизма.

Химический, или водородный бомбаж, возникает в результате сильной коррозии металла под влиянием кислого содержимого банки. При взаимодействии кислоты с металлом выделяется молекулярный водород. Давление последнего приводит к изменению внешней формы банок. Для предотвращения химического бомбажа продукты с повышенной кислотностью укладывают в жестяные банки, покрытые с внутренней поверхности специальным кислотоупорным лаком. Консервы с химическим бомбажем практически безвредны, но они не подлежат реализации в торговой сети, поскольку невозможно на складе достоверно дифференцировать этот вид бомбажа от бомбажа биологического происхождения.

Физический бомбаж либо является результатом переполнения банки консервированным продуктом, либо обусловлен подмораживанием консервов и расширением содержимого банок вследствие образования в них льда. Физический бомбаж бывает и при вполне доброкачественных консервах, однако, реализация их требует осторожности. При подмораживании бомбаж обычно массовый, но выявить в таких партиях консервов отдельные банки, вздутие которых произошло под влиянием опасных микроорганизмов, невозможно. Поэтому консервы с физическим бомбажем вследствие замораживания можно использовать только после предварительной варки.

Различают также так называемые хлопуши - вздутие донышек (крышек) консервной банки.

Кроме порчи консервов, происходящей в результате развития остаточной микрофлоры, порча может быть и результатом попадания микробов из окружающей среды в случае нарушения герметичности банки. Иногда микроскопические поры (вследствие ржавчины, дефектов шва и закатки) могут плотно закупориться содержимым и не выявляться при испытании на герметичность.

Таким образом, отсутствие бомбажа ещё не свидетельствует о стерильности консервов, в то же время наличие отдельных бомбажных банок в партии не доказывает недоброкачественности всей партии.

2. Отбор проб.

Отбор проб консервов проводят в соответствии с требованиями ГОСТа 26668-85 и ГОСТ 51446-99. Вначале проверяют состояние тары и отмечают её недостатки - неисправность, отсутствие пломб, наличие плесени, загрязнённости, утечки, отсутствие или неясность маркировки. Затем устанавливают однородность партии (продукт одного вида и сорта, в таре одного типа и размера, одной даты выработки, изготовленный одним заводом). Все организации, занятые хранением и реализацией консервной продукции, при приёме, хранении и выпуске на довольствие консервов обязаны их сортировать, отбраковывать банки с подтёками, бомбажные, пробитые гвоздями и сильно деформированные.

На каждую выявленную партию непригодных в пищу консервов составляют акт с указанием причин браковки, количества забракованных банок, маркировки. Такие консервы хранят до утилизации или уничтожения в отдельных помещениях на особом учёте.

При пищевых отравлениях консервами отбор проб для анализа проводят в таком количестве, какое необходимо по заключению санитарно-эпидемиологической службы или какое удаётся собрать, включая и недоеденные остатки. В этих случаях отобранные пробы помещают в стерильную посуду вместе с банками и опечатывают или пломбируют.

От партии отбирают исходный образец, из которого формируют среднюю пробу. От пищевых консервированных продуктов, расфасованных в жестяную, стеклянную или полимерную тару вместимостью до 1 дм³, средний образец состоит из трёх единиц упаковки, а вместимостью от 1 до 3 дм³ - из одной упаковки. Если масса (объём) пробы продукта не установлена в нормативно-технической документации на конкретный вид продукции в потребительской таре, то от каждой упаковочной единицы (коробка, ящик), попавшей в выборку, отбирают не менее одной банки.

При отборе проб консервов в жестяной таре необходимо руководствоваться действующими требованиями к маркировке указанного вида пищевой продукции.

Маркировку условными обозначениями в три ряда по шесть знаков на банки наносят методом выштамповывания или несмываемой краской на внешней стороне дна или крышки банки (ГОСТ Р 51074-97 «Продукты пищевые. Информация для потребителя. Общие требования»).

На дне или крышке нелитографированных жестяных и алюминиевых банок с консервами наносят условные обозначения:

- число изготовления — первые две цифры;
- месяц изготовления — вторые две цифры;
- год изготовления - последние две цифры.

На продукции, изготовленной в Российской Федерации, указывают:

- номер смены — одна, три цифры;
- ассортиментный номер — одна, три цифры.
- индекс отрасли, к которой относится предприятие-изготовитель - одна-две буквы:
 - мясная промышленность - А;
 - пищевая промышленность — КП;
 - плодово-овощное хозяйство — К;
 - потребительская кооперация - ЦС;
 - сельскохозяйственное производство - МС;
 - лесное хозяйство — ЛХ;
 - рыбная промышленность - Р;
- номер предприятия-изготовителя — одна-две цифры.

На крышки литографированных банок наносят только реквизиты, отсутствующие на литографии, а дату изготовления указывают в первом ряду.

3. Лабораторные исследования.

Отобранные единицы расфасовки осматривают. Отмечают наличие и состояние бумажной этикетки или литографического оттиска, а также дефекты тары: нарушение герметичности, потёки, вздутие крышек и донышек, хлопающие крышки и др. Обязательно указывают на деформацию корпуса и донышек жестяных банок, ржавые пятна, степень их распространения, дефекты продольного и закаточного швов. Результаты наблюдения протоколируют.

Для проверки герметичности тары банки укладывают в сосуд с нагретой до кипения водой (но не ниже 80°C) на 5 мин при высоте слоя воды над банками не менее 5 см. Над поверхностью разгерметизированных банок появляются пузырьки воздуха.

Термостатная выдержка — эффективный способ контроля доброкачественности консервов. Перед микробиологическим анализом консервы выдерживают в термостате до 5-7 сут при температуре 37°C. Рыбные консервы в масле (шпроты, треска, корюшка и др.) не подлежат термостатной выдержке вследствие возможной активизации стафилококков, которые иногда сохраняются при термической обработке из-за низкой теплопроводности масла. Известно, что развитие стафилококков не сопровождается газообразованием, поэтому банки выглядят не вздутыми.

Не подвергают термостатной выдержке фруктовые компоты, пюре и соки, томатные и соевые соусы, цельноконсервированные томаты, огурцы и другие консервы, имеющие кислую реакцию, так как кислая среда препятствует токсинообразованию микроорганизмов — возбудителей пищевых отравлений (*C. botulinum*, *Staphylococcus spp*).

Термостатному контролю не подлежат пресервы, т.е. заведомо нестерильные продукты, например, кильки, маринованные грибы, овощи и фрукты, сгущённое молоко с сахаром, варенье, джемы, повидло и др.

Консервы вскрывают после нахождения в термостате (бомбажные банки подобной подготовке не подвергают). Непосредственно перед вскрытием консервируемый продукт перемешивают десятикратным переворачиванием с донышка на крышку.

Консервы вскрывают в условиях, исключающих внесение микроорганизмов из внешней среды в продукт (в специально оборудованном боксе). Для стерилизации воздуха

применяют ультрафиолетовые лампы. В случае отсутствия бокса рядом с банкой ставят зажжённые горелки. Микробиолог и его помощник выполняют работу в масках.

Перед вскрытием банки тщательно протирают спиртом. Затем берут один из заранее приготовленных стерильных ватных тампонов, смачивают его спиртом, поджигают в пламени горелки и помещают на крышку банки. Сквозь пламя или под горящий тампон подводят предварительно обожжённый пробойник и прокалывают крышку. Отверстие должно быть около 1—1,5 см в диаметре. Если консервы не содержат жидкой фазы, то делают подряд три-четыре прокола так, чтобы длина отверстия была не менее 3 см.

Лабораторный контроль консервов, выпущенных для реализации и хранения на складах, проводят:

- когда внешний вид партии вызывает подозрения (повышенное количество бомбажных, деформированных, разгерметизированных банок и др.);
- по прямым эпидемиологическим показаниям (пищевые отравления данными консервами);
- в ряде других случаев.

Консервы исследуют на промышленную стерильность, для выявления возбудителей порчи и патогенной (токсигенной) флоры.

Для выявления МАМи ФАнМ в две пробирки (по 5 см³) мясопеп-тонного бульона с глюкозой вносят стерильной трубкой по 1 см³ пробы консервированного продукта. Посевы выдерживают при температуре 37 °С в течение 5 сут. Посевы для выявления термофильных микроорганизмов инкубируют при температуре 55-62 °С. За признаками роста наблюдают ежедневно. При появлении помутнения, образовании плёнки, выделении пузырьков газа содержимое пробирок микроскопируют и делают пересев в случае необходимости.

Мезофильные бациллы из группы *B. subtilis* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*) в посевах не выделяют газа, имеют форму палочек со спорами, положительно или вариабельно окрашиваются по Граму и синтезируют каталазу. Факультативно-анаэробные газообразующие бациллы из группы *B. polymyxa* (*B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*) могут не синтезировать каталазу. При отрицательных результатах тестов на МАМ и ФАнМ в посевах делают вывод об отсутствии активно развивающихся микроорганизмов этой группы.

Обнаружение в посевах признаков роста микроорганизмов, отличных от таковых у бактерий группы *B. subtilis*, указывает на присутствие другой микрофлоры. В таком случае отмечают характер роста на питательной среде, морфологию клеток (кокки, грамотрицательные палочки, грамположительные неспорообразующие палочки), отношение к каталазе.

Для обнаружения мезофильных анаэробных микроорганизмов проводят посев по 2 см³ консервированного продукта в две пробирки, содержащие 12 см³ регенерированной среды Кит-Тароцци. Если среда не содержит агар, сразу после посева наслаивают на поверхность голодный агар или вазелиновое стерильное масло в таком количестве, чтобы образовался слой высотой 1 см. Посевы держат в термостате при температуре 37°С в течение 5 сут.

Развитие мезофильных анаэробных микроорганизмов в посевах сопровождается помутнением среды, выделением газа, появлением постороннего запаха, в некоторых случаях разложением кусочков мяса или печени. Материал для приготовления препаратов для микроскопии берут пастеровской пипеткой со дна пробирки.

В мазках с облигатно-анаэробными бактериями видны палочки, окрашивающиеся положительно по Граму и образующие споры. Если каталаза не выявлена, то анализ прекращают и считают, что в посевах присутствуют мезофильные анаэробы.

Если при микроскопии спорообразующие микроорганизмы не обнаружены, то отрицательная проба на каталазу не считается достаточной для прекращения

исследования. В случае выявления смешанной микрофлоры и наличия положительной пробы на каталазу исследование продолжают. Посевы в чашках (1-2 капли) заливают растопленным и охлаждённым до температуры 45 °С МПА с глюкозой и среду тщательно перемешивают. На застывшую поверхность агаров накладывают стерильное предметное стекло так, чтобы под стеклом не было пузырьков воздуха. Чашку помещают в термостат при температуре 37°С на 24-48 ч. При обнаружении под стеклом роста бактерий или разрывов в агаре считают, что в посевах присутствуют мезофильные анаэробные микроорганизмы.

Посевы в чашках можно заливать средой Вильсона-Блер, расплавленной и охлаждённой до 45°С. Посевной материал и среду перемешивают. Застывшую поверхность заливают холодным агаром. Посевы помещают в термостат на 24-48 ч (температура 37°С). Появление в агаре чёрных или коричневых колоний свидетельствует о присутствии в посевах гнилостных и протеолитических микробов.

Для подтверждения присутствия бацилл в споровой форме навески консервированного продукта дополнительно вносят в две пробирки со средами, одну из которых прогревают на водяной бане в течение 30 мин при температуре 80±1°С (для выявления спор мезофильных микроорганизмов), другую - при температуре 95±1°С (для термофильных видов).

Бактериологическое исследование для выявления колиформных бактерий родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* проводят в соответствии с ГОСТом Р 500474-93 и ГОСТом Р 50454-92 (арбитражный метод). Эти стандарты предусматривают подсчёт количества колиформных бактерий методом НВЧ либо путём глубинного или поверхностного посева с использованием селективно-диагностических сред.

Отсутствие *C. botulinum* устанавливают методами, изложенными в ГОСТе 10444.7-85 «Продукты пищевые. Методы определения ботулинических токсинов и *C. botulinum*».

Определение количества плесневых грибов и дрожжей проводят посевом продукта параллельно в две пробирки с 5—6 см³ жидкой среды Сабуро.

Консервы группы Д и другие виды консервов по показаниям (пищевые отравления) исследуют на присутствие *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus*.

Лекция №8 (4 часа)

Тема: «Пищевые отравления микробной этиологии»

1. Вопросы лекции:

1. Общая характеристика пищевых отравлений.
2. Стафилококковые пищевые токсикозы.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Общая характеристика пищевых отравлений.

Пищевые отравления - острые, реже хронические, неконтагиозные заболевания, возникающие в результате употребления пищи массивно обсеменённой определёнными видами микроорганизмов или содержащей токсичные для организма вещества микробной или немикробной этиологии.

В соответствии с действующей классификацией выделяют следующие виды пищевых отравлений.

- 1. Пищевые отравления бактериальной природы.
 - 1.1. Пищевые токсикоинфекции.
 - 1.2. Пищевые токсикозы.
- 2. Пищевые отравления смешанной этиологии.
- 3. Пищевые отравления грибковой этиологии (микотоксикоз).
- 4. Немикробные.

- 4.1. Отравления химическими веществами.
- 4.2. Отравления ядовитыми растениями и тканями животных.
- 4.3. Отравления продуктами растительного и животного происхождения.
- 5. Пищевые отравления неустановленной этиологии.

Токсикоинфекции — острые заболевания, возникающие при употреблении в пищу продуктов, содержащих массивное количество живых клеток и их токсинов, выделенных при размножении и гибели микроорганизмов. Вызываются *Proteus vulgaris*; *P. mirabilis*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens* типа А, *Enterococcus faecalis*, паразитические вибрионы; *Citrobacter spp.*, *Hafnia spp.*; *Klebsiella spp.*; *Yersinia spp.*; *Pseudomonas spp.*; *Aeromonas spp.*

Токсикозы (интоксикации) - острые или хронические (микотоксикозы) заболевания, вызванные употреблением пищи, содержащей токсины, накопившиеся в ней в результате развития специфического возбудителя; при этом жизнеспособные микроорганизмы могут отсутствовать или обнаруживаться в небольшом количестве. Интоксикации вызывают следующие токсины: стафилококковый энтеротоксин; ботулотоксин; микотоксины (вырабатываемые микроскопическими грибами родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и др.); токсин *Clostridium perfringens* типа А.

В соответствии с действующими документами очень важно правильно собрать материал при расследовании пищевых отравлений.

В качестве исследуемого материала можно использовать: остатки пищи, исходные продукты; суточные пробы (при условии сохранения их на холоде); рвотные массы; промывные воды желудка; испражнения; мочу; кровь для гемокультуры и серологических исследований (8-10 см³); слизь из зева и носа; смывы из гнойничков на руках у работников питания; широкий отбор смывов с разных предметов; соскобы везде, где можно их взять; питьевую воду; трупный материал.

Исследуемый материал (продукты) отбирают в стерильную посуду:

- мясо - 500 г;
- птица - целая тушка;
- вторые блюда - 1 или 2 порции;
- консервы открытые и закрытые и др. Пробы печатают и отправляют в лабораторию сразу же после взятия. Допустимо хранение, но не более 24 ч при температуре +4-6⁰С. В сопроводительном документе описывают эпидемиологию, клинику, подозрительный продукт (с тем, чтобы его исследовать в первую очередь).

В разных странах в этиологии пищевых отравлений преобладают различные микроорганизмы: в России - стафилококки, в Великобритании - сальмонеллы, в США - стафилококки, в Японии — галлофильные вибрионы и др.

Шигеллы и сальмонеллы также оказываются причиной пищевых отравлений, но в классификацию не вошли. Значителен процент пищевых отравлений неясной этиологии (22-60%). Причины высокой частоты случаев пищевых отравлений неясной этиологии.

1. Некачественная лабораторная диагностика.
2. Наличие неспецифического действия, вызванного продуктами метаболизма микроорганизмов.
3. Наличие вирусов.

4. Пищевые отравления протеинами бактерий и аллергической природы.
2. Стафилококковые пищевые токсикозы.

Стафилококковые пищевые токсикозы - острые отравления энтеротоксином, который накапливается в пищевом продукте при размножении стафилококков. Энтеротоксин - это экзотоксин, представляющий собой белково-углеводный комплекс. Название связано с его способностью воздействовать на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта. Энтеротоксин подразделяют на типы (серовары): А, В, С, Д, Е. Из них наиболее часто встречается тип А, поскольку он термостабилен и разрушается только при кипячении в течение 2 ч. Остальные типы энтеротоксина термолабильные. 50% случаев пищевых отравлений вызывает энтеротоксин типа А, 25% - типы А+Д, в 25% случаев - все остальные.

Чувствительность к энтеротоксину у разных видов животных разная. Наиболее чувствителен человек ($0,5 \text{ см}^3$ фильтрата бульонной культуры достаточно, чтобы вызвать пищевое отравление у человека; $20\text{-}25 \text{ см}^3$ - у котят; 50 см^3 - у обезьян).

Энтеротоксин можно обнаружить следующими способами.

1. **Биопроба** на 1,5-2-месячных котятах-сосунках. Им скармливают экстракт пищевого продукта с молоком. Через 0,5-5 ч появляется рвота и диарея. Пробу ставят на двух котятах, реже - на взрослых кошках. Им внутривенно в бедренную вену вводят прокипячённый в течение 10 мин фильтрат (чтобы денатурировать α - и β -токсины). Можно обработать фильтрат панкреатином. При этом α - и β -токсины разрушаются, а все остальные энтеротоксины сохраняются.

2. **Реакция** преципитации по типу определения дифтерийного токсина.

3. **Реакция непрямой** (пассивной) гемагглютинации.

В случае невозможности поставить ни один из этих методов используют другие свойства энтеротоксигенных штаммов стафилококков, которые в 80% случаев коагулируют плазму, в 78% - ферментируют маннит в анаэробных условиях, в 84% — образуют гиалуронидазу, в 80% - лизируют эритроциты кролика и относятся к фаготипам 42Д, 42Е.

Между фаголизабельностью и энтеротоксигенностью есть связь, которая доказана в опытах по передаче свойства продуцировать энтеротоксин с помощью умеренных фагов неэнтеротоксигенным штаммам стафилококков.

Чаще всего стафилококки контаминируют следующие продукты: молочные, мясные, кондитерские изделия, салаты, винегреты. Источники загрязнения продуктов:

- люди с гнойничковыми заболеваниями кожи;
- коровы, страдающие гнойным маститом.

Для накопления энтеротоксина необходимы определённые условия:

1. В продукте должно быть много белка, крахмала, сахара (но не более 60%) и влаги. Всем этим условиям отвечают заварные кремы (40% влаги, 47% сахара). При относительно высокой температуре уже через 3 ч после попадания в крем энтеротоксигенного штамма стафилококка энтеротоксин накапливается в количестве, которое может вызывать пищевое отравление (при $18\text{-}20^\circ\text{C}$ - через 6 ч), однако, если хранить пищевой продукт в бытовом холодильнике, то даже в случае обсеменения стафилококками энтеротоксин не образуется.

2. Температурный оптимум образования энтеротоксина составляет $18\text{-}37^\circ\text{C}$, а оптимум pH 5,2-9. Кислая реакция пищевого продукта подавляет размножение стафилококка, и образование энтеротоксина не наступает (например, в молочнокислых продуктах). Но если энтеротоксин уже образовался в молочных продуктах до скисания, то при хранении он не разрушается.

3. Нужны условия аэрации, т.е. доступ кислорода, поэтому в герметических консервах энтеротоксин не накапливается.

Стафилококковый энтеротоксин типа А отличается очень высокой устойчивостью: не разрушается при кипячении в течение 1,5 ч, при содержании в автоклаве при температуре $+112^\circ\text{C}$ в течение 55 мин, инактивируется только при кипячении более 2 ч, а в автоклаве - при температуре 120°C в течение 35 мин. В замороженных продуктах стафилококковый энтеротоксин сохраняется 2 мес., а в солёных продуктах - 2-3 нед. (концентрация соли 5-10%). Энтеротоксин не разлагается желудочным соком, устойчив к трипсину, пепсину, спирту, формалину, хлору.

Поступив в организм, токсин фиксируется на слизистой оболочке ЖКТ и действует на гладкую мускулатуру, вызывая спазм и развитие гастроэнтерита, а у детей - ещё и колита. Токсин раздражает периферические нервные окончания в ЖКТ, от них импульс идёт по блуждающему нерву в рвотный центр - возникает рвота.

Клинические проявления.

1. Короткий инкубационный период: 0,5-6 ч (в среднем 2-3).

2. Многократная рвота, иногда с кровью.

3. Обезвоживание организма.
4. Падение артериального давления.
5. Признаки острого гастрита (резкие боли в желудке, иногда учащение стула до 4-6 раз в сутки без тенезмов).
6. Усиление потоотделения.
7. Нормальная температура тела. Заболевание заканчивается через сутки, реже через 2-3 дня.

Летальные исходы редки (в основном дети и пожилые люди).

Лабораторная диагностика стафилококковых пищевых отравлений включает:

- обнаружение энтеротоксина в пищевых продуктах или культуральной жидкости;
- обнаружение возбудителя и определение его количества во всех испытуемых материалах.

Бактериологическая диагностика осуществляется в несколько этапов. **Первый этап** исследования: бактериоскопия исходного материала (рвотные массы, промывные воды, фекалии, продукты).

Наличие одного микроорганизма в поле зрения при прямом микроскопировании пищевого продукта в разведении 1:10 соответствует содержанию 50 000 КОЕ/г продукта. Если обнаружено 27-30 клеток в мазке из твёрдого продукта или 100—200 клеток в разведении 1:10, следует обратить внимание на продукт, который мог вызвать пищевое отравление.

Если есть котята, то ставят биопробу. Для этого жидкий пищевой продукт или экстракт из твёрдого продукта разводят в стерильной дистиллированной воде в количестве 20-25 см³ и скормливают 1,5-2-месячным котятам, вводя пипеткой. Через 0,5-5 ч возникает рвота и диарея (может быть только рвота).

Твёрдые продукты размельчают в аппарате (размельчитель ткани) в 0,1% пептонной воде со стерильным песком в соотношении 1:2, 1:5. Рвотные массы просто размельчают. Промывные воды центрифугируют 20 мин при 2-3 тыс. об./мин. Фекалии эмульгируют или разводят в 0,9% растворе натрия хлорида.

Второй этап. Исследуемый материал по 2 капли засевают на чашки с плотными средами - ЖСА и этим же шпателем на кровяной агар. Дополнительно делают посев на солевой бульон в две пробирки (с 6,5% и 10% раствором натрия хлорида), помещают в термостат при температуре 37⁰С на 24 ч для жидкого материала, на 48 ч - для твёрдого. Для выявления степени обсеменённости материала стафилококком готовят разведения испытуемого материала на 0,1% пептонной воде от 10⁻¹ до 10⁻⁵, а затем по 0,1 см³ каждого разведения засевают на чашки с ЖСА.

Исследуемый материал в количестве 0,1 см³ тщательно втирают во всю поверхность агара газоном, затем помещают в термостат при 37⁰С на 48 ч. Рвотные массы и фекалии засевают по 2 капли на ЖСА.

Третий этап: изучение роста на ЖСА, отсев двух-трёх колоний после микроскопии, определение каталазной активности (стафилококк каталазоположителен), отсев на косой агар.

Вычисляют индекс обсеменённости стафилококком на чашках, где выросло не менее 20 колоний. При отсутствии роста на твёрдых средах делают высеv из солевого бульона на чашки с ЖСА.

Четвертый этап. Выделенный стафилококк идентифицируют. Важно определить не только патогенность, но и идентичность (определение фагомозаики, чувствительности к антибиотикам, набора ферментов патогенности и др.). Для доказательства идентичности используют особый набор (международный комплект фагов), который включает пять групп.

Обоснование этиологической роли стафилококков при пищевых отравлениях основано на:

- данных эпидемиологического обследования (указания на подозреваемый продукт, нарушение технологии приготовления, хранения, транспортировки и др.);
- клинической картине заболевания;
- лабораторных данных, включающих обнаружение энтеротоксина в пищевом

продукте или в культуральных жидкостях, обнаружение массивности обсеменения продукта стафилококками в концентрации 10^4 в 1 см^3 или в 1 г продукта. Но это лишь косвенное доказательство возможного присутствия энтеротоксина в пищевом продукте;

• дополнительным доказательством служит обнаружение стафилококков, идентичных по биологическим, культуральным свойствам, фагомозаике и антибиотикограмме, выделенных от больных из различных материалов.

1. Пищевая токсикоинфекция, вызванная *Bacillus cereus*.

Род *Bacillus* представляет собой грамположительные, каталазопозитивные, палочкообразные либо сферические клетки, подвижные в большинстве случаев. Объединяет 25 видов. В этиологии заболеваний человека играют большую роль несколько представителей рода *Bacillus*, в том числе:

- *B. anthracis* (возбудитель сибирской язвы);
- *B. cereus*.

Температурный оптимум *B. cereus* составляет 30°C , но рост отмечается и в диапазоне температур $+12-39^{\circ}\text{C}$ (у 4% штаммов - $+6-55^{\circ}\text{C}$). Оптимум pH лежит в области 7-9,5 (у 39% штаммов - в пределах 4-12). На питательном агаре *B. cereus* образует крупные, распластанные колонии серовато белого цвета с зернистой поверхностью и изрезанными краями. Клетка может синтезировать желтоватый, зелёный и оранжевый пигмент. На кровяном агаре колонии восковидные, перламутровые, с зоной гемолиза, в отличие от возбудителя сибирской язвы. На косом агаре колонии растут в виде восковидного налёта. На бульоне, в отличие от сибирской язвы вызывает помутнение среды, редко с образованием хлопьев и нежной белой плёнки. Имеет устойчивость к 6,5% раствору натрия хлорида, но при возрастании концентрации соли до 10-15% рост прекращается.

Метаболизм протекает как по типу брожения, так и окисления. *B. cereus* - факультативный анаэроб, обладает многими протеолитическими свойствами: разжижает желатин, осуществляет гидролиз казеина до параказеина или пептона, слабо расщепляет глюкозу до кислоты без газа. По способности расщеплять лактозу, сахарозу, дульцит, глицерин, арабинозу, галактозу различают 12 биохимических вариантов. Другой обязательный признак - образование ацетилметилкарбинола. На среде Козера растут только 20% штаммов. Протеолиз (+) у 85% штаммов отмечается на 1-2 день, у остальных - на 3-4. Все штаммы створаживают молоко и переводят казеин в параказеин в течение 6 сут.

Все штаммы продуцируют лецитиназу. *B. cereus* продуцирует фермент пенициллиназу, детерминирующий резистентность к пенициллину и к полимиксину. Эти антибиотики добавляют в питательные среды для выделения возбудителя. Кроме того, микроорганизмы чувствительны к ристомичину, биомичину, канамицину, эритромицину, олеандомицину, левомицетину.

Отличительные признаки *B. cereus* от *B. anthracis*.

1. Подвижность (+).
2. Гемолиз бараньих эритроцитов на агаре (+).
3. Образование гомогенной мути на бульоне.
4. Быстрая пептонизация молока.
5. Быстрое и сильное разжижение желатина с образованием горизонтальных отростков.

6. Подщелачивание лакмусового молока.
7. Разложение молока с метиленовой синью.

От других бацилл отличается комплекс видовых признаков:

- подвижностью;
- окислением, ферментацией глюкозы ($\pm$);
- способностью к гемолизу (+);
- выделением лецитиназы (+);
- способностью разлагать маннит (-).

Более подробно дифференциальные признаки изложены в определителе бактерий Берджи.

Для *B. cereus* характерно наличие гемотоксина, лецитиназы, протеазы, гиалуронидазы. Вырабатываемый микробом энтеротоксин белковой природы (термолабильный, чувствительный к трипсину) вызывает воспаление слизистой оболочки кишечника. Микроорганизм относят к условно-патогенным.

Различные продукты могут служить причиной пищевых отравлений, вызванных *B. cereus* при индексе обсеменённости их $10^4/\text{г}$. В чернозёмной почве микроорганизм обнаруживают в 100% случаев, в фекалиях людей - в 0,5% случаев, в водопроводной воде - в 15% проб.

Инкубационный период пищевого отравления, вызванного *B. cereus*, составляет 10-14 ч, начинается внезапно и быстро заканчивается. Отмечается тошнота, рвота, коликообразные боли в животе, жидкий водянистый стул с тенезмами; в тяжёлых случаях повышается температура, но летальность низкая. Из фекалий больных возбудителя выделяют редко, не более чем в 14% случаев.

Бактериологическая диагностика

Первый этап: бактериоскопия исходного материала (рвотные массы, промывные воды, фекалии, пищевые продукты) и посев исследуемого материала на плотные питательные среды для выделения возбудителя и определения его количества. Для этого пищевые продукты титруют на децепроцентной (0,1%) пептонной воде до 10^{-7} , фекалии, рвотные массы, промывные воды от 10^{-2} до 10^{-4} . Затем по 0,1 см³ засевают на плотные питательные среды: Пивоварова (ЖСА с полимиксином и ТТХ), Никодемуса (желточно-спиртовой агар) или Чистовича (ЖСА). Температура инкубации составляет 37⁰С, но лучше 30⁰С. На среде Пивоварова учёт проводят через 48 ч, на средах Никодемуса и ЖСА - через 72 ч. Затем вычисляют индекс возбудителя.

Второй этап: изучение характера роста. На среде Пивоварова колонии розовые (могут быть красные) за счёт редукции ТТХ, окружённые зоной лецитиназной активности. На средах Никодемуса и Чистовича колонии цвета среды с зоной лецитиназного венчика вокруг колонии. После оценки роста 3-5 колоний пересевают на скошенный агар и параллельно на мясопептонный бульон, инкубируют при температуре 37⁰С в течение 24 ч.

Идентификация *B. cereus*.

1. Подвижность в раздавленной капле (+).
2. На среде Гисса с маннитом (-).
3. На среде Кларка за 48 часов образует ацетон, т.е. реакция Фогес- Проскауэра (+).
4. На кровяном агаре гемолиз (+).
5. Окисление, ферментация глюкозы (++).
6. Каталаза (+).

Для доказательства идентичности выделенной культуры из различных материалов определяют метки.

- **Определение биовара** на среде Гисса:

- лактоза (+/-);
- сахароза (+/-);
- глицерин (-), Различные сочетания дают 12 биоваров;
- галактоза (+/-);
- дульцит (+/-);
- арабиноза (+/-)

- **Определение вирулентности:** 500 КОЕ вводят внутрибрюшинно двум белым мышам массой 10-15 г. На 1-4 сутки мыши погибают, и в органах обнаруживается *B. cereus*. Этиологическую роль *B. cereus* при пищевых отравлениях можно признать (при отсутствии патогенных микроорганизмов) в следующих случаях, когда *B. cereus*:

1. Обнаружен в пищевых продуктах в количествах $10^5/\text{г}$ (см³) или более.
2. Обнаружен одновременно в рвотных массах, промывных водах, испражнениях в

количестве 100 КОЕ/г (см³) и более.

3. Выделен из фекалий у большинства пострадавших.

4. Выделен из фекалий больного только в остром периоде болезни в количестве 100-1000 КОЕ/г и более с последующим исчезновением микроорганизма после выздоровления.

2. Ботулизм.

Ботулизм (от лат. *botulus* — колбаса) — тяжелый пищевой токсикоз, возникающий в результате употребления продуктов, зараженных палочкой ботулизма и ее экзотоксинами.

Возбудитель ботулизма широко распространен в природе (почве, навозе, воде) и часто попадает в мясо из окружающей среды. Это строгий анаэроб, который размножается и выделяет экзотоксин в консервах, соленой рыбе, колбасе, ветчине, грибах домашнего консервирования.

Консервированные продукты, загрязненные спорами ботулизма. При нарушении технологических процессов стерилизации или хранении консервов при температуре выше +15...+17°C в консервированных продуктах, зараженных спорами ботулизма, данные споры прорастают и вегетативные палочки ботулизма начинают продуцировать экзотоксин.

Изучено 7 сероваров экзотоксина — А, В, С, D, E, F, G, различающихся по антигенной структуре. В патологии человека имеют значение экзотоксины типа А, В, С, Е (у типа А самый сильный токсин).

Типизацию токсина проводят в реакции нейтрализации с гомологичными антитоксическими сыворотками согласно прилагаемой к ним инструкции. Ботулинический токсин отличается наибольшей токсичностью из всех известных микробных экзотоксинов (0,035 мг сухого порошка токсина является смертельной дозой для человека).

Экзотоксин всасывается в желудок и кишечник, поражает черепно-мозговые нервы, приводя к атрофическому параличу мышц лица и носоглотки: появляется двойное видение, нарушается глотательный акт, исчезает голос (афония). Инкубационный период длится от нескольких часов до 10-12 суток.

В настоящее время доказано, что не только токсин, но и сам возбудитель может быть причиной отравления. Споры ботулизма, попавшие в организм, превращаются в вегетативные клетки и продуцируют экзотоксин, приводящий животное к гибели, при этом сам возбудитель выделяется из всех органов и тканей. В связи с этим мясо больных ботулизмом животных нельзя использовать в пищу.

Морфология. *Cl. botulinum* крупные — до 8,0 мкм, располагаются одиночно или короткими цепочками, подвижные, грамположительные палочки. Капсулу не образуют. Образуют споры через 48 ч, расположение споры субтерминальное.

Культивирование. Строгий анаэроб, оптимальная температура для типа А, В, С, D +34...+36°C, для E, F, G — +28...+30°C, pH — 7,2-7,4. На специальных плотных питательных средах в глубине образует колонии в виде «чечевицы» или комочков ваты. На МПБ — обильное помутнение, запах прогорклого масла и газ.

Биохимические свойства. Расщепляют до кислоты и газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, салицин, декстрозу и глицерин. МПЖ разжижается, кусочки печени расплавляются, мозговая среда чернеет. На кровяном агаре вызывает гемолиз эритроцитов. На поверхности кровяного агара образует колонии двух типов — S-R-колонии.

Возбудитель ботулизма очень устойчив к неблагоприятным факторам. Споры хорошо переносят абсолютный холод, в почве сохраняются десятилетиями, выдерживают кипячение в течение 3-6 ч. Устойчивы к действию дезинфицирующих средств, например, к 20%-ному формалину - 24 ч, к этиловому спирту - в течение 2 месяцев, к 5%-ной карболовой кислоте - в течение 24 ч.

Снижение pH среды позволяет уменьшить длительность обработки и температурного воздействия, даже если в этих продуктах содержатся споры ботулизма. Например, споры погибают при температуре +100°C уже через несколько минут, если кислотность окружающей среды pH снижена до 3,5-4,5. Не удаётся культивирование *Cl. botulinum* в слабокислой среде — в пределах pH 4,5. Экзотоксин к высокой температуре не устойчив, он разрушается при кипячении через 15 мин, при +80°C — через 30 мин.

Лекция №9 (2 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование воды»

1. Вопросы лекции:

1. Вода как фактор передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Нормативная документация.
2. Отбор проб воды для санитарно-бактериологических исследований.
3. Санитарно-бактериологическое исследование питьевой воды.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Вода как фактор передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Нормативная документация.

Вода является не только одним из важнейших элементов биосферы и основой для воспроизводства любой формы органической жизни, но и ведущим фактором риска в развитии заболеваний инфекционной и химической этиологии. Значительное число болезней человека связано с неудовлетворительным качеством питьевой воды и нарушениями санитарно-гигиенических норм водоснабжения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно во всем мире около 500 миллионов человек страдают от инфекционных заболеваний, связанных с потреблением недоброкачественной по микробиологическим показателям воды. Не случайно ООН объявила текущее десятилетие Десятилетием по образованию в интересах устойчивого развития (ДОУР) и определила внимание к водным ресурсам как основной приоритет до 2010 года. В связи с напряжённым состоянием питьевого водоснабжения в Оренбургской области принята региональная программа «Обеспечение населения Оренбургской области питьевой водой на 2003-2010 годы».

По данным ВОЗ, около 80% всех инфекционных болезней в мире связано с неудовлетворительным качеством питьевой воды и нарушениями санитарно-гигиенических норм водоснабжения. Суммарно количество людей, болеющих в связи с использованием загрязненной воды, приближается к 2 миллиардам человек.

По оценке Госкомсанэпиднадзора состояние водоснабжения населения России неудовлетворительное. В целом около 50% населения Российской Федерации продолжает использовать для питья воду, не соответствующую гигиеническим требованиям по различным показателям качества.

В Оренбургской области ежегодно регистрируются подъемы и вспышки кишечных инфекционных заболеваний, связанных с употреблением населением недоброкачественной по санитарно-микробиологическим показателям питьевой воды. Так, в 2007 году допущена вспышка дизентерии Флекснера в посёлке Кумак Ясненского района, обусловленная употреблением населением загрязненной воды из колодца, обустройство и содержание которого не отвечает санитарным нормам и правилам, с числом пострадавших 11 человек.

Водный путь распространения возбудителей кишечных инфекций возможен только при сочетании следующих условий:

- имеется возможность попадания возбудителей заболеваний в воду с выделениями больных или бациллоносителей;
- возбудители достаточно долгое время сохраняют в воде жизнеспособность и вирулентность;
- окажется возможным проникновение зараженной воды в кишечник человека.

В соответствии с Конституцией РФ каждый имеет право на благоприятную окружающую среду, каждый обязан сохранять природу и окружающую среду. Бережно относится к природным богатствам, которые являются основой устойчивого развития

жизнедеятельности народов, проживающих на территории Российской Федерации. Поверхностные и природные воды являются частью окружающей среды и их использование должно проводиться в соответствии с водным законодательством РФ.

В зависимости от предназначения вода может быть классифицирована на:

- питьевую воду централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения;
- воду подземных и поверхностных источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения;
- децентрализованную питьевую воду (из колодцев, артезианских скважин и родников);
- воду объектов в зонах рекреации;
- воду плавательных бассейнов с пресной и морской водой;
- хозяйственно-бытовые сточные воды после обеззараживания и очистки.

Безопасность воды в эпидемиологическом отношении определяется ее соответствием нормативам по следующим индикаторным показателям для:

- питьевой воды централизованного водоснабжения — термотолерантным колиформным бактериям, общим колиформным бактериям, общему микробному числу, колифагам, спорам сульфитредуцирующих клостридий (СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества");

- питьевой воды нецентрализованного водоснабжения - числу бактерий группы кишечных палочек (СанПиН 2.1.4.544-96 "Требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения");

- воды бассейнов - общим колиформным бактериям, колифагам, термотолерантным колиформным бактериям, синегнойной палочке, золотистому стафилококку, отсутствию возбудителей кишечных инфекций (СанПиН 2.1.2.1188—03 "Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды");

- сточных вод (хозяйственно-фекальных, промышленных, смешанных, талых и ливневых) - общим колиформным бактериям, термотолерантным колиформным бактериям, колифагам, фекальным стрептококкам, патогенным микроорганизмам (МУ 2.1.5.800-99 "Организация Госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод").

Неудовлетворительное качество питьевой воды может быть связано со следующими причинами:

- нарастающим загрязнением водоисточников;
- применением устаревших и малоэффективных технологий, низкими темпами внедрения новых технологий водоподготовки;
- неполными циклами очистки воды;
- ухудшением санитарно-технических состояний разводящих сетей;
- отсутствием зон санитарной охраны водоисточников;
- несоблюдением режима зон санитарной охраны: санитарно-оздоровительные мероприятия в зонах санитарной охраны водоисточников водопользователями не выполняются;
- несвоевременной корректировкой водопользователями проектов зон санитарной охраны (в порядке внедрения СанПиН 2.1.4.1110-02 «Зоны санитарной охраны источников водоснабжения и водопроводов питьевого назначения»);
- частой реорганизацией предприятий, при которой объекты водоснабжения остаются «бесхозными».

Всё вышеуказанное свидетельствует о том, что качество питьевой воды непосредственно влияет на здоровье людей, поэтому к ней предъявляются определенные санитарные требования, зафиксированные в СанПиН 2.1.4.1074-01.

Комплексная оценка качества питьевой воды (СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»)

п/п	Показатель	Единица измерения	Норматив
	Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствует
	Общие колиформные бактерии (ОКБ)	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствует
	ОМЧ	Колониеобразующие единицы (КОЕ) в 1 см ³	Не более 50
	Коли-фаги	Бляшкообразующие единицы (БОЕ) в 100 см ³	Отсутствует
	Споры сульфитредуцирующих	Число спор в 20 см ³	Отсутствует
	Цисты лямблий	Число цист в 50 см ³	Отсутствует

В питьевой воде источников децентрализованного водоснабжения без разводящей сети труб из микробиологических показателей нормируются:

- ОМЧ - не более 100 КОЕ/см³;

- ОКБ - отсутствие в 100 см³;

- при отсутствии ОКБ определяют глюкозопозитивные БГКП по ГОСТ 18963-73 «Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа» с постановкой оксидазного теста;

- ТКБ - отсутствие в 100 см³;

- коли-фаги - отсутствие в 10 см³;

Исследования на ТКБ и коли-фаги проводят при неблагоприятной эпидемической обстановке по решению Главного государственного санитарного врача территории.

По мнению ряда экспертов, мониторинг является наиболее желательным типом охраны питьевой воды.

2. Отбор проб воды для санитарно-бактериологических исследований.

Пробы воды для бактериологического анализа отбирают в стерилизованные бутылки из стекла или одноразовую посуду из полимерных материалов. Емкости должны быть снабжены плотно закрывающимися пробками (силиконовые, резиновые или из других материалов, кроме ватно-марлевых) и защитными колпачками (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Стерильные емкости открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны ничего касаться. Ополаскивать посуду запрещается. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность, и стерильным колпачком. При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании.

Пробы воды на заданной глубине в озерах или водохранилищах отбирают с помощью батометров, представляющих собой металлический каркас с массивным свинцовым дном-грузилом.

В металлический каркас вставляют емкость, батометр погружают на глубину и открывают его, потягивая за веревку, привязанную к пробке. После заполнения батометр извлекают и закрывают емкость стерильной пробкой.

Поверхностные пробы отбирают с глубины 10-15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. Придонные пробы отбирают в 30-50 см от дна. Отбор проб следует производить с использованием различных плавсредств, с мостов, помостов и т.п., в местах, где глубина водоемов не менее 0,5 м. Недопустимо производить отбор проб с берега.

Пробы воды из колодца, оборудованного ручным или механическим насосом, отбирают, предварительно откачав застоявшуюся воду из трубопровода. Отверстие насоса фламбируют (паяльной лампой, сварочной газовой горелкой и др.), воду вначале сливают, а затем наливают в бутылку. Пробы воды плавательных бассейнов отбирают из ванны бассейна

между сменами и в середине дня не менее чем в двух точках, в мелкой и глубокой частях ванны бассейна на глубине 25-30 см от поверхности зеркала воды.

Объем пробы зависит от того, какие микроорганизмы должны быть определены, например:

- при анализе воды на индикаторные микроорганизмы - не менее 500 см³;
- при анализе воды на индикаторные и патогенные бактерии сальмонеллы, шигеллы) - 300 см³.

Отобранную пробу маркируют, прикрепляют этикетки к емкости или кодируют при помощи нанесения на емкость несмываемой краской шифра (кода). Составляется акт об отборе проб воды с указанием расположения и наименования места отбора проб; даты отбора; метода отбора; времени отбора; климатических условий окружающей среды при отборе проб; температуры воды; цели исследования воды; должности, фамилии и подписи исполнителя.

В лабораторию пробы питьевой воды доставляются в контейнерах-холодильниках при температуре 4-10°C. Время начала исследований от момента отбора проб не должно превышать 6 ч; если пробы нельзя охладить, то их анализ проводят в течение 2 ч после забора пробы.

Для обнаружения и количественного определения индикаторных бактерий в воде используются основные методы:

1) метод мембранных фильтров, при котором определенные объемы воды фильтруются через мембранный фильтр, задерживающий бактерии на своей поверхности, и выращивают посевы на дифференциальной плотной питательной среде с последующей идентификацией бактерий по культуральным и биохимическим свойствам. Для мембранной фильтрации под вакуумом используются микрофильтрационные установки с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и вакуумным насосом для создания разрежения 0,5-1,0 атм.;

2) титрационный метод, основанный на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциальную плотную питательную среду и идентификацией бактерий по культуральным и биохимическим свойствам;

3) метод прямого обнаружения — исследование нормируемого объема воды путем прямого посева на плотные питательные среды.

Для обеспечения сопоставимости результатов необходимо всегда использовать один и тот же выбранный метод. Арбитражным методом при оценке качества питьевой воды является метод мембранной фильтрации.

Микробиологический анализ проводят непосредственно после доставки отобранных образцов в лабораторию согласно МУ 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» (2001).

3. Санитарно-бактериологическое исследование питьевой воды.

Коли-фаги - вирусы бактерий, не патогенные для человека. Распространены во всех водных объектах, в т.ч. в воде плавательных бассейнов. В силу своей высокой устойчивости к воздействию физических и химических факторов сходны с энтеровирусами, и являются оптимальными индикаторами вирусного загрязнения воды в системе водоочистных сооружений, плавательных бассейнов. По данным ВОЗ наиболее широко изучены две группы: соматические коли-фаги, которые инфицируют штаммы организма-хозяина (*E. coli*) через рецепторы клеточных стенок; и F-специфические РНК-бактериофаги, которые инфицируют штаммы *E. coli* и родственные бактерии через F-фимбрии. Они важны как индикаторы загрязнения стоков в связи с их большей способностью к персистенции (способностью сохранять жизнеспособность вне тела "хозяина") по сравнению с бактериальными индикаторами.

Коли-фаги определяют только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

Определение колифагов в питьевой воде заключается в предварительном накоплении колифагов в среде обогащения на культуре *E. coli* и последующем выявлении

зон лизиса (просветления) газона *E. coli* на питательном агаре. Метод предназначен для проведения текущего контроля качества питьевой воды.

На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь, приготовленную следующим образом: культуру *E. coli* K12 Str^R засевают в пробирку на скошенный питательный агар со стрептомицином. Через 18±2 ч инкубации при температуре 37±1⁰С производят смыв бактерий 5 мл стерильного физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl) и по стандарту мутности готовят взвесь *E. coli* в концентрации 10⁹ КОЕ в 1 мл.

Проведение качественного анализа. В исследуемую пробу воды объемом 100 мл вносят 10 мл 10-кратного питательного бульона и 1 мл подготовленного смыва тест-культуры или 2 мл 4-часовой бульонной культуры.

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий *E. coli* (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) помещают в чашку Петри и заливают питательным агаром. Исследуемую пробу воды (100 мл) и чашку Петри с контролем *E. coli* инкубируют при 37±1⁰С в течение 18±2 ч. После инкубации из исследуемой пробы воды отливают в пробирку 10 мл и добавляют 1 мл хлороформа для освобождения от бактерий. Пробирку закрывают стерильной резиновой или силиконовой пробкой, энергично встряхивают для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставляют при комнатной температуре не менее 15 мин до полного осаждения хлороформа. В предварительно расплавленный и остуженный до 45-49⁰С питательный агар добавляют приготовленный смыв бактерий *E. coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

В стерильную чашку Петри пипеткой из пробирки переносят 1 мл обработанной хлороформом пробы (не касаясь хлороформа) и заливают смесью расплавленного и остуженного до 45-49⁰С питательного агара объемом 12-15 мл, а также одну дополнительную чашку Петри для контроля культуры *E. coli* и осторожно покачивают для равномерного перемешивания пробы воды и агара. Для полного застывания чашки оставляли на столе при комнатной температуре на 10 мин. После застывания чашки помещали в термостат на 18±2 ч при 37⁰С.

Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. Проба считается положительной при наличии полного лизиса, просветления нескольких бляшек, одной бляшки на чашке с пробой воды при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке. При наличии зон лизиса в контроле культуры результат считается недействительным.

Лекция №10 (2 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование воздуха»

1. Вопросы лекции:

1. Микрофлора воздуха.
 - 1.1. Микрофлора атмосферного воздуха.
 - 1.2. Микрофлора воздуха закрытых помещений.
 - 1.3. Условия циркуляции микроорганизмов в воздухе.
2. Цели и задачи санитарно-микробиологического исследования воздуха.
3. Отбор проб воздуха и приборы.
4. Методы санитарно-микробиологического исследования воздуха.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Микрофлора воздуха.

Воздух не является благоприятной средой для развития микроорганизмов, что обусловлено недостатком питательных веществ и влаги, а также бактерицидным действием солнечных лучей. Однако, попадая в воздух, многие микроорганизмы

способны какое-то время находиться в жизнеспособном состоянии. Среди них большая группа патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Количественный и видовой состав микрофлоры атмосферного воздуха зависит от характера почвенного и водного покрова, общего санитарного состояния местности, сезонных, климатических и метеорологических факторов (интенсивности солнечной радиации, температуры, атмосферных осадков, движения воздушных масс).

Воздух больших городов загрязнен микробами в большей степени, чем сельской местности. Воздух лесов, гор, а также воздух над водной поверхностью (озера, моря) содержит еще меньшее количество микроорганизмов. Воздух над тайгой содержит настолько незначительное их количество, что открытые пробирки с питательным агаром остаются стерильными в течение 8 дней. В воздухе Арктики и Антарктиды имеется очень незначительное количество микробов.

Летом воздух загрязнен микроорганизмами в 2 раза больше, чем зимой. Благодаря осадкам (дождь, снег) воздух освобождается от пыли и в нем уменьшается содержание микробов.

Видовой состав микробов в воздухе весьма разнообразен. В нем встречаются сотни видов устойчивых к высыханию стафилококков, стрептококков, пигментообразующих бактерий, плесневых грибов.

Количество микробов в воздухе помещений зависит от частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и некоторых других условий. В помещениях, где проводится регулярное проветривание помещений и влажная уборка, количество микробов в 30 раз меньше, чем в непроветриваемых.

Максимум загрязненности воздуха совпадает с периодами повышенной активности людей, когда количество микробов в воздухе возрастает примерно в 50 раз по сравнению со средними показателями в сутки.

Через воздух передается группа заболеваний, которая так и называется - инфекции дыхательных путей с воздушно-капельным и воздушно-пылевым механизмами передачи. Патогенные микроорганизмы попадают в воздух из почвы и выделений человека и животных (при разговоре, кашле, чихании). Выживаемость патогенных микроорганизмов в воздухе зависит от биологических свойств возбудителя, а также влажности и температуры.

Воздух может быть источником загрязнения пищевых продуктов. Поэтому к воздуху производственных помещений на пищевых предприятиях предъявляются определенные санитарно-гигиенические требования. Микробная загрязненность воздуха подчиняется законам аэриобиологии имеет непостоянный и локальный характер. Микрофлора воздуха зависит от места и времени отбора проб. Летом обсемененность воздуха в несколько раз выше, чем зимой. Особенно сильно микроорганизмами насыщен атмосферный воздух над крупными городами. Микрофлора атмосферного воздуха и микрофлора воздуха жилых помещений различается. Наиболее часто в воздухе встречаются споры аэробных палочек рода *Bacillus*, пигментированные (окрашенные) штаммы бактерий (родов *Sarcina*, *Staphylococcus* и др.), а также грибы (родов *Penicillium*, *Aspergillus* и др.), дрожжи *Rhodotorula*.

1.1. Микрофлора атмосферного воздуха.

В атмосферном воздухе стафилококки и стрептококки обнаруживают лишь в 3,7% проб, взятых в местах большого скопления людей. Среди микроорганизмов доминируют виды, обитающие в почве. В атмосферном воздухе в основном встречаются три группы микроорганизмов.

- **Пигментообразующие кокки** в солнечные дни составляют до 70-80% всей флоры (пигмент защищает бактерии от инсоляции).
- **Почвенные споровые и гнилостные микроорганизмы.** Их содержание резко увеличивается в сухую и ветреную погоду.

- **Плесневые грибы и дрожжи.** Их содержание увеличивается при повышении влажности воздуха.

В отличие от воздуха закрытых помещений, в атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самоочищения. Этот процесс происходит благодаря осадкам, инсоляции, температурным воздействиям и другим факторам. В свою очередь атмосферный воздух сам по себе — фактор очищения воздуха жилых помещений.

1.2. Микрофлора воздуха закрытых помещений.

Микрофлора воздуха закрытых помещений более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носоглотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. Основной источник загрязнения воздуха патогенными видами — бактерионосители.

Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязнённости, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещённости и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижает обсеменённость воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). Самоочищения воздуха закрытых помещений не происходит.

Для снижения численности микроорганизмов в воздухе закрытых помещений применяют механические методы - проветривание и влажную уборку помещений, а также пропускание воздуха через специальные воздушные фильтры.

Для дезинфекции воздуха закрытых помещений применяют:

- а) физические методы - ультрафиолетовое облучение (бактерицидные лампы);
- б) химические методы - обработка озоном, двуокисью азота, распыление молочной кислоты, хлорсодержащих препаратов.

1.3. Условия циркуляции микроорганизмов в воздухе.

Микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. Выделяют три основные фазы бактериального аэрозоля.

Капельная, или крупноядерная фаза состоит из бактериальных клеток, окружённых водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц около 0,1 мм и более. Частицы оседают довольно быстро: длительность пребывания в воздухе составляет несколько секунд, а скорость перемещения — в среднем 30 см/с.

Мелкоядерная фаза образуется при высыхании частиц первой фазы и состоит из бактериальных клеток, сохранивших только химически связанную воду на своей поверхности и свободную воду внутри клеток. В этой фазе частицы имеют наименьшие размеры, легко перемещаются потоками воздуха, длительное время находятся в нём во взвешенном состоянии. Это наиболее устойчивая фаза, так как диаметр большинства частиц не превышает 0,05 мм, а скорость оседания частиц составляет, в среднем, 0,013 см/с. При этом скорость их передвижения превышает 30 см/с, поэтому они могут рассеиваться на большие расстояния. Эта фаза представляет наибольшую эпидемиологическую опасность, так как в её составе распространяется большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций, особенно малоустойчивых к внешним воздействиям (например, возбудитель коклюша).

Фаза «бактериальной пыли». Из первых двух фаз бактерии могут переходить в состав более крупных частиц, оседающих в виде пыли на различных предметах, образуя так называемую «бактериальную пыль». Её важное свойство — способность легко диспергироваться под воздействием даже малых токов воздуха. Размер частиц варьирует от 0,01 до 1 мм. В зависимости от размера частиц и скорости воздушных течений, скорость их перемещения находится в пределах 0,5-30 см/с. Вследствие длительного пребывания во взвешенном состоянии и способности частиц проникать в дистальные отделы лёгких, мелкодисперсная «бактериальная пыль» также представляет эпидемиологическую опасность. Эта фаза бактериального аэрозоля преобладает в воздухе

жилых помещений и с ней рассеиваются патогенные микроорганизмы, устойчивые к высушиванию (микобактерии, клостридии, стафилококки, стрептококки, грибы).

2. Цели и задачи санитарно-микробиологического исследования воздуха.

Задачами санитарно-микробиологического исследования воздуха являются гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды, и, как следствие, разработка комплекса мероприятий, направленных на профилактику аэрогенной передачи возбудителей инфекционных болезней.

Объектами санитарно-микробиологического исследования воздуха закрытых помещений являются: воздух больниц (операционные, отделение реанимации, родильные залы роддомов, и т.п.), детских садов, школ, поликлиник, аптек, производственных цехов и вспомогательных помещений на предприятиях различного профиля (пищевых, микробного синтеза и т.п.), а также мест массового скопления людей - кинотеатров, спортивных залов и т. д.

В последнее время внимание санитарных микробиологов привлекают крупные животноводческие комплексы и птицефабрики. Так было показано, что в воздухе птицефабрик содержится большое количество микроорганизмов — до 8 млн. в 1 м³, которые, попадая в атмосферный воздух, переносятся потоками воздуха на большие расстояния; среди них микроорганизмы р.р. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, грибы рода *Aspergillus* и др.

Санитарно-микробиологическое исследование атмосферного воздуха в крупных городах проводится в плановом порядке и в некоторых случаях по эпидемическим показаниям. Исследование атмосферного воздуха в местах орошения земледельческих полей сточными водами методом дождевания проводится с целью обнаружения микроорганизмов р.р. *Salmonella*, *Escherichia*.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяется общая бактериальная обсемененность (общее микробное число), присутствие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, α - и β -гемолитических стрептококков), а также непосредственно патогенных микроорганизмов (в зависимости от характера помещений - микобактерий туберкулеза, коринебактерий дифтерии, дрожжей и мицелиальных грибов и пр.). Например, при исследовании воздуха медицинских учреждений определяется присутствие микроорганизмов, относящихся к условно-патогенной флоре (синегнойная палочка, бактерии рода *Proteus* и ряд других грамотрицательных палочек), вызывающих внутрибольничные инфекции.

При исследовании воздуха на предприятиях пищевого профиля, общественного питания помимо показателя общей обсемененности определяют те группы микроорганизмов, которые являются характерными возбудителями порчи данных видов продукции или могут встречаться в данном производственном помещении (дрожжи и грибы - в холодильниках, стафилококки - в цехе производства мороженого и т.п.).

На предприятиях микробиологической промышленности, где в производстве используются актиномицеты, грибы, спорообразующие бациллы, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и др., изучается присутствие и количественное содержание в воздухе микробов-продуцентов с целью предупреждения воздействия их на организм работающих людей (возможность заболевания и развития сенсibilизации).

При изучении присутствия микроорганизмов различных физиологических групп в воздухе используют питательные среды разного назначения (как стандартные, так и селективные или дифференциально-диагностические), в зависимости от цели исследования.

3. Отбор проб воздуха и приборы.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха можно разделить на 4 этапа:

1. отбор проб;
2. обработка, транспортировка, хранение проб, получение концентрата микроорганизмов (если необходимо);

3. бактериологический посев, культивирование микроорганизмов;
4. идентификация выделенной культуры.

Отбор проб, как и при исследовании любого объекта, является наиболее ответственным. Правильное взятие проб гарантирует точность исследования. В закрытых помещениях точки отбора проб устанавливаются из расчета на каждые 20 м² площади - одна проба воздуха, по типу конверта: 4 точки по углам комнаты (на расстоянии 0,5 м от стен) и 5-я точка - в центре. Пробы воздуха забираются на высоте 1,6—1,8 м от пола.

- на уровне дыхания в жилых помещениях. Пробы необходимо отбирать днем (в период активной деятельности человека), после влажной уборки и проветривания помещения. Атмосферный воздух исследуют в жилой зоне на уровне 0,5—2 м от земли вблизи источников загрязнения, а также в зеленых зонах (парки, сады и т.д.) для оценки их влияния на микрофлору воздуха.

Следует обратить внимание на то, что при отборе проб воздуха во многих случаях одновременно происходит и его посев на питательную среду.

Все методы отбора проб воздуха можно разделить на седиментационные и аспирационные.

Седиментационный - наиболее старый метод, широко распространен благодаря простоте и доступности, однако является неточным. Метод предложен Р. Кохом и заключается в способности микроорганизмов под действием силы тяжести и под влиянием движения воздуха (вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля) оседать на поверхность питательной среды в открытые чашки Петри. Чашки устанавливаются в точках отбора на горизонтальной поверхности. При определении общей микробной обсемененности чашки с мясопептонным агаром оставляют открытыми на 5—10 мин или дольше в зависимости от степени предполагаемого бактериального загрязнения. Для выявления санитарно-показательных микробов применяют среду Гарро или Туржецкого (для обнаружения стрептококков), молочно-солевой или желточно-солевой агар (для определения стафилококков), суслоагар или среду Сабуро (для выявления дрожжей и плесневых грибов). При определении санитарно-показательных микроорганизмов чашки оставляют открытыми в течение 40—60 мин.

По окончании экспозиции все чашки закрывают, помещают в термостат на сутки для культивирования при температуре, оптимальной для развития выделяемого микроорганизма, затем (если этого требуют исследования) на 48 ч оставляют при комнатной температуре для образования пигмента пигментообразующими микроорганизмами.

Седиментационный метод имеет ряд недостатков: на поверхность среды оседают только грубодисперсные фракции аэрозоля; нередко колонии образуются не из единичной клетки, а из скопления микробов; на применяемых питательных средах вырастает только часть воздушной микрофлоры. К тому же этот метод совершенно непригоден при исследовании бактериальной загрязненности атмосферного воздуха.

Более совершенными методами являются аспирационные, основанные на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость (мясо-пептонный бульон, буферный раствор, изотонический раствор хлорида натрия и др.). В практике санитарной службы при аспирационном взятии проб используются аппарат Кротова, бактериоуловитель Речменского, прибор для отбора проб воздуха (ПОВ-1), пробоотборник аэрозольный бактериологический (ПАБ-1), бактериально-вирусный электропреципитатор (БВЭП-1), прибор Киктенко, приборы Андерсена, Дьяконова, МБ и др. Для исследования атмосферы могут быть использованы и мембранные фильтры № 4, через которые воздух просасывается с помощью аппарата Зейтца. Большое разнообразие приборов свидетельствует об отсутствии универсального аппарата и о большей или меньшей степени их несовершенства.

Прибор Кротова. В настоящее время этот прибор широко применяется при исследовании воздуха закрытых помещений и имеется в лабораториях СЭС.

Принцип работы аппарата Кротова основан на том, что воздух, просасываемый через клиновидную щель в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды, при этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе. Чашку Петри с тонким слоем среды укрепляют на вращающемся столике аппарата, что обеспечивает равномерное распределение бактерий на ее поверхности. Работает аппарат от электросети. После отбора пробы с определенной экспозицией чашку вынимают, закрывают крышкой и помещают на 48 ч в термостат. Обычно отбор проб проводят со скоростью 20-25 л/мин в течение 5 мин.

Таким образом, определяется флора в 100-125 л воздуха. При обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов объем исследуемого воздуха увеличивают до 250 л.

Бактериоуловитель Речменского представляет собой полый стеклянный цилиндр, внутри которого впаяна стеклянная воронка с капилляром, сообщаемым с приемником.

Приемник перед забором пробы воздуха заполняется 3—5 мл улавливающей жидкости (водой, мясопептонным бульоном, изотоническим раствором хлорида натрия).

Прибор Речменского работает по принципу пульверизатора: при прохождении воздуха через узкое отверстие воронки жидкость из приемника через капилляр в виде капелек поднимается в цилиндр. Капли жидкости еще больше дробятся, ударяясь о стеклянную лопаточку и стенки сосуда, создавая облачко из мелких капелек, на которых и адсорбируются находящиеся в воздухе микроорганизмы. Насыщенные бактериями капли

жидкости стекают в приемник, а затем опять диспергируются, что обеспечивает максимальное улавливание бактерий из воздуха. При работе прибор помещают под углом 15—25°, что обеспечивает стекание улавливающей жидкости в приемник. Скорость отбора проб воздуха через аппарат Речменского - 10-20 л/мин. По окончании работы жидкость из приемника забирают стерильной пипеткой и засевают (по 0,2 мл) на поверхность плотных питательных сред. Преимуществом бактериоуловителя Речменского является высокая эффективность улавливания бактериальных аэрозолей. Недостатки прибора заключаются в трудности его изготовления, нестандартности получаемых аппаратов, их большой хрупкости и сравнительно низкой производительности.

Прибор ПОВ-1 (прибор для отбора проб воздуха). Отбор проб воздуха с помощью прибора ПОВ-1 (рис. 3). Основан на том же принципе, что и в бактериоуловителе Речменского.

Большим преимуществом являются серийный выпуск этого прибора (что дало возможность оснастить им лаборатории СЭС), его портативность, более высокая производительность (20—25 л/мин). Колба прибора, в которую помещается улавливающая жидкость, изготавливается из термостойкого плексигласа, капилляр из нержавеющей стали. В колбу вмонтирован пульверизатор, вызывающий диспергирование улавливающей жидкости при просасывании воздуха. Такое устройство дает возможность легко очищать и стерилизовать колбу с диспергирующим устройством простым кипячением в течение 30 мин (автоклавирование недопустимо, так как оно вызывает деформацию цилиндра).

Перед забором проб воздуха в колбу вносят 5-10 мл улавливающей жидкости (чаще всего мясопептонный бульон) и устанавливают ее под углом

10°, что обеспечивает естественное стекание жидкости после диспергирования. Воздух, проходя через колбу и пульверизатор, вызывает образование мелких капелек улавливающей жидкости, на которых оседают микроорганизмы. Прибор ПОВ-1 применяется для исследования воздуха закрытых помещений на общую микробную обсемененность, для обнаружения патогенных бактерий (например, микобактерий туберкулеза) и респираторных вирусов в воздухе больничных палат. Для выявления

микобактерий туберкулеза в качестве улавливающей жидкости используют среду Школьниковой. Исследуют 250—500 л воздуха.

Пробоотборник аэрозольный бактериологический (ПАБ-1). Механизм действия ПАБ-1 основан на принципе электростатического осаждения частиц аэрозоля (а следовательно, и микроорганизмов) из воздуха при прохождении его через прибор, в котором эти частицы получают электрический заряд и осаждаются на электродах с противоположным знаком. На электродах для улавливания аэрозолей помещают в горизонтальном положении металлические поддоны с твердыми средами в чашках Петри или жидкой питательной средой (15—20 мл). Прибор переносной с большой производительностью 150-250 л/мин, т.е. за 1 ч можно отобрать 5—6 м³ воздуха. Его рекомендуют применять для исследования больших объемов воздуха при обнаружении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, например, при выявлении в воздухе палат больниц возбудителей внутрибольничных инфекций (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus* и др.), определении сальмонелл и эшерихий в атмосферном воздухе в местах дождевания при орошении сельскохозяйственных полей сточными водами.

Бактериально-вирусный электропреципитатор (БВЭП-1). Прибор основан на аспирационно-ионизационном принципе действия. БВЭП-1 состоит из осадительной камеры, в которую вмонтированы электроды: отрицательный в виде приводящей трубки, через которую поступает воздух (и частички аэрозоля соответственно заряжаются отрицательно), и положительный, на котором оседают бактерии.

Прибор представляет собой металлическую чашу с улавливающей жидкостью. В качестве улавливающей среды применяют мясопептонный бульон, 0,5% мясопептонный агар, а при минусовых температурах - смесь 66,7% глицерина с 33,3% мясопептонного бульона.

Прибор переносной, работает от электросети и обладает значительно большей эффективностью в сравнении с аппаратом Кротова.

Прибор МБ. Этот прибор служит не только для определения общей микробной обсемененности, но и для отбора проб воздуха с аэрозольными частицами различных размеров. Прибор МБ построен по принципу «сита» и представляет собой цилиндр, разделенный на 6 горизонтальных полос, на каждую из которых помещают чашки Петри с МПА. Воздух просасывается, начиная с верхней ступени, в пластине которой отверстия самые крупные, и чем ниже ступень, тем меньше размером отверстия (через последние проходят только тонкодисперсные фракции воздушного аэрозоля). Прибор рассчитан на улавливание частиц аэрозоля размером более 1 мкм при скорости отбора воздуха 30 л/мин. Уменьшение числа отверстий обеспечивает более равномерное распределение по питательной среде аэрозоля из воздуха. Для улавливания еще более мелких частиц аэрозоля можно добавлять дополнительно фильтр из фильтрующего материала АФА.

При использовании любого из перечисленных приборов получаемые результаты являются приблизительными, однако они дают более правильную оценку обсемененности воздуха в сравнении с седиментационным методом. Поскольку и отбор и санитарно-микробиологические исследования воздуха не регламентированы ГОСТ, то можно использовать любой прибор для оценки бактериальной загрязненности воздуха. Во многих случаях отбор проб совмещен с этапом посева.

4. Методы санитарно-микробиологического исследования воздуха.

Общая бактериальная обсемененность воздуха или микробное число - это суммарное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха. Для определения общего количества бактерий в воздухе закрытых помещений забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи любого прибора (чаще всего аппарата Кротова), либо седиментационным методом, расставляя чашки с питательной средой по принципу конверта. Чашки с посевом помещают в термостат на сутки, а затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре. Экспозиция чашек с посевами на свету дает возможность подсчитать раздельно количество пигментных

колоний (желтых, белых, розовых, черных, оранжевых и др.), количество спорообразующих бацилл, грибов и актиномицетов.

Подсчитывают количество колоний на обеих чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Бациллы образуют колонии, как правило, крупные, круглые, с неровными краями, сухие, морщинистые. Колонии грибов с пушистым налетом (*Mucor* и *Aspergillus*) и плотные - зеленоватые или сероватые (*Penicillium*). Актиномицеты образуют беловатые колонии, выросшие в агар. Количество каждой группы колоний (пигментных, беспигментных, плесеней, бацилл, актиномицетов) выражают в процентах по отношению к общему числу.

При определении микробного числа методом седиментации по Коху подсчитываются колонии, выросшие на МПА в чашках Петри, и расчет ведется по В.Л. Омелянскому. Если придерживаться этой методики, на чашку площадью 100 см² за 5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л воздуха.

Определение стафилококков

Стафилококки являются одним из наиболее распространенных микроорганизмов в воздухе закрытых помещений, что обуславливается значительной устойчивостью их к различным факторам окружающей среды. Обнаружение патогенных стафилококков в воздухе закрытых помещений имеет санитарно-показательное значение и свидетельствует об эпидемическом неблагополучии. Отбор проб воздуха проводится с помощью аппарата Кротова в количестве 250 л на 2-3 чашки с молочно-желточно-солевым агаром (или молочносолевым, желточно-солевым) и на чашку с кровавым агаром. Чашки инкубируют при температуре 37°C в течение 48 ч. Изучают культуральные признаки всех видов колоний (см. приложение 3), из подозрительных готовят мазки и окрашивают по Граму.

Помимо качественной характеристики отдельных колоний, подсчитывают количество выросших колоний стафилококков в 1 м³ воздуха.

Определение стрептококков

Стрептококки также являются санитарно-показательными микроорганизмами воздуха, в который они попадают от больных скарлатиной, тонзиллитами, ангиной и носителей стрептококков. Отбор проб воздуха при исследовании на наличие α - и β -гемолитических стрептококков производят с помощью аппарата Кротова на чашки с кровавым агаром, средами Гарро и Туржецкого. Забирают 200—250 л воздуха, чашки с посевами выдерживают в термостате 18—24 ч и затем еще 48 ч при комнатной температуре (после предварительного просмотра и учета). Идентификацию проводят по общепринятой методике/

Определение патогенных микроорганизмов в воздухе

Ввиду малой концентрации патогенных микроорганизмов в воздухе закрытых помещений, их выделение является достаточно трудной задачей.

При расшифровке внутрибольничных инфекций определяют в воздухе присутствие стафилококков, стрептококков, синегнойной палочки, сальмонелл, протеев и др. Отбор проб воздуха производят с помощью ПАБ-1 в объеме не менее 1000 л. Посев производят на соответствующие элективные среды. Если используется жидкая среда как улавливающая жидкость, то пробирку с жидкостью помещают в термостат на сутки для подрачивания (получение накопительной культуры), а затем высевают на элективную среду.

При исследовании воздуха на наличие микобактерий туберкулеза отбор проб производят с помощью прибора ПОВ-1 в объеме 250—500 л воздуха. В качестве улавливающей жидкости берут среду Школьниковой, которую затем обрабатывают 3% раствором серной кислоты (для подавления сопутствующей микрофлоры) и центрифугируют. Осадок засевают в пробирки на одну из яичных сред, чаще среду Левенштейна - Йенсена. Инкубируют при 37°C до 3 мес. Отсутствие роста в течение 3 мес дает возможность выдать отрицательный ответ. Пробирки первый раз просматривают через 3 нед, затем каждые 10 дней. Выделенную культуру идентифицируют, определяют

ее вирулентность (заражением морских свинок - биопроба) и при необходимости определяют устойчивость к лекарственным препаратам.

При определении в воздухе коринебактерий дифтерии для посева воздуха используют чашки со средой Клауберга.

В последние годы определяют в атмосферном воздухе в районах дождевания сельскохозяйственных полей, при орошении их сточными водами, сальмонеллы в случае появления заболевания среди персонала станций орошения или населения. Отбор проб производят с помощью аппарата Кротова на чашки с висмут-сульфитным агаром. Исследуют не менее 200 л воздуха. Выделенная культура идентифицируется по обычной схеме определения сальмонелл.

В связи с развитием микробиологической промышленности возникла необходимость исследования воздуха с целью обнаружения грибов-продуцентов при производстве антибиотиков, ферментных препаратов, при изготовлении кормовых дрожжей и др. Для исследования воздуха плесневые грибы и грибы рода *Candida* отбор проб производят с помощью аппарата Кротова в объеме от 100 до 1000 л на чашки со средой Чапека, сусло - агаром (для обнаружения плесневых грибов) и с метабисульфит-натрий - агаром (МБС-агар) с добавлением антибиотиков (для обнаружения дрожжеподобных грибов рода *Candida*). Чашки инкубируют в термостате при температуре 26—27°C в течение 3-4 суток (для плесневых грибов) и при 35—37°C в течение 2—3 суток (для грибов - продуцентов и дрожжеподобных рода *Candida*). Идентификация проводится с учетом особенностей плодоносящих грибов и характера мицелия. Считают, что концентрация дрожжеподобных грибов в количестве 500—600 клеток в 1 м³ воздуха рабочего помещения является предельной, превышение ее ведет к развитию аллергических реакций у рабочих.

Лекция №11 (2 часа)

Тема: «Санитарно-микробиологическое исследование почвы»

1. Вопросы лекции:

1. Микрофлора почвы. Показатели санитарного состояния почвы.
2. Отбор проб для исследования и пробоподготовка.
3. Определение токсичности почв по отношению к микроорганизмам.

2. Краткое содержание вопросов:

1. Микрофлора почвы. Показатели санитарного состояния почвы.

Состав микрофлоры почвы меняется в зависимости от глубины. В поверхностном слое почвы (0-10 см), как правило, количество микроорганизмов незначительно; это связано с губительным действием прямого солнечного света и низкой влажности почвы. Максимальное количество микроорганизмов обнаруживается на глубине 10-30 см. На глубине 1 м выявляются единичные клетки бактерий. Наиболее богата микроорганизмами культурная возделываемая почва (до 5 млрд. клеток в 1 г почвы), наименее — почва, бедная влагой и органическими веществами (200 млн. клеток в 1 г).

Оценить микробный пейзаж почвы и степень ее опасности для здоровья населения, активность протекающих процессов самоочищения можно при ведении мониторинга за балансом постоянных обитателей и состоянием микроорганизмов, попадающих в почву с выделениями человека и животных, для которых почва служит местом кратковременного (кишечная палочка - до 8 мес, брюшнотифозные палочки - от нескольких дней до 3 мес, шигеллы - от 14 до 100 дней) или длительного пребывания (спорообразующие бактерии - сибиреязвенная палочка, возбудитель столбняка и газовой гангрены - годами и десятилетиями).

Санитарно-гигиенический надзор за состоянием почвы предусматривает определение и прогноз степени их опасности для здоровья людей в населенных пунктах, а

также разработку мероприятий по их рекультивации, профилактике инфекционной и неинфекционной заболеваемости, схем районной планировки и охраны водосборных территорий. Результаты надзора учитывают при решении очередности оздоровительных мероприятий в рамках комплексных природоохранных программ, оценке эффективности реабилитационных и санитарно-экологических мероприятий и текущего санитарного контроля за объектами, прямо или косвенно воздействующими на окружающую среду населенного пункта.

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска (детские сады, игровые площадки, зоны санитарной охраны и т.п.) и в санитарно-защитных зонах по следующим индикаторным показателям:

- косвенным показателям, характеризующим интенсивность биологической нагрузки на почву. Это санитарно-показательные микроорганизмы бактерий группы кишечной палочки (БГКП) - общие колиформные бактерии (ОКБ) и фекальные энтерококки (индекс энтерококков). На свежее фекальное загрязнение почвы указывает наличие высокого индекса БГКП при низких титрах нитрификаторов, термофилов, а также относительно высокое содержание вегетативных форм *C. perfringens*. Обнаружение энтерококков всегда свидетельствует о свежем фекальном загрязнении, каковы бы не были другие показатели.

- прямым санитарно-бактериологическим показателям эпидемической опасности почвы – обнаружением возбудителей кишечных инфекций (патогенные энтеробактерии, энтеровирусы).

Почву оценивают как чистую без ограничений по санитарно-бактериологическим показателям при отсутствии патогенных бактерий и индексе СПМО до 10 клеток на 1 г почвы. При загрязнении почвы сальмонеллами индекс СПМО БГКП и энтерококков достигает 10 клеток на 1 г почвы и более. Концентрация колифага в почве на уровне 10 БОЕ/г и более тоже свидетельствует о загрязнении почвы.

Показатели биологической активности почвы.

Исследования биологической активности почвы проводятся при необходимости углубленной оценки её санитарного состояния и способности к самоочищению.

Основными интегральными показателями биологической активности почвы являются: ОМЧ, численность основных групп почвенных микроорганизмов (почвенных сапрфитных бактерий, актиномицетов, почвенных микромицетов), показатели интенсивности трансформации соединений углерода и азота в почве («дыхание» почвы, санитарное число, динамика азота, аммиака и нитратов в почве, азотофиксация, аммонификация, нитрификация и денитрификация), динамика кислотности и ОВ потенциала в почве, активность ферментативных систем и др. показатели.

Так, почву можно считать «незагрязненной» по показателям биологической активности при изменении микробиологических показателей не более 50% и биохимических — не более 25% по сравнению с такими же показателями для контрольных, принятых в качестве чистых, незагрязненных почв.

2. Отбор проб для исследования и пробоподготовка.

Отбор проб для бактериологического анализа проводится не реже 1 раза в год в местах возможного нахождения людей, животных, в местах загрязнения органическими отходами. При изучении динамики самоочищения почвы отбор проб осуществляют в течение первого месяца еженедельно, а затем ежемесячно в течение вегетационного периода до завершения активной фазы самоочищения.

При выборе объектов в первую очередь обследуют почвы территорий повышенного риска воздействия на здоровье населения (детские, дошкольные, школьные и лечебные учреждения, селитебные территории, зоны санитарной охраны водоемов, питьевого водоснабжения, земли, занятые под сельхозкультуры, рекреационные зоны и т.д.). На данных объектах отбор проб проводится 2 раза в год, размер пробной площадки

— не более 5х5 м. На территории детских учреждений и игровых площадок пробы отбирают отдельно из песочниц и с общей территории с глубины 0-10 см.

Из каждой песочницы или с игровой территории отбирается одна объединенная проба, составленная из 5 точечных проб. Допускается отбор изо всех песочниц или со всех игровых территорий каждой возрастной группы одной объединенной пробы, составленной из 8-10 точечных проб загрязнения почв.

Санитарно-бактериологический контроль почв населенных пунктов проводится с учетом функциональных зон города. Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. При неоднородности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа. На территорию, подлежащую контролю, составляют описание с указанием адреса, точки отбора, общего рельефа микрорайона, расположения мест отбора и источников загрязнения, растительного покрова, характера землепользования, уровня грунтовых вод, типа почвы и других данных, необходимых для правильной оценки и трактовки результатов анализов образцов.

При контроле за загрязнением почв промышленными источниками площадки для отбора проб располагают на площади трехкратной величины санитарно-защитной зоны вдоль векторов розы ветров на расстоянии 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 5000 м и более от источника загрязнения (ГОСТ 17.4.4.02-84).

При изучении загрязнения почв в районе транспортных магистралей пробные площадки закладывают на придорожных полосах с учетом рельефа местности, растительного покрова, метео- и гидрологических условий. Пробы почвы отбирают с узких полос длиной 200-500 м на расстоянии 0-10, 10-50, 50-100 м от полотна дороги. Одна смешанная проба составляется из 20-25 точечных, отобранных с глубины 0-10 см.

При оценке сельскохозяйственных территорий пробы почвы отбирают 2 раза в год (весна, осень) с глубины 0-25 см. На каждые 0-15 га закладывается не менее одной площадки размером 100-200 м² в зависимости от рельефа местности и условий землепользования. Для взятия проб применяют бур Некрасова.

Точечные пробы отбирают в соответствии с ГОСТом 17.4.4.02-84, с соблюдением стерильности для санитарно-микробиологических исследований методом конвертов. Объединенную пробу составляют из равных по объему точечных проб (не менее 5), отобранных на одной площадке. Объединенные пробы упаковывают в чистые полиэтиленовые пакеты, закрывают, маркируют, регистрируют в журнале отбора проб и пронумеровывают. На каждую пробу составляют сопроводительный талон, вместе с которым пробу вкладывают во второй внешний пакет, что обеспечивает целостность и безопасность их транспортирования. Время от отбора проб до начала их исследований не должно превышать 1 сут. В лаборатории пробу освобождают от посторонних примесей, доводят до воздушно-сухого состояния, тщательно перемешивают и делят на части для проведения анализа. Отдельно оставляют контрольную часть от каждой анализируемой пробы (около 200 г) и хранят в холодильнике 2 недели на случай арбитража.

Подготовка и обработка почвы для анализа. Для приготовления среднего образца почву всех образцов одного участка высыпают на стерильный плотный лист бумаги, перемешивают и распределяют в форме квадрата, диагоналями почву делят на 4 треугольника, почву из двух противоположных треугольников отбрасывают, а оставшуюся вновь перемешивают и далее повторяется приведенная выше процедура до тех пор, пока не останется 0,5 кг почвы. Перед посевом почву просеивают через сито диаметром 3 мм.

Образец почвы тщательно перемешивают и из него отбирают навески, величины которых выбирают исходя из предполагаемой степени загрязнения почвы и планируемых определений. Для учета почвенных микроорганизмов достаточно навески от 1 до 10 г. Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде (например, 1 г почвенной суспензии разводят в 10 мл стерильной водопроводной воды, 10 г почвы - в 100 мл воды и т.д.). После приготовления разведений применяют соответствующую

предварительную обработку почвы с целью извлечения клеток микроорганизмов из почвенных агрегатов, что достигается разрушением последних и десорбцией микроорганизмов с поверхности почвенных частиц при помощи:

- 10-минутного вертикального встряхивания почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками;

- 3-минутной обработки почвенной суспензии первого разведения на мешалке.

Приготовленные разведения используются для посева на различные питательные среды, а также для учета численности микроорганизмов методом прямой микроскопии.

3. Определение токсичности почв по отношению к микроорганизмам.

Метод определения степени токсичности почв для микроорганизмов используется в качестве быстрого и достаточно чувствительного теста для получения ориентировочных данных о способности почвы самоочищаться от патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Кроме того, этот тест оказался также чувствительным для определения влияния химических веществ на почвенный микробиоценоз. Низкая степень токсичности или ее снижение по отношению к патогенным микроорганизмам свидетельствуют о наличии или возникновении условий для выживания возбудителей в таких почвах. Это явление неблагоприятное.

Для определения токсичности почв можно использовать два метода — качественный и качественно-количественный.

Качественный метод определения токсичности почв. На половину дна стерильной чашки Петри ровным слоем распределяют 10 г перемешанной и просеянной почвы. На дне и крышке чашки записывают номер пробы по журналу и тест-микроорганизм. Затем чашки переносят в бокс, устанавливают на ровной поверхности и заливают 1,5% голодным агаром в количестве 10 мл с таким расчетом, чтобы он покрыл слой почвы. После его застывания в чашки вносят питательный агар в таком же количестве, адекватный тест-микроорганизмам. Из одного почвенного образца готовят две параллельные чашки для каждого микроорганизма. Чашки высушивают под бактерицидными лампами в течение 30 мин. Затем производится посев индикаторных штаммов микроорганизмов.

В качестве контроля производят посевы тех же культур на аналогичные среды, но без почвы.

Условия инкубации посевов зависят от вида индикаторного микроорганизма. Учет результатов начинают с просмотра контрольного посева. В случае равномерного роста тест-микроба на всей поверхности агаровой пластинки просматривают остальные чашки с посевами. Колонии идентифицируют по "форме роста". Из каждой серии посевов снимают колонии и производят их идентификацию.

Рост колоний только на участке агаровой пластинки, под которой нет почвы, указывает на токсичность (Т) исследуемого образца почвы.

При исследовании некоторых почвенных проб отмечают частичное ингибирование роста тест-микроба. В этих случаях регистрируют маловыраженную токсичность (М/Т).

Качественно-количественный метод определения токсичности почв. В стерильную чашку Петри вносят 10 г почвы и распределяют равномерно по всей поверхности, затем, как и при качественном методе, вносят непитательный и питательный агар. В качестве дополнительного барьера между почвой и индикаторным штаммом на поверхности питательной среды укладывают мембранный фильтр.

На матовую поверхность мембранных фильтров простым карандашом наносят 16 точек, после чего фильтр стерилизуют кипячением. Затем на питательную среду помещают мембранные фильтры (матовой поверхностью вверх) в количестве от 1 до 4 на одну чашку. На поверхность фильтра в местах, отмеченных точками, производят посев бактериальной петлей (иглой) культуры индикаторного штамма, суспензированного в изотоническом растворе натрия хлорида до содержания 100 млн. бактериальных клеток в 1 мл по оптическому стандарту мутности. Посевы инкубируют в термостате или

анаэробостате при оптимальной температуре и продолжительности в зависимости от физиологических особенностей индикаторного штамма.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент пророста (Р) высчитывается как отношение количества образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: $T=100-P$. Этим методом, как и качественным, устанавливают абсолютную токсичность, если на фильтрах не вырастает ни одна колония; отсутствие токсичности — на метках всех посевов вырастают колонии, токсичности различной степени — когда прорастает только часть засеянных точек.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1. Лабораторная работа №1 Определение СПМО (4 часа)

Цель: изучить методы выделения санитарно-показательных, патогенных микроорганизмов и микроорганизмов порчи.

Санитарно-показательные микроорганизмы – это микроорганизмы постоянно обитающие в естественных полостях тела человека и животных, откуда они поступают в окружающую среду, где могут сохранять жизнеспособность в течение определённого времени. Обнаружение СПМО в окружающей среде свидетельствует о загрязнении ее выделениями человека или животных и косвенно указывает на возможность присутствия в исследуемом объекте патогенного микроорганизма.

Работа

Задание 1. Определить общее микробное число (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов).

Из пробы продукта готовят разведения. Выбирают те разведения, при посеве которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний. Осуществляют посев, внося в стерильные чашки Петри по 1 мл разведения, слегка приоткрывая крышки. В каждую чашку вливают 8-12 мл расплавленного и остуженного до 45-49°C питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха. После застывания агара помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. Учет результатов осуществляют путём подсчёта всех выросших на чашке колоний, наблюдаемых при увеличении в 2 раза. Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы.

Задание 2. Выделить из исследуемого материала бактерии группы кишечной палочки.

Бактерии группы кишечной палочки – это м/о, обитающие в кишечнике. Будучи неспорообразующими и некислотоустойчивыми формами, БГКП служат показателем антисанитарного состояния производства, свидетельствуют о свежем фекальном загрязнении.

В качестве среды накопления (жидкая элективная среда, для увеличения количества искомого микроорганизма в смешанной популяции) используют среду Кесслера, в состав которой входят вещества (жёлчь, краситель генциановый фиолетовый), подавляющие рост грамположительных микробов. Посевы инкубируют 48 часов при 43°C. При наличии БГКП в среде отмечается газообразование.

В связи с тем, что в пробах могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на среду Эндо. При образовании на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре 37°C характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамтрицательных палочек, не обладающих оксидазной активностью, свидетельствует о присутствии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

Задание 3. Выделить из исследуемого материала *S. aureus*.

S. aureus может стать причиной пищевого токсикоза - острого отравления энтеротоксином, который накапливается в пищевом продукте при размножении стафилококков. Энтеротоксин - это экзотоксин, способный воздействовать на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта.

Для определения в пробах патогенного стафилококка осуществляют посев в среду накопления - солевой бульон: МПБ + 6 %-й NaCl. Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37°C . При наличии признаков роста: помутнение среды, образование осадка, производят пересев со среды накопления на дифференциально-диагностические среды:

желточно-солевой агар и плазму крови кролика. Инкубируют 18-24 ч при 37⁰С. На ЖСА вырастают колонии правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, непрозрачные, вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком – радужный венчик. При наличии плазмокоагулазы у исследуемого стафилококка, образуется плотный сгусток плазмы или сгусток в виде взвешенного мешочка. Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Из культур, выросших на ЖСА, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Золотистый стафилококк имеет вид грамположительных кокков, расположенных в виде скоплений неправильной формы, а также единично, парами или цепочками из 3-4-ёх клеток.

Таблица 1

Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов

СПМО	Культуральные свойства	Результат микроскопии
БГКП	Среда Эндо	
<i>S. aureus</i>	ЖСА	
	Плазма крови кролика	

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты.

Материалы и оборудование: культуры *E.coli* на среде Эндо, чистая культура *Proteus vulgaris*, солевой бульон, среда Кесслера, желточно-солевой агар с культурой *S. aureus*, чашки с МПА, свежескошенный МПА в пробирках, плазма крови кролика, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, наборы для окрашивания по Граму, дезинфицирующий раствор, термостат.

Работа

Задание 1. Выделить из исследуемого материала микроорганизмы рода *Proteus*.

Присутствие в воде и пищевых продуктах представителей рода *Proteus* свидетельствует о загрязнении объекта разлагающимися органическими субстратами, это признак начала гнилостных изменений. При массовом обсеменении употребляемого в пищу продукта протеи могут вызвать пищевые токсикоинфекции. На присутствие бактерий рода *Proteus* исследуют продукцию предприятий общественного питания, меланж, яичный порошок.

0,5 мл анализируемой взвеси бактерий из выделенной чистой культуры вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Через 18-24 ч инкубации при 37⁰С обращают внимание на наличие ползучего вуалеобразного налёта с голубым оттенком на поверхности скошенного агара и подъёму культуры из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды. При наличии такого роста культуру бактерий микроскопируют, изучают её подвижность в препарате «висячая» капля и биохимические свойства стандартными методами.

Обнаружение полиморфных Г- палочек, дающих ползучий рост, вследствие высокой подвижности, ферментирующих лактозу и манит, указывает на наличие в продукте микроорганизмов рода *Proteus*.

Задание 2. Определить бактерии рода *Salmonella*.

Сальмонеллы – возбудители пищевых токсикоинфекций, нередко с летальным исходом. Попадают в окружающую среду и пищевые продукты с хозяйственно-

фекальными водами, содержащими выделения кишечника человека и животных. Главный источник возбудителя – мясо вынужденно убитых животных.

Для выявления бактерий рода *Salmonella* навеску исследуемого продукта высевают в забуференную пептонную воду. Соотношение массы продукта и среды 1:9. Посевы инкубируют при 37⁰С в течение 18-20 ч. Отбирают 10 см³, засевают в 100 см³ магниевой или селениновой среды. Инкубируют 37⁰С в течение 18-20 ч. Культуру пересевают на висмут-сульфитный агар (ВСА). Инкубируют при 37⁰С в течение 18-20 ч. На ВСА отмечают рост колоний характерных для сальмонелл: черные с металлическим блеском, иногда нежно-зелёного цвета. Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов осуществляют микроскопию, изучение биохимических и антигенных свойств.

Задание 3. Определить количество дрожжей и плесневых грибов в пищевых продуктах.

1 см³ нативного продукта, 1 см³ из разведений продукта 1:10 или 1 см³ из разведений продукта 1:100 высевают на 2 чашки Петри. В каждую чашку добавляют 14,0 см³ расплавленной и охлажденной до 40-45⁰С среды Сабуро. Содержимое тщательно перемешивают, дают застыть. Инкубируют вверх дном при 24⁰С в течение 5 суток (120 часов). Проводят подсчёт колоний на каждой чашке отдельно. Колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально, при необходимости проводят микроскопическое исследование.

Типичные колонии дрожжей: крупные, выпуклые, блестящие, серовато-белые или беловато-жёлтые, с гладкой поверхностью и ровным краем, сметанообразной консистенции; могут иметь перламутровый оттенок и куполообразное возвышение.

Типичные колонии плесневых грибов: имеют поверхность, покрытую пушистым мицелием, похожим на вату.

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 2

Таблица 2

Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов

СПМО	Культуральные свойства	Результат микроскопии
<i>Proteus sp.</i>	Скошенный МПА	
Дрожжи и плесневые грибы	Среда Сабуро	

По окончании лабораторной работы проанализировать полученные результаты.

Материалы и оборудование: культуры *E.coli* на среде Эндо, чистая культура *Proteus vulgaris*, солевой бульон, среда Кесслера, желточно-солевой агар с культурой *S. aureus*, чашки с МПА, свежескошенный МПА в пробирках, плазма крови кролика, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, наборы для окрашивания по Граму, дезинфицирующий раствор, термостат.

2.2. Лабораторная работа №2. Микробиологический анализ мяса и мясных продуктов (4 часа)

Цель: Изучить принцип микробиологического анализа мяса.

Работа

Задание 1. Изучить микрофлору мяса и определить его качество.

На предметных стеклах делают два мазка-отпечатка - один с поверхности, другой из глубинного слоя. Для приготовления мазка-отпечатка с поверхности мяса стерильными ножницами вырезают кусочек 0,5-1 г, прикладывают срезанной стороной к поверхности обезжиренного, про-фламбированного предметного стекла. Чтобы сделать мазки-отпечатки из глубоких слоев, поверхность мяса прожигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и из глубины берут небольшой кусочек (0,5-1 г), который прикладывают к профламбированному стеклу.

Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают фуксином и микроскопируют, подсчитывают количество микроорганизмов в поле зрения, отмечая их форму.

Примечание: мазок-отпечаток из свежего мяса обычно плохо окрашивается. Если он получен с поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев они или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения. Мазок-отпечаток из мяса подозрительной свежести окрашивается удовлетворительно. При его просмотре в поле зрения обнаруживают несколько десятков микробов. Особенно много их в мазке с поверхностного слоя. Мазок-отпечаток из испорченного мяса окрашивается хорошо. В поле зрения препаратов как с поверхностных, так и из глубинных слоев встречается в среднем более 30 микробов, среди которых преобладают палочки. При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют и все поле зрения усеяно палочками.

Задание 2. Определить наличие анаэробов в мясе. Поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным скальпелем делают надрез и берут из глубины небольшой кусочек. Соблюдая правила асептики, его опускают в пробирку с расплавленным, предварительно охлажденным до 50°C МПА. В результате вращения пробирки между ладонями кусочек мяса должен осесть на дно пробирки.

Опытные пробирки с МПА помещают в термостат при 40°C. После инкубирования посевов в термостате в течение нескольких дней пробирки просматривают визуально.

Примечание: если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в среде обнаруживают разрывы агара вследствие выделения микроорганизмами газа. В пробирках со свежим мясом столбик МПА плотный и не содержит разрывов и трещин, так как газообразующие анаэробные формы в нем не развиваются.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 3 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве образцов мяса.

Таблица 3

Бактериологический анализ мяса

Образец мяса	Количество микроорганизмов в 1-ом поле зрения		Наличие анаэробов в мясе
	кокки	палочки	
	Глубокий слой		
	Поверхностный слой		

Материалы и оборудование: пробы сырого мяса, стерильные пробирки с пробками, МПА, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, смесь спирта с эфиром, фуксин, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, термостат.

Работа

Задание. В целях контроля технологии производства котлет в студенческой столовой необходимо провести бактериологическое исследование жареной котлеты.

Определить микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

1. Из внутренней части котлеты приготавливают навеску массой 10,0 г. Эмульгируют в ступке с 90,0 мл физиологического раствора (разведение 1:10).

2. Для определения микробного числа делают посев на три чашки по 1 мл разведения 1:10 и заливают 14 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, после инкубации 24 часа при 37°C подсчитывают выросшие колонии.

Другие эмульсии сеют по 10,0 мл на среды накопления:

а) для определения кишечной палочки - на среду Кесслера;
б) для определения патогенного стафилококка - на солевой бульон (МПБ+6%-й NaCl). Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37 °С.

3. При наличии признаков роста, производят пересев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды:

а) со среды Кесслера пересевают на среду Эндо;
б) с солевого МПБ - в плазму крови кролика, на желточно-солевой агар (ЖСА).

4. Учет результатов.

а) Подсчитывают общее количество микроорганизмов в 1 г. Для этого суммируют количество колоний, выросших на трёх чашках с МПА, находят среднее арифметическое и умножают на степень разведения (на 10).

б) При наличии на среде Эндо колоний, характерных для группы кишечной палочки, готовят препарат, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах бактерий группы кишечной палочки.

в) Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Примечание. При бактериологическом исследовании жареной котлеты (внутренняя часть) кишечная палочка и патогенный стафилококк должны отсутствовать. Микробное число не должно превышать 1000 КОЕ в 1 г продукта.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 4 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение.

Таблица 4

Бактериологическое исследование готовых кулинарных изделий из мяса

№ исследуемого образца	Рост на МПА	Рост на средах накопления		Рост на дифференциально-диагностических средах				
	Микробное число КОЕ/г	Кесслера	МПБ + 6 %-й NaCl	Эндо (лактозо-положительные колонии)	Результат микроскопии	Цитратная плазма (плазмо-коагулаза)	ЖСА (лецитовителлаза)	Результат микроскопии

Материалы и оборудование: пробы котлет, стерильные пробирки с пробками, ступки с пестиками, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, чашки Петри, МПА, ЖСА, среда Эндо, солевой бульон, среда Кесслера, плазма крови кролика, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, набор красителей для окраски по Граму, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, термостат.

2.3. Лабораторная работа №3. Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов (2 часа)

Цель: провести санитарно-микробиологическое исследование охлаждённой рыбы из торговой сети.

Работа

Задание. В целях контроля качества охлаждённой рыбы на рынке необходимо провести бактериологическое исследование. Определить микробное число, наличие в пробе кишечной палочки и патогенного стафилококка.

1. Из мышц охлаждённой рыбы готовят навеску массой 10,0 г и эмульгируют в ступке с 90,0 мл физиологического раствора (разведение 1:10). Затем готовят ряд последовательных десятикратных разведений до 10^{-4} .

2. Для определения микробного числа делают посев на 3 чашки по 1 мл разведения 1:10. Заливают 14 мл расплавленного и остуженного до 45°C МПА, после инкубации 24 часа при 37 °С подсчитывают выросшие колонии, умножают на степень разведения, суммируют и находят среднее арифметическое.

3. Эмульсии сеют по 10,0 мл на среды накопления:

а) для определения кишечной палочки — на среду Кесслера 10 мл 4-ого разведения (1:10000);

б) для определения патогенного стафилококка — на солевой бульон (МПБ+6%-й NaCl) 10 мл 3-го разведения (1:1000). Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37 °С.

4. Производят пересев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды:

а) со среды Кесслера пересевают на среду Эндо;

б) с солевого МПБ - в плазму крови кролика, на желточно-солевой агар (ЖСА).

5. Учет результатов.

а) Подсчитывают общее количество микроорганизмов в 1 г, т.е. число колоний на трёх чашках с МПА суммируют, делят на 3 и умножают на степень разведения (10^4).

б) При наличии на среде Эндо колоний, характерных для группы кишечной палочки, готовят препарат, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах бактерий группы кишечной палочки.

в) Наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Примечание. При бактериологическом исследовании охлаждённой рыбы БГКП должны отсутствовать в 0,001 г, патогенный стафилококк в 0,01 г продукта. Микробное число не должно превышать $1 \cdot 10^5$ КОЕ в 1 г продукта.

Результаты эксперимента занести в таблицу 5.

Сделать заключение о качестве продукта.

Материалы и оборудование: пробы рыбы охлаждённой, стерильные пробирки с пробками, ступки с пестиками, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, чашки Петри, МПА, ЖСА, среда Эндо, солевой бульон, среда Кесслера, плазма крови кролика, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, набор красителей для окраски по Граму, стерильные шпатели, скальпели, ножницы, иммерсионное масло, дезинфицирующий раствор, весы, термостат.

Таблица 5

Бактериологическое исследование охлаждённой рыбы из торговой сети

№ исследуемого образца	Рост на МПА	Рост на средах накопления		Рост на дифференциально-диагностических средах				
	Микробное число КОЕ/г	Кесслера	МПБ + 6 %-й NaCl	Эндо (лактозо-позитивные колонии)	Результат микроскопии	Цитратная плазма (плазмо-коагулаза)	ЖСА (лецитови-теллаза)	Результат микроскопии

2.4. Лабораторная работа №4. Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов (4часа)

Цель: Изучить санитарную оценку молока.

Работа

Задание 1. Провести редуктазную пробу.

В чистые пробирки наливают 1 мл раствора метиленового синего и 20 мл исследуемого молока, предварительно нагретого до 38-40°C. После перемешивания, содержимое пробирки помещают на водяную баню при 40°C (указанная температура оптимальная для редуктазы) и наблюдают за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. По времени обесцвечивания резазурина молоко разделяют на четыре класса.

Задание 2. Определить общее количество бактерий в молоке.

Вначале готовят разведения (10^{-1} – 10^{-6}), для чего из отобранной пробы стерильной пипеткой берут 1 мл молока и переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Содержимое пробирки взбалтывают 1 мин и, таким образом, получают разведение 10^{-1} . Из первой пробирки 1 мл разведения переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды (разведение 1:100) и т.д. При обесцвечивании молока в пробе на редуктазу до 20 минут, делают посев по 1 мл из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} в чашки с мясопептонным агаром. При обесцвечивании молока в пробе на редуктазу после 20 мин, делают посев из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Чашки Петри с посевом помещают в термостат при 37°C. После 3-дневной инкубации подсчитывают колонии бактерий в чашках. Количество дрожжей и плесеней определяют на четвертый день. Число колоний умножают на степень разведения и находят среднее арифметическое на основании результатов подсчета колоний на трех чашках, что соответствует числу клеток в 1 мл молока.

Задание 3. Определить титр кишечной палочки.

Коли-титр молока определяют бродильным методом. Для этого в шесть пробирок разливают по 5 мл среды Кесслера, в состав которой входят вещества (жёлчь, краситель генциановый фиолетовый), подавляющие рост молочнокислых и других грамположительных микробов. В первые три пробирки вносят по 1 мл цельного молока, в следующие три - по 1 мл молока, десятикратно разведенного стерильной водой. Посевы инкубируют 48 часов при 43 °C.

Отсутствие газообразования во всех шести пробирках указывает на чистоту продукта, и его коли-титр считают выше 3 мл; при газообразовании в одной пробирке, засеянной 1 мл исследуемого продукта, коли-титр равен 3 мл; при образовании газа в одной пробирке с 0,1 мл коли-титр равен 0,3 мл; при образовании газа в шести или пяти пробирках коли-титр менее 0,3 мл (такое молоко непригодно к употреблению).

В связи с тем, что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбрасывающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на среду Эндо. Образование на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре 37°C характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком указывает на наличие кишечной палочки. Готовят мазки,

окрашивают по Граму. Наличие грамтрицательных палочек свидетельствует о наличии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 6 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве образцов молока.

Таблица 6

Оценка качества молока

<i>Образцы молока</i>	<i>Время обесцвечивания молока, мин</i>	<i>Количество микроорганизмов в 1 мл молока, КОЕ/мл</i>	<i>Титр кишечной палочки, мл</i>	<i>Рост на среде Эндо</i>	<i>Результаты микроскопии (рисунок)</i>

Материалы и оборудование: пробы молока, стерильные пробирки со средой Кесслера и поплавками, стерильные чашки Петри, МПА, водяная баня, метиленовый синий, стерильные пробирки с пробками, стерильные пипетки на 1 и 10 мл, стерильные вода, чашки Петри со средой Эндо, бактериальные петли, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, красители для окраски по Граму, дезинфицирующий раствор, иммерсионное масло, термостат.

Работа

Задание 1. Изучить микрофлору сыра.

При изучении микрофлоры сыра можно использовать метод отпечатков для установления естественного расположения микроорганизмов в сыре.

Для исследования берут свежий сыр. Сначала фламбированным ножом срезают то место, где будет взята проба. Затем срезают тонкий кусочек сыра и плотно сдавливают его двумя сухими чистыми предметными стеклами. Стекла осторожно разъединяют и удаляют сыр. Полученный на стекле мазок-отпечаток сушат вдали от пламени, фиксируют смесью спирта с эфиром и окрашивают метиленовым синим.

Примечание: При микроскопировании крупных сыров (типа советского, швейцарского) выявляют палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких (типа голландского) - молочнокислые стрептококки.

Задание 2. Определить наличие микробов порчи в кефире.

Для выявления микробов порчи сделать микропрепарат и окрасить метиленовым синим. Рассмотреть под микроскопом приготовленный мазок (сделать рисунок).

Сделать вывод, сравнивая результаты микроскопии и учитывая, что в норме в кефире должны быть обнаружены молочнокислые стрептококки (часто в виде диплококков), небольшое количество молочнокислых палочек и единичные дрожжевые клетки.

Полученные данные по окончании исследования внести в таблицу 7, оценить соответствие кисломолочных продуктов требованиям ГОСТ.

Таблица 7

Микроскопический анализ кисломолочных продуктов

<i>Наименование продукта</i>	<i>Фактический состав исследуемого материала (рисунок)</i>	<i>Ориентировочное количество кисломолочных микроорганизмов</i>	<i>Соответствие требованиям ГОСТ</i>
Творог		Молочнокислые стрептококки	

Кефир		Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи	
-------	--	--	--

Задание 3. Определить БГКП в пробах творога и кефира.

Суть метода – способность БГКП (беспоровые грамотрицательные аэробные и факультативно анаэробные палочки в основном являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*) сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37⁰С в течении 24 ч.

Отобранные пробы кисломолочных продуктов и продуктов закваски тщательно перемешивают и нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 см³ исследуемого продукта в стерильную пробирку или колбу, добавляя 1,0 см³ стерильного 10% раствора двууглекислого натрия, и содержимое перемешивают. 10 г творога или сыра взвешивают на стерильном часовом стекле и тщательно растирают в ступке.

Перед посевом берут 10 см³ исследуемого продукта и вносят в 90 см³ стерильного раствора хлористого натрия или фосфатного буфера, получая разведение 1:10. Из первого разведения готовят последующие 1:100, 1:1000, 1: 10000. В среду Кесслера проводят посев по 1см³ из каждого разведения (для творога) и 1см³ чистого продукта, 1:10, 1:100 (для кефира). Пробирки или колбы помещают в термостат на 18-24 ч. при температуре 37⁰С. Просматривают пробирки. При отсутствии газообразования в наименьшем из засеваемых объёмов считается, что БГКП в нём не обнаружены. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объёмов считается, что БГКП в нём обнаружены.

По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу 8 и на основании проведенного бактериологического анализа сделать заключение о качестве исследуемых образцов.

Таблица 8

Бактериологический анализ кисломолочных продуктов

Наименование продукта	Разведения				
	1см ³ чистого продукта	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Творог	-				
Кефир				-	-
Образование газа					

Материалы и оборудование: пробы кефира и творога, стерильные пробирки с пробками, МПА, стерильные пробирки со средой Кесслера и поплавками, стерильные чашки Петри, метиленовый синий, стерильные пробирки с пробками, стерильные пипетки на 1 и 10 мл, стерильные вода, физиологический раствор (0,9% раствор NaCl), 10% раствор двууглекислого натрия, бактериальные петли, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, красители для окраски по Граму, дезинфицирующий раствор, иммерсионное масло, термостат.

2.5. Лабораторная работа №5. Санитарно-микробиологическое исследование яиц (2 часа)

Цель: осуществить бактериологическое исследования яиц из торговой сети.

Работа

Задание 1. Определить КМАФАнМ в яйцах птиц.

С поверхности яйца делают смыв в сосуде со 100 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. Общую бактериальную обсемененность поверхности яиц мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами (МАФАнМ)

определяют общепринятыми методами путем посева определенного объема смыва или его 10-кратных разведений на мясо-пептонный агар. Для этого 1 см³ полученных разведений вносят в чашки Петри (2 на каждое разведение) со стерильной средой, покачиванием равномерно распределяют пробу по всей поверхности чашки. Затем инкубируют при 30±1°С в течение 72±3 часов, после чего проводят учет, подсчитывая число колоний на каждой чашке и умножая на степень разведения.

Задание 2. Определить наличие БГКП. Для выявления БГКП проводят посев из разведений 1:10, 1:100 на среду Эндо и помещают в термостат при 37±1° С. Образование на среде Эндо после инкубации в течение суток при температуре 37°С характерных колоний красного цвета с металлическим оттенком указывает на наличие кишечной палочки. Готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грамотрицательных палочек свидетельствует о наличии бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в данной пробе.

Задание 3. Определить наличие сальмонелл. 1см³ материала из разведений 1:10, 1:100 высевает на висмут-сульфит агар. Инкубируют при 37°С в течение 18-20 ч. На ВСА отмечают рост колоний характерных для сальмонелл: черные с металлическим блеском, иногда нежно-зелёные. Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов осуществляют микроскопию, изучение биохимических и антигенных свойств.

Все выросшие колонии на плотной питательной среде подсчитывают, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц, которая определяется по формуле:

$$S=3,14 \cdot B \cdot P \cdot 2,$$

где В – ширина яйца, (см), а Р – длина окружности, (см). В результате получают количество микроорганизмов (КОЕ/см²) на 1 см² скорлупы яиц. Результаты исследований вносят в таблицу 9. В результате проведенной работы делают выводы о микробной обсемененности яиц МАФАНМ и патогенными микроорганизмами, о пригодности яиц к употреблению в пищу.

Таблица 9

Бактериологическое исследование яиц из торговой сети

Название продукта	ОМЧ (КОЕ/см ²)	БГКП (КОЕ/см ²)	Salmonella spp. (КОЕ/см ²)
Яйцо куриное столовое			
Яйцо перепелиное диетическое			

Примечание: Показатели микробиологического анализа оценивают в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01 (табл. 10).

Таблица 10

Санитарно-микробиологические показатели яиц

Группа продуктов	МАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие		
		БГКП	S.aureus	Proteus spp.
Яйцо куриное, перепелиное диетическое	1·10 ²	0,1	-	-
Яйцо куриное столовое	5·10 ³	0,01	-	-

Материалы и оборудование: яйца, стерильные среды: МПА, висмут-сульфитный агар, среда Эндо, стерильные чашки Петри, пипетки, пробирки, стерильный изотонический раствор хлорида натрия, термостат, наборы для окраски по Граму, ёмкость с дез.средством.

2.6. Лабораторная работа №6. Коллоквиум (2 часа)

Цель: систематизировать и проверить знания и практические навыки по вопросам санитарно-микробиологического исследования пищевых продуктов.

Вопросы к занятию:

1. Санитарно-микробиологическое исследование рыбы: технологические особенности рыбы, состав микрофлоры, отбор проб.
2. Санитарно-гигиенический контроль молока.
3. Санитарно-микробиологическое исследование рыбы: нормативные документы, лабораторный контроль.
4. Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов. Определение санитарно-показательных микроорганизмов.
5. Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов: нормативные документы. Правила отбора, пересылки и исследования проб.
6. Консервирование яиц.
7. Пороки яиц и возбудители инфекционных заболеваний, передаваемые через яйца.
8. Патогенные микроорганизмы молока. Микрофлора молока в норме и при патологии.
9. Методики определения общей бактериальной обсемененности, БГКП, стафилококков и сальмонелл в рыбе и рыбных продуктах.
10. Методы снижения бактериальной обсеменённости молока: пастеризация, стерилизация.
11. Санитарно-микробиологическое исследование кисломолочных продуктов.
12. Пороки молока и молочных продуктов микробного происхождения.
13. Способы консервирования рыбы (посол, маринование, вяление, сушка).

2.7. Лабораторная работа №7. Санитарно-микробиологическое исследование воды (4 часа)

Цель: провести санитарно-бактериологическую оценку воды централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения.

Открытые водоемы постоянно загрязняются органическими веществами и разнообразными микроорганизмами, попадающими туда со сточными, ливневыми и талыми водами. Основным путем микробного загрязнения водоемов является попадание неочищенных городских отходов и сточных вод. Микрофлора сточных вод содержит обитателей кишечника человека и животных, включая представителей нормальной и условно-патогенной флоры, в ее состав могут входить и патогенные виды (возбудители кишечных инфекций, иерсиниозов, лептоспирозов, вирусы гепатита, полиомиелита и др.). Загрязнение водоемов происходит также при купании людей, скота, стирке белья. Хотя патогенные бактерии слабо приспособлены к существованию в воде, где на них оказывает неблагоприятное воздействие солнечный свет и различные другие факторы, включая конкурентную водную микрофлору, многие из них могут достаточно длительное время сохраняться в воде. Более того, в летнее время при наличии в воде органических веществ, щелочном pH и благоприятной температуре некоторые из них, например, холерный вибрион, могут даже размножаться. Заразиться можно и при использовании в пищу льда, в котором патогенные бактерии могут сохраняться в течение нескольких недель и даже месяцев.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды и по эпидемиологическим показаниям - к выявлению патогенных микроорганизмов (сальмонелл, холерных вибрионов, лептоспир, шигелл и энтеровирусов). Кроме того, поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные методы, позволяющие дать количественную оценку степени фекального загрязнения воды (выявление БГКП, *E.coli*, энтерококков, сульфитредуцирующих клостридий). Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, сточные жидкости.

Работа

Задание 1. Отбор проб воды. Воду для санитарно-бактериологического исследования отбирают в количестве 500 мл в бутылки или флаконы с ватно-марлевой пробкой, предварительно простерилизованные в бумажных пакетах. К горлышку бутылки привязывают бумажный пакетик с завернутой в него запасной пробкой.

Пробы воды из открытых водоемов (колодцев, бассейнов, озер, рек и пр.) отбирают с помощью стерильных батометров. После наполнения бутылки водой с заданной глубины, ее извлекают из батометра и закрывают стерильной пробкой. Сверху надевают бумажный колпачок и маркируют пробу. Пробы воды из открытых водоемов рекомендуется брать на глубине 10-15 см от поверхности воды и на таком же расстоянии от дна при малой глубине водоема.

Из водопроводных кранов воду отбирают следующим образом. Кран протирают изнутри тампоном, смоченным в спирте, и обжигают, после чего 10-15 мин спускают воду. Затем отбирают приблизительно 400 мл воды. Заполненный флакон плотно закрывают стерильной резиновой или корковой пробкой, а сверху надевают бумажный колпачок и маркируют пробу. При проведении анализа хлорированной воды во флакон для отбора проб (емкость 500 мл) перед стерилизацией вносят дехлоратор - 10 мг гипосульфита натрия.

Бактериологическое исследование отобранных проб воды должно производиться не позднее 2 ч с момента отбора. В случае невозможности соблюдения этих сроков допускается проведение анализа воды не позднее, чем через 6 ч при хранении пробы при температуре от 1 до 6 °С.

Задание 2. Определение ОМЧ воды.

С флаконов с пробой воды снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку с ватой. Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, отобранных с таким расчетом, чтобы число выросших на чашках колоний колебалось в пределах от 30 до 300 (см. таблицу 11).

Таблица 11

Рекомендуемые объемы воды для определения микробного числа

<i>Тип исследуемой воды</i>	<i>Рекомендуемый для посева объем</i>
Водопроводная вода	1 мл
Чистая вода	1 и 0,1мл
Более загрязненная вода	0,01 и 0,001мл
Сильно загрязненные воды и сточные жидкости	0,0001 и 0,00001мл

Для посева 0,1 мл и меньших объемов исследуемую воду разводят стерильной водой. Готовят последовательно десятикратные разведения, используя для каждого разведения отдельную стерильную пипетку. По 1 мл каждого разведения вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-50⁰С МПА, который тщательно, круговыми движениями перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение суток при 37°С. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37°С в течение суток, а другую - 2 суток при 20°С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний (видимых невооруженным глазом и при увеличении в 2-5 раз) и вычисляют микробное число воды - количество микроорганизмов в 1 мл.

Задание 3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий (ОКБ и ТКБ) титрационным методом. Коли-титр - минимальное количество воды (в мл), в котором

обнаруживаются БГКП. Коли-индекс - количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды (по международному стандарту - в 100 мл). Эти показатели определяют двухэтапным бродильным (титрационным) методом или методом мембранных фильтров.

Первый день:

а) при исследовании питьевой воды засевают 3 объема по 100 мл (качественный метод). При исследованиях воды с целью количественного определения ОКБ и ТКБ при повторном анализе производят посев: трех объемов по 100 мл, трех объемов по 10 мл, трех объемов по 1 мл;

б) посев воды водоемов производят в двух или трех повторностях. Воду водоемов, не загрязняемых сточными водами, засевают в объемах по 10; 1; 0,1; 0,01 мл; воду водоемов, загрязняемых сточными водами, — по 1; 0,1; 0,01; 0,001 мл; воду водоемов в зоне влияния выпусков сточных вод — в объеме по 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 мл.

Каждый объем исследуемой воды засевают в лактозопептонную среду. Посев 100 и 10 мл воды производят в 10 и 1 мл концентрированной лактозопептонной среды, посев 1 мл пробы проводят в 10 мл среды обычной концентрации.

Второй день. Посевы инкубируют при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Не ранее 24 ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. Из емкостей, где отмечено наличие роста (помутнение) и образование газа, производят высев бактериологической петлей на сектора среды Эндо для получения изолированных колоний. Емкости без наличия роста и образования газа оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными и дальнейшему исследованию они не подлежат. Из емкостей, где отмечено помутнение и образование газа или только помутнение, делают высев на сектора среды Эндо.

Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 ч.

При образовании помутнения и газа в среде накопления и росте на среде Эндо колоний, типичных для лактозоположительных бактерий (темно-красных или красных, с металлическим блеском или без него, выпуклых с красным центром и отпечатком на питательной среде), дают положительный ответ на присутствие ОКБ в данном объеме пробы.

Отрицательный ответ выдается, если в среде накопления и на секторах среды Эндо не отмечено роста; на секторах среды Эндо выросли не характерные для колиформных бактерий колонии; все колонии оказались оксидазоположительными; все бактерии оказались грамположительными; не отмечено газообразования в подтверждающем тесте на среде с углеводом.

Для определения ТКБ с секторов среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии, делают посев 2-3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с любой из лактозных сред.

Среду перед посевом нагревают на водяной бане или в термостате до 44°C . Немедленно после посева пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Допускается просмотр посевов через 4—6 ч. При образовании газа в среде накопления, росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24 ч при температуре 44°C дают положительный ответ на наличие в этом объеме пробы воды ТКБ. Во всех остальных случаях выдают отрицательный ответ.

Для ускорения выдачи ответа на присутствие ТКБ производят высев 1 мл из объемов среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование в пробирке с лактозо-пептонной средой с поплавком и прогретой предварительно до температуры 44°C . Посевы выдерживают в термостате при температуре $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ. При обнаружении ОКБ и ТКБ хотя бы в одном из трех объемов питьевой воды выдается ответ об обнаружении ОКБ и ТКБ в 100 мл. Результат анализа выражают в виде коли-индекса, величину которого определяют по таблице 12.

Определение коли-индекса при исследовании воды

Объем исследуемой воды, мл		Коли-индекс		Коли-титр	
100	10	1,0	0,1		
-	-	-	-	Менее 9	Более 111
-	-	+	-	9	111
-	+	-	-	10	105
+	-	-	-	23	43
+	-	+	-	94	10
+	+	-	-	230	4
+	+	-	+	960	1
+	+	+	-	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

Зная коли-индекс, рассчитывают коли-титр по формуле:

$$\text{коли-титр} = 1000 / \text{коли-индекс}$$

Задание 4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий титрационным методом.

Пробу воды объёмом 20 см³ прогревают на водяной бане в пробирках при температуре 75°C в течение 15 мин для уничтожения вегетативных форм микроорганизмов.

В 4 стерильные пробирки объёмом не менее 15 см³ вносят по 5 см³ подготовленной пробы воды и заливают горячим, расплавленным на водяной бане (не кипятить!) железосульфитным агаром по 10 см³ в каждую пробирку. Среду заливают по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирку быстро охлаждают в ёмкости с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при температуре 44°C в течение 16-18 ч.

Количественному учёту подлежат те посевы, где получены изолированные чёрные колонии в толще питательной среды. Результат выражают числом КОЕ спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 см³ воды.

В случае сильного роста результат оценивают качественно и в протоколе отмечают: «Обнаружено в 20 см³ воды». При отсутствии роста чёрных колоний дают ответ: «Не обнаружено в 20 см³ воды».

Материалы и оборудование.

Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, стерильные пипетки, стерильные бутылки или флаконы емкостью 500 мл, стаканчики стеклянные термостойкие, колбы или флаконы емкостью 150-250 мл, палочки стеклянные, пинцеты, петли бактериологические, лупа, батометр, вата, микроскопы, стекла предметные и покровные, термостаты на 30°C и 37°C.

Стерильный 0,85% раствор NaCl (или вода водопроводная стерильная), среда Эндо, МПА, лактозо-пептонная среда, железосульфитный агар, водяная баня, реактивы для окраски по Граму, фуксин, этанол 70%, ёмкость с дез.средством.

Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, стерильные пипетки, стерильные бутылки или флаконы емкостью 500 мл, стаканчики стеклянные термостойкие, колбы или флаконы емкостью 150-250 мл, палочки стеклянные, пинцеты, петли бактериологические, лупа, батометр, вата, микроскопы, стекла предметные и покровные, термостаты на 30°C и 37°C.

Стерильный 0,85% раствор NaCl (или вода водопроводная стерильная), среда Эндо, МПА, лактозо-пептонная среда, железосульфитный агар, водяная баня, реактивы для окраски по Граму, фуксин, этанол 70%, ёмкость с дез.средством.

Таблица 13

Санитарная оценка воды централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Образец	ОКБ				ТКБ	Коли-титр	ОМЧ КОЕ/л	<i>S. perfringens</i>	
	Рост на ср. Кесслера	Рост на ср. Эндо	Результат микроскопии	Оксидазный тест	Ферментация лактозы при 44°С			Рост на железосульфитном агаре	Результат микроскопии

2.8. Лабораторная работа №8 Санитарно-микробиологическое исследование воздуха (2 часа)

Цель: осуществить санитарно-микробиологическое исследование воздуха в помещениях кафедры микробиологии.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микроорганизмов. Бактериальная обсемененность жилых помещений всегда превышает таковую атмосферного воздуха, в том числе и патогенными микроорганизмами, попадающими в воздух от больных людей и животных (капельным путем в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чихании, со слущивающимся эпителием кожных покровов, с пылью загрязненного постельного белья и зараженной почвы).

Микрофлора воздуха формируется в основном, за счет почвенных микроорганизмов, отличающихся большой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, таким как высушивание, ультрафиолетовые лучи солнечного света, колебания температуры и прочее. Обычно из воздуха выделяют различных представителей рода *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus*, различные виды грибов родов *Actinomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, α- и β-гемолитических стрептококков, являющихся показателями контаминации микрофлорой носоглотки человека). Кроме того, например, при исследовании воздуха стационаров (хирургические клиники, родильные дома) основное внимание направлено на выявление патогенных стафилококков, а также синегнойных палочек и других грамотрицательных условно-патогенных бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций. На предприятиях микробиологической промышленности выявляют наличие и содержание микроорганизмов-продуцентов (*Candida sp.* на гидролизно-дрожжевых заводах и заводах по производству БВК, *Aspergillus sp.* и споровые бактерии на ферментных заводах, *Bacillus thuringiensis* и сальмонеллы - при производстве бактериальных средств защиты растений и борьбы с грызунами и т. д.).

Определение тех или иных патогенных или условно-патогенных микроорганизмов из воздуха проводят на специальных дифференциально-диагностических средах.

Для исследования микрофлоры воздуха используют различные методы:

- седиментационный метод (метод Коха, 1881) - основан на оседании бактериальных частиц и капель под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри. Обычно производят перерасчет по Омелянскому – на поверхность 100 см² плотной среды оседает за 5 мин такое количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха. Однако, позднее было определено, что эти показатели занижены в 3 раза. Метод не точен и абсолютно не пригоден для атмосферного воздуха, где имеют место большие колебания в скорости его движения. Однако, этот метод может быть использован в тех случаях, когда отсутствуют более совершенные приборы или нет электроэнергии;

- фильтрационный метод (воздух продувают через жидкость) - основан на улавливании бактерий в жидкости, которая затем может быть использована для посева на различные среды (прибор Дьяконова, 1925 и др.);

- методы, основанные на осаждении микробных аэрозолей паром или распыленной жидкостью (прибор Речменского и пр.);

- методы, основанные на принципе ударно-прибивного действия воздушной струи с использованием специальных приборов (например, прибор Кротова, 1951). Струя воздуха приходит через узкую клиновидную щель и с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли, в том числе содержащие бактерии пылевые частицы и капли, прибиваются к поверхности МПА или элективных сред. Производительность такого прибора составляет от 20 до 40 л/мин. Подобные методы наиболее надежны и точны.

Работа

Задание. Провести санитарно-бактериологическую оценку состояния воздуха в помещениях кафедры микробиологии с использованием седиментационного и аспирационного методов.

В каждом помещении расставляют по пять чашек Петри со стерильными МПА, ЖСА и средой Сабуро методом конверта. Оставляют чашки открытыми в течение 60 минут (чашки располагают на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека), после чего посева на МПА и ЖСА инкубируют при 37°C в течение 1-2 суток; на среде Сабуро 120 часов при 24°C. Подсчитывают суммарное число колоний, выросших на чашках с разными средами, находят среднее арифметическое по каждой группе микроорганизмов. Для подтверждения принадлежности выросших микроорганизмов к *S. aureus*, учитывают культуральные свойства (вокруг колонии на ЖСА зона помутнения (радужный венчик) и морфологические свойства (готовят мазки, окрашивают по Граму)).

Осуществляют отбор проб воздуха в помещениях с помощью аппарата Кротова. Дальнейший порядок определения микроорганизмов аналогичен описанному ранее.

Примечание: при наличии менее 250 колоний воздух считается чистым; 250-300 колоний - загрязненным в средней степени, при количестве колоний более 500 - загрязненным. Присутствие спор плесневых грибов и *S. aureus* указывает на загрязнение воздуха.

Полученные результаты заносят в таблицу 14, делают заключение о санитарно-микробиологическом состоянии воздуха и точности использованных методов.

Таблица 14

Санитарная оценка воздуха в помещениях кафедры микробиологии

Помещение кафедры	ОМЧ, КОЕ/м ³		S. aureus, КОЕ/м ³		Плесневые грибы, КОЕ/м ³	
			Рост на ЖСА			Результат микроскопии
	Асп. метод	Сидем. метод	Асп. метод	Сидем. метод	Асп. метод	
1. Учебная аудитория						

2. Бокс							
3. Моечная							

Материалы и оборудование.

Стерильные чашки Петри, термостат на 37°C, стерильные МПА, ЖСА, среда Сабуро, аппарат Кротова, набор для окрашивания по Граму, бактериологические петли, спиртовки.

2.9. Лабораторная работа №9. Санитарно-микробиологическое исследование почвы (4 часа)

Цель: провести санитарно-микробиологическое исследование почвы.

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска и в санитарно-защитных зонах по следующим показателям:

- косвенные, характеризующие интенсивность биологической нагрузки на почву. Это СПМО: БГКП, фекальные энтерококки. В крупных городах биологическая нагрузка на почву очень велика и как следствие высоки индексы СПМО. На свежее фекальное загрязнение указывает наличие высокого индекса БГКП при низких титрах нитрификаторов, а также относительно высокое содержание вегетативных форм *S. perfringens*. Обнаружение энтерококков всегда свидетельствует о свежем фекальном загрязнении, каковы бы ни были другие показатели.

- прямые - обнаружение возбудителей кишечных инфекций (патогенные энтеробактерии, энтеровирусы).

Почву оценивают как чистую без ограничений по санитарно-бактериологическим показателям при отсутствии патогенных бактерий и индексе СПМО до 10 клеток в 1 г почвы. При загрязнении почвы сальмонеллами индекс СПМО: БГКП и энтерококков достигает 10 клеток на 1 г почвы и более. Концентрация колифага в почве на уровне 10 БОЕ/г и более тоже свидетельствует о загрязнении почвы.

Задание 1. Приготовить ряд последовательных десятикратных разведений на стерильной водопроводной воде. После приготовления разведений применяют соответствующую предварительную обработку почвы с целью извлечения клеток микроорганизмов из почвенных агрегатов, что достигается разрушением последних и десорбцией микроорганизмов с поверхности почвенных частиц при помощи 10-минутного вертикального встряхивания почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками или 3-х минутной обработке на мешалке.

Задание 2. Определить общую численность микроорганизмов

По 1 мл каждого разведения почвы вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-50°C МПА, который тщательно, круговыми движениями перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха. Инкубируют при 37°C в течение суток. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний (видимых невооруженным глазом и при увеличении в 2-5 раз) и вычисляют среднее арифметическое и умножают на степень разведения.

Задание 3. Определить наличие в почве БГКП.

При анализе почв, для которых предполагается невысокая степень фекального загрязнения, рекомендуется использовать титрационный метод. В качестве ускоренного метода можно использовать метод мембранной фильтрации. При анализе проб с предполагаемой высокой степенью загрязнения проводят прямой посев на среду Эндо.

Титрационный метод. Из разведений стерильной пипеткой берут 1 мл и засевают во флаконы с 9 мл среды накопления (среда Кесслера). Инкубируют 48 ч при 37°C. Через

24 ч проводят предварительную оценку. При наличии газообразования и помутнения производят высев на среду Эндо и инкубируют в течение 18-24 часов при 37⁰С. При наличии розовых или красных колоний, малиновых с металлическим блеском или без него проводят микроскопию с постановкой оксидазного теста. При обнаружении грамотрицательных, оксидазонегативных палочек дают заключение о присутствии БГКП в пробе.

Задание 4. Определить наличие в почве энтерококков.

Энтерококки – грамположительные, не образующие каталазу кокки, слегка вытянутые, с заострёнными концами, располагающиеся попарно или в виде коротких цепочек, реже одиночными кокками. Полиморфны. При росте на жидких питательных средах (лактозопептонная среда и щелочная энтерококковая среда) вызывают диффузное помутнение и образование осадка. Определяют титрационным методом и методом мембранной фильтрации.

Титрационный метод:

Из разведений почвенной суспензии берут 10 мл и засевают во флаконы с 50 мл жидкой среды ЛПС или ЩЭС. Инкубируют 24 ч при 37⁰С. Из среды накопления с признаками роста высев производят петлёй на одну из плотных питательных сред, например, молочно-ингибиторную среду.

Через 24-48 ч инкубации при 37⁰С на МИС отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых, с металлическим блеском (*E. faecalis*) или сероватых, мелких, плоских колоний (*E. faecium*). Подтверждают принадлежность колоний к энтерококкам с помощью микроскопирования окрашенных по Граму мазков и постановкой каталазного теста (добавление 3% перекиси к материалу исследуемой колонии).

Задание 5. Определить наличие *C. perfringens* в почве.

По 1 мл разведённой почвы, прогретой при температуре 75±5⁰С в течение 20 минут для исключения вегетативных форм, вносят в два ряда параллельных пробирок. Затем по стенке пробирок, избегая образования пузырьков воздуха, наливают по 9-10 мл железосульфитного агара, приготовленного ex tempore и подогретого до 70-80⁰С. Для создания анаэробных условий роста пробирки быстро охлаждают, помещая в ёмкости с холодной водой. Инкубируют при 44⁰С 16-18 ч. При росте в среде чёрных крупных колоний (грамположительные палочки, каталазоотрицательные) выдают положительный ответ о присутствии *C. perfringens* в 1 г почвы.

Материалы и оборудование.

Пробы почвы, стерильные чашки Петри, стерильные пробирки с резиновыми и ватно-марлевыми пробками, стерильные пипетки, стерильные флаконы ёмкостью 500 мл, пинцеты, петли бактериологические, лупа, микроскопы, стекла предметные и покровные, термостаты.

Стерильный 0,85% раствор NaCl (или вода водопроводная стерильная), среда Эндо, среда Кесслера, МПА, щелочной энтерококковый агар, молочная ингибиторная среда, железосульфитный агар, водяная баня, перекись водорода, диметил-*n*-фенилендиамина, стеклянные палочки, фильтровальная бумага, реактивы для окраски по Граму, фуксин, этанол 70%.

Результаты исследований вносят в таблицу 15 и делают заключение о санитарно-микробиологическом состоянии почвы.

Таблица 15

Санитарная оценка почвы

Образец	БГКП	Энтерококки	ОМЧ КОЕ/г	<i>C. perfringens</i>	
				Рост на железос-	Результат

	<i>Рост на сп. Кес- слера</i>	<i>Рост на сп. Эндо</i>	<i>Резуль- тат микро- скопии</i>	<i>Окси- дазный тест</i>	<i>Рост на ЩЭС</i>	<i>Рост на МИС</i>	<i>Резуль- тат микро- скопии</i>	<i>Катала- зный тест</i>		<i>сульфит- ном агаре</i>	<i>микро- скопии</i>

Материалы и оборудование.

Пробы почвы, стерильные чашки Петри, стерильные пробирки с резиновыми и ватно-марлевыми пробками, стерильные пипетки, стерильные флаконы емкостью 500 мл, пинцеты, петли бактериологические, лупа, микроскопы, стекла предметные и покровные, термостаты.

Стерильный 0,85% раствор NaCl (или вода водопроводная стерильная), среда Эндо, среда Кесслера, МПА, щелочной энтерококковый агар, молочная ингибиторная среда, железосульфитный агар, водяная баня, перекись водорода, диметил-*n*-фенилендиамина, стеклянные палочки, фильтровальная бумага, реактивы для окраски по Граму, фуксин, этанол 70%.