Министерство образования и науки Республики Казахстан

Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова

Кафедра ветеринарной санитарии

А.Т. Елеусизова

САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Костанай, 2019

ББК 48.4
Е 50
Автор:
Елеусизова Анара Тулегеновна, доктор философии (PhD), доцент кафедры ветеринарной санитарии

Рецензенты:
Кауменов Нурлан Сарсенбаевич - кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой ветеринарной санитарии
Мурзакаева Гульмира Калихановна - доктор философии (PhD), старший преподаватель кафедры ветеринарной санитарии Казахского агро-технологического университета имени С.Сейфуллина
Бермагамбетова Нургуль Нурмуханбетовна - доктор философии (PhD), старший преподаватель кафедры технологии производства продукции животноводства

Елеусизова А.Т.
Е 50 Санитарная микробиология: Учебное пособие. - Костанай: КГУ имени А.Байтурсынова, 2019 г. – 101 с.

В учебном пособии изложены методики санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды (почвы, воды, воздуха), правила отбора и исследование смывов, а также бактериологическое исследование продуктов животного происхождения. Описаны количественный и качественный лабораторный анализ проб с целью санитарного обследования и оценки их безопасности по микробиологическим показателям.

В пособие включены контрольные вопросы и задания для самоконтроля.

Данное учебное пособие предназначено для выполнения практических занятий студентами.

ББК 48.4
Е 50

Утверждено и рекомендовано к заседанию Учебно-методическим советом Костанайского государственного университета имени А.Байтурсынова, протокол от ___10___ _____12___ 201 г. № ___.

© Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова, 2019
© Елеусизова А.Т., 2019

Содержание

Введение..... 4

Тема 1 Методы оценки санитарного состояния объектов внешней среды..... 5

1.1 Санитарно-микробиологическое исследование почвы..... 6

1.2 Санитарно-микробиологическое исследование воды..... 15

1.3 Санитарно-микробиологическое исследование воздуха..... 31

1.4 Санитарно-микробиологическое исследование смывов..... 39

1.5 Вопросы для самоконтроля и проверки знаний..... 45

Тема 2 Микробиологический контроль качества и безопасности пищевых продуктов 47

2.1 Микробиологические показатели и нормативы контроля качества и безопасности продуктов животного происхождения..... 47

2.2 Стадии микробиологического анализа пищевых продуктов..... 50

2.3 Санитарно-бактериологическое исследование молока и молочных продуктов..... 53

2.4 Санитарно-бактериологическое исследование мясных и колбасных изделий..... 56

2.5 Санитарно-бактериологическое исследование яиц и яичной продукции..... 64

2.6 Санитарно-бактериологическое исследование баночных консервов. 70

2.7 Вопросы для самоконтроля и проверки знаний..... 73

Тема 3 Методы идентификации микроорганизмов..... 75

3.1 Метод выявления бактерий рода Salmonella..... 75

3.2 Метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia.... 78

3.3 Метод определения молочнокислых микроорганизмов..... 80

3.4 Методы выявления и определения количества сульфит-редуцирующих клостридий..... 87

3.5 Характеристика основных видов микроорганизмов, колонии которых можно обнаружить при посевах…….. 92

Список использованной литературы..... 98

Приложения..... 99

Введение

Санитарная микробиология изучает микрофлору окружающей среды с целью исследования всех ее объектов (почвы, воды, воздуха, пищевых продуктов и др.), как возможных источников и факторов передачи инфекционных заболеваний. Она тесно связана с микробиологией, гигиеной, экологией. В ее задачи входят: санитарно-гигиеническая оценка всех объектов внешней среды; изучение и разработка методов выявления и идентификации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; нормирование допустимого количества представителей различных родов и видов, контроль исполнения установленных нормативов.

Учебное пособие содержит информацию о микрофлоре почвы, воды и воздуха, методах оценки состояния объектов внешней среды в качестве возможных резервуаров и факторов передачи инфекционных заболеваний и их влияние на здоровье человека. Приведены критерии оценки загрязненности объектов окружающей среды и методы индикации и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов.

Тема 1 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ПОЧВЫ, ВОДЫ, ВОЗДУХА)

Основные методы оценки санитарно-эпидемиологического состояния внешней среды (рис. 1):

• прямое обнаружение патогенных микроорганизмов;

• выявление косвенных признаков пребывания патогенов во внешней среде.

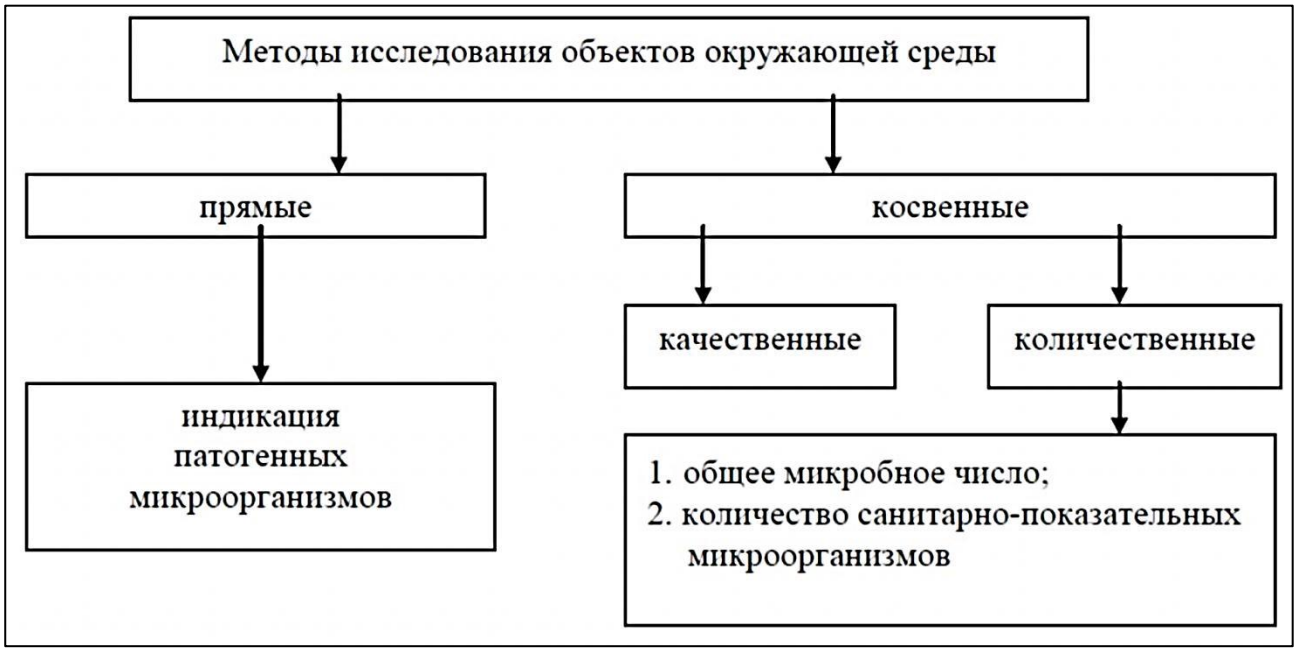


Рисунок 1 – Санитарно-микробиологические методы исследования

Прямые методы – обнаружение в пробах сальмонелл, протей и др.

Косвенные методы – это определение общей микробной обсеменённости или общего микробного числа, а также определение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов.

Общее микробное число (ОМЧ) - общее количество микроорганизмов, содержащееся в единице объёма или массы исследуемого объекта (расценивается как показатель интенсивности загрязнения окружающей среды органическими веществами).

Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМ) являются постоянными обитателями организма человека или животного и показателями загрязнения теми выделениями человека и животных, которые могут содержать патогенные микроорганизмы.

Свойства санитарно-показательных микроорганизмов.

• Постоянно обитают в естественных полостях человека и животных и выделяются в окружающую среду.

• Не размножаются вне организма, исключая пищевые продукты.

• Длительность их выживания в окружающей среде не меньше и даже несколько больше, чем у патогенных микроорганизмов.

• Сроки выживания и устойчивость санитарно-показательных микроорганизмов в окружающей среде аналогична или превышает таковую у патогенных микроорганизмов.
• Должны встречаться в окружающей среде в значительно больших количествах, чем патогенные микроорганизмы.
• Отсутствие «двойников» санитарно-показательных микроорганизмов в окружающей среде.
• Простота методов индикации и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов.

1.1 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

Цель работы: Освоить метод посева проб почвы на питательные среды, метод определения количества микроорганизмов в почве и выделения чистых культур бактерий из проб почвы.
Материалы и оборудование. Весы, ступка, резиновые перчатки, колба со стерильной дистиллированной водой, пипетки на 10 мл и 1 мл, стерильные пробирки, колба вместимостью 250 мл, чашки Петри с МПА, средой Чапека.

Почва служит благоприятной средой для развития и накопления многих видов бактерий, грибов, вирусов, простейших и представляет собой трехфазную систему, включающую почвенный воздух, почвенную влагу, минеральные и органические вещества. Вода и вещества, растворенные в ней, образуют почвенный раствор, в котором развивается большая часть всех микроорганизмов. Представители почвенной микрофлоры обитают в водных и коллоидных пленках, обволакивающих почвенные частицы.

Основную массу почвенных микроорганизмов составляют сапрофитные и лишь незначительное количество приходится на долю патогенных видов.

Санитарное состояние почвы оценивают на основании нескольких показателей:
1 – содержания общего количества микроорганизмов (общее микробное число),
2 – наличия санитарно-показательных микроорганизмов.

Общее микробное число (ОМЧ) для почвы, это бактерии участвующие в различных процессах превращения азота и углеродсодержащих веществ (аммонифицирующие, азотфиксирующие, целлюлозоразрушающие и др.).

Санитарно-показательными организмами для почвы служат бактерии группы кишечной палочки (БГКП или колиформные), фекальные энтерококки, Clostridium perfringens, термофильные бактерии, Proteus spp.

Методы анализа микрофлоры почвы (качественно-количественный учет):

- *ОМЧ* - общая численность сапрофитных термофильных и нитрифицирующих бактерий в 1 г почвы.
- *Индекс БГКП* – количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП), обнаруженных в 1 г почвы.

- *Перфрингенс-титр* – наименьшая масса почвы (в граммах), в которой обнаружена 1 особь Clostridium perfringens.

По вышеуказанным трем показателям производят санитарную оценку гигиенического состояния почвы.

Основным показателем санитарного состояния почвы является титр кишечной палочки, поскольку наиболее часто почва загрязняется содержащими различные патогенные микроорганизмы фекалиями людей и животных.

Расширенная схема санитарно-микробиологического исследования почвы представлена на рисунке 2.

Рисунок 2 - Схема санитарно-микробиологического исследования почвы

Показатели давности загрязнения почвы (обнаружение определённых микроорганизмов):

- *Escherichia coli, Enterococcus faecalis* – загрязнение почвы не более чем 2-недельной давности.
- *Citrobacter, Enterobacter* – загрязнение почвы не более чем 2-месячной давности.
- *Clostridium perfringens* – загрязнение почвы не менее, чем 2 месяца назад.

Патогенные микроорганизмы выявляют в объектах внешней среды чаще всего для того, чтобы оценить эпидемиологическую ситуацию и принять необходимые меры для ликвидации источников инфекции. При наличии

эпидемических показаний производят исследование почвы на зараженность бактериями паратифозной группы, возбудителями столбняка и ботулизма.

Техника взятия проб почвы. Для бактериологического исследования *поверхностных слоев* почвы на глубине от 1-2 до 20 см берут 200-300 г почвы в 4-5 точках участка площадью 25м^2. На каждом участке намечают 5 точек: четыре - по углам участка и одну - в центре. Если требуется исследовать *более глубокие слои* почвы, то пробы берут на заданной глубине, пользуясь для этой цели специальным буром. Если бура нет, то делают вертикальный надрез почвы до необходимой глубины и ножом или лопаткой берут несколько образцов с отвесной стороны разреза из нужного горизонта.

Средняя проба почвы составляется из нескольких образцов почвы, взятой на изучаемом участке.

Забор проб производят в стеклянные банки или в синтетические пакеты с помощью ножа, лопаты или совка. Все приспособления и тара для почвенных образцов должны быть стерильными. Отобранные образцы почвы доставляют в лабораторию и проводят исследования. Анализы делают в тот же день. Допускается хранение почвы не дольше 24 ч в холодильнике при Т=1-5ºС.

Взятие образцов из глубинных слоев почвы производят *буром Некрасова*, который представляет собой штангу, снабженную на верхнем конце рукояткой для вращения. В нижней части бура имеются полость, остающаяся закрытой во время бурения. При достижении заданной глубины бур поворачивают в обратную сторону, вследствие чего полость его открывается, наполняясь почвой, подлежащей исследованию.

В сопроводительном документе отмечают характер почвы, расположение источников загрязнения, площадь обследуемой территории, данные, характеризующие климат местности и т. п.

Образцы почвы, доставленные в лабораторию, освобождают от крупных примесей – стекол, камней, корней и др. Крупные комочки почвы измельчают, затем образцы пропускают через сито с диаметром отверстий не более 3 мм, объединяют и из этой смеси берут навеску:

- для учета почвенных микроорганизмов и энтеровирусов достаточно навески от 1 до 10 г;
- для санитарно-показательных микроорганизмов от 1 до 30 г;
- для патогенных энтеробактерий (50 - 55,5 г).

Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде, добавляя стерильную водопроводную воду в соотношении 1:10 к весу почвы (например: 1 г почвы разводят в 10 мл стерильной водопроводной воды, 10 г почвы - в 100 мл воды и т.д.).

Определение общего микробного числа (ОМЧ) в почве

1. Метод учета ОМЧ на мясопептонном агаре

Приготовленное разведение тщательно перемешивают взбалтыванием в течение 5-10 мин. Это необходимо для извлечения микроорганизмов из комочков земли и с поверхности почвенных частиц. Полученную равномерную

взвесь отстаивают 2 мин и затем готовят из нее ряд 10-кратных разведений: *последовательно убывающих концентраций почвы*, перенося стерильной пипеткой по 1 мл в пробирки с 9 мл стерильной дистиллированной воды. При этом получают второе разведение, содержащее 0,01 г/мл почвы (или 10^{-2}). Повторяя эту операцию, доводят разведение почвы до 0,0001 - 0,00001 г/мл. Таким образом, готовят разведения до 1:1 000 000 и более в зависимости от того, из каких почв были взяты пробы для исследования, и их предполагаемой заселенности микроорганизмами.

Схема последовательных разведений почвы представлена на рисунке 3.

При приготовлении разведений взвесь переносят в каждую последующую пробирку новой стерильной пипеткой. Для посева используют не менее двух различных разведений (обычно используют два последних, максимальных). Из каждого выбранного разведения по 1 мл вносят в 2 стерильные чашки Петри (для получения средних показателей) и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45ºС МПА. Осторожно передвигая чашки по поверхности стола, перемешивают агар с внесенными в него разведениями почвы. После застывания питательной среды чашки инкубируют в термостате при температуре 30-35ºС в течение 24 - 48 ч. Количество микроорганизмов, содержащихся в 1г исследуемой почвы, определяют следующим образом. Подсчитывают количество колоний, выросших на каждой из двух чашек, суммируют полученные результаты и делят на 2, вычисляя среднеарифметический показатель, и умножают его на степень разведения. Для подсчета берут чашки, на которых выросло от 50 до 150 колоний**.**

Пример. В чашках, засеянных почвенной суспензией, взятой из разведения 1: 10 000, выросли в среднем 75 колоний. Число выросших колоний надо умножить на степень разведения, получается число микроорганизмов в 1 г почвы: 75 х 10 000 = 750 000 бактерий. Такое количество ОМЧ содержится в 1 г исследуемого образца почвы.

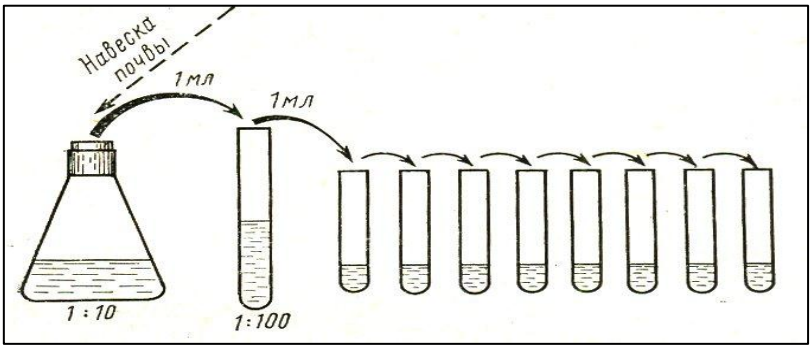


Рисунок 3 - Схема последовательных разведений почвы

2. Метод прямого подсчета по Виноградскому

Исходное разведение почвы готовят так же, как и при использовании первого метода. Для дальнейшей работы берут стерильной пипеткой суспензию из разведения 1:100 и наносят 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло, на площади в 4 см. Чтобы правильно распределить каплю по стеклу, под него

подкладывают квадратик бумаги размером 2х2 см. Препарат высушивают, фиксируют на пламени горелки, окрашивают по Граму и микроскопируют, используя иммерсионный объектив.

При просмотре препарата подсчитывают количество бактерий, находящихся в 100 полях зрения микроскопа или 100 квадратиков окулярной сетки. Вычисляют среднее количество бактерий в одном поле зрения и затем определяют содержание микроорганизмов в 1 г почвы.

Пример. Квадратик сетки имеет площадь 0,004 мм (край сетки = 0,02 мм), значит на 1 см он будет повторяться 25000 раз, а на всей площади препарата 100000 раз. В препарате было обнаружено, в среднем, 2 бактерии в одном квадратике. Тогда на препарате площадью 4 квадратных сантиметра будет 200000 бактерий (2х100000).

Определение общего количества бактерий группы кишечной палочки – БГКП

1. Метод мембранных фильтров

Почвенную суспензию, приготовленную так же, как в предыдущем исследовании, (см. определение общего количества микроорганизмов в почве), разводят от 1:10 до 1:1000 - при исследовании чистых почв и от 1:1000 до 1:1000000 – при изучении загрязненных почв. Затем 5 или 10 мл полученных разведений фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм в аппарате Зейтца. Фильтры помещают на среду Эндо, в состав которой входят мясопептонный агар, лактоза и индикатор и инкубируют в термостате при температуре 37º С в течение 24 ч.

При наличии бактерий группы кишечной палочки на фильтрах появляется рост колоний темно-красного цвета с металлическим блеском. Из колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму, и микроскопируют.

- *БГКП имеют палочковидную форму и грамотрицательные (приобретают красный цвет).*

Затем с культурой грамотрицательных лактозоположительных бактерий ставят ***оксидазный тест,*** который позволяет дифференцировать представителей семейства Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae.

Для определения оксидазной активности часть исследуемой колонии переносят стерильной петлей на фильтровальную бумагу, пропитанную диметил-n-фенилендиамином и а-нафтолом.

У микроорганизмов, продуцирующих оксидазу, цвет колонии становится сине-фиолетовым.

- *БГКП - являются оксидазоотрицательными и не изменяют своего цвета.*

Дополнительно проверяют способность исследуемой культуры ферментировать глюкозу и разлагать белки.

Результат: колонии, выросшие на фильтрах на среде Эндо, учитывают как БГКП, если они образованы грамотрицательными, оксидазонегативными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа и не разлагающими белки.

Для определения общего количества БГКП в исследуемой почве, подсчитывают количество колоний, выросших на фильтре, через который был пропущен определенный объем разведения почвенной болтушки. Затем вычисляют, сколько бактерий группы кишечной палочки содержится в одном миллилитре этого разведения. Общее количество БГКП подсчитывают, умножая показатель содержания этих микроорганизмов в 1 мл на соответствующее разведение.

Пример: Было профильтровано 10 мл из разведения 1:10000. На фильтре выросло 20 колоний. Составляем пропорцию: в 10 мл - 20 бактерий, а в одном – х. Получаем результат: X = (20 × 1) : 10 = 5 бактерий. Поскольку проба для фильтрования была отобрана из разведения 1:10000, умножаем 5 на 10000. Окончательный итог – в 1 г. почвы содержатся 50 000 БГКП.

2. Определение титра кишечной палочки почвы. Для определения загрязнения почвы кишечной палочкой различные количества разведений почвы засевают в среду Кесслера.

Чистую почву берут в количестве от 1 до 0,001 г, загрязненную – от 0,001 до 0,000001 г, для посевов пользуются различными разведениями почвенной взвеси. Для посева 1 г почвы набирают стерильной пипеткой 10 мл первого разведения (1:10) и вносят его в 50 мл среды Кесслера. Меньшие количества почвы берут из соответствующих разведений по 1 мл и засевают в пробирки с поплавками, содержащими по 5 мл среды. Для посева 0,1 г - набирают 1 мл первого разведения, для посева 0,001 г – 0,1 мл из разведения 1:1000 и т.д. Колбы и пробирки с засеянной средой Кесслера помещают в термостат при 43^0С. Дальнейший ход анализов и учет полученных результатов ведутся так же, как при исследовании воды.

Определение перфрингенс-титра. Для определения титра *Cl.perfringens* пользуются разведениями почвенной взвеси. Чистую почву засевают в разведении 1:10 - 1:1000, загрязненную – 1:1000, загрязненную – 1:100 000; 1 мл из каждого разведения почвенной взвеси вносят в пробирки с 5 мл молочной среды Тукаева. Для освобождения от посторонней неспороносной микрофлоры посевы прогревают на водяной бане при 80^0С в течение 15 мин и затем выращивают в термостате при 43^0С (можно при 37^0С) в течение 12-20 ч.

Размножение Cl.perfringens сопровождается характерным свертыванием молока. Предельное разведение почвенной взвеси, которое дает на молочной среде размножение Cl.perfringens, означает титр этого микроба в почве.

Количественный учет сапрофитных бактерий в почве. Из каждой пробы должно быть использовано для посева менее двух различных разведений в зависимости от степени предполагаемого загрязнения исследуемой почвы. Перед посевом каждое разведение в пробирках тщательно перемешивают стерильной пипеткой, после чего из него отбирают 1 мл и переносят на дно стерильной чашки Петри под слегка приподнятую крышку. Каждое разведение вносят минимум на 2 чашки, в которые затем вливают 7-10 мл предварительно

растопленного и остуженного до 45^0С мясо-пептонного агара. Расплавленный агар в чашках Петри хорошо перемешивают с имеющейся в них взвесью почвы, осторожно наклоняя во все стороны.

Для равномерного распределения питательной среды по дну чашки Петри последнюю ставят на горизонтальную поверхность. На крышке чашки отмечают номер пробы, разведение и помещают на 24 ч при 28-30^0С. Если выращивание производят при более низкой температуре, например 22^0С, срок инкубации должен быть увеличен до 72 ч. После инкубации посевов подсчитывают количество выросших колоний бактерий. Необходимо брать такие разведения, при которых на чашках вырастает от 50 до 150 колоний. Если выросло больше 150 колоний и нет других разведений, допускается счет колоний на ¼ с пересчетом на всю ее площадь. Из суммы колоний, выросших на 2 чашках, выводят среднеарифметическое и затем пересчитывают число колоний на 1 г почвы. Учет общего числа сапрофитных бактерий в почве следует заносить в протокол анализа по следующей схеме:

Наименование участка	Подсчет числа бактерий в разведении 1: 100 000	Число бактерий
Двор жилого дома	90 среднее 80 70	800 000

Санитарное значение числа сапрофитных бактерий в почве нельзя рассматривать без учета особенностей почвы, и оно может быть использовано только в комплексе с другими санитарно-микробиологическими показателями.

Определение термофильных бактерий. Учет термофильных бактерий производят на МПА, разлитым более толстым слоем, чем обычно.

Посев делают из разведений почвенной суспензии 1:10, 1:100 и 1:1000, причем из каждого разведения рекомендуется засевать при температуре около 60^0С (от 58 до 63^0С). Развившиеся колонии учитывают через 24 ч после посева.

Определение протей. При исследовании почвы на наличие протей приготавливают почвенную суспензию 1:10. Из каждого разведения стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии и вносят в конденсационную воду свежескошенного мясо-пептонного агара (по методу Шукевича). При этом поверхность питательной среды не должна загрязняться вносимой почвой. Засеянные пробирки с мясо-пептонным агаром ставят в термостат при 37^0С. Через 48 ч роста протей обнаруживают в виде тонкой вуалеобразной пленки на поверхности агара. Для протей характерны полиморфность клеток, их подвижность и способность быстро распространяться по поверхности скошенного мясо-пептонного агара.

Определение сальмонелл и шигелл. Для исследования берут навеску почвы не менее 30-50 г. Посевы почвы производят из основного разведения ее

1:10 в стерильной водопроводной воде. Почвенную суспензию после ее приготовления и последующего отставания около 1 мин осторожно сливают с осевшего осадка в другой стерильный сосуд для освобождения от грубых механических примесей.

Для концентрации сальмонелл к 500 мл взвеси почвенной суспензии добавляют 2 мл 10% стерильного раствора бикарбоната натрия (Na_2CO_3) и затем 1,7 мл 10% стерильного раствора сульфата окиси железа оставляют на холоде (4^0C) на 1 ч. Образовавшиеся после коагуляции хлопья оседают на дно сосуда вместе с частицами почвы и бактериями. Осадок вместе с оставшейся жидкостью центрифугируют 5 мин. После чего прозрачную жидкость над осадком сливают, а осадок растворяют в 25% стерильном растворе виннокаменнокислого калия, прибавляя его по каплям до растворения осадка.

Осадок после коагуляции засевают по 0,5–1 мл на две плотные элективные среды – Вильсон-Блера и Плоскирева.

Для получения изолированных колоний на чашке со средой производят рассев внесенного в чашку осадка с помощью стерильного шпателя. Этим же шпателем заражают поверхность среды еще на 3-4 чашках. Оставшийся осадок почвенной суспензии заливают 50 мл 10-20% желчного бульона. Посевы выращивают при 37^0C. Из среды обогащения производят посев петлей на плотные элективные среды через 5–6 ч (ранний высев) и через 18-20 ч (дополнительный высев).

Дальнейшая идентификация сальмонелл и шигелл производят по общепринятой методике.

В таблице 1 приведена схема оценки санитарного состояния почвы по проведенному микробиологическому анализу.

Таблица 1 – Показатели оценки санитарного состояния почвы по микробиологическим показателям

Категория почв	Титры			Кол-во термофильных бактерий в 1 г почвы
	Кишечной палочки	Нитрифицирующих бактерий	Cl.perfringens	
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	100 - 1 000
Загрязненная	0,9 - 0,01	0,09 – 0,001	0,009 – 0,0001	1001 - 100 000
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,0009 и ниже	0,00009 и ниже	100 001 - 4 000 000

Лабораторная работа 1

Ход выполнения работы:

1. Приготовьте суспензию почвы. Для этого отвесьте 10 г почвы и перенесите навеску в стерильную ступку, добавьте 2-3 мл стерильной воды и разотрите до пастообразного состояния.
2. Полученную пробу почвы (10г) перенесите в стерильную колбу, содержащую 90 мл стерильной воды, размешайте в течение 5 мин и дайте отстояться 30 мин. Это первое разведение исследуемой пробы почвы (1:10).
3. Приготовьте ряд последующих 10-кратных разведений этой пробы в пробирках в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в пробе. Для приготовления каждого последующего разведения используйте новую пипетку (1:1000 - 1:1000000).
4. Полученные разведения в объеме 1 мл перенести в чашку Петри (на каждое разведение по 2-3 чашки):

а) на МПА для определения общего числа бактерий;

б) на среду Чапека для учета и выделения актиномицетов;

в) на среду Эшби для учета и выделения азотобактера.

5. Равномерно распределите каплю инокулята на поверхности агара, покачивая чашку, и оставьте на 30 мин для адсорбции при комнатной температуре.
6. Засеянные чашки Петри через 30 минут переверните вверх дном и поместите в термостат при температуре 28-37^{0}С для выращивания мезофильной микрофлоры. Количество бактерий на МПА учитывайте через 1-5 сут., актиномицетов и азотобактера – через 5-7 сут.
7. Учитывайте количество колоний следующим образом: дно чашки Петри маркером разделите на равные секторы, учтенные колонии отмечайте точками на стекле. Подсчитайте среднее число колоний на чашке и далее пересчитайте количество микроорганизмов на 1 г почвы по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V}.$$, где (1)

a – количество выросших колоний

10^n – степень разведения суспензии;

V – объём исследуемой пробы (1 г).

8. Результаты работы внесите в таблицу 2.

Таблица 2 – Качественный и количественный учет микрофлоры почвы

Номер пробы	ОМЧ (общее микробное число)	Количество в 1 г почвы		Индекс БГКП	Перфрингенс-титр
		азотобактера	актиномицетов		
1					

Контрольные вопросы:

1. Правила отбора проб почвы для микробиологического исследования?
2. Дайте определения понятиям: «перфрингенс-титр, ОМЧ, Индекс БГКП».
3. По каким показателям оценивают санитарное состояние почвы?
4. Каким методами определяют общее количество кишечной палочки в 1 г почвы?
5. Какие микроорганизмы служат показатель давнего загрязнения почвы?
6. Методика определения протей, сальмонелл в почве.

1.2 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ

Цель работы: Освоить методы отбора проб воды, их посева и определения бактериальной загрязненности воды.

Материалы и оборудование: оптический микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, стерильные чашки Петри с МПА и средой Эндо, исследуемые пробы воды, столик для окрашивания препаратов, промывка с водой, красители для окраски по Граму, мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, системы индикаторные бумажные (СИБ), для идентификации энтеробактерий, стерильный физиологический раствор; термостат с температурой 37^0С.

Вода представляет собой естественную среду обитания микроорганизмов. Содержание микробов в 1 мл воды открытых водоисточников варьирует от десятков и сотен до десятков миллионов. Наибольший процент водных микроорганизмов составляют сапрофитные представители родов *Micrococcus, Sarcina, Pseudomonas, Clostridium, Proteus,* а также *дрожжи и плесневые грибы.* Среди них присутствуют пигментообразующие и флюоресцирующие бактерии. Вместе с тем, в воде находятся и *патогенные микроорганизмы*, которые попадают туда с различными стоками, при купании, стирке белья, водопое скота, во время дождей, особенно обильных, в водоемы могут стекать потоки с участков земли, занятых под посевы сельскохозяйственных культур.

Водным путем передаются брюшной тиф, бактериальная и амебная дизентерия, холера, лептоспироз, полиомиелит, гепатиты А и Е и ряд других болезней.

При санитарно-бактериологическом исследовании воды определяют:

- общее микробное число (общее количество микроорганизмов в 1 мл),
- количество БГКП, как показатель степени фекального загрязнения.
- дополнительно определяют титр Clostridium perfringens, индекс бактериофага и цисты лямблий.
- наличие патогенных бактерий определяют по эпидемиологическим показателям.

Исследованию подлежит:
- питьевая вода (водопроводная, колодезная, из артезианских скважин),
- вода открытых водоемов (реки, озера),
- вода плавательных бассейнов,
- сточные воды.

Допустимое содержание отдельных видов микроорганизмов в различных водоисточниках регламентируется ГОСТом (государственным стандартом).

Термины и определения, используемые при проведении санитарного контроля воды:

- *общее микробное число (ОМЧ)* – общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37^0С в течение 24 часов, видимые с увеличением в 2 раза;
- *общие колиморфные бактерии (ОКБ)* - грамотрицательные, оксидазо-отрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 37^0С в течение 24-48 часов;
- *термотолерантные колиморфные бактерии (ТКБ)* – бактерии, обладающие признаками общих колиморфных бактерий, а также способные ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 44^0С в течение 24 часов;
- *сульфитредуцирующие клостридии* – палочковидные спорообразующие анаэробные бактерии, редуцирующие сульфит натрия до сульфидов (на железо-сульфитном агаре - *ЖСА*, при температуре 44^0С в течение 16-18 часов);
- *колифаги* – вирусы, способные лизировать *E.coli*, и при температуре 37^0С через 18 часов формировать зоны лизиса этой бактериальной культуры на питательном агаре;
- *колониеобразующие единицы (КОЕ)* – обособленное скопление бактерий на плотной среде, как результат роста и размножения одной микробной клетки;
- *бляшкообразующая единица (БОЕ)* – зона лизиса бактериального газона (бляшка);
- *наиболее вероятное число (НВЧ)* – вероятная оценка числа микроорганизмов в определенном объеме воды, полученная из сочетания положительных и отрицательных результатов в серии объемов биопробы, исследованных стандартными методами с использованием жидких питательных сред.

Значение показателей и область применения

ОКБ - основной нормируемый показатель при оценке качества воды водоемов в местах водозаборов для централизованного водоснабжения, рекреации, в черте населенных пунктов.

ОКБ - интегральный показатель степени фекального загрязнения, который включает ТКБ, E. coli, и поэтому обладает индикаторной надежностью в отношении возбудителей бактериальных кишечных инфекций. ОКБ - наиболее

чувствительный показатель при выявлении источников фекального загрязнения, в т. ч. небольших.

ТКБ рекомендуется определять одновременно в одном и том же посеве с ОКБ для подтверждения фекального происхождения загрязнения.

Уровни ОКБ и ТКБ в воде водоемов, загрязняемых сточными водами, близки. По мере удаления от источника загрязнения и воздействия факторов самоочищения различия в численности этих групп индикаторов возрастают.

При высоком антропогенном, в частности, химическом загрязнении водоемов, сбросах недостаточно обеззараженных сточных вод, нарушении естественного статуса водоема (зарегулированные водоемы, каналы и т.п.) возможно снижение индикаторного значения лактозоположительных ОКБ и ТКБ в результате их более интенсивного отмирания, чем патогенных (сальмонеллы) и условно-патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae

Отбор проб воды

Для взятия проб воды используют как многоразовую, так и одноразовую стерильную посуду. *Многоразовая* изготовляется из материалов, выдерживающих обработку сухим жаром и автоклавированием. Емкости для забора воды закрывают плотными пробками и защитным колпачком из фольги или плотной бумаги.

Из открытых водоемов пробы берут обычно с глубины 10-15 см от поверхности, а из мелководных водоисточников - на уровне 10-15 см от дна. Для взятия проб используют также специальный аппарат – *батометр* (рис 2,3). Он состоит из металлического каркаса, в который вставляется бутылка для воды, закрывающаяся плотной пробкой с приспособлением для ее открывания. Этот аппарат укреплен на тросе, позволяющем опускать его на нужную глубину. Батометры часто используются при взятии глубинных проб воды из больших водоемов.

Из распределительных сетей отбор проб из крана должен производиться после предварительного обжигания и последующего спуска воды не менее 10 минут при полностью открытом кране; при отборе пробы напор воды может быть уменьшен.

Пробу отбирают непосредственно из крана, без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок.

- если через пробоотборный кран происходит постоянный излив воды, пробы отбирают без предварительного обжига, изменения напора воды и существующей конструкции (не снимая силиконовые или резиновые шланги);
- при заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды (пробка не должна смачиваться при транспортировании); после наполнения емкости закрывают стерильной пробкой или колпачком;
- отобранную пробу маркируют и сопровождают документом с указанием места, даты, времени забора, фамилии специалиста, отбиравшего пробу, и другой информации.

Подготовка проб воды. Перед посевом пробу тщательно перемешивают и фламбируют горящим тампоном край емкости. Используемые пробирки и чашки маркируют.

Перед каждым отбором новой порции воды для анализа пробу перемешивают продуванием воздуха стерильной пипеткой.

Приготовление разбавлений. Для посева объемов воды, меньших, чем 1 мл, используют разбавления анализируемой воды. Перед посевом стерильную воду разливают по 9 мл в пробирки с соблюдением правил стерильности. Затем в первую пробирку с 9 мл раствора вносят 1 мл анализируемой воды. При этом пипетка не должна быть опущена ниже поверхности воды, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. Другой стерильной пипеткой продуванием воздуха тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают из нее 1 мл и переносят в чашку Петри, что будет соответствовать посеву 0,1 мл анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов, этой же пипеткой переносят 1 мл содержимого первой пробирки в следующую пробирку с 9 мл раствора для разбавления. В случаях высокого уровня загрязнения воды разбавление продолжают аналогично, каждый раз меняя пипетку.

Время от момента приготовления разбавлений и заливки питательным агаром не должно превышать 30 мин.

Определение общего количества микроорганизмов в воде

Общее микробное число (ОМЧ) воды определяют *путем культивирования* содержащихся в пробах бактерий в плотных питательных средах.

В зависимости от предполагаемой загрязненности водоема перед посевом готовят десятикратные разведения исходной пробы в стерильной водопроводной воде. В таблице 3 приведены рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности (объем каждого разведения для дальнейшего посева в МПА составляет 1 мл).

Таблица 3 - Рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности при определении ОМЧ

Тип исследуемой воды	Рекомендуемые для посева разведения воды
Водопроводная вода и вода артезианских колодцев	1 мл исходной воды без разведения
Чистая вода (вода колодцев, родников и др., вода плавательных бассейнов)	1 и 1:10
Открытые водоемы, не загрязненные сточными водами	1; 1:10 и 1:100
Чистые водоемы в местах массового купания	1:10 и 1:100

	Продолжение таблицы 3
Открытые водоемы, загрязненные сточными водами	1:10; 1:100 и 1:1000
Сильно загрязненные хозяйственно-бытовые воды и сточные жидкости	1:10000; 1:10 0000 и 1:100 000

Для получения разведений берут ряд пробирок, содержащих по 9 мл стерильной воды. Исследуемую воду, в объеме 1 мл, вносят в первую пробирку, получают разведение 1:10, затем из этой пробирки переносят 1 мл в следующую (1:100) и т.д., с соблюдением правил стерильности.

Стерильной пипеткой делают посев 1 мл из каждой пробирки на МПА, например из второй пробирки, что будет соответствовать посеву 0,01 мл анализируемой воды. Посевы делают в 2 чашки Петри с каждого разведения, для подсчета средних показателей, и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45ºС МПА. Содержимое чашек тщательно перемешивают круговыми движениями, перемещая их по поверхности стола. После застывания агара, чашки помещают в термостат на 24 ч при температуре 37ºС.

Колонии бактерий растут, как на поверхности питательной среды (аэробы), так и в ее глубине (анаэробы).

Результат: Подсчитывают суммарное количество колоний и *вычисляют общее микробное число*. Если воду предварительно разводили, то полученную сумму умножают на степень разведения и в итоге получают количество микроорганизмов в 1 мл исходной воды.

Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом КОЕ в 1 мл исследуемой пробы воды.

Если на одной из двух чашек подсчет не возможен, результат выдают на основании учета колоний на одной чашке. Если на двух чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющихся на всю поверхность чашки, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают колонии на секторе чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечается «число КОЕ/мл - ориентировочно».

❖ ГОСТ: *ОМЧ в 1 мл питьевой воды не должно превышать 50 КОЕ.*

Определение бактерий группы кишечной палочки (БКГБ)

Санитарно-показательными микроорганизмами в воде, также как и в почве, являются бактерии группы кишечной палочки. Они также называются *колиформными бактериями* (от лат. Escherihia coli - кишечная палочка.) Эта группа объединяет факультативно анаэробных представителей семейства Enterobacteriaceae. По морфологическим свойствам все они имеют палочковидную форму, не имеют эндоспор, грамотрицательные, оксидазо-отрицательные, разлагают лактозу до кислоты и газа.

Следует обратить внимание на температуру, при которой наиболее активно проявляются сахаролитические свойства колиформных бактерий.

Большинство из них сбраживает лактозу через 24-48 ч при температуре **37ºС.** Такие бактерии относят к ***общим колиформным бактериям (ОКБ).***

А те бактерии, которые разлагают лактозу до кислоты и газа при более высокой температуре **= 44ºС** в течение более короткого времени – за 24 ч, относятся к ***термотолерантным колиформным бактериям (ТКБ)*** (это их отличительная особенность). Обнаружение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) указывает на свежее фекальное загрязнение воды.

При проведении микробиологического анализа воды БГКП выявляют основными ***2 методами:***

- методом мембранных фильтров - наиболее распространенный.
- титрационный метод (бродильный тест).

В оценке санитарного состояния объектов окружающей среды, важное значение, имеют следующие ***2 показателя:***

Коли-индекс – это количество кишечных палочек, обнаруживаемое в определенном объеме субстрата: в 1 л жидкости, 1 кг твердого вещества (для пищевых продуктов) или в 1 г почвы.

Для определения коли-индекса используют *метод мембранных фильтров* или непосредственный посев исследуемого материала на плотные питательные среды.

Коли-титр – это наименьшее количество жидкости или твердого вещества (выраженное в миллилитрах или граммах), в котором обнаруживается одна кишечная палочка. Коли-титр определяют *бродильным методом***.**

Коли-титр величина, обратная коли-индексу, который является прямым показателем фекального загрязнения.

Предельно допустимые величины коли-титра/коли-индекса нормированы ГОСТ, техническими условиями или инструкциями.

Норматив для питьевой воды (нормативы см. табл. 6):

- *Коли-индекс* (количество E.coli в 1 л воды) - *по ГОСТ не более 3.*
- *Коли-титр* (количество мл воды, в которой находится 1 E.coli) – *300 мл.*

1. Определение БГКП методом мембранных фильтров. Для определения БГКП данным методом используют фильтровальный аппарат Зейтца, (рис. 4), который перед началом исследований протирают тампоном, смоченным в спирте, стерилизуют прокаливанием и устанавливают на колбе Бунзена. Затем в прибор помещают нитрацеллюлозный или ацетатцеллюлозный мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Такие фильтры предварительно стерилизуют методом кипячения.

Выбранный для исследования объем воды пропускают через фильтр, присоединяя аппарат к вакуумному насосу. Если анализируют несколько проб воды, то для каждой из них используют отдельный мембранный фильтр. Перед фильтрованием новой пробы аппарат стерилизуют.

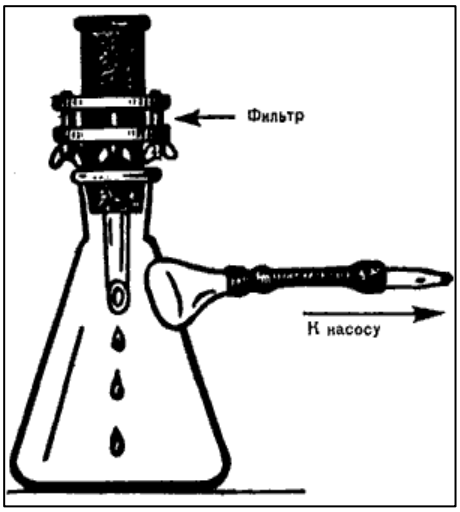


Рисунок 4 - Фильтр Зейтца и
колба Бунзена для фильтрации воды

После пропускания через них воды фильтры помещают на поверхность среды Эндо в чашки Петри, располагая их на питательной среде фильтрующей стороной вверх. Чашки затем инкубируют в термостате 24 ч при 37ºС. На одну чашку можно поместить 3-4 фильтра с условием, чтобы они не соприкасались.

Примечание: в состав среды Эндо входят лактоза, индикатор, фуксин и МПА, поэтому для БГКП характерным является образование ней колоний красного цвета с металлическим блеском; темно-красные.

Для учета выбирают фильтры, на которых выросли изолированные типичные для лактозоположительных бактерий колонии: темно-красные, красные, с металлическим блеском и без него, слизистые с темно-малиновым центром с отпечатком на обратной стороне фильтра (рис. 5).

Для повышения точности анализа учет ведут не менее чем на двух фильтрах с числом типичных для колиформных бактерий колоний не менее 10 и не более 30 для фильтров с диаметром диска 35 мм и не менее 15 и не более 50 для фильтров с диаметром диска 47 мм. Допустимо вести учет по 1 фильтру или на фильтрах с более густым ростом, но с обязательной оговоркой в приложении к протоколу анализа.

Подсчитывают количество таких колоний, готовят из них мазки и окрашивают по Граму, а также проверяют оксидазную активность.

Рисунок 5 – Мембранный фильтр, с ростом бактерий на среде Эндо

Постановка оксидазного теста

- для постановки теста используют оксидазные диски (DD018). Ввиду возможной ложноотрицательной реакции подозрительные колонии со среды Эндо отсевают на питательный агар для оксидазного теста и после получения роста повторяют с ним тест на оксидазу. Агар для определения оксидазы у микроорганизмов водного происхождения (M1274) и рекомендован международным комитетом ISO.

Если на части или на всей поверхности фильтра наблюдается наложение колоний или сплошной рост, оксидазный тест выполняют путем наложения оксидазного диска, смоченного дистиллированной водой на мембранный фильтр. *При появлении синего окрашивания оксидазный тест считается положительным.*

Если на фильтрах все колонии оксидазоположительные, их не учитывают; выдается ответ об отсутствии ОКБ и ТКБ и анализ завершается.

При отрицательной оксидазной реакции проводят рассев до получения изолированных колоний и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ (анализ качественный).

Результат: Оксидазоотрицательные бактерии, разлагающие лактозу до кислоты и газа, обнаруженные на фильтре, позволяют дать положительный ответ о наличие в воде БГКП. При анализе питьевой воды вычисляют количество БГКП, содержащихся в 100 мл.

Для дифференциации ОКБ (общих колиформных бактерий) и ТКБ (термотолерантных колиформных бактерий) каждую выросшую на фильтре колонию БГКП засевают в две пробирки с лактозной средой:

- Одну из пробирок предварительно прогревают до 44ºС с тем, чтобы инактивировать ОКБ. Затем эту пробирку инкубируют при этой же температуре в течение 24 ч (для подтверждения наличия ТКБ).
- Вторую пробирку с посевом ставят в термостат при температуре 37ºС на 48 ч, чтобы убедиться в наличии ОКБ.

Загрязненную воду открытых водоемов предварительно разводят, как указано в таблице 3 и для фильтрации используют объем не менее 10 мл. Дальнейшие исследования проводят, как описано выше.

Учет результатов: Типичные колонии учитывают как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и образовании кислоты на лактозной среде Эндо. Среди этих колоний учитывают как ТКБ при подтверждении ферментации лактозы с образованием кислоты и газа при температуре 44 °С.

В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний число колониеобразующих единиц (КОЕ) ОКБ и ТКБ подсчитывают на всех фильтрах и результат анализа выражают в КОЕ в мл воды.

Вычисление проводят по формуле:

$$X = \frac{\alpha \times 100}{V}$$, где (2)

X - число колоний в 100 мл;
V - профильтрованный объем воды через фильтры, на которых велся учет;
α - число подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

При отсутствии общих и термотолерантных колиморфных бактерий на всех фильтрах записывают результат: «не обнаружено ОКБ в 100 мл» и «не обнаружено ТКБ в 100 мл».

2. Определение БГКП титрационным методом (бродильная проба)

Этот метод известен также под названием: «двухфазный бродильный метод». Данный метод может быть использован:
- при отсутствии материалов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации;
- при анализе с большим содержанием взвешенных веществ;
- в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиморфных бактерий.

Сущность метода: он основан на накоплении колиформных бактерий в жидкой *глюкозо-пептонной среде (ЛПС),* путем посева установленного объема воды, с последующим пересевом на среду Эндо и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

Объемы воды при этом определяются в зависимости от водоисточника и предполагаемой степени его загрязненности.

1 этап исследования (1 фаза): При исследовании питьевой воды *качественным методом* (текущий санэпиднадзор, производственный контроль) засевают 3 объема по 100 мл.

При исследованиях воды с целью *количественного определения* ОКБ и количественного определения ТКБ делают посев таким образом: 3 объемов по 100 мл, 3 объемов по 10 мл, 3 объемов по 1 мл.

Каждый объем исследуемой пробы засевают в ГПС. Посев 100 мл и 10 мл воды производят в 10 и 1 мл концентрированной ГПС, пробу объемом 1 мл засевают в 10 мл среды обычной концентрации. Посевы инкубируют при 37^0С в течение 48 часов. Не ранее 24 часов инкубации проводится предварительная оценка посевов.

Например, берут воду с исходным объемом 300 мл и производят посев следующим образом: два объема по 100 мл засевают в два флакона с 10 мл питательной среды, а 10 объемов по 10 мл той же пробы воды засевают в 10 пробирок, содержащих по 1 мл питательной среды. Посевы инкубируют в термостате при 43ºС в течение 7 -12 ч. Указанная температура подавляет рост сапрофитных микроорганизмов, но не влияет на колиформные бактерии.

Результат: Если в глюкозо-пептонной среде идет газообразование и помутнение, то это свидетельствует о присутствии кишечной палочки.

На 2 этапе (2 фаза): из емкостей, где отмечено наличие признаков роста (помутнение, газообразование) делают высевы петлей на чашки Петри со средой Эндо, разделенной на 3-4 сектора, и помещают их в термостат при 37ºС на 18-20 ч для того, чтобы получить рост изолированных колоний.

- Емкости с посевами воды в среде ГПС, на которых через 7-12 ч не было признаков роста, оставляют в термостате еще на 24 - 48 ч. Отсутствие роста в них через 48 ч свидетельствует об отсутствии в воде БГКП.

При просмотре посевов ***на среде Эндо*** обращают внимание на колонии красного, розового, бледно-розового цвета с металлическим блеском. Делают из них мазки, окрашивают по Граму и проверяют оксидазную активность, позволяющую дифференцировать ОКБ от других грамотрицательных бактерий.

Результат: наличие грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек свидетельствует о наличие в воде БГКП. Для определения термотолерантных колиформных бактерий по 2-3 лактозоположительные колонии из каждого сектора со среды Эндо засевают в пробирки с любой средой, содержащей лактозу, предварительно нагретой до 44ºС и помещают в термостат на 24 ч при той же температуре. Образование в пробирках кислоты и газа свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствуют термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ). Это позволяет сделать вывод о свежем фекальном загрязнении воды.

Учет результатов: При исследовании 3 объемов по 100 мл результаты оценивают качественно и при обнаружении ОКБ и ТКБ хотя бы в одном из 3 объемов, в протоколе делают запись: «обнаружены в 100 мл». При исследовании количественным методом определяют наиболее вероятное число (НВЧ) ОКБ и ТКБ в 100 мл водопроводной или питьевой воды по таблице 4.

Таблица 4 - Расчет НВЧ кишечных бактерий в 100 мл питьевой воды

Число положительных результатов из:			НВЧ бактерий в100 мл	Доверительный интервал (95%)	
3 объемов по 100 мл	3 объемов по 10 мл	3 объемов по 1 мл		нижний	верхний
0	0	1	0,3	0,0	1,4
0	1	0	0,3	0,1	1,4
0	2	0	0,6	0,1	2,8
1	0	0	0,4	0,1	1,7
1	0	1	0,7	0,2	3,4
1	1	0	0,7	0,2	3,4
1	1	1	1,1	0,2	5,2
1	2	0	1,1	0,2	5,3
2	0	0	0,9	0,2	4,3
2	0	1	1,4	0,3	6,7

					Продолжение таблицы 4
2	1	0	1,5	0,3	6,9
2	1	1	2	0,4	9,6
2	2	0	2	0,5	9,9
2	2	1	3	0,6	12,9
2	3	0	3	0,6	13,3
3	0	0	2	0,5	10,8
3	0	1	4	0,8	18,0
3	0	2	6	1,4	29,7
3	1	0	4	0,9	20,0
3	1	1	8	1,6	35,0
3	1	2	12	2,5	53,8
3	2	0	9	2,0	43,6
3	2	1	15	3,2	69,8
3	2	2	21	4,6	100,3
3	2	3	29	6,2	136,4
3	3	0	24	5,1	112,1
3	3	1	46	9,3	216,0
3	3	2	110	23,5	516,6
3	3	3	≤ 240	-	-

Вирусологическое исследование воды

Колифаги - вирусы, способные лизировать кишечную палочку *(E.coli)* и формировать зоны лизиса (бляшки) через (18±2) ч при температуре 37°С на ее газоне на питательном агаре.

Колифаги являются нормируемым показателем и предназначены для проведения *текущего контроля качества воды* поверхностных водоемов, служащих источником для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, водоснабжения пищевых предприятий, для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест в отношении возможного вирусного загрязнения.

Наиболее распространёнными являются **2 метода**:

- титрационный метод;
- метод прямого выделения фагов.

Определение колифагов

1. Титрационный метод определения 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.

Проведение качественного анализа: В исследуемую пробу воды объемом 100 мл вносят 10 мл 10- кратного питательного бульона и 1 мл подготовительного смыва тест – культуры или 2 мл 4- часовой бульонной культуры. Для контроля культуры 0,1 мл смыва *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* помещают в термостат и инкубируют при 37^0С в течение 18 часов. После инкубации из исследуемой пробы воды в пробирку отбирают 10 мл, туда же добавляют 1 мл хлороформа. Пробирку закрывают стерильной резиновой или силиконовой пробкой, энергично встряхивают для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставляют при комнатной температуре не менее, чем на 15 минут до полного осаждения хлороформа. В предварительно расплавленный и остуженный до 45^0- 49^0С питательный агар добавляют приготовленный смыв *E. coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара. Из пробирки 1 мл обработанной хлороформом пробы (не касаясь хлороформа) переносят пипеткой в стерильную чашку Петри, заливают смесью расплавленного питательного агара и культуры (объемом 12-15 мл). Также готовят дополнительную чашку Петри без внесения воды (для контроля культуры *E. coli*). Чашки осторожно покачивают для равномерного перемешивания пробы и агара. До полного застывания чашки оставляются на столе при комнатной температуре на 10 минут. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат на 18 часов при 37^0С. При выполнении серии проб ставится общий контроль для всей серии.

Учет результатов. 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. В протоколе анализа отмечают: «колифаги обнаружены или не обнаружены в 100 мл воды» (результат качественный). При наличии зон лизиса в контроле культуры результат считается недействительным.

Проведение количественного анализа: исследуемую пробу воды в количестве 100 мл разливают на 6 объемов: в 1 флакон – 50 мл и в 5 пробирок – по 10 мл. В 50 мл пробы добавляют 5 мл десятикратного питательного бульона и 0,5 мл смыва (или 1 мл 4-х часовой бульонной культуры) *E. coli.* В каждые 10 мл пробы вносят по 1 мл десятикратного питательного бульона и 0,1 мл смыва (или 0,2 4- часовой бульонной культуры) *E. coli.*

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий (или 0,2 мл 4- часовой бульонной культуры) *E. coli* вносят в чашку Петри и заливают питательным агаром. Посевы инкубируют при 37^0С в течение 18 часов. Из объема 50 мл после инкубации в пробирку отбирают 10мл. Во все исследуемые 6 объемов добавляют по 1 мл хлороформа. Пробирки закрывают стерильными резиновыми или силиконовыми пробками, энергично встряхивают для

равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставляют не мене, чем на 15 минут для осаждения хлороформа. В предварительно расплавленный и остуженный до 45^0- 49^0С питательный агар добавляют приготовленный смыв *E. coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4- часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

Приготовленную смесь разливают в чашки Петри: 1 чашку для контроля культуры *E. coli* на лизогенность и по одной чашке на каждую исследуемую пробу воды. При одновременном анализе нескольких проб воды ставят один контроль культуры *E. coli.* После застывания агара чашки, предназначенные для посева проб, делят на 6 секторов, которые маркируют в соответствии с исследуемыми объемами. На каждый сектор из соответствующей пробирки наносят пастеровской пипеткой (микропипеткой или бактериологической петлей продольным штрихом) по капле надосадочной жидкости (без хлороформа). После подсыхания капель чашки с исследуемыми пробами и контрольную чашку помещают при 37^0С на 18 часов.

Учет результатов. Просмотр посевов осуществляется в проходящем свете. Учитывают наличие зон просветления (лизиса) на секторах газона *E. coli.* При применении капельного способа посева пипеткой образуется зона лизиса в виде округлого пятна или отдельных бляшек. При посеве продольным штрихом бактериологической петлей отмечается лизис по ходу штриха. Проба считается положительной при наличии зоны лизиса хотя бы на одном секторе при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

Оценка проводится по таблице наиболее вероятного числа (НВЧ) бляшкообразующих единиц (БОЕ). В протоколе анализа указывают наиболее вероятное количество колифагов в 100 мл воды и диапазон возможных колебаний: НВЧ БОЕ (нижний предел верхний предел) колифагов в 100 мл результат полуколичественный. При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат считается недействительным.

2. Прямой метод определения колифагов. В питьевой воде заключается в исследовании нормируемого объема воды (100 мл) путем его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на газоне *E. coli* в чашках Петри с питательным агаром.

При исследованиях по эпидемическим показаниям для выделения колифагов из воды проводится параллельное исследование прямым и титрационным методами.

Проведение анализа прямым методом: в питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45^0- 49^0С питательный агар добавляют смыв *E. coli* из расчета 2,0 мл смыва (или 4 мл 4- часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара и перемешивают. Исследуемые 100 мл воды разливают по 20 мл в большие пробирки, нагревают до 35-44^0С и немедленно (не более чем через 5 минут по достижении требуемой температуры) разливают в 5 чашек Петри; сразу в каждую чашку вносят по 20 мл стерильной водопроводной смеси агара с культурой *E. coli.* Для контроля культуры *E. Coli* в одну чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды, предварительно прогретой до 35-44^0С, заливают 20 мл приготовленного агара с

E. coli, осторожно перемешивают и оставляют при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром помещают вверх дном в термостат и инкубируют при 37^0С в течение 18 часов.

Учет результатов. Просмотр посевов ведут в проходящем свете. Учет результатов проводится путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5 чашках Петри. Результаты выражают в БОЕ на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

Предварительный учет результатов проводят через 5-6 часов инкубации. На этом этапе при наличии четких зон лизиса может быть выдан предварительный ответ о присутствии колифагов в воде. Окончательный количественный учет прямого посева проводят через 18 часов. Результат выражают количеством БОЕ на 100 мл пробы воды.

Если отмечен сливной рост бляшек и счет затруднителен, то по данным прямого посева выдают качественный результат: «обнаружено в 100 мл воды». При получении отрицательного результата при работе прямым методом окончательный ответ выдают по результатам титрационного метода. При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат исследования считается недействительным.

Постановка контролей:

Отрицательный контроль: подтверждает отсутствие контаминации фагом питательных сред, лабораторной посуды, оборудования на этапах подготовки и проведения анализа, а также позволяет оценить способность тест - культуры *E. coli* давать равномерный газон.

Отрицательным контролем служит исследование стерильной водопроводной воды, проводимое аналогично анализируемой пробе воды. Так, при анализе воды титрационным методом 10 мл стерильной водопроводной воды вносят в дополнительную пробирку. При анализе воды прямым посевом в дополнительную (шестую) чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды. Дополнительные посевы исследуют на колифаги аналогично основным пробам.

При анализе серии проб можно ставить один отрицательный контроль на каждый вид анализа: титрационный и прямой. В этом случае постановку отрицательного контроля поэтапно осуществляют после обработки всех проб данной серии.

В случае обнаружения бляшек колифагов в чашках с отрицательным контролем результаты исследования всей серии проб считают недействительными. Следует проверить стерильность лабораторного оборудования, посуды, питательных сред, а также повторить контрольный посев на чистоту тест – штамма *E. coli* K12 F^+Str^R. Кратность проведения отрицательного контроля 1 раз в день.

Подтверждение фаговой природы лизиса проводится в сомнительных случаях при работе как титрационным, так и прямым методами; необходимо провести контрольный посев на подтверждение фаговой природы лизиса. С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара, подозрительный на колифаги, помещают в 5 мл питательного бульона, куда

добавляют каплю тест – культуры *E. coli* и инкубируют при 37^0С в течение 16-18 часов. Полученную культуру обрабатывают хлороформом и исследуют на наличие фага. Высев осуществляют петлей или пипеткой на сектора питательного агара. Лизис на любом из секторов расценивается как подтверждение наличия фага (табл. 5).

Таблица 5 - Расчет НВЧ колифагов в 100 мл водопроводной воды

Число положительных результатов		НВЧ в 100 мл	Вероятность	Нижний предел	Верхний предел
из объема по 50 мл	из объемов по 10 мл				
1	4	16,1	0,4095	1,9	113,9
1	3	9,3	0,3422	1,1	77,4
1	2	5,6	0,3218	0,7	46,4
1	1	3,2	0,3039	0,4	26,2
1	0	1,4	0,2500	0,2	11,5
0	5	6,9	0,0010	0,8	57,6
0	4	5,1	0,0060	0,6	42,5
0	3	3,6	0,0222	0,4	29,6
0	2	2,2	0,0671	0,3	18,5
0	1	1,1	0,1937	0,1	8,8

Лабораторная работа 2

Ход выполнения работы:

1. Отберите пробы воды в стерильные флаконы или колбы в объеме 50 или 100 мл непосредственно перед началом занятия: а) пробу водопроводной воды; б) пробу из отрытого водоема (ручей, ключ, пруд). До начала занятия (посева) пробы можно хранить не более 3 ч. при температуре не выше 4^0С.
2. Приготовьте ряд последующих 10-кратных разведений отобранных проб в пробирках, в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в пробе. Для приготовления каждого последующего разведения используйте новую пипетку.
3. Полученные разведения в объеме 1 мл поместить в чашки Петри и залейте остуженным до 45^0С МПА для определения общего числа бактерий (ОМЧ);
4. В чашки Петри со средой Эндо для учета БГКП (бактерии группы кишечной палочки или энтеробактерии) внесите по 0,1 мл последнего и предпоследнего разведений, равномерно распределите каплю инокулята на поверхности агара, покачивая чашку, и оставьте на 30 мин для адсорбции при комнатной температуре.

5. Засеянные чашки Петри через 30 мин переверните вверх дном и поместите в термостат при температуре 28-37^{0}С для выращивания мезофильной микрофлоры. Количество бактерий учитывайте через 1–2 сут.
6. Водопроводную воду исследуйте также методом мембранных фильтров, которые простерилизуйте кипячением в течение 30 мин. Фильтровальную установку подготовьте к работе вместе с преподавателем.
7. Профильтруйте пробу водопроводной воды в объеме 100 мл. Стерильным пинцетом фильтр аккуратно перенесите в чашку Петри с МПА (для определения общего числа бактерий) и средой Эндо и поместите в термостат с температурой 37^{0}С.
8. Учитывайте количество колонии следующим образом: дно чашки Петри маркером разделите на равные секторы, учтенные колонии отмечайте точками на стекле. Для определения титра подсчитайте среднее число колоний на чашке и умножьте на разведение.
9. Для подтверждения принадлежности к БГКП из колоний, выросших на среде Эндо, приготовьте фиксированные мазки, окрасьте их по Граму, микроскопируйте. Грамотрицательные бактерии протестируйте по биохимическим свойствам с системой индикаторной бумажной (СИБ) для идентификации энтеробактерий.
10. Подсчитайте количество колоний кишечной палочки в 1 мл воды по формуле 2 (см. с. 22).
11. Результаты запишите в виде таблицы «Количественный учет бактерий в пробах воды».

Номер пробы	Общее число бактерий в 1 мл воды	Коли-титр
1		

12. Полученные результаты сравните с нормативами безопасности питьевой воды представленными в таблице 6.

Таблица 6 – Нормативы безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим и паразитологическим показателям *(по методическим указаниям «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» МУК 4.2.1018-01)*

Показатели	***Единицы измерения***	***Нормативы***
Общее микробное число[2]	Число образующих колонии бактерий в 1 мл	Не более 50 колоний
Общее количество колиформных бактерий[2]	Число бактерий в 100 мл	Отсутствие бактерий
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл[1]	Отсутствие бактерий
Колифаги[3]	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие колифагов

Споры сульфитредуцирующих клостридий[4]	Число спор в 20 мл	Отсутствие клостридий
Цисты лямблий[3]	Число цист в 50 мл	Отсутствие цист

Примечание:

[1] Трехкратно исследуют по 100 мл отобранной пробы воды.

[2] Превышение норматива не допускается в 95 % проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 мес., при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

[3] Определяют только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

[4] Определение проводят при оценке эффективности технологии обработки воды.

Контрольные вопросы:

1. Правила отбора проб воды для микробиологического исследования?
2. Дайте определения понятиям: «Коли-титр, «Коли-индекс» ТКБ, ОКБ.
3. По каким показателям оценивают санитарное состояние воды?
4. Что такое мембранные фильтры, методика проведения исследования?
5. Опишите прямой метод определения кишечных фагов в воде.

1.3 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА

Цель работы: Освоить методы бактериологического исследования воздуха.
Материалы и оборудование: чашки Петри с МПА, аппарат Кротова, мембранные фильтры, сахарный бульон, термостат.

Воздух является *неблагоприятной средой* обитания для микроорганизмов, так как в нем отсутствуют питательные вещества, необходимые для поддержания их жизни и размножения. Одним из важных условий для выживания в воздухе является способность микроорганизмов противостоять высушиванию, действию ультрафиолетовых и радиоактивных лучей, колебаниям температуры и другим неблагоприятным факторам. Микрофлора атмосферного воздуха формируется в основном за счет почвенных микроорганизмов, в меньшей степени они попадают в воздух с поверхности воды или растений. Поэтому наибольшее количество микроорганизмов содержится вблизи земной поверхности.

В атмосферном воздухе обнаруживаются *сапрофитные* микроорганизмы, представленные кокками (микрококки, сарцины), споровыми бактериями (Bacillus subtilis, B. cereus, B. mesentericus и др.), актиномицетами и грибами (Penicillium, Aspergillus, Mucor и др.). Они находятся в воздухе во взвешенном (аэрозольном) состоянии. Максимальное количество микроорганизмов в воздухе обнаруживают летом (июнь-август), минимальное – зимой (декабрь-январь).

Атмосферный воздух значительно отличается по количеству микроорганизмов и их видовому составу от воздуха закрытых помещений.

Бактериальная обсемененность воздуха закрытых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха. В составе воздуха закрытых помещений помимо сапрофитной микрофлоры находятся те микроорганизмы, которые выделяет человек через дыхательные пути (при разговоре, кашле, чихании), с поверхности кожи, с пылью загрязненного постельного белья и других источников (домашние животные, декоративные птицы). Здоровый человек при чихании выделяет в воздух 10 000 - 20 000 микробных тел, а больной – значительно больше. От больных с локализацией патологического процесса в полости рта и верхних дыхательных путях наряду с *условно-патогенными микроорганизмами* – стафилококками и зеленящими стрептококками – выделяются в окружающую среду *и патогенные* - гемолитические стрептококки группы А, бактерии дифтерии, коклюша, микобактерии туберкулеза и другие, в зависимости от этиологии заболевания. Микробиологический анализ воздуха на патогенную флору производят только по эпидемическим показателям.

В плановом порядке пробы воздуха для бактериологического исследования берутся в операционных блоках, послеоперационных палатах, отделениях реанимации, интенсивной терапии и других помещениях, требующих асептических условий.

Для оценки санитарного состояния воздуха закрытых помещений определяют показатели, характеризующие микробную чистоту воздуха:

- ***Общее микробное число*** – количество микроорганизмов в 1 $м^3$ воздуха
- ***Количество санитарно-показательных микроорганизмов в воздухе*** - это представители микрофлоры дыхательных путей - стафилококк (*Staphylococcus aureus)* и α- и β-гемолитические стрептококки (*Streptococcus viridans, Streptococcus pyogenes*).

Бактериальную обсемененность и количество санитарно-показательных микроорганизмов определяют по их количественному содержанию в 1 $м^3$ (1000 литров) воздуха.

В настоящее время существует много методов и устройств для отбора проб воздуха и их исследования.

Наиболее простыми и доступными для проведения санитарно-бактериологического исследования воздуха являются **методы:**

седиментации ↓ **фильтрации** **аспирации**

1. Седиментационный метод *Коха* (Koch, 1881г.) основан на спонтанном оседании микроорганизмов под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри.

Ход анализа: для определения *общего микробного числа* две чашки Петри со стерильным МПА оставляют открытыми в течение 10-30 мин. Затем их закрывают, надписывают и инкубируют в термостате при 37ºС в течение 24 ч. Затем посевы выдерживают 24 ч при комнатной температуре для выявления

плесневых грибов. Таким образом, через 48 ч подсчитывают суммарное количество колоний, выросших на чашках.

Расчет производят *по Омелянскому В.Л.*: исходят из того, что за 5 мин на поверхность 100 $см^2$ агара оседают такое количество бактерий, которое содержится в 10 литрах воздуха помещения.

Метод оседания не дает количественного представления о содержании микрофлоры в воздухе, так как на открытых чашках плохо удерживаются тонкодисперсные фракции бактериальных капель и пылевых частиц, а задерживаются главным образом крупные пылевые частицы, которые оседают или прибиваются токами воздуха к поверхности среды.

Тем не менее, метод оседания может быть использован в тех случаях, когда отсутствуют более совершенные приборы и методы или когда нет источника электроэнергии.

Для выявления *санитарно-показательных микроорганизмов* используют специальные питательные среды: для стафилококков – желточно-солевой агар - ЖСА (экспозиция 15 мин), для гемолитических стафилококков и стрептококков – кровяной агар (экспозиция 10-15 мин), для грибов – среду Сабуро (посевы выдерживают 3-5 суток при 20-22 ºС).

2. Аспирационный метод - проводят с использованием *аппарата Кротова* или его современных модификаций (рис. 6 a,b,c). Метод основан на ударном действии воздушной струи о поверхность питательной среды, на которую оседают микроорганизмы.

Аппарат Кротова состоит из трех частей: узла для отбора проб воздуха, микромонометра и электромотора. Узел для отбора проб воздуха, вмонтированный в металлический корпус, имеющий форму цилиндра, представляет собой электромотор, на оси которого укреплен центробежный вентилятор, на оси которого укреплен центробежный вентилятор, а в ротор вделана малая крыльчатка. Одновременно с вращением центробежного вентилятора начинает вращаться малая крыльчатка, на диске которой с помощью трех пружин укрепляется чашка Петри, заполненная плотной питательной средой.

Корпус прибора герметически закрывают крышкой, центральная часть которой представляет собой прозрачный диск из плексигласа с радиально расположенной клиновидной целью. Ширина щели у края диска 1,2 мм, а у центра – 0,1 мм.

На площадку устанавливают открытую чашку Петри с питательной средой, закрывают крышкой аппарата и включают мотор. Вращением центробежного вентилятора воздух засасывается через клиновидную щель и с силой ударяется о поверхность питательной среды, на которой оседают микроорганизмы, равномерно распределяясь по ней. Скорость вращения чашки Петри регулируется, что позволяет пропускать разный объем воздуха в минуту. Воздух, поступивший в прибор, выделяется наружу через воздухопроводную трубу, соединенную с микроманометром, с помощью него регистрируется скорость просасывания воздуха через прибор. По истечении

заданного времени экспозиции выключают мотор, чашку Петри с посевом воздуха снимают, закрывают и ставят в термостат.

Аппарат позволяет пропустить от 25-30 л воздуха в минуту.

a)

b)

c)

Рисунок 6 – Приборы: a – аппарат Кротова; b - пробоотборник бактериологический Тайфун Р-40 (современный аналог прибора Кротова); c) – автоматический импактор «Флора-100»

П о р я д о к р а б о т ы с а п п а р а т о м К р о т о в а. Прибор включают в электросеть. Снимают крышку, укрепляют на диске открытую чашку Петри с питательной средой, сообщая ей некоторые движения от руки по часовой стрелке. Крышку прибора закрывают и отмечают начальное время поступления воздуха в прибор. Устанавливают скорость просасывания воздуха.

Считают, что *для определения ОМЧ* необходимо использовать МПА, и скорость пропускания воздуха через аппарат = 25л/мин с экспозицией 4 мин, что гарантирует оседание микроорганизмов из объема не менее 100 л воздуха.

Для обнаружения *золотистого стафилококка* используют ЖСА, *гемолитических стафилококков и стрептококков* - 3-5% кровяной агар, а время экспозиции увеличивают до 10-15 мин, что обеспечивает посев бактерий из 250-300 л воздуха. Посев воздуха проводят в две чашки Петри с МПА или желточно-солевым агаром и выращивают 48 час (24 ч в термостате при 37ºС, затем выдерживают 24 ч при комнатной температуре). Чашки Петри с кровяным агаром инкубируют в термостате при 37ºС - 24 ч.

Подсчитывают количество выросших колоний и полученные данные пересчитывают на 1 м^3 исследуемого воздуха.

Подсчет количества колоний. Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 1000}{V},$$, где (3)

а – количество выросших на чашке колоний;
1000 – искомый объем воздуха, л.
V – объем пропущенного через прибор воздуха, л;
Х– количество микроорганизмов в 1 м^3 исследуемого воздуха.

Пример: на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 246 колоний, на второй – 254, т.е. в среднем 246+254= 250 колоний. Аппарат вращал чашку Петри 2 мин со скоростью 25 л/мин. Всего было пропущено 50 л воздуха. Таким образом в 50 л воздуха содержится 250 микробов, а общее микробное число в пересчете на 1 м^3 воздуха составляет (250×1000) : 50 = 5000 бактерий.

Учет результатов: При просмотре микробного роста через указанный промежуток времени, изучение качественного состава микрофлоры проводят по общепринятым методикам: из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, выделяют чистую культуру, которую идентифицируют.

Результаты анализа выражают средним числом микроорганизмов, обнаруженных в 1м^3 воздуха.

При исследовании атмосферного воздуха дополнительно определяют *спорообразующие анаэробы.* С этой целью делают посев воздуха в объеме 200-300 л на чашки Петри с железо-сульфитной средой, инкубируют в термостате при 37ºС 24 час.

Для *выявления плесневых грибов* посев воздуха делают на среду Сабуро и культивируют 3-5 суток при 20-22 ºС.

3. Метод фильтрации с использованием мембранных фильтров.

Мембранные фильтры обладают способностью задерживать все микроорганизмы воздуха, поэтому их устанавливают на пути воздушной струи в специальных приборах (см. рис. 7). Фильтры после контакта с воздухом прижимают к поверхности питательных сред в чашках Петри, и осевшие на них микроорганизмы переносятся в чашку с питательной средой. Культивируют в термостате и подсчитывают количество выросших колоний.

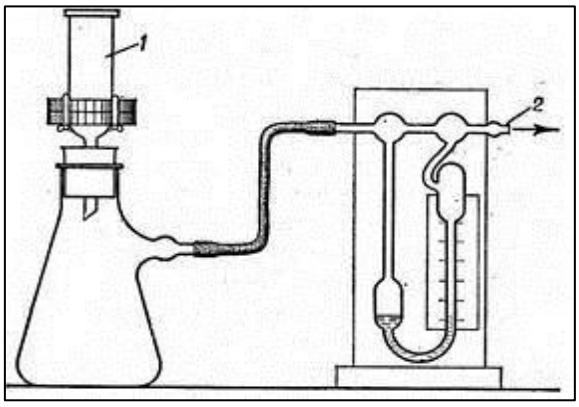


Рисунок 7 - Прибор Милявской: 1 - воронка Зейтца; 2 - трубка к аспиратору.

Для бактериологического исследования воздуха могут быть использованы стерилизованные и высушенные мембранные фильтры. Для этой цели мембранные фильтры два раза по 20 мин кипятят в дистиллированной воде и высушивают в термостате при 37^0С в чашке Петри между слоями стерильной фильтровальной бумаги.

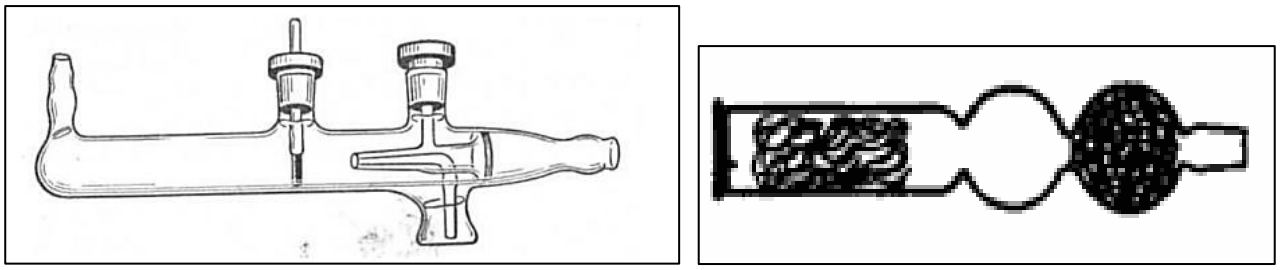
Затем при помощи аппарата через фильтр просасывают воздух. Поскольку всегда можно измерить объем воздуха, прошедшего через фильтры этих приборов, возможен и количественный учет микрофлоры на единицу объема воздуха. Мембранные фильтры должны быть хорошо просушены, так как мокрые и даже влажные фильтры практически воздухонепроницаемы.

Преимуществом метода мембранных фильтров является их портативность и возможность концентрировать на них микроорганизмы из относительно больших объемов воздуха.

Мембранные фильтры могут быть использованы при исследованиях атмосферного воздуха в зимних условиях.

Вирусологическое исследование воздуха

Для обнаружения вирусов в воздухе наиболее целесообразно использовать приборы, в которых улавливание вирусного аэрозоля осуществляется в жидкой улавливающей среде: бактериоуловитель Речменского (рис.8), прибор ПОВ-1.



a) **b)**

Рисунок 8 - a) бактериоуловитель Речменского, b) - прибор Киктенко В.С.

Прибор работает по принципу пульверизатора. Скорость отбора проб воздуха 10-20 л/мин. По окончании работы жидкость из приемника забирают стерильной пипеткой (2 мл) и затем высеивают на питательные среды с последующим культивированием и подсчетом выросших колоний.

Принцип работы прибора: улавливание микроорганизмов в этом бактериоуловителе осуществляется на мелких каплях распыляемой жидкости (улавливающей среды) с последующим инерционным осаждением этих капель на внутренней поверхности прибора. Позднее Киктенко В.С. в соавт. (рис. 8 b) предложили бактериоуловитель, улавливающий бактерии и вирусы при помощи тампона из хлопчатобумажной или тонкой стеклянной ваты, пропитанной смесью вазелинового масла и 3% раствора желатины.

Последующее определение патогенных микроорганизмов осуществляется путем посева улавливающей жидкости из бактериоуловителей Речменского и

Киктенко на элективные питательные среды, а также путем заражения восприимчивых животных, куриных эмбрионов и культуры тканей.

Объем исследуемого воздуха должен быть не менее 250 л. Изучается воздух закрытых помещений и в первую очередь стационаров, где находятся больные с ОРЗ, а также помещений вивария и лабораторий, где находятся больные или инфицированные животные. Значительные количества вирусного аэрозоля могут поступать в воздух при интранозальном заражении животных.

Для обнаружения *вируса гриппа* в воздухе в качестве улавливающей жидкости используют сахарный бульон или гидролизат лактальбумина (по 5 мл в приборе Речменского, по 7-10 мл в приборе ПОВ-1).

После отбора проб воздуха жидкостью из приборов заражают 10-дневные куриные эмбрионы по 0,2 мл в аллантоисную полость.

Для *определения аденовирусов* из воздуха применяют также гидролизат лактальбумина с добавлением 10%телячьей сыворотки и антибиотиков (пенициллина и стрептомицина). Улавливающей жидкостью заражают культуру клеток HeLa.

Помимо улавливания на жидких средах, для обнаружения вирусов в воздухе могут быть использованы мембранные фильтры №4 и фильтры типа АФА, изготовленные из ткани Петрянова. После окончания отбора проб воздуха (200 л на мембранные фильтры и 250-500 л на фильтры АФА) с их поверхности производят смыв жидкой средой с антибиотиками.

Находят применение также так называемые адгезивные смазки, которыми покрывают поверхность МПА в чашках Петри, например, для отбора проб при помощи прибора Кротова. Наиболее эффективна смесь равных частей насыщенного раствора сахароза и глицерина с добавлением 10% бычьей сыворотки в количестве 0,1%. Смыв с поверхности МПА осуществляют жидкой средой. Полученной суспензией заражают куриных эмбрионов или культуры ткани.

Заключение. При отборе проб воздуха следует исходить из основных положений; а) при высоком содержании микроорганизмов в воздухе исследуют небольшие объемы; б) при низком содержании микроорганизмов или необходимости обнаружения патогенных бактерий или вирусов целесообразно исследовать большие объемы воздуха; в) пробы воздуха следует отбирать на уровне дыхания сидящего или стоящего человека.

В таблице 7 представлены критерии оценки воздуха жилых помещений:

Критерии для оценки воздуха жилых помещений по числу микроорганизмов в 1 м^3 воздуха

Оценка воздуха	Летом в 1м^3		Зимой в 1м^3	
	Всего микроорганизмов	Гемолитический и зеленящий стрептококк	Всего микроорганизмов	Гемолитический и зеленящий стрептококк
Чистый	до 1500	16	4300	36
Грязный	до 2500	36	7000	124

Описание основных видов микроорганизмов, встречаемых в воздухе, представлено в разделе «Методы индикации микроорганизмов», подраздел 3.5 (стр. 95) настоящего пособия.

Лабораторная работа 3

Ход выполнения работы:

1. Провести посев микроорганизмов воздуха в столовой, туалетной комнате, коридоре факультета. Для этого чашки Петри с МПА поставьте в различных помещениях, откройте крышки и экспонируйте 5–15 мин, в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения, в одном из названных помещений.
2. После посева чашку закрыть, подписать, указав место посева, фамилию студента и номер группы, а чашку поместить в термостат для культивирования. Инкубируйте при температуре 37^0С в течение суток.
3. На следующем занятии достать чашки Петри из термостата и просмотреть на наличие различных групп микроорганизмов. Колонии исследовать визуально и при малом увеличении микроскопа, помещая чашки на предметный столик вверх дном.
4. Подсчитайте среднее количество колоний, выросшее на чашке и рассчитайте среднее микробное число по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 1 \cdot 5}{B \cdot 10 \cdot t},$$, где (4)

X – количество микробов в 1 м^3 воздуха;
A – количество колоний в чашке;
B – площадь чашки Петри (при диаметре 8 см – 50 см^2, 9 см – 63 см^2);
t – время экспозиции в опыте, мин;
5 – время экспозиции, мин;
10 – объем воздуха, из которого происходит оседание микробов за 5 мин, л;
100 – площадь, на которую происходит оседание, см^2;

4. Используя аппарат Кротова, пропускайте через неё воздух в течение 4 мин, затем стерильным пинцетом аккуратно перенесите фильтр на чашку Петри со стерильным МПА.
5. Инкубируйте чашку с фильтром в течение 24ч при 37^0С, затем подсчитайте количество колоний.
6. Полученные результаты запишите в виде таблицы «Определение бактериальной обсемененности воздуха»:

Номер пробы	Общее микробное число в воздухе	
	по методу оседания	по методу мембранных фильтров

7. Сравнить полученные разными студентами данные по общей микробной обсемененности помещений.
8. Результаты учета записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:
1. Микробиологические показатели, характеризующие чистоту воздуха?
2. Сущность метода мембранных фильтров?
3. Для каких целей используют метод Коха?
4. В чем заключается аспирационный метод, и с какой целью его используют?
5. Принцип работы бактериоуловителя.

1.4 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СМЫВОВ

Цель работы: изучить технику исследования методом смывов, с целью контроля санитарного состояния объектов окружающей среды
Материалы и оборудование: стерильные ватные тампоны, изотонический раствор хлорида натрия, марлевые салфетки, пинцет; питательные среды – МПА, среды Кесслера, Эндо, Плоскирева, Вильсон-Блера и ЖСА.

Методика сбора и изучения смывов широко используется во всем мире, поскольку дает очень точные и объективные результаты, а также помогает определить присутствие тех или иных патогенных микроорганизмов.

Собственно **смыв** представляет собой жидкость с теми бактериями, которые были взяты из среды их обитания, т.е. с поверхностей рук работников, оборудования, столов, спецодежды и т.п.

Изучение бактериологической загрязненности рук и различных предметов инвентаря производится ***в целях:***
а) оценки санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта;
б) установления путей распространения различных инфекционных заболеваний при эпидемиологических обследованиях;
в) лабораторного контроля эффективности обработки кожи рук (главным образом хирургов) и предметов окружающей обстановки (инвентаря, оборудования, посуды, одежды).
г) установление безопасности выпускаемой на предприятии продукции;
д) минимизация рисков отравлений, возникновения различных заболеваний, связанных с приемом или использованием загрязненной продукции и др.

В зависимости от цели проводимого исследования и характера контролируемых объектов в полученных смывах **определяют:**

- ***общую микробную обсемененность (ОМЧ),*** с пересчетом на 1 $см^2$ исследуемой поверхности (производится по показаниям);
- наличие ***бактерий группы кишечной палочки (БГКП),*** как показатель фекального загрязнения, свидетельствующих о наличии санитарного режима;

- наличие патогенных бактерий кишечной группы (род ***Proteus, Salmonella***), обнаружение которых является безусловным показателем эпидемического неблагополучия;
- наличие гемолитического ***стафилококка (St. aureus).***

Например:

а) исследование смывов на стафилококки проводят при обследовании кремово-кондитерских цехов, столовых и ресторанов, молочных кухонь и других пищеблоков, обращая особое внимание на контроль рук персонала;

б) общую микробную обсемененность можно определить для установления эффективной обработки посуды, а также при оценке моющих и дезинфицирующих средств.

Смывы производятся ***двумя способами:***

1. *Традиционный способ* - забор смывов производится с использованием специальных стерильных ватных тампонов, увлажненных специальной питательной средой и вмонтированных в пробирки. После взятия смывов тампоны погружают в питательную среду.

2. *Контактные слайды*, которые представляют собой специальную коробочку с готовым физиологическим раствором на которую наклеена пленка. Используя эту пленку, специалист прислоняет ее к поверхности и наклеивает обратно. Безусловно, данный *метод более современный* и эффективный, но, к сожалению, используется реже.

Техника взятия смывов. Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Стерильные ватные тампоны на стеклянных, металлических или деревянных палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками, заготавливают заранее в лаборатории.

В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливают (в условиях бокса над горелкой) по 5 мл стерильного 0,1% водного раствора пептона (2 мл стерильной водопроводной воды или изотонического раствора хлорида натрия) так, чтобы ватный тампон находится над уровнем жидкости.

В таком виде пробирка прибывает на место проведения смывов. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют средой. Специалист, используя тампон «протирает» место смыва и погружает тампон обратно в пробирку, после чего она направляется обратно в лабораторию для исследования.

Примеры проведения забора материала для анализа методом смывов:

• ***Смывы с крупного оборудования и инвентаря*** берутся до начала работы или в санитарные дни после санобработки. Исследуется поверхность в 100 $см^2$, для ограничения поверхностей используют шаблон (трафарет), сделанный из проволоки. Трафарет имеет площадь 25 $см^2$, чтобы взять смывы с площади в 100 $см^2$ его накладывают 4 раза в разных местах поверхности контролируемого объекта.

При исследовании ***мелких предметов*** смывы делают со всей их поверхности. При заборе смывов с тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном

протирают три одноименных объекта - три тарелки, три ложки и т. п. У столовых приборов протирают их рабочую часть. При исследовании стаканов протирают внутреннюю поверхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз.

• ***Смывы с рук*** протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, затем протирают межпальцевые пространства, также протираются ногти и участки под ногтями.

• ***Смывы с санитарной одежды*** берутся так: выбираются и протираются тампоном 4 участка площадью по 25 $см^2$ каждый: на правом и левом рукаве, а также с передней и верхней части рабочей одежды. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25 $см^2$.

• Дополнительно необходимо взять смывы с систем кондиционирования и вентилирования.

По окончании процедуры салфетки или тампоны помещают в пробирку, в которой они находились. Трафарет, изготовленный из проволоки, после смыва и перед употреблением прожигают над пламенем горелки.

Бактериологическое исследование смывов:

1. Методика посева на общую бактериальную обсемененность (ОМЧ)

Для определения ОМЧ в исследуемом смыве к 2 мл раствора, который был использован для увлажнения тампона, добавляют еще 8 мл раствора 0,1% пептонной воды или изотонического раствора хлорида натрия, чтобы общее количество раствора было 10 мл.

Тампон тщательно отмывают, получая исходное разведение. Из него готовят ряд последовательных десятикратных разведений. После чего из различных разведений, берут по 1,0 мл смывной жидкости, помещают в чашку Петри и заливают МПА.

Чашки помещают в термостат. Посевы выдерживают 24 ч при 37^0С и 24 ч при комнатной температуре. Предварительный подсчет выросших колоний производят через 48 часов, окончательный — через 72 часа.

После чего производят подсчет выросших колоний:

- устанавливают количество микробов в 1 мл исходного разведения смыва. Для этого подсчитывают число колоний на агаре в чашке и полученную величину умножают на степень разведения смыва;
- определяют количество микробов в 10 мл смыва, соответствующее общему числу микробов, находящихся на той площади, с которой производился смыв. Для этого количество колоний, выросших на чашке, умножают на 10 для определения ОМЧ (соответствующее количеству микробов в 1 мл смыва), содержащихся на поверхности исследуемого предмета.

2. Методика посева смывов на бактерии группы кишечных палочек

При плановых санитарно-гигиенических обследованиях для выявления БГКП производят посевы смывов на среды Кесслера с лактозой или Кода. Для этого делают высев 0,2 - 0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл данных

сред. Посевы на средах Кесслера или Кода инкубируют при 37°С, через 18-24 часа со среды Кесслера производят высев на плотную дифференциальную среду Эндо, со среды Кода высев производят в случае изменения окраски среды или ее помутнения.

Посевы помещают в термостат при температуре 37°С на 24 часа, после чего просматривают.

Выросшие колонии на среде Эндо подвергают дальнейшему изучению для установления их возможной принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Результат: из колоний, подозрительных или типичных для БГКП, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамотрицательных палочек указывает на наличие БГКП.

Для выявления БГКП можно пользоваться ***прямым посевом*** исследуемого материала на чашки со средой Эндо. Для этого материал, находящийся на тампоне, втирают в поверхность питательной среды.

Посевы на плотных питательных средах инкубируют в термостате при 37^0С, посевы на жидких средах обогащения – при 43^0С в течение 18-24 ч. На 2-й день из флаконов с признаками микробного роста производят высев на чашки со средой Эндо. Дальнейший ход исследования плотностью соответствует методике изучения штаммов кишечной палочки.

Для выявления **патогенных бактерий кишечной группы** содержащихся на тампоне материал тщательно втирают в поверхность плотных питательных сред Левина, Вильсона–Блер, Плоскирева. После произведенного посева тампон, снятый с палочки, и оставшуюся в пробирке жидкость – смыва засевают в среду обогащения (10% желчный бульон).

Через 24-48 ч инкубирования в термостате при 37^0С просматривают посевы, сделанные на плотные питательные среды, выявляя прозрачные и полупрозрачные бесцветные колонии, характерные для патогенных бактерий кишечной группы.

3. Исследование смывов на содержание золотистого стафилококка

Для выявления *золотистого стафилококка* посев смывов производят на чашки с желточно-солевым агаром (ЖСА), непосредственно втирая посевной материал тампоном, затем последний погружают в пробирку с 6,5% солевым бульоном.

Также проводят исследование для обнаружения стафилококков путем высева 0,2 - 0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл 6,5 % солевого бульона. Засеянные пробирки инкубируют при 37°С в течение (24 ± 2) ч, после чего делают высев на желточно-солевые среды на основе сред: элективно-солевой агар, стафилококкагар, манитолагар или агар Байд-Паркер.

Дальнейшие исследования выделенных культур стафилококков проводят по общепринятым методикам.

Оценка результатов: Колонии стафилококка на плотных питательных средах круглые, слегка выпуклые с ровными краями, влажной глянцевой поверхностью. По цвету колонии стафилококков, в зависимости от

продуцируемого пигмента, подразделяются на белые Staphylococcus albus, лимонно-желтые - St. citreus, золотистые - St.aureus.

Из колоний, с типичными для стафилококка признаками, делают мазок и окрашивают по Грамму. При наличии стафилококков видны характерные гроздевидные скопления коков, окрашенных грамположительно.

4. Исследования смывов на содержание патогенных бактерий

Для обнаружения **сальмонелл** делают высев 0,2-0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл одной из сред обогащения (магниевая, селенитовая или среда Раппапорта-Вассилиадиса). Засеянные пробирки инкубируют при 37°С в течение 18-20 ч, затем делают пересев на среду Эндо и висмут-сульфит агар, с последующим отбором подозрительных колоний и их идентификацией.

Для обнаружения **синегнойной палочки** *(лат. Pseudomonas aeruginosa)* делают высев на среду №8 (бульон для накопления стафилококков и синегнойной палочки) и среду № 9 (для определения синегнойной палочки по наличию пигмента пиоцианина). Колонии, подозрительные на синегнойную палочку (колонии с ровными или слегка волнистыми краями, гладкой блестящей поверхностью с характерным запахом и пигментом, однако, следует учесть, что запах и пигмент могут сильно варьировать или вообще отсутствовать), пересевают на скошенный агар.

P. aeruginosa - грамотрицательная, подвижная, оксидазоположительная палочка, окисляющая, но не ферментирующая глюкозу, дающая рост при 42 °С.

Бактериологический контроль эффективности обработки рук персонала

Смывы с рук персонала производят стерильными марлевыми салфетками размером 5´5 см, смоченной в нейтрализаторе. Марлевой салфеткой тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук. После отбора проб марлевую салфетку помещают в широкогорлые пробирки или колбы с физиологическим раствором и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 мин. Жидкость засевают глубинным способом на 2 чашки Петри с мясопептонным агаром (по 0,5 мл) и в 2 пробирки с 0,5 %-м сахарным бульоном (по 1 мл). Посевы инкубируют при температуре 37°С в течение 48 ч.

Дальнейшие исследования проводят на наличие патогенных кишечных бактерий, как указано в пункте 4.

Учет результатов: отсутствие роста патогенных и условно-патогенных бактерий.

Вывод:

Обнаружение санитарно-показательных и условно-патогенных бактерий в смывах с поверхностей чистых, подготовленных к работе предметов, инвентаря и оборудования, а также рук персонала свидетельствует о нарушении санитарного режима и дает основание для проведения административных мер.

Лабораторная работа 4

Ход выполнения работы:

1. Провести оценку санитарно-гигиенического состояния кожи рук. Для этого подготовьте ватные тампоны и пробирки с 2-5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Расплавленный МПА, среду Эндо и чашки Петри.
2. Протрите тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, затем протрите межпальцевые пространства, также ногти и участки под ногтями.
3. Для определения ОМЧ в исследуемом смыве к 2 мл раствора, который был использован для увлажнения тампона, добавьте еще 8 мл раствора изотонического раствора хлорида натрия, чтобы общее количество раствора было 10 мл.
4. Тампон тщательно отмывают, получая исходное разведение. Из него готовят ряд последовательных десятикратных разведений. После чего из различных разведений, берут по 1,0 мл смывной жидкости, помещают в чашку Петри и заливают МПА.
5. Чашки помещают в термостат. Посевы выдерживают 24 ч при 37^0С и 24 ч при комнатной температуре. Потом проводят подсчет колоний. Количество микробов в 1 мл исходного разведения смыва определяют путем подсчета числа колоний на агаре в чашке и полученную величину умножают на степень разведения смыва.
6. Для выявления БГКП используйте метод *прямого посева* исследуемого материала на чашки со средой Эндо. Для этого материал, находящийся на тампоне, втирают в поверхность питательной среды.
7. Из колоний, подозрительных или типичных для БГКП, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамотри-цательных палочек указывает на наличие БГКП.
8. После посева чашки закрыть, подписать, указав место смыва, фамилию студента и номер группы, а чашку поместить в термостат для культивирования. Инкубируйте при температуре 37^0С в течение суток.
9. На следующем занятии достать чашки Петри из термостата и просмотреть на наличие различных групп микроорганизмов. Колонии исследовать визуально и при малом увеличении микроскопа, помещая чашки на предметный столик вверх дном.
10. Результаты учета записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Что такое смывы? Техника взятия смывов с крупного оборудования.
2. Методика исследования смывов на содержание БГКП.
3. Ход исследования смывов на наличие стафилококков.
4. Какие санитарно-показательные микроорганизмы учитываются при взятии и исследовании смывов?
5. Как необходимо проводить взятие смывов с рук работников, персонала?
6. О чем свидетельствует обнаружение санитарно-показательных и условно-патогенных бактерий в смывах?

1.5 ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ И ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ по теме «Санитарная микробиология объектов окружающей среды»

1.Санитарно-показательными микроорганизмами воздуха являются:
а. патогенные клостридии
б. кишечная палочка
в. стафилококки
г. гемолитические стрептококки
д. герпесвирусы

2. Забор проб воды для исследования производят с помощью:
а. Аппарата Кротова
б. Батометра
в.Фильтра Зейтца
г. Колбы Бунзена

3. Колиформные бактерии имеют следующие признаки и свойства:
а. палочковидную форму
б. шаровидную форму
в. грамотрицательные
г. грамположительные
д. разлагают лактозу до кислоты и газа
е. разлагают лактозу до кислоты

4. Общее микробное число почвы это количество микороорганизмов в :
а. 1 гектаре почвы
б. 1 литре почвенной «болтушки»
в. 1 кг почвы
г. 1 г почвы

5. Санитарно-показательными микроорганизмами воды являются:
а. лептоспиры
б. колиформные бактерии
в .стафилококки
г. вирусы гепатита А

6. О свежем фекальном загрязнении воды свидетельствует обнаружение в ней:
а. термотолерантных кишечных палочек (ТКП)
б. общих колиформных бактерий (ОКБ)
в. сальмонелл
г. шигелл
д. вируса гепатита Е

7. Для определения количества БГКП используют метод:
а. бумажных дисков
б. серийных разведений
в. мембранных фильтров
г. седиментационный

8. Для выявления колиформных бактерий используют питательные среды:
а. Китта-Тароцци
б. МПА

в. Эндо
г. кровяной агар
д. среда Вильсон-Блера

9. Общее количества микроорганизмов в воздухе определяется методом:
а. серийных разведений
б аспирационным
в. мембранных фильтров
г. седиментационным
д. бродильных проб

10. Пробы воды после их взятия исследуют через:
а.24 часа.
б. сразу после забора
в. 48 часов
г. не позднее 2-6 часов после забора
д. 72 часа

11. Назовите аппарат, с помощью которого проводят забор проб воздуха для исследования:
а. анаэростат
б. аппарат Кротова
в. автоклав
г. батометр
д. колба Бунзена

12. Допустимое количество термотолерантных колиформных бактерий в 100 мл питьевой воды:
а. 500
б. 100
в. полное отсутствие
г. 10

13. Общее микробное число для питьевой воды (в 1 мл) составляет:
а. 500
б. 200
в. 100
г. 50
д. 25

Тема 2 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Большое значение в повышении качества продуктов имеет санитарно-бактериологический контроль за процессом производства, качеством готовых пищевых продуктов, выпускаемых предприятиями, и в процессе хранения.

Санитарно-микробиологическое исследование является объективным и ценным методом, как при санитарном и техническом контроле пищевых предприятий, так и при контроле качества продуктов.

Основные ***цели*** санитарно-микробиологического контроля:

– предупредить заражение пищевых продуктов и сырья патогенной микрофлорой;

– исключить накопление нежелательной микрофлоры в продукте;

– предупредить возникновение заболеваний, причиной которых могут стать пищевые продукты.

Качество готовых пищевых продуктов, в том числе и их безопасность, зависит, прежде всего, от качества сырья. Наблюдение за здоровьем животных (продуцентов молока и мяса), поддержание высокого уровня санитарного режима получения скоропортящегося сырья, внедрение системы НАССР - обязательные условия для повышения качества продуктов.

2.1 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И НОРМАТИВЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Цель: ознакомить обучающихся с основными критериями обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов

Материалы и оборудование: технический регламент Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции»; ГОСТы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов для осуществления оценки (подтверждения) соответствия продукции.

Качество пищевых продуктов – совокупность свойств и характеристик продукции, удовлетворяющих потребителя и обеспечивающих безопасность его здоровья и жизнедеятельности. Качество чистой продукции определяется ее пищевой, биологической и энергетической ценностью.

Безопасность продуктов питания – аспект качества продукции, характеризующий совокупность ее признаков, обусловленных возможным присутствием в сырье чужеродных химических веществ и микроорганизмов, или их накоплением в процессе производства и хранения продукции, и представляющих опасность для жизни и здоровья нынешнего и будущих поколений людей при обычных условиях их использования.

Микробиологический анализ играет важную роль в оценке качества и безопасности пищевых продуктов и преследует ***три основные цели:***

1. Контроль качества сырья, пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их изготовления.
2. Контроль режимов хранения пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их транспортировки и реализации.
3. Контроль над обеспечением микробиологической безопасности пищевых продуктов.

Кроме удовлетворения физиологических потребностей человека в необходимых веществах и энергии, пищевые продукты должны соответствовать установленным нормативными документами (НД) требованиям микробиологического качества и безопасности.

Среди ***нормативных документов*** можно выделить:

– законы, соглашения, действующие на международном уровне, в отдельных странах, в странах СНГ, едином Таможенном союзе, например, Закон Республики Казахстан от 04 декабря 2008г. №361-II «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, утвержденные решением Комиссии Таможенного союза 28.05.2010;

– международные стандарты (ИСО 9000, ИСО 22000 и др.) и стандарты, устанавливающие основные требования к системе управления качеством и безопасностью пищевых продуктов на основе НАССР;

– отдельные стандарты по методам отбора и подготовки проб к анализам, методам контроля показателей качества и безопасности продукции;

– СанПиНы, устанавливающие санитарно-гигиенические нормативы показателей качества и безопасности по группам пищевых продуктов, ветеринарные и фитосанитарные правила и нормы;

– ТУ, регламенты на отдельные виды продукции; инструкции, МУ и другие вспомогательные НТД.

Безопасность пищевых продуктов оценивается по гигиеническим нормативам, которые включают биологические объекты, потенциально опасные химические соединения, радионуклиды и вредные примеси. Присутствие их в пищевых продуктах не должно превышать допустимых уровней (ПДУ) содержания в заданной массе (объеме) исследуемой продукции.

Гигиеническое нормирование микробиологических показателей

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям (табл. 8) включают контроль по 4 группам микроорганизмов:

– санитарно-показательными, к которым относятся КМАФАнМ и БГПК;

– условно-патогенными микроорганизмами, к которым относятся E.coli, S.aureus, бактерии рода Proteus, B. cereus и сульфитредуцирующие клостридии;

– патогенными микроорганизмами, в т. ч. сальмонеллами, листериями;

– микроорганизмами порчи - в основном это дрожжи и плесневые грибы.

Регламентирование по показателям микробиологического качества и безопасности пищи осуществляется по принципу - *нормируется масса продукта*, в которой не допускаются присутствие БГПК, условно-патогенные микроорганизмы, а также патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы.

В других случаях норматив *отражает количество колониеобразующих единиц в 1 г (мг)* продукта (КОЕ/г, мл).

Указанные показатели безопасности установлены для 11 групп продуктов (мясомолочные, рыбные, кондитерские, плодоовощные, продукты детского питания и др.). Эпидемиологическая и санитарно-микробиологическая безопасность пищевых продуктов определяются, прежде всего, по микробиологическим показателям.

Таблица 8 - Микробиологические показатели, регламентируемые в нормативных документах и дополнительно выявляемых в пищевых продуктах

Микробиологические показатели	В соответствии с техническим регламентом	Дополнительные показатели
Косвенные микробиологические показатели		
Микроорганизмы порчи	КМАФАнМ; Плесневые грибы; Дрожжи; Молочнокислые бактерии	Количество психрофильных микроорганизмов; Количество термофилов.
Санитарно-показательные микроорганизмы	БГКП (колиформные бактерии); *E. coli* (кишечная палочка); *Proteus vulgaris* (протей); Сульфитредуцирующие клостридии (*Cl. perfringens*)	Энтерококки (*S. faecalis, S. faecium*)
Прямые микробиологические показатели		
Условно-патогенные микроорганизмы	Bacillus cereus *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка)	
Патогенные микроорганизмы	*Cl. botulinum,* *S.aureus* (золотистый стафилококк), бактерии рода Salmonella, листерии *(L.monocytogenes)*	Энтеропатогенная *E. coli*, Клебсиеллы, Иерсинии, шигеллы, Патогенные вибрионы, Кампилобактер Аэромонады

В продуктах массового потребления, для которых в таблицах отсутствуют микробиологические нормативы, патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы, листерии - не допускаются в 25 г продукта.

Во всех видах доброкачественной рыбной продукции Vibrio parahaemolyticus не допускается в количестве более 10 КОЕ/г.

Контроль производится при эпидемическом неблагополучии в регионе. В салатах и смесях из сырых овощей, готовых к употреблению, бактерии рода Yersinia не допускаются в 25 г продукта; контроль проводится при эпидемиологическом неблагополучии в регионе.

При получении неудовлетворительных результатов анализа хотя бы по одному из микробиологических показателей по нему проводят повторный анализ удвоенного объема выборки, взятого из той же партии. Результаты повторного анализа распространяются на всю партию.

Для оценки доброкачественности продукции часто используют самый распространённый микробиологический тест – это определение КМАФАнМ (табл. 9).

Таблица 9 – Оценка качества пищевых продуктов по показателю КМАФАнМ

Группа	КМАФАнМ, КОЕ/г ($см^3$)	Качество продукта
I	$10^3 – 10^4$	Высококачественный продукт по зарубежным стандартам
II	$1 \cdot 10^4 – 1 \cdot 10^6$	Доброкачественный, стойкий при хранении, соответствует высшему качеству в странах СНГ
III	$1 \cdot 10^5 – 1 \cdot 10^6$	Безопасный, но пониженной сортности в зависимости от содержания микроорганизмов. Нарушен санитарно-гигиенический режим производства
IV	$1 \cdot 10^6 – 1 \cdot 10^7$	Потенциально опасный продукт, как источник патогенных микро-организмов и их токсинов
V	$10^7 – 10^8$	Продукт испорчен и наблюдается органолептические изменения

Контрольные вопросы:

1. Укажите основные цели санитарно-микробиологического контроля?
2. Какие нормативные документы регламентируют оценку качества продуктов?
3. Назовите группы микроорганизмов определяемые при микробиологическом анализе пищевых продуктов?

2.2 СТАДИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Цель: ознакомить обучающихся с ходом проведения микробиологического анализа продуктов.

Микробиологический анализ пищевых продуктов включает **стадии**:

1. Отбор и подготовка проб;
2. Проведение микробиологических испытаний и оценка качества измерений;
3. Заключение о микробиологической безопасности и качестве продукции.

1 Отбор проб продукции для проведения микробиологических испытаний

Отбор проб пищевых продуктов осуществляют в соответствии с нормативными документами на отдельные товары.

Нормы отбора проб зависят от объема партии, цели испытаний и регламентируются на каждый вид продукции.

Отбор проб продукции для микробиологических испытаний состоит из следующих этапов: отбора выборок, отбора точечных проб, составления объединенной пробы, выделения средней пробы.

Для сыпучих пищевых продуктов усредненная проба отбирается в пяти местах на разной глубине, общей массой 1 кг.

Для колбасных изделий отбирают не менее трех точечных проб (по краям, в центре), массой 250 г каждая, и составляют среднюю пробу.

Для молока и молочных продуктов отбор проб для микробиологических анализов проводят по ГОСТ 26809–86.

Перед отбором проб жидкий образец перемешивают, после чего отбирают точечные пробы и составляют объединенную пробу объемом 1 $дм^3$.

Объединенные пробы для бактериологических испытаний помещают в стерильную посуду, маркируют. На этикетке указывают: наименование продукта; номер пробы и партии продукта; дату и время отбора проб.

Пробы пломбируют и отправляют в лабораторию для анализа. К ним прикладывают акт отбора проб с указанием реквизитов предприятия-изготовителя, характеристики продукции и цели испытания.

При характеристике продукции отмечаются: вид, сорт продукции, размер партии; дата выработки, номер смены, время выработки, срок годности; НТД, по которой выработан продукт; номер документа сдачи-приемки партии.

При характеристике отбираемых проб приводятся: ГОСТ, в соответствии с которым отобраны пробы; место, дата и время отбора проб; номер пробы; цель испытания (анализ общей бактериальной загрязненности, определение содержания санитарно-показательных микроорганизмов и т. д.). В акте отбора проб приводятся также Ф.И.О., должность лиц, принимавших участие в осмотре и отборе проб, и их роспись.

Общие правила для микробиологических испытаний всех пищевых продуктов включают:

1) отбор образцов для микробиологического анализа ответственным лицом в присутствии представителей предприятия;
2) соблюдение условий стерильности при отборе проб;
3) процедуру усреднения образцов путем составления объединенной пробы;
4) охлаждение проб до температуры не выше 10^0С;
5) проведение микробиологических измерений не позже 4 ч после отбора проб.

Подготовка проб для микробиологического анализа

Процедура подготовки проб сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов для микробиологического анализа различается в зависимости от

консистенции продукта и наличия защитной оболочки, а также от цели микробиологических испытаний.

Перед проведением испытаний отобранные *жидкие пробы* перемешивают путем перевертывания посуды с пробами не менее трех раз.

Пробы, имеющие густую консистенцию, нагревают на водяной бане до температуры 30^0С.

Твердые и сухие пробы гомогенизируют или растирают в ступке до получения однородной консистенции.

Продукты в оболочке исследуют в глубине продукта. Продукты без оболочки исследуют с поверхности и в глубине продукта.

Для анализа бактериальной загрязненности *поверхности продуктов* делают смыв с площади 100 $см^2$. Стерильным ватным тампоном, слегка смоченным физиологическим раствором, обтирают анализируемую поверхность через приложенный трафарет площадью 10-100 $см^2$. Смыв делается штриховыми движениями в одну сторону, а затем – в перпендикулярном направлении. Тампон помещают в стерильные пробирки, содержащие 5 $см^3$ физиологического раствора или питательной среды. Для каждого образца используют новый тампон.

Для анализа *глубинных участков продукта* образцы помещают в металлическую посуду, смачивают спиртом и обжигают. Затем делают продольный разрез на 3/4 глубины продукта и отбирают точечные навески с общей массой 50 г в трех местах (по концам и в середине продукта). Из объединенной пробы каждого образца берут навеску массой 25±0,1 г, затем помещают в стерильную фарфоровую ступку. Добавляют немного стерильного кварцевого песка и 10 $см^3$ физиологического раствора, растирают образец вручную до кашицеобразного состояния и вносят еще 65 $см^3$ раствора. При использовании автоматического гомогенизатора навеску продукта вносят в 75 $см^3$ стерильного физиологического раствора, и гомогенизируют в течение 2,5 мин при 1000 об/мин и выше. Полученную суспензию или растертый гомогенат анализируют далее при микробиологических испытаниях.

2 Проведение микробиологических испытаний и оценка качества измерений

Для определения численности микроорганизмов используют методы:
- качественные (бактериоскопия свежести продукции),
- полуколичественные (редуктазная проба, бродильная проба и др.),
- количественные арбитражные методы анализа, основанные на методах посева и культивирования микроорганизмов.

При количественном методе отбирают 1 $см^3$ (или 1 г) продукта, *готовят десятикратные разведения* в зависимости от предполагаемой степени загрязненности пищевых продуктов микроорганизмами.

Приготовленные разведения *высевают на питательные среды в чашки Петри*. После культивирования образцов в термостате при оптимальных условиях развития микроорганизмов в течение 1–10 сут *подсчитывают число*

выросших колоний и определяют содержание микроорганизмов в пищевом продукте.

Измерения проводят с учетом 2–3-кратной повторности опытов. Результаты анализа обрабатывают статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel. Качество выполненных работ считается удовлетворительным, если относительная погрешность измерений не ≥ ±20%.

После завершения микробиологического анализа при работе с микроорганизмами III–IV класса опасности *обеззараживание* использованных сред и посуды проводят в соответствии с санитарными правилами. Чашки с посевами микроорганизмов освобождают от содержимого, тщательно моют в 0,125%-ном горячем растворе карбоната натрия. Выдерживают в растворе 0,1 н HCl или других дезинфектантах, промывают дистиллированной водой. Обеззараживание производят в автоклаве или в сушильном шкафу.

3 Заключение о микробиологической безопасности и качестве пищевых продуктов

По результатам проведенного микробиологического анализа делается заключение о пригодности пищевого продукта к употреблению человеком либо его условной годности и необходимости дополнительной обработки.

В случае *непригодности продукции* к употреблению человеком или животными она может быть направлена на техническую утилизацию или на уничтожение при обнаружении опасных возбудителей заболеваний.

Основным гигиеническим критерием качества и безопасности пищевых продуктов является соответствие качественного состава и количественного содержания контролируемых групп микроорганизмов нормируемым микробиологическим показателям, представленным в нормативно-технической документации. Продукция *признается безопасной*, если в ней отсутствуют патогенные и условно-патогенные микроорганизмы или их содержание не превышает допустимых норм.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите стадии микробиологического анализа пищевых продуктов?
2. Правила отбора и подготовки проб к исследованию.
3. В каком случае заключение о качестве исследуемого продукта будет положительным, продукт признан безопасным?

2.3 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

***Цель*:** изучить бактериологические методы исследования молока и молочных продуктов

Материалы и оборудование: пробы молока, творога, масла; лабораторная посуда; питательные среды – сренда Кесслера, Эндо, Гисса, мясо-пептонный агар; краски по Граму – генцианвиолет, фуксин; раствор Люголя.

Санитарно-бактериологический анализ молока и молочных продуктов предусматривает определение КМАФАиМ, БГКП патогенные в т.ч. сальмонеллы, дрожжи, плесени, Staphylococcus aureus.

Молоко, сливки, кефир, простоквашу и другие жидкие продукты после тщательного перемешивания стерильным черпаком, щупом или шпателем отбирают в количестве 50 мл. Пробы творога и сливочного масла по 20 г. забирают щупом из глубины в 2-3 различных точках после тщательного зачищения верхнего слоя. При взятии проб сыра поверхность его протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, а затем прожигают ее. Стерильный щуп вводят наклонно в середину сыра на ¾ его глубины и отбирают 10 г.

Подготовка молочных продуктов для бактериологического исследования. Из образца продуктов жидкой и полужидкой консистенции готовят ряд последовательных десятикратных разведений в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Образцы творога, полученные из различных участков продукта перемешивают стерильным шпателем. Из каждого подготовленного таким образом продукта в стерильную посуду берут навески по 10 г, добавляют к ним 90 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, подогретого до 40-45^{0}С, затем тщательно в течение 3-5 мин взбалтывают до получения однородной эмульсии. Образцы масла помещают в стерильную посуду и растапливают в водяной бане при температуре 40-45^{0}С и до образования однородной массы.

Приготовленное основное разведение (1:10) используют для получения всех дальнейших разведений.

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАМ)

КМАФАМ определяют в 1 мл/г исследуемого молока или молочного продукта. Выбранное для посева разведения продукта вносят по 1 мл. (каждого разведения) в одну чашку Петри и заливают 8-12 мл расплавленного и остуженного до температуры 45^{0}С мясо-пептонного агара. Посевы помещают в термостат при 37^{0}С на 24 часа. Подсчет колоний в 1 мл/г исследуемого продукта производят в соответствии с общепринятой методикой.

У молочнокислых продуктов (кефир, простокваша и др.) КМАФАМ не определяют, т.к. они содержат производственную молочнокислую микрофлору: Str.bactis, Str.cremoris, Zactobact. vulgaricum в виде диплококков, цепочек и палочек.

Определение БГКП в молоке и молочных продуктов

Обсемененность молока и молочных продуктов бактериями группы кишечной палочки определяется бродильным методом.

Первый день. Из разведений исследуемых образцов продуктов берут по 1 мл. и засевают в пробирку со средой Кесслера. Засеянные пробирки помещают на 18-24 ч в термостат при 43^0С.

Второй день. Учитывают результаты первой бродильной пробы. Из пробирок с наличием газа на среду Эндо. Посевы инкубируют при 37^0С в течение 20-24 ч.

Третий день. Просматривают результаты микробного роста на среде Эндо. Отбирают колонии, характерные для БГКП, готовят из них мазки, окрашивают по Грамму и микроскопируют. При наличии в мазке грамотрицательных палочек производят высев в среду Гисса с глюкозой (2-я бродильная проба).

Четвертый день. Просматривают посевы. На среде Гиса с лактозой отмечают рост бродильной пробы и устанавливают коли-титр исследуемого продукта.

Для молока, сливок, кефира, кумыса коли-титр вычисляется в соответствии с данными, приведенными в таблице 10.

Таблица 10 – Коли-титр молочных продуктов

Вариант	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах, мл						Коли-титр
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
а	-	-	-	-	-	-	>3
б	+	-	-	-	-	-	3
в	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- + +	<0,3

а) Если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаруживаются кишечные палочки, коли-титр считывается «более 3 мл»

б) Если в одном из трех засеянных объемов по 1 мл продукта обнаруживается кислота и газ, коли-титр считывается равным «3мл».

в) Если кишечная палочка обнаруживается в посевах 5 объемов или во всех 6 объемах продукта, коли-титр считывается «менее 0,3 мл».

Во всех остальных случаях коли-титр принимается за «0,3 мл» Для творога, сыра и др. продуктов коли-титр устанавливают, руководствуясь данными таблицы 11.

Таблица 11 – Коли-титр для молочных продуктов по нормативам

Вариант	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах, мл					Коли-титр, мл
	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	
а	-	-	-	-	-	>1,1
б	+	+	+	+	+	<0,0001
в	+	-	-	-	-	1,1
г	+	+	-	-	-	0,1
д	+	+	+	-	-	0,01

а) Если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаружено кислоты и газа, коли-титр считается больше суммы засеянных объемов.
б) Если кислота и газ обнаружены во всех засеянных объемах продукта, коли-титр считается менее засеянного объема или масса продукта.
в) Если кислота и газ обнаруживаются только в одном из засеянных объемов, коли-титр равен общему засеянному объему (массе) продукта.
г) Если кислота и газ обнаруживаются в первых двух засеянных объемах, коли-титр считается «равен 0,1 мл».
д) Если кислота и газ обнаруживаются в нескольких засеянных объемах, за коли-титр принимают количество продукта в наибольшем разведении, давшем рост кишечной палочки. Если кишечная палочка обнаруживается в меньшем засеянном объеме и не обнаруживается в большем исследовании необходимо повторить.

Контрольные вопросы:
1 Каким методом определяют БГКП в молоке и молочных продуктах?
2 Как определяют КМАФАМ в молоке и молочных продуктах?
3 Как необходимо проводить отбор проб молока и молочных продуктов для бактериологического анализа?

2.4 САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСНЫХ И КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Цель: Освоить методы бактериологического исследования колбасных изделий и продуктов из мяса
Материалы и оборудование: пробы вареной, полукопченой, копченой колбасы, лабораторная посуда – фарфоровые ступки, стаканы, пипетки, пробирки, питательные среды – мясо-пептонный агар, среда Кесслера, Мюллера, Эндо, Вильсон-Блера.

Микробиологические исследования колбасных изделий (фаршированные, кровяные колбасы, мясные хлебы, сосиски, сардельки, паштеты, зельцы,

студни), продукты из мяса (из свинины, говядины, баранины, из мяса других видов убойного скота и птицы) определяют по следующим показателям:

-определения общего количества микробов;

-определение бактерий группы кишечной палочки;

-определения бактерий из рода сальмонелл;

-определения коагулазоположительных стафилококков;

-определения сульфитредуцирующих клостридий.

Подготовка проб. В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г. Составляют из точечных проб следующим образом:

Колбасные изделия в оболочке и продукты из свинины, баранины и говядины помещают в металлический или эмалированный тазик (тарелку), тщательно протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и дважды обжигают над пламенем.

Затем батоны разрезают продольно стерильным (фламбированным) ножом или скальпелем на две половинки, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части и из-под оболочки обеих половинок батона.

Из свиных, бараньих, говяжьих продуктов на костях и из бекона пробы вырезают стерильным инструментов из различных участков обожженного образца на глубине 2-3 см от поверхности, предпочтительно ближе к кости;

Изделия без оболочки (мясные хлебы, паштеты, студни и другие изделия) исследуют с поверхности и в глубине продукта.

Для анализа поверхности изделий без оболочки, после развертывания упаковки, с поверхности исследуемых образцов делают смыв (с каждого образца новым стерильным увлажненным ватным тампоном) с тех участков, с которыми могли соприкасаться руки упаковщика.

Тампоны помещают в пробирки, заполненные на ¾ их высоты средой среды Кесслера.

Для анализа глубинных участков продукта образцы помещают в металлический или эмалированный тазик (тарелку), смачивают спиртом и обжигают. Затем делают продольный разрез и отбирают навеску методом, указанным для колбасных изделий и продуктов в оболочке, составляя из них одну объединенную пробу для каждого образца в отдельности, которую помещают в предварительно взвешенную стерильную бюксу или чашку Петри.

Из объединенной пробы каждого образца берут в стерильную посуду (пергамент) навеску массой 20 г с погрешностью, не превышающей 0,1 г.

Навеску помещают в стерильную колбу (стакан) гомогенизатора для приготовления испытуемой взвеси. Для этого в колбу добавляют раствор 1 мл пептонной воды или стерильного физиологического раствора в четырехкратном количестве и гомогенизируют в электрическом смесителе; вначале измельчают материал на кусочки замедленной скоростью вращения ножей, затем при 15000-20000 об /мин в течение 2,5 мин.

Допускается при отсутствии гомогенизатора приготовление испытуемой взвеси в ступке путем растирания 20 г продукта в стерильной фарфоровой

ступке с 2-3 г стерильного песка, постепенно приливая 80 $см^3$ раствора 1 мл пептонной воды или стерильного физиологического раствора. При растирании проб вареных изделий мажущей консистенции (ливерные, кровяные колбасы) стерильный песок можно не добавлять.

Для посевов на питательные среды стерильной градуированной пипеткой отбирают взвесь после 15 мин выдержки при комнатной температуре.

1 мл приотовленной испытуемой взвеси содержит 0,2 г продукта.

Определение общего количества микробов в 1 г продукта

Метод не распространяется на сырокопченые колбасы. Сущность метода заключается в способности мезофильных аэробов и факультативных анаэробов расти на питательном агаре при температуре $(30+0,5)^0$ С с образованием колоний, видимых при увеличении 5*. Питательный агар, расплавляют на водяной бане и охлаждают до температуры 45^0С. Стерильные чашки Петри раскладывают на столе, подписывают наименование анализируемого продукта, дату посева и количество посеянного продукта.

Из каждой пробы должно быть сделано не менее двух посевов, различных по объему, взятых с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. При этом на одну чашку Петри проводят посев 0,1 г, а на другую-0,01 г продукта.

Для посева 0,1 продукта готовят первое десятикратное разведение испытуемой взвеси: стерильной пипеткой с широким концом отбирают 5 мл испытуемой взвеси, переносят ее в пробирку с 5 мл стерильного физиологического раствора или пептонной воды. Конец пипетки должен быть опущен ниже поверхности раствора, не прикасаясь к стенкам пробирки, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. 1 мл полученного раствора содержит 0,1 г испытуемого продукта.

Другой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки продуванием, отбирают 1 $см^3$ и переносят в стерильную чашку Петри, слегка приоткрывая крышку.

Для посева 0,01 г продукта готовят следующее разведение: другой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. 1 мл испытуемого раствора разведения содержит 0,01 г испытуемого продукта. 1 мл этого раствора переносят в стерильную чашку Петри, как описано выше. При необходимости таким же образом готовят последующие разведения.

После внесения разведения анализируемой взвеси в чашки Петри чашку заливают 12-15 мл расплавленного и охлажденного питательного агара при фламбировании краев пробирки или бутылки, где он содержится. Быстро смешивают с мясо - пептонным питательным агаром, осторожно наклоняя или вращая чашку по поверхности стола. Необходимо избегать образования пузырьков воздуха, незалитых участков дна чашки Петри, попадания среды на края и крышку чашки.

Для того, чтобы помешать развитию на поверхности агара спорообразующих микробов и бактерий группы протея в Н-форме, допускается наслоение расплавленного и охлажденного до температуры 45-50^{0}С голодного агара толщиной 3-4 мм.

После застывания агара чашки Петри перевертывают и помещают в термостат с температурой 30^{0}С на 72 ч. Через 72 ч подсчитывают общее количество колоний бактерий, выросших на чашках.

Колонии, выросшие как на поверхности, так и в глубине агара, подсчитывают при помощи лупы с пятикратным увеличением или специальным прибором с лупой. Для этого чашку кладут вверх дном на черный фон и каждую колонию отмечают со стороны дна тушью или чернилами для стекла.

Для определения общего количества микробов в 1 г продукта подсчитанное количество колоний умножают на степень разведения анализируемого продукта.

За окончательный результат определения количества бактерий в 1 г анализируемого продукта принимают среднее арифметическое результатов подсчета двух чашек разной массы продукта.

Определение бактерий группы кишечной палочки в 1 г продукта

Сущность метода заключается на способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу. При этом в среде Кода образуются кислые продукты, меняющие цвет индикатора, а в среде Кесслера в поплавке образуется газ, вследствие расщепления лактозы.

Цель определения этой группы бактерий - проверка соблюдения режима варки колбас или санитарно-гигиенических условий в процессе производства сырокопченых колбасных изделий.

При микробиологическом контроле колбасных изделий в производственных лабораториях можно ограничиваться обнаружением бактерий из группы кишечной палочки без их биохимической дифференциации.

В пробирки со средой Кода, вносят по 5 мл испытуемой взвеси стерильной пипеткой вместимостью 5-10 мл с широким концом.

Допускается применение среды Кесслера по 10 мл. Пробирки со средой Кесслера, или Кода помещают в термостат с температурой 37^0 С на 18-20 ч.

Посевы смывов, отобранных тампонами с поверхности изделий без оболочки, выдерживают при температуре 43^{0}С (для обнаружения повторного бактериального загрязнения).

При росте бактерий группы кишечной палочки на среде Кода - окрашиваются в желтый цвет, на среде Кесслера в поплавке образуется глаз.

Для окончательного заключения о присутствии в продукте бактерий группы кишечной палочки проводят высев со среды Кесслера (забродившие пробирки) на среду Эндо или Плоскирева, или Левина. Чашки Петри помещают в термостат при температуре 37^{0}С. Через 18-20 ч посевы просматривают. На

среде Эндо бактерии группы кишечной палочки образуют темно-красные колонии с металлическим блеском или розово-красные без блеска, на среде Плоскирева - кирпично-красные с глянцевой поверхностью, на среде Левина - темно-фиолетовые колонии или фиолетово-черные блестящие. Из подозреваемых колоний готовят мазки, которые окрашивают по Граму.

При заведомо высокой обсемененности анализируемый продукт массой не более 0,25 г помещают в пустую пробирку, в которую закладывают комочек стерильной фильтровальной бумаги размером 5*5 см, и стерильной стеклянной палочкой или фламбированной проволокой проталкивают материал до дна (не уплотняя), в пробирку наливают среду Кода, заполняя ее на ¾ высоты пробирки. Пробирки помещают в термостат с температурой 37^0С на 8-10 ч. При росте бактерий группы кишечной палочки на среде Кода среда изменяет свой цвет из фиолетово-пурпурного в желтый.

Обнаружение грамотрицательных не образующих спор палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, указывает на наличие бактерий группы кишечной палочки.

Определение бактерий из рода сальмонелл в 25 г продукта

Сущность метода заключается в определении характерного роста сальмонелл на элективных средах и установлении биохимических и серологических свойств.

Навеску продукта массой 25 г от объединенной пробы вносят во флакон Сокслета, содержащий 100 мл среды обогащения (Мюллера, Кауфмана). Жидкость во флаконе должна подняться до метки 125 $см^3$. Флаконы тщательно встряхивают и помещают в термостат с температурой 37^0С. Через 16-24 ч после тщательного перемешивания с помощью бактериологической петли или пастеровской пипетки проводят посев из среды обогащения в чашки Петри с предварительно подсушенной средой Эндо, БФА, Плоскирева, Левина или висмут – сульфит - агар (по выбору).

Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37^0С; посевы просматривают через 16-48 ч, на висмут - сульфит-агаре-через 24-48 ч.

На среде Эндо бактерии из рода сальмонелл образуют бесцветные или с розовым оттенком колонии.

На среде БФА сальмонеллы образуют крупные, гладкие, красноватого оттенка прозрачные колонии. Бактерии группы кишечной палочки образуют колонии желто-зеленоватого цвета.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний, но колонии более плотные и несколько меньшего размера, чем на среде Эндо.

На среде Левина сальмонеллы растут в виде прозрачных, бледных, нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

На Висмут-сульфит агаре сальмонеллы растут в виде черных или коричневых колоний с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, которые на этой среде растут в виде нежных светло-зеленых или крупных серовато-зеленых колоний.

Изолированные колонии, характерные для бактерий из рода сальмонелл, пересевают на трехсахарный агар Крумвиде - Олькеницкого в модификации Ковальчука штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик. Посевы помещают на 12-16 ч в термостат с температурой 37^0С.

При росте бактерий из рода сальмонелл цвет скошенной поверхности среды Крумвиде - Олькеницкого в модификации Ковальчука - розовый, столбик - желто-бурый; газообразование устанавливают по наличию трещин и разрыву столбика агара, сероводородобразующие - вызывают потемнение столбика.

Другие грамотрицательные бактерии дают следующие изменения цвета среды:

Бактерии группы кишечной палочки - вся среда окрашивается в синий или сине-зеленый цвет с образованием газа или без него;

Шигеллы и возбудители брюшного тифа - косяк окрашивается в розовый цвет, столбик в синий или сине-зеленый.

Допускается вместо среды Крумвиде - Олькеницкого в модификации Ковальчука, посев на углеводные среды в короткий пестрый ряд, включая среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом и мальтозой, полужидкий агар уколом (для определения подвижности) и бульон Хоттингера для определения образования индола и сероводорода.

Для дальнейшей идентификации бактерий готовят мазки, которые окрашивают по Граму, микроскопируют и изучают серологические свойства микроорганизмов путем постановки пробной агглютинации на предметном стекле с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сальмонеллезной О - сывороткой. При получении положительной реакции на стекле с поливалентной сывороткой проводят идентификацию с помощью монорецепторных агглютинирующей О - сывороткой.

Установив серологическую группу, к которой относятся исследуемые бактерии, с помощью Н-сывороток определяют тип бактерий.

Обнаружение подвижных (кроме S.pullorum и S.gallinarum) грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, неферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа (S.typhi suis. не ферментирует маннит), дающих положительную реакцию агглютинации с монорецепторными О- и Н - сальмонеллезными сыворотками, указывает на наличие бактерий из рода сальмонелл.

Определение коагулазоположительных стафилококков

Сущность метода заключается в определении морфологии, характера роста на питательных средах и в способности отдельных стафилококков

продуцировать лецитиназу и коагулировать цитратную плазму крови кролика под воздействием фермента коагулазы.

Из разведения анализируемой взвеси продукта (1:10)проводят посевы на молочно-солевой агар, содержащий 65 мл хлористого натрия, для выявления пигмента или желточно - солевой агар, содержащий 65 мл хлористого натрия, для выявления лецитиназной активности.

Взвесь наносят на поверхность агара в количестве 0,2 мл и равномерно растирают по всей поверхности агаровой среды.

Посевы термостатируют в течение 24 ч при температуре 37^0С и 24 ч выдерживают при комнатной температуре.

На поверхности питательной среды колонии стафилококка имеют вид плоских или слегка выпуклых блестящих колоний с ровным краем. При этом на молочно-солевом агаре лучше выявляется пигмент (эмалево-белый или золотистый), а на желточно - солевом агаре колонии стафилококков могут образовывать «радужный венчик», что является одним из признаков их патогенности.

Из подозрительных колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму. При наличии стафилококков в препарате обнаруживаются грамположительные мелкие кокки, располагающиеся неправильными гроздьями.

Для подтверждения признаков патогенности стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции. В прибор с 0,5 мл цитратной плазмы крови кролика, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:4, вносят петлю чистой суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при температуре 37^0С. Реакцию плазмокоагуляции учитывают через 3-4 ч (не встряхивая пробирку) и оставляют в термостате на сутки для окончательного учета через 24 ч.

Для постановки реакции плазмокоагуляции можно использовать также сухую цитратную плазму крови кролика.

Реакцию считают положительной, если плазма коагулируется в сгусток.

Для определения количества стафилококков учитывают колонии стафилококков, давшие положительную реакцию плазмокоагуляции. При расчете на 1 г продукта количество подсчитанных колоний умножают на степень разведения и делят на количество посевного материала.

Определение сульфитредуцирующих клостридий

Сущность метода заключается в специфическом росте сульфитредуцирующих клостридий в среде СЦС или Вильсон - Блера, на которых в результате восстановления сернистокислого натрия в сернокислый натрий происходит взаимодействие с хлористым железом и образуется почернение среды за счет сернистого железа.

Проведение анализа на сульфитциклосериновой среде (СЦС). 1 мл анализируемой взвеси (1:10) стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл жидкой сульфит - циклосериновой среды, затем проводят последовательные

пересевы на аналогичные объемы среды, в результате чего получают возрастающие десятикратные разведения суспензии. Инкубацию проводят при 46^0С в течение 8-12 ч. При наличии роста сульфитвосстанавливающих клостридий образуется почернение среды.

Проведение анализа на среде Вильсон-Блера. В пробирки, содержащие по 9 мл расплавленной и охлажденной до температуры 45^0С среды Вильсон-Блера, вносят стерильной пипеткой по 1 мл десятикратных разведений (от 10^{-1} до 10^{-7}) взвеси испытуемого продукта. Посевной материал и среду тщательно перемешивают. Посевы помещают в термостат с температурой 46^0С на 8-12 ч или 37^0С на 20 ч. Появление в среде черных колоний или почернение всей среды указывает на присутствие сульфит - восстанавливающих клостридий.

Почернение среды Вильсон - Блера могут вызвать многие энтеробактерии. Для подтверждения роста сульфитвосстанавливающих клостридий используют пересев в пробирки со средой Китта - Тароцци, предварительно прогретой в течение 25 мин в кипящей водяной бане и быстро охлажденной до 45^0С. Термостатирование посевов проводят при 37^0С, ежедневно в течение 5 суток проверяя в них помутнение среды, выделение газа, появление постороннего запаха, иногда разложение кусочков печени. Сразу после появления признаков роста готовят микроскопический препарат. Материал для этого берут пастеровской пипеткой со дна пробирки. При микроскопировании отмечают грамположительные палочки, образующие овальные споры.

У спорообразующих грамположительных микроорганизмов выявляют каталазную активность с помощью раствора перекиси водорода 30 мл. Отсутствие пузырьков газа при добавлении к капле культуральной жидкости такого же количества перекиси водорода позволяет считать, что в посевах присутствуют микроорганизмы из рода клостридий.

В случае отсутствия спор в микроскопическом препарате положительной пробы на каталазу, присутствия в посевах смешанной микрофлоры, 1-2 капли накопительной среды переносят в стерильную чашку Петри, заливают расплавленной и охлажденной до 45^0С средой Вильсон - Блера. Застывшую поверхность плотной среды заливают холодным агаром. Посевы термостатируют 24-48 ч при 37^0С. Появление в нижнем слое агара черных или коричневых колоний свидетельствует о присутствии в посевах сульфитвосстанавливающих клостридий.

За положительный титр клостридий (сульфит - восстановителей) принимают то максимальное разведение суспензий, в посеве которого произошло почернение среды. Например, если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением 10^{-1},то считают, что в исследуемом продукте будет 10 (или 1×10^1) клеток в 1 г; если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением 10^{-2}, то считают, что в исследуемом продукте - 100 (или 1×10^2) микробных клеток в 1 г.

Контрольные вопросы:

1 Как определить общее микробное число в мясо-колбасных изделиях?
2 Как подготовить колбасные изделия для бактериологического исследования?
3 Исследование колбасных изделий на содержание сальмонелл и кишечной палочки?

2.5 САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯИЦ И ЯИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Цель: изучить методы микробиологического контроля яиц и яичной продукции.

Материалы и оборудование: яйца куриные, яичные продукты, лабораторная посуда, мясо-пептонный агар, среда Эндо, селенитовая среда, висмутсульфат агар, среда Плоскирева, среда Левина, среда Клиглера, среда Гиса.

Методы микробиологического контроля яиц и яичных продуктов включает следующие ***бактериологические исследования:***

-определения количества аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;
-определения бактерий группы кишечных палочек;
-выявления бактерий рода Salmonella;
-выявления бактерий рода Proteus;
-выявления бактерий рода Staphylococcus aureus.

Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Метод основан на подсчете всех колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, вырастающих на плотном питательном агаре, и пересчете их количества на 1 г сухого (1 $см^3$ жидкого) яичного продукта.

По 1 мл исследуемого продукта высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. При посеве крышку чашки Петри слегка приоткрывают и посевной материал вносят на дно чашки. Не позже чем через 15 мин. После внесения исследуемого материала в чашки его заливают 15-20 $см^3$ предварительно расплавленного и охлажденного до 45^0С питательного или мясо-пептонного агара. Чашки с посевами, залитыми питательной средой, осторожно вращают. Чтобы посевной материал равномерно распределился по всей питательной среде. Затем чашки с посевами оставляют на горизонтальной поверхности до полного застывания питательной среды. Чашки с посевами, перевернутые вверх дном, инкубируют в термостате при температуре 30^0С в течение 72 ч.

Для подсчета микроорганизмов учитывают все выросшие колонии, отмечая стеклографом по дну чашки. Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводят невооруженным глазом или с помощью специально предназначенного для подсчета колоний прибора.

Подсчет проводят в посевах того разведения, количество колоний в котором в пределах 30–300. По результатам подсчета вычисляют среднее арифметическое количество микроорганизмов в каждом из этих разведений отдельно. Если полученные результаты отличаются друг от друга более чем в 2 раза, то оценку проводят по результатам посева наибольшего разведения.

Если 30-300 колоний в посевах не одного, а двух следующих друг за другом разведений, то подсчитывают и вычисляют среднее арифметическое количество микроорганизмов в каждом из этих разведений отдельно. Если полученные результаты отличаются друг от друга более чем в 2 раза, то оценку проводят по результатам посева наибольшего разведения.

Полученные результаты округляют следующим образом:

если инкубированные чашки не содержат колоний, то результат выражают так: меньше чем 1,0 × 10 микроорганизмов в 1 $см^3$ или 1 г продукта;

если в чашках с разведением 1:10 выросло меньше чем 30 колоний, то результат выражают так: меньше чем 3,0 ×10;

если число выросших колоний меньше 100, его округляют до ближайшего числа, кратного 5;

если число больше 100 и его последняя цифра 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 20.

если число больше 100 и его последняя цифра не 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 10.

Количество микроорганизмов КОЕ X в 1 г или в 1$см^3$ яичных продуктов вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10^n}{V}, \quad \text{где} \qquad (5)$$

a – округленное среднее арифметическое число колоний на чашках;
V – объем посевного материала, внесенного в чашку, $см^3$;
n – степень десятикратного разведения продукта.

Результаты исследований записывают следующим образом: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов 1,0×10 КОЕ/г ($см^3$) и т.д. до 9,9 ×10 КОЕ/г ($см^3$) продукта.

Метод определения бактерий группы кишечных палочек

Метод основан на способности бактерий группы кишечных палочек ферментировать лактозу с образованием кислоты и газа.

По 1 мл из разведений сухих или жидких яичных продуктов и вносят в пробирки со средой Кесслер или Хейфеца. Посевы инкубируют при температуре 37^0С в течение 24 ч. Из пробирок с признаками роста (изменение

цвета среды, помутнение, газообразование) делают высев на среду Эндо. Посевы инкубируют при температуре 37^0С в течение 24 ч. Затем посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек (плоские или слегка выпуклые, или с валиком, красные с различной интенсивностью окраски, розовые, бледоно-розовые с металлическим или без металлического блеска). Из не менее чем трех характерных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Обнаружение на среде Эндо характерного роста колоний, наличие в мазках из этих колоний грамотрицательных палочек, сбраживающих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37^0С, указывают на выявление в продукте бактерий группы кишечных палочек.

Результат записывают как «не обнаружены» или «обнаружены» бактерии группы кишечных палочек в 0,1 мл жидких или в 0,1 г. сухих яичных продуктов.

Метод выявления бактерий рода Salmonella

Метод основан на использовании сред обогащения с последующим выделением сальмонелл на дифференциально-диагностических средах, а также на изучении культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств культур.

25 г сухих или 25 мл жидких яичных продуктов из средней пробы с соблюдением стерильности вносят в колбу, содержащую 225 мл одной из сред обогащения (селенитовой), встряхивают и инкубируют при температуре 37^0С в течение 16–20 ч. Затем проводят высев бактериологической петлей (диаметр 0,4–0,5 мм) из сред обогащения в чашки Петри с висмут-сульфитным агаром или средой Плоскирева, или агаром Левина, растирая шпателем. Чашки с посевом инкубируют при температуре 37^0С. Учет результатов проводят на висмут-сульфитном агаре через 48 ч, на среде Плоскирева и Левина через 18-24 ч. Сальмонеллы на висмут-сульфитном агаре образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией и нежные светло-зеленые колонии. На средах Плоскирева и Эндо колонии сальмонелл прозрачные, на среде Левина – голубоватые. При отсутствии типичных или подозрительных колоний или при наличии слабого роста микробов на плотных дифференциальных средах чашки с посевами повторно инкубируют при температуре 37^0С в течение 24 ч. Затем снова определяют присутствие колоний сальмонелл. При обнаружении подозрительных колоний продолжают исследование. В противном случае работу с посевами прекращают.

При наличии подозрительных типичных, характерных для сальмонелл колоний берут не менее 3 колоний. Если имеется на одной чашке менее 3 типичных колоний, то берут все выросшие подозрительные колонии для пересева в пробирки: со скошенным питательным или мясо-пептонным агаром, с мясо-пептонным бульоном, с пептонной водой и на среду Клиглера.

Среду Клиглера засевают сначала штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика. Посевы инкубируют при температуре 37^0С в течение 24 ч. Выросшие культуры с поверхности скошенного агара используют для постановки реакции агглютинации и приготовления мазков. Мазки окрашивают по Граму и микроскопируют. Сальмонеллы – грамотрицательные палочки. Посевы на мясо-пептонном бульоне и пептонной воде используют для определения способности выделенных культур образовывать сероводород и индол.

На среде Клиглера оценивают окраску и газообразование. При росте сальмонелл в среде Клиглера в малиновый цвет окрашивается столбик (за счет расщепления глюкозы), скошенная часть среды остается бледно-розовой при отсутствии расщепления лактозы, сахарозы или обоих сахаров. Газообразование устанавливают по трещинам и разрывам столбиков агара. На среде Клиглера образование сероводорода обнаруживают на основании почернения среды (от темной линии по месту протокола среды до разлитого почернения всего столбика). Расщепление мочевины выявляется по восстановлению первоначального цвета (бледно-розового) столбика среды.

Сальмонеллы мочевину не разлагают, сероводород образуют.

При необходимости более полной биохимической характеристики культуры пересеивают на цветные среды Гисса с углеводами («короткий пестрый ряд» с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом и мальтозой) и определяют их способность образовывать индол и сероводород.

С этой целью суточную культуру, взятую со скошенного питательного или мясо-пептонного агара, растирают в 1,0 мл физиологического раствора. Заем по 2 капли 0,2 мл взвеси вносят пастеровской пипеткой в среды Гисса, пептонную воду или мясо-пептонный бульон. Питательные среды с посевами инкубируют при температуре 37^0С.

На средах Гисса через 24 ч термостатирования учитывают кислотообразование (среды приобретают розово-красный цвет) и газообразование (наличие пузырьков в поплавках).

Сальмонеллы не ферментируют лактозу и сахарозу, ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа.

Для обнаружения индола в пробирку с мясо-пептонным бульоном или пептонной водой сразу же после посева испытуемой культуры помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную насыщенным водным раствором щавелевой кислоты. Бумажку помещают таким образом, чтобы она удерживалась пробкой, но не прикасалась к среде. При наличии индола через 1–3 дня инкубирования при температуре 37^0С нижняя часть бумажки окрашивается в розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете. Индол можно определить и другим способом: в пробирку с суточной бульонной культурой осторожно по стенке добавляют 5-10 капель реактива Эрлиха. Перед добавлением реактива к бульону можно ввести 2 мл этилового эфира. При наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо. Сальмонеллы индола не образуют.

Принадлежность выделенных культур к роду сальмонелл определяется реакцией агглютинации на стекле с поливалентной адсорбированной сальмонеллезной сывороткой.

С этой целью на предметное стекло помещают каплю изотонического раствора хлористого натрия и рядом каплю поливалентной агглютинирующей сальмонеллезной сыворотки. Затем в каждую из приготовленных капель, начиная с изотонического раствора, вносят петлей часть анализируемой колонии, равномерно растирают и покачивают предметным стеклом в течение 30-60 с. Помещают стекло на темный фон и рассматривают с помощью увеличительного стекла. При положительной реакции агглютинации через 1–2 мин в капле сыворотки образуются хлопья, жидкость просветляется.

В капле с изотоническим раствором остается равномерное помутнение.

Штаммы, дающие типичные биохимические изменения и положительные серологические реакции с поливалентной агглютинирующей сальмонеллезной сывороткой, относят к сальмонеллам.

Для видовой идентификации подозрительных на сальмонеллы культур их отправляют в специализированные лаборатории.

Метод определения бактерий рода Proteus

Метод основан на высеве определенного количества продукта в конденсационную воду свежескошенного агара, способности бактерий рода Proteus давать ползучий, опережающий другие виды бактерий рост и образовывать сероводород.

Яичные продукты или 1 $см^3$ из разведений 1:10 вносят пробирки со свежескошенным питательным или мясо-пептонным агаром, не прикасаясь к скошенной поверхности среды. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37^0С в течение 24 ч.

При учете посевов обращают внимание на образование ползучего муарообразного налета с голубоватым оттенком на скошенном агаре, поднимающегося из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды и издающего резкий гнилостный запах. При появлении характерного роста микробов рода Proteus готовят мазки, окрашивают их по Грамму, микроскопируют. Бактерии рода Proteus – неспорообразующие грамотрицательные палочки.

Для определения способности образовывать сероводород подозрительные культуры с агара высевают методом укола в столбик и штрихами по скошенной поверхности среды: Клинглера. Посевы термостатируют при температуре 37^0С в течение 24 ч. При образовании сероводорода столбик среды чернеет. Бактерии рода Proteus образуют сероводород, при этом в столбике среды появляеься газ, что указывает на ферментацию глюкозы.

Наличие характерного роста в виде тонкого муарообразного налета, поднимающегося вверх от конденсата на свежескошенном агаре, резкого гнилостного запаха, неспоробразующих грамотрицательных палочек в мазках,

образующих сероводород, указывает на присутствие бактерий рода Proteus в 1 мл жидких и в 0,1 г сухих яичных продуктов.

Метод выявления бактерий рода Staphylococcus aureus

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в селективные питательные среды, способности стафилококков расти на средах с повышенным содержанием хлористого натрия, коагулировать плазму крови и образовывать кислоту из маннита и мальтозы в аэробных условиях.

Сухие яичные продукты в количестве 1г, жидкие – 1 мл солевого бульона, через 24 ч инкубирования при температуре 37^0С из солевого бульона проводят пересев бактериологической петлей на чашки Петри с подсушенным желточно-солевым агаром. Чашки с посевами инкубируют при температуре 37^0С в течение 18-24 ч.

Для лучшего выявления пигментов после суточной инкубации чашки с посевами выдерживают на свету при комнатной температуре 18-24 ч.

На желточно-солевом агаре колонии Staphylococcus aureus имеют форму выпуклых дисков диаметром 2–4 мм желтого, белого, кремового, лимонного, золотистого цветов с ровными краями, вокруг колоний образуется радужное кольцо.

Из характерных колоний, подозрительных на Staphylococcus aureus, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Колонии грамположительных мелких кокков, гроздевидно расположенные в мазке, бактериологической петлей отсеивают в чашки Петри с питательным или мясо-пептонным агаром. Посевы инкубируют при температуре (37±1) ^{0}С в течение 18-24 ч.

Из выросших на агаре подозрительных на Staphylococcus aureus колоний после проверки мазков в чистоту культуры под микроскопом ставят реакцию плазмокоагуляции. Для этого в две пробирки помещают п^o 0,5 см3 разведенной кроличьей плазмы. В одну пробирку вносят петлей исследуемую суточную агаровую культуру, другую пробирку оставляют незасеянной. Пробирки помещают в термостат при температуре 37^0С. учет результатов проводят через 2-4 ч и пробирки оставляют до утра при комнатной температуре для окончательного учета. Пробирки следует просматривать осторожно, чтобы не разрушить образовывающийся сгусток.

При учете реакции плазмокоагуляции могут наблюдаться три степени активности фермента коагулазы:

++++ – сгусток плотный, при наклоне пробирки неподвижен;

+++ – сгусток, имеющий небольшой отсек, при наклоне пробирки подвижен, плотная коагуляция плазмы;

Все три варианта являются положительным результатом.

Подозрительные на Staphylococcus aureus колонии, выросшие на желточно-солевом агаре, бактериологической петлей пересевают в чашки Петри, содержащие агаризованную среду с маннитом (или мальтозой) и индикатором

феноловым красным. Посевы термостатируют при температуре (37±1) ^{0}С в течение (24±) ч. При положительной реакции вокруг колонии наблюдается желтое окрашивание среды, четко контрастирующее с пурпурно-красным фоном.

Наличие грамположительных гроздевидно расположенных мелких кокков в мазках из характерных колоний на желточно-солевом агаре, положительная реакция плазмокоакуляции, ферментация маннита и мальтозы с образованием кислоты свидетельствуют о выявлении в 1 г или в 1 см^3 яичных продуктов Staphylococcus aureus.

Лабораторная работа 1.

Ход работы

1. Определить количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в яице и яичных продуктах
2. Определить бактерии группы кишечной палочки, сальмонелл в яйце и яичных продуктах
3. Определить количество стафилококков и протея в яйце и яичных продуктах
4. Мазки окрасить по Граму, микроскопировать и зарисовать.

Контрольные вопросы:

1 Как определять КМАФаМ в яйце и яичных продуктах.
2 Какие бактериологические исследования включает микробиологический контроль яиц и яичных продуктов?

2.6 БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БАНОЧНЫХ КОНСЕРВОВ

Цель: изучить методы бактериологического исследования мясных, овощных и рыбных продуктов, в металлических и стеклянных банках

Материалы и оборудование: образцы консервов, стеклянные трубки, пробойник, питательные среды – 1% сахарный бульон, среда тароци, мясо-пептонный агар, краски по Граму-генцианвиолет, фуксин, раствор Люголя.

Мясные, овощные и рыбные консервированные продукты (в металлических и стеклянных банках), находящиеся в товаропроизводящей сети, подвергают бактериологическому исследованию при наличии факторов, вызывающих сомнение в качестве продукта.

Образцы консервов, доставленные в лабораторию, регистрируют в специальном журнале, отмечая все данные, обозначенные на специальном журнале, отмечая все данные, обозначенные на этикетке банки и в сопроводительном документе. Затем банки освобождают от этикеток и делают в журнале запись обо всех обнаруженных при внешнем осмотре дефектах (бомбаж, деформация коробок, ржавчина, следы потеков и пр.). Банки с нарушенной герметичностью бактериологическому исследованию не подлежат.

Герметические банки с консервами, предназначенные для выявления аэробных и анаэробных мезофильных бактерий, помещают в термостат на 5 сут. при 37^0С.

Подготовка банок с консервами для бактериологического исследования

Бактериологическое исследование консервов проводится в боксах со строгим соблюдением правил асептики. При этом в боксе должны находиться:

1 Стерильные стеклянные трубки диаметром **7**-9 мм, закрытые с одного конца ватой.

2 Пробойник (металлический стержень, один конец которого имеет форму копья).

3 Питательные среды: 1% сахарный бульон и среда Китта-Тароци без масла, но с добавлением 0,15% агара, регенерированная перед посевом 35-минутным прогреванием в водяной бане с последующим быстрым охлаждением до 40^0С.

Вскрытие банок. Исследуемую банку, предварительно обмытую горячей водой с мылом, насухо вытертую полотенцем, обтирают спиртом; верхнюю крышку обжигают. Затем на середину крышки на тот участок, в котором предполагается пробить отверстие для взятия пробы, кладут кусочек ваты, смоченный спиртом, и зажигают. Под горящую вату подводят острие профламбированного пробойника под углом 30-40^0 к поверхности крышки и нажимом на ручку прокалывают ее. Получающееся при этом отверстие вполне достаточно для введения стеклянной трубки. После извлечения пробойника из банки отверстие тотчас закрывают стерильной половинкой чашки Петри.

Посев содержимого консервных банок на питательные среды. Материал для посева набирают из банки через отверстие сделанное в крышке, слегка приоткрыв прикрывающую его половинку от чашки Петри. В стеклянную трубку насасывают жидкую массу с плотными частицами и засевают ее в питательные среды для выделения аэробной и анаэробной микрофлоры.

Посев на обнаружение аэробных бактерий. Исследуемый материал в количестве 1-1,5 мл засевают в две пробирки с мясо-пептонным бульоном, посевы помещают в термостат при 37^0С на 5 сут. За состоянием посевов ведут повседневное наблюдение.

Из пробирок с признаками микробного роста в период инкубации в термостате делают мазок и производят высев на скошенной МПА.

Выросшие на мясо-пептонном агаре колонии микроскопируют. При обнаружении грамотрицательных неспороносных палочек производят пересев на дифференциально-диагностические среды (Левина или Эндо). Выделенную чистую культуру идентифицируют с бактериями группы кишечной палочки или бактериями группы сальмонелл.

При обнаружении в консервных микробов с культурально-морфологическими признаками, характерными для стафилококка, проводят исследование.

При обнаружении в посевах Bac.subtilis, Bac.mesentericus исследование на данном этапе заканчивают, и результат отмечают в протоколе исследования.

При отсутствии явно выраженных признаков микробного роста на 5-6-е сутки инкубирования посевов в термостате из содержимого пробирок мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

Одновременно производят высев на скошенный мясо-пептонный агар. Дальнейшее исследование проводят по описанной выше схеме.

Посев на обнаружение анаэробных бактерий. Исследуемый материал по 3-4 г засевают в две пробирки, содержащие по 15-20 мл среды Кита-Тароцци, предварительно регенерированной кипячением.

После засева одну из пробирок прогревают в водяной бане при температуре 80^0С в течение 20 мин для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры. Обе засеянные пробирки помещают в термостат при 37^0С на 5 сут. Затем независимо от наличия или отсутствия признаков микробного роста готовят мазки, окрашивают их по Грамму и микроскопируют. При обнаружении в мазках из анаэробных посевов грамположительных палочек со спорами овальной формы, расположенными субтерминально, дальнейшее исследование проводят в плане идентификации выделенного микроба с возбудителем ботулизма.

Лабораторная работа 2.

Ход работы:

1 Провести отбор проб баночных консервов
2 Провести посев на плотные питательные среды
3 Приготовить мазки из выросших колоний
4 Мазки окрасить по Граму, микроскопировать и зарисовать
5 Результаты записать в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1 Как необходимо проводить вскрытие баночных консервов для бактериологического исследования?
2 Как проводят посев на обнаружение аэробных бактерий содержимого консервных банок?

2.7 ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ И ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ
по теме «Санитарно-бактериологическое исследование пищевых продуктов»

1. Какова остаточная микрофлора в готовой консервной банке?
A) отсутствует
B) кишечная палочка
C) стрептококки
D) стафилококки
E) грибы

2. Пути проникновения микробов в мясо?
A) эндогенные и экзогенные
B) при разделке и транспортировке
C) только через корм
D) при инъекции
E) при ослаблении организма

3. Какие микробы придают молоку запах прогорклого масла?
A) молочнокислые
B) пропионово-кислые
C) гнилостыне
D) кишечные палочки
E) маслянокислые

4. Допустимый коли-титр молока для человека
A) 1
B) 2
C) 3
D) 4
E) 5 и более

5. Через какое время после взятия пробы молока необходимо приступить к исследованию?
A) не позднее 2 часа
B) не позднее 4 часа
C) не позднее 6 часа
D) не позднее 12 часов
E) не позднее 24 часа

6. В какой фазе в молоке наблюдается задержка роста микроорганизмов?
A) плесневых грибов и дрожжей
B) молочнокислых бактерий
C) смешанной микрофлоры
D) бактериоцидной
E) при кисломолочном брожении

7. О чем говорит присутствие в исследуемом материале термофилов и протея?
A) о воздушно-капельном загрязнении
B) о фекальном загрязнении
C) о производственном загрязнении

D) о загрязнении разлагающимися отбросами
E) о загрязнении патогенными микробами

8. Какие микробы могут содержатся в яйце водоплавающих птиц?
A) сальмонеллы
B) кишечные палочки
C) стафилококки
D) протей
E) стрептококки

9. Какие микробы определяются при санитарно-микробиологических исследованиях молочных продуктов?
A) кишечная палочка
B) стрептококки
C) стафилококки
D) бактерий
E) актиномицеты

10. Какие микробы вызывают порчу продуктов питания на холоде?
A) термофилы
B) психрофилы
C) мезофилы
D) азотфиксирующие
E) нитрофицирующие

11. Для чего используют пастеризацию?
A) для уничтожения всех микробов, кроме спорообразующихся и термофильных
B) для полного уничтожения всех микробов
C) для уничтожения дрожжей
D) для уничтожения кишечной палочки
E) для уничтожения токсинов

12. Размножаются ли санитарно-показательные микроорганизмы во внешней среде?
A) нет
B) да
C) в аэробных условиях
D) в анаэробных условиях
E) в поверхностных слоя почвы

13. Санитарно-показательные микроорганизмы:
A) сарцины, тетракокки
B) кишечные палочки, энтерококки, протеи
C) актиномицеты, клостридии
D) дрожжи, грибы
E) спирохеты, вибрионы

Тема 3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1 МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА SALMONELLA

Цель: Изучить метод выделения бактерий рода Salmonella
Материалы и оборудование: пробирки, чашки Петри, жидкие среды – бульон Хоттенгера, МПБ, среды Гиса, плотные среды- среда Плоскирева, Эндо, Левина, висмут-сульфит - агар, бактериологические петли, шпателя, предметные стекла, спиртовки.

Метод выявления бактерий рода Salmonella основан на высеве определенного количества продукта в жидкую неселективную среду, инкубирования посевов, последующем выявлением в этих посевах бактерий, способных развиваться в жидких селективных средах, образующих типичные колонии на агаризованных дифференциально-диагностических средах, имеющих типичные для бактерий рода Salmonella биохимические серологические характеристики.

Неселективное предварительное обогащение

Навеску продукта, в массе (объеме) которая нормативно-технической документацией на анализируемый продукт предусматривается отсутствие бактерий рода Salmonella, высевают в забуференную пептонную воду. Соотношение массы (объема) продукта и забурефенной пептонной воды 1:9.
При посеве жидких высококислотных продуктов для предотвращения снижения pH питательных сред на 0,5 и более pH продукта перед посевом доводят до 7,0± 0,2.

При посеве твердых высококислотных продуктов доводят pH до 7,0± 0,2. в посевах. Доведение pH проводят асептически с помощью стерильных растворов гидроокиси натрия и соляной кислоты. Количество добавляемого раствора гидроокиси натрия устанавливают опытным путем. Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}C в течение 18-24 часов.

Селективное обогащение

Культуры, полученный после инкубирования пересевают в две среды для селективного обогащения. Для этого по 10 см^3 культуры переносят в 100 см^3 магниевой среды и 100 см^3 тетратионатной среды или 10 см^3 культуры переносят в 100 см ^{3} селенитово й среды и в 100 см^3 тетратионатной среды. Посевы инкубируют в течение 24-48 часов на магниевой и селенитовой средах при температуре 36 ^{0}C, а на тетратионатной среде при температуре 43 ^{0}C.

Выделение и идентификация культур на агаризованных дифференциально-диагностических средах

Культуры через 24-48 часов инкубирования на три агаризованных среды висмут-сульфит-агар, среду Плоскирева и среду Эндо или (среду Левина). Допускается использование одной чашки каждой из сред для одновременно высева с 2-х селективных сред Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение 24-48 часов. После 24 часов инкубирования посевов проводят предварительный отчет результатов, а после 48 часов – окончательный.

После инкубирования посевов на дефференциально-диагностических средах рост колоний, характерных для бактерий рода Salmonella:

- на висмут-сульмат-агаре колоний черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пегментированием среды под колониями;
- на среде Плоскирева колонии бесцветные прозрачные, но более плотные чем на среде Эндо;
- на среде Эндо колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные;
- на среде Левина колонии прозрачные.

При отсутствии в посевах на дифференциально-диагностической среде характерны для бактерии рода Salmonella колоний проводят их дальнейшее изучение.

Биохимическое подтверждение принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода Salmonella

Не менее 3-х характерных колоний с каждой дифференциально-диагностической среды пересевают на скошенную поверхность мясо-пептонного агара или среды их сухого питательного агара. Посевы инкубируются с термостате при температуре 36 ^{0}С в течение 24 часов.

Из отобранных для биохимического подтверждения колоний приготовляют маски и окрашивают по Грамму. Бактерии рода Salmonella являются грамотрицательными палочками с закругленными концами

После инкубирования посевов проводят учет результатов ферментации, лактозы, глюкозы и сахарозы на трехсахарном агаре:

- пожелтение скошенной части среды указывает на ферментацию лактозы или сахарозы или обоих сахаров;
- пожелтение столбика среды с разрывом среды или пузырьками газа указывает на ферментацию глюкозы и образованием газа,
- пожелтение среды без разрывов или пузырьков газа указывает на ферментацию глюкозы без образования газа;
- почернение среды в столбике указывает на образование сероводорода.

Типичным для бактерии рода Salmonella является культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа ферментирующие лактозу или сахарозу образующие сероводород. Дальнейшему изучения подвергают также лактозоположительные бактерии или бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

Определение расщепления мочевины. Культуры пересевают штрихом на поверхность агара Кристенсена с мочевиной. Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение 24ч. При положительной реакции-расщеплении мочевины цвет среды от розового до светло-вишневого. Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования. Бактерии рода Salmonella не расщепляют мочевину.

Определение образование ацетоина (реакция Фогес-Проскауера). Культуры пересевают в мясо-пептонный бульон с глюкозой. Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение 48 ч. После инкубирования к 1см^3 отобранной культуральной жидкости прибавляют 0,6см^3 раствора α-нафтола, и 0,2см^3 раствора гидроокиси калия концентрации 400г/дм^3.После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через15мин указывает на положительную реакцию.
Бактерии рода Salmonella не образует ацетоина (реакция Фогес-Проскауера отрицательная).

Определение образования индола. Культуры пересевают в бульон Хоттингера,или в мясо-пептонный бульон с L-триптофаном . Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение 24ч. Посевы инкубирования посевам прибавляют по 1см^3 реактива Эрлиха или Ковача. Образование красного слоя указывает на положительную реакцию. Бактерии рода Salmonella не образуют индол.

Определение ферментации маннита и сахарозы. Культуры пересевают в среды Гиса с маннитом или сахарозой. Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение. Бактерии рода Salmonella не сбраживают сахарозу,не сбраживают маннит. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

Определение подвижности. Культуры пересевают уколом в полужидкий мысо-пептонный агар. Посевы инкубируют при температуре 36 ^{0}С в течение 24ч. При росте подвижных культур отмечается диффузный рост по всему столбику агара, при росте неподвижных культур – вдоль места укола. Большинство штаммов бактерии рода Salmonella подвижны. Результаты биохимического подтверждения культур оценивают по таблице.

Серологическое подтверждение принадлежности культур к бактериям рода Salmonella

Серологическое подтверждение принадлежности культур к бактериям рода Salmonella проводят с культурами, давшими типичные биохимические реакции согласно приложению, и предварительно пересеянными, на поверхность мясо-пептонного агара или среды приготовленной сухого питательного агара.

Определение самоаггютинирующих штаммов

Помещают каплю физиологического раствора на тщательно очищенное предметное стекло. Диспергируют в этой капле часть тестируемой колонии, так чтобы получилась гомогенная и густая суспензия. Покачивают осторожно стекло в течении 30-60 сек. Отмечают результаты на темном фоне, лучше с помощью увеличительного стекла. Если наблюдается в разной степени склеивание бактерий то есть образование осадка, то считают, что тестируемые штаммы обладают самоаггютинацией.

Штаммы бактерии, обладающей самоагглютинацией, не подвергают дальнейшей серологической идентификации.

Определение наличия 0- антигенов

Штаммы, у которых не выявлено самоагглютинации, испытывают в реакции агглютинации с агглютинирующими адросбированными поливалентными сальмонеллюзными сыровотками основных групп A, B, C, D, E, а затем если не выявлено 0-антигенов с сыворотками основных групп, ставят реакцию с сыворотками редких групп. Подготовка сывороток с постановке реакции агллютинации и методика её проведения указаны в наставлении, прилагаемом к сывороткам. Агллютинация (наличие 0-антигенов) проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости. При отрицательной реакции агллютинации культура после тщательного смешения с каплей сыворотки образует гомогенную смесь.

Контрольные вопросы:

1 Как подтверждают биохимическую принадлежность выделенных колоний?

2 Как дифференцируют на питательных средах сальмонелл?

3.2 МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДОВ PROTEUS, MORGANELLA, PROVIDENCIA

Цель: Изучить методы выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia

Материалы и оборудование: пробирки, чашки Петри, мясо-пептоный бульон, мясо - пептоный агар, бактериологические петли, шпателя.

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую селективную среду, культивировании посевов при 36^0С в течение 48 ч, последующих пересеве выросших культур на плотные дифференциально – диагностические среды, культивировании посевов при 36^0С в течение 48 ч, выделении характерных колоний и подтверждении с помощью биохимических тестов их принадлежности к бактериям родов Proteus и (или) Morganella и (или) Providencia или к видам Proteus vulgaris или Proteus mirabilis.

Проведение исследования

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить предполагаемое минимальное количество продукта, содержащее бактерии родов Proteus и (или) Morganella и (или) Providencia или к видам Proteus vulgaris или Proteus mirabilis. Из продукта и (или) соответствующих разведений высевают по 1,0 $см^3$ в жидкую селективную среду. Посевы инкубируют при 36^0С в течение 48 ч. Положительными считают пробирки, в которых наблюдается помутнение среды. При росте бактерий, расщепляющих мочевину, наблюдается изменение цвета среды в синий. Отсутствие изменения цвета среды не является показателем отсутствия роста выделяемых бактерий.

Для подтверждения присутствия бактерий родов Proteus и (или) Morganella, и (или) Providencia или видов Proteus vulgaris или Proteus mirabilis из всех пробирок, в которых наблюдается помутнение среды, делают пересевы на одну из дифференциально-диагностических плотных сред, приготовленных таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при 36ºС в течение 48 ч.

На дифференциально-диагностических плотных средах бактерии образуют колонии круглой формы диаметром 1 – 3 мм. Бактерии рода Proteus обладают свойством роения (ползучим ростом). Из всех чашек с характерным ростом выбирают не менее 5 колоний для выделения чистых культур и дальнейшего изучения.

Для получения чистых культур используют скошенный в пробирке мясо - пептонный агар или мясо-пептонный бульон. Посевы инкубируют при 36ºС в течение 24 ч.

Биохимическое подтверждение принадлежности выделенных микроорганизмов к бактериям родов родов Proteus и (или) Morganella, и (или) Providencia.

Для определения наличия дезаминазы фенилаланина из 24 – часовой культуры делают высев штрихами на поверхность скошенного в пробирке агара и культивируют при 36ºС в течение 48 ч, после этого на поверхность агара пипеткой наносят 3-5 капель раствора хлорного железа. При этом появление интенсивной зеленой окраски среды свидетельствует о положительной реакции. При отрицательной реакции цвет среды не меняется. Бактерии родов Proteus, Morganella, Providencia дают положительную реакцию.

Для определения способности образовывать сероводород культуры высевают методом укола в столбик и штрихами по поверхности агаризованной среды. Посевы инкубируют при 36ºС в течение 48 ч. При образовании сероводорода столбик среды чернеет. Бактерии рода Proteus образуют сероводород, при этом в столбике среды появляется газ, что указывает на ферментацию глюкозы с образованием кислоты и газа. Допускается инкубирование посевов при отсутствии сероводорода через 48 ч продолжать до 4 сут, так как P. Myxofaciens может образовывать сероводород на 3-и – 4-е сутки. Бактерии рода Morganella и Providencia сероводорода не образуют.

Для определения способности утилизировать цитрат культуры пересевают на поверхность скошенного агара. Просевы инкубируют при 36ºС в течение 48 ч. Окрашивание в синий цвет – положительная реакция, отсутствие изменения – отрицательная реакция. Бактерии рода Providencia утилизируют цитрат, бактерии рода Morganella не утилизируют цитрат.

Для дифференциации видов Proteus vulgaris и Proteus mirabilis у культур, образующих сероводород проводят определение наличия дезоксилазы орнитина и способности образовывать индол.

Для определения способности образовывать индол выделенные культуры высевают в триптон – триптофановую среду. Посевы инкубируют при 36ºС в течение 48 ч. После инкубирования добавляют 1 $см^3$ реактива Ковача или Эрлиха. Темно – красное кольцо свидетельствует о положительной реакции. P. vulgaris образует индол, P. mirabilis и P. myxofaciens индола не образуют.

Для определения наличия декарбоксилазы орнитина выделенные культуры высевают в среду. Посевы инкубируют при 36ºС в течение 48 ч. Положительной реакцией считают помутнение среды и изменение ее цвета в фиолетовый. P. mirabilis дает положительную реакцию, P. vulgaris и P. Myxofaciens – отрицательную.

Контрольные вопросы:

1 Метод выявления бактерий родов Proteus?
2 Метод выявления бактерий родов Morganella, Providencia?

3.3 МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель: изучить методы определения молочнокислых микроорганизмов.
Материалы и оборудование: пробирки, чашки Петри, питательные среды, бактериологические петли, шпателя.

Метод основан на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в жидкие или агаризованные селективные питательные среды, культивировании посевов при оптимальных условиях и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете.

Метод предназначен для:

- установления соответствия микробиологических показателей качества пищевых и кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий требованиям нормативно – технической документации;
- установления промышленной стерильности консервов;
- выяснения причин возникновения дефектов пищевых продуктов.

Проведение исследования пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий)

Для определения присутствия и подсчета количества микроорганизмов на чашках Петри из пробы пищевого продукта или из исходного разведения готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно – технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Для подсчета НВЧ из пробы пищевого продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений, таким образом, чтобы в посевах наибольшего разведения микроорганизмы не были обнаружены. Для посева выбирают не менее трех последовательных разведений. Из каждого разведения засевают три параллельные пробирки.

Для посева в жидкие среды по методу НВЧ и на чашки Петри глубинным методом отбирают по 1,0 $см^3$ подготовленной пробы продукта и (или) его разведения, для посева на чашки Петри поверхностным методом – по 0,1 – 0,2 $см^3$.

Посевы глубинным или поверхностным методами, а также с применением мембранной фильтрации

При применении метода мембранных фильтров фильтруют объем жидкого продукта, который указан в нормативно – технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Для определения присутствия или подсчета НВЧ молочнокислых микроорганизмов проводят посев на одну из жидких сред. Если после внесения продукта в среду Бликфельдта среда изменит цвет, то в нее добавляют несколько капель раствора стерильной щелочи (NaOH или KOH) массовой концентрацией 50 $г/дм^3$ до восстановления первоначальной окраски.

Для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов допускается взамен посева в жидкие среды проводить посев глубинным методом в одну из агарированных сред.

Для определения присутствия или подсчета НВЧ бактерий рода Lactobacillus взамен посева в жидкие среды проводят посев глубинным методом в одну из агаризованных сред.

Для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Lactobacillus взамен посева в жидкие среды проводят посев глубинным методом в одну из агаризованных сред.

Для определения присутствия бактерий рода Leuconostoc проводят посев в жидкую среду.

Для определения присутствия взамен использования жидкой среды, а также для подсчета количества бактерий рода Leuconostoc на чашках Петри или с применением метода мембранной фильтрации проводят посев поверхностным методом на агаризованную среду.

Для определения присутствия или подсчета количества стрептококков группы N рода Streptococcus проводят посев глубинным методом в агаризованную среду, а для S. Thermophilus среду МРС.

Для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Pediococcus проводят посев глубинным методом в агаризованную среду.

Посевы для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов, бактерий рода Lactobacillus стрептококков группы N рода Streptococcus инкубируют не более 5 сут при температуре 30^0С или не более 3 сут при температуре 37^0С; посевы для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Leuconostoc инкубируют не более 5 сут при температуре 22^0С. Посевы для определения присутствия или подсчета количества S. thermophilus инкубируют 48 ч при температуре 45^0С. Посевы на чашки Петри для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Leuconostoc инкубируют дном вниз. Инкубирование посевов на жидких средах прекращают при появлении видимых признаков роста. Предварительный подсчет колоний на агаризованных средах проводят через 48 ч.

В посевах на агаризованных средах для определения присутствия или подсчета количества кисломолочных микроорганизмов, бактерий рода Lactobacillus, Pediococcus стрептококков группы N рода Streptococcus, S. thermophilus, ограничение доступа кислорода осуществляют одним из указанных ниже способов: на застывшую питательную среду в чашках Петри наливают второй слой расплавленной и охлажденной до 45^0С агаризованной среды в количестве 5,0 $см^3$ и оставляют до затвердевания ; чашки Петри помещают в газовую среду, состоящую из 95% N_2 и 5% CO_2 чашки Петри помещают в анаэростат. Аппарат закрывают, с помощью вакуумного насоса создают вакуум 86,6 – 93,3 кПа; в каждую пробирку с жидкой средой добавляют стерильный жидкий парафин в количестве, необходимом для получения столба высотой около 2 см. Посевы на жидких средах ежедневно просматривают и отбирают пробирки с видимыми признаками роста. Из пробирок с признаками роста проводят пересев на агаризованные среды бактериологической петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний.

Посевы на агаризованных средах после инкубирования просматривают и для подсчета отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

При определении количества микроорганизмов методом мембранных фильтров допускается проводить отбор чашек Петри для подсчета, если на фильтрах выросло менее 15 характерных колоний.

Для подтверждения принадлежности характерных колоний к молочнокислым микроорганизмам или бактериям одного из родов Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus стрептококкам группы N рода Streptococcus или S. thermophilus отбирают из посевов не менее 5 характерных колоний. Принадлежность каждой отобранной колонии к определенным микроорганизмам устанавливают по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы, дополнительно при идентификации бактерий

рода Leuconostoc определяют наличие капсул, при идентификации стрептококков вида N рода Streptococcus и стрептококков группы N рода Streptococcus – наличие роста в мясопептонном бульоне с pH 9,6 и в мясопептонном бульоне с 6,5% NaCl.

Для определения отношения микроорганизмов к окраске по Граму из колоний приготавливают мазки, окрашивают их микроскопируют.

Для изучения подвижности микроорганизмов из колоний приготавливают препараты методов висячей или раздавленной капли и микроскопируют.

Разложение перекиси водорода у бактерий рода Pediococcus возможно за счет фермента псевдокаталазы. Поэтому при определении молочнокислых микроорганизмов или бактерий рода Pediococcus в случае, если в характерных колониях обнаружены грамположительные, неподвижные микроорганизмы, дающие положительную каталазную реакцию, контролируют отсутствие цитохромов путем постановки бензидинового теста. Для этого выросшие на чашках Петри колонии бактерий 24-48 часового возраста заливают раствором бензидина. После того, как раствор пропитает колонии, прибавляют в чашку приблизительно такой же объем 5%-ной перекиси водорода. Молочнокислые микроорганизмы, в том числе бактерии рода Pediococcus, не содержат цитохромов. В случае присутствия цитохромов колонии окрашиваются в голубовато – зеленый или ярко – голубой цвет.

При отсутствии бензидина допускается проводить определение наличия псевдокаталазы на среде с низкой концентрацией глюкозы – 0,5%.

Культуры, образующие псевдокаталазу, относят к роду Pediococcus.

При идентификации бактерий рода Leuconostoc готовят препараты и окрашивают по Бури для выявления бактериальных капсул. Для этого на хорошо обезжиренном и обожженном предметном стекле смешивают каплю бактериальной культуры с мелким порошком черной туши или суспензией нигрозина. С помощью другого стекла со шлифованными краями быстро готовят тонкий мазок, который фиксируют, несколько раз проводят его через пламя горелки. Мазок докрашивают раствором кристаллического фиолетового или рабочим раствором карболфуксина. Осторожно промывают в сосуде с водой, оставляют на воздухе для высыхания и микроскопируют. Не допускается сушить мазок между листами фильтровальной бумаги. Фон препарата окрашивается тонкой суспензией черной туши или нигрозина. Тела бактерий окрашиваются монохроматично, капсулы остаются неокрашенными.

При идентификации стрептококков группы N рода Streptococcus, стрептококков вида S. thermophilus определяют отсутствие роста на мясопептонном бульоне с pH 9,6 и на мясопептонном бульоне с содержанием хлористого натрия 6,5%. Для этого культуры пересевают на среды. Посевы инкубируют при температуре 30^0C в течение 3 сут, а при идентификации S. thermophilus посевы инкубируют при 45^0C в течение 3 сут.

Проведение исследования кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий

Для приготовления разведений заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий края флакона и пакета протирают спиртом, край флакона обжигают и вынимают пробку, край пакета надрезают профламбированными ножницами, отвешивают 1г испытуемого материала в стерильную ил профламбированную ступку, прикрытую крышкой от чашки Петри или стерильной бумагой, тщательно растирают, добавляя небольшое количество раствора хлористого натрия или фосфатного буфера из колбы, содержащей 99 $см^3$ раствора или буфера. Суспензированный материал переливают в колбу с оставшимся раствором хлористого натрия или фосфатного буфера и получают второе разведение 1:100.

Из вторых разведений кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий готовят следующие разведения в соответствии с количеством молочнокислых бактерий, указанным в нормативно – технической документации. Посев для подсчета количества молочнокислых стрептококков проводят в агаризованную или жидкую питательную среду, а посев для подсчета количества молочнокислых палочек – в жидкую среду.

Для посева в агаризованную питательную среду выбирают разведения, при посеве которых на чашках вырастает от 15 до 150 колоний.

Из каждой пробы делают посев по ГОСТ 9225 1 $см^3$ соответствующих разведений продукта на чашки Петри.

При посеве в жидкую питательную среду из трех-четырех последних разведений вносят по 1 $см^3$ каждого разведения в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком (см. таблицу 13).

Пробирки или чашки Петри с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре 30^0С для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий, при температуре 40^0С для подсчета термофильных молочнокислых бактерий и при температуре 32^0С для совместного подсчета термофильных и мезофильных молочнокислых бактерий. Посевы инкубируют в течение 72 ч.

Характеристика молочнокислых бактерий представлена в таблицах 14, 15.

Таблица 13 – Показатели степени разведения исходного продукта

Наименование продукта	Разведения, используемые для посева
Кисломолочные напитки, закваски жидкие и сухие, творог, сметана	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}
Бактериальные концентраты, бактериальные препараты молочнокислых бактерий	10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11};

Сухие кисломолочные продукты	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8};

Таблица 14 - Характеристика молочнокислых микроорганизмов

Наименование микроорганизмов	Характеристика
Молочнокислые микроорганизмы (за исключением рода Sporolactobacillus идентифицируемого по ГОСТ 10444.3).	Неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки или неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки.
Бактерии рода Lactobacillus	Грамположительные, неспорообразующие короткие или длинные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки
Слизеобразующие рода Leuconostoc	Грамположительные, неспорообразующие, имеющие сферическую или овальную форму, располагающиеся попарно или в цепочках, окруженные капсулой, которая по Граму не окрашивается, неподвижные каталазоотрицательные кокки
Стрептококки группы N рода Streptococcus	Грамположительные, неспорообразующие, располагающиеся в виде коротких и длинных цепочек, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с Рн 9,6 и 6,5% NaCl кокки.
Бактерии рода Pediococcus	Грамположительные, неспорообразующие, располагающиеся парами и тетрадами, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки
Стрептококки рода S. thermophilus	Грамположительные, располагающиеся парами или в виде коротких или длинных цепочек, неподвижные, каталазоотрицаткльные, термофильные, не дающие роста в питательных средах с Рн 9,6 и 6,5% NaCl кокки

Таблица 15 - Характеристика колоний молочнокислых микроорганизмов на агаризованных и характер роста на жидких средах

Микроорганизмы	Питательная среда	Характеристика колоний или характер роста на жидкой среде
Молочнокислые микро-организмы	Бликфельдта жидкая	Изменение цвета среды от фиолетового до желтого, помутнение среды или образование осадка, возможно выделение газа
	Бликфельдта агаризованная, среда из томатного сока	Колонии мелкие гладкие или шероховатые
	Капустный агар	Колонии окружены прозрачной зоной
Молочнокислые бактерии рода Lactobacillus или молочнокислые микрооргнанизмы	Рогоза и МРС агаризованные	Колонии бесцветные диаметром от 1 до 3 мм линзовидной или звездообразной формы
	Рогоза и МРС жидкие	Помутнение среды
Молочнокислые бактерии рода Leuconostoc	Рогоза питательный с сахарозой	Колонии выпуклые, округлые, слизистые. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи
Молочнокислые бактерии рода Streptococcus группы N	Редди	S. lactis образуют колонии белые, мелкие, круглые, вокруг колоний могут быть зоны просветления
		S. cremoris колонии мелкие, желиые, эллипсовидные

Молочнокислые бактерии рода Pediococcus Молочнокислые стрептококки вида S. thermoprilus	Среда Бригс в модификации Шарп Среда Lee	Колонии мелкие гладкие или шероховатые Колонии желтые, круглые или эллипсовидные, вокруг есть зона просветления

Контрольные вопросы:
1 Охарактеризуйте молочнокислые микроорганизмы
2 Дайте характеристику колоний молочнокислых микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах

3.4 МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СУЛЬФИТРЕДУЦИРУЮЩИХ КЛОСТРИДИЙ

Цель: Изучить метод определения Closridium perfringens
Материалы и оборудование: пробирки, чашки Петри, мясо-пептоный бульон, мясо - пептоный агар, агар Вильсом – Блера, бактериологические петли, шпателя.

Метод определения Closridium perfringens основан на выделении С. Perfringens из колоний, полученных при глубинном посеве продукта, его разведения или культуральной жидкости в селективные среды. Принадлежность выделенных колоний к С. Perfringens определяют по морфологическим и биохимическим свойствам. В зависимости от требований нормативно-технической документации подсчитывают количество или учитывают присутствие (отсутствие)
С. Perfringens в исследуемом продукте.

Метод предназначен для:
- установления соответствия микробиологических показателей качества пищевого продукта требованиям нормативно- технической документации;
- исследования продукта по санитарно-эпидемиологическим показаниям;
- анализа микрофлоры посевов (культуральной жидкости), в которых обнаружены мезофильные анаэробные клостридии, при необходимости подтверждения присутствия в посевах С. Perfringens.

В ы д е л е н и е х а р а к т е р н ы х к о л о н и й

Для проведения испытания отбирают объем 0,1см^3 подготовленной пробы продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости. Допускается для получения раздельных колоний проводить посев

культуральной жидкости петлей (штрихом) на поверхность питательной среды. Подготовленную пробу продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости высевают глубинным методом параллельно в две чашки Петри. Посевы заливают агаром Вильсон-Блера. Содержимое чашек Петри быстро, осторожными круговыми движениями перемешивают. После застывания среды чашки подсушивают и заливают той же средой так, чтобы высота слоя питательной среды была не менее 4 мм. Посевы на чашках Петри термостатируют при температуре 37 ^{0}С в течение 18-24 ч. в анаэробных условиях. После окончания термостатирования отбирают те чашки, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Подсчитывают количество выросших характерных колоний. Характеристика колоний C. perfringens на селективных питательных средах приведена в таблице 4..

Корректировку подсчета количества C. perfringens проводят после изучения морфологических и биохимических особенностей микроорганизмов из колоний, характерных для C. Perfringens.

Подтверждение принадлежности характерных колоний к C. perfringens

Для подтверждения принадлежности обнаруженных колоний C.Perfringens отбирают произвольно не менее пяти, характерных для C. perfringens, колоний и пересевают их в жидкую (вязкую) среду для мезофильных анаэробных микроорганизмов. Жидкие (вязкие) среды подготавливают к анализу. Посевы термостатируют при температуре 37 ^{0}С в течение 18-24 ч. Культуральную жидкость используют для изучения морфологических и биохимических свойств микроорганизмов. Если колонии в посевах на чашках Петри растут в виде ковра или среди обнаруженных колоний много нетипичных для C. Perfringens, то мазок из ковра или кажущиеся характерные колонии пересевают, в питательные жидкие (вязкие) среды для мезофильных анаэробов и термостатируют при температуре 37 ^{0}С в течении е 18-24 ч. Полученную культуральную жидкость вновь высевают на чашки Петри так, чтобы получить раздельные колонии, предназначенные для определения культуральных, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов, предположительно относящихся к C. perfringens. Питательные среды, используемые для вторичного посева на чашки Петри, не должны содержать циклосерина. Вторичные посевы термостатируют.

Из посевов готовят препараты, окрашивают их по грамму и микроскопируют. C. Perfringens представляет собой грамположительные палочки размером 0,9 - 1,3 х 3,0 - 9,0 мкм, плохо или необразующие в посевах споры. Палочки с закругленными концами располагаются в одиночку, попарно, в виде цепочек или штакетообразных скоплений. В спороносных палочках спора расположена субтерминально.

Культуры высевают в пробирки с лакмусовым молоком. Посевы инкубируют при температуре 37 ^{0}С в течение 8-12 ч.

C. Perfringens вызывает бурную ферментацию лактозы с образованием газа, редукцию лакмуса, коагуляцию молока с последующим его свертыванием и

образованием губчатого сгустка красновото-сиреневого цвета в верхней части пробирки и просветлением сыворотки. При инкубации посевов при температуре 45 ^{0}С характерную реакцию ферментации молока С. Perfringens вызывают уже через 3-5ч.

Исследуемую культуру высевают бактериологической петлей уколом в полужидкую питательную среду для изучения подвижности и редукции нитратов. Посев термостатируют при температуре 37^0 С в течение 24ч. С. Perfringensнеподвижен, он растет по ходу линии посева, не вызывая помутнения всей среды. После учета подвижности в эту же пробирку вносят реактив на нитраты.Культуры, которые показывают слабую реакцию на нитриты (т.е розовый цвет), не учитывают, так как С. perfringens стойко дает сильную и немедленную реакцию (красный цвет).

Исследуемую культуру высевают бактериологической петлей уколом в питательную среду для определения способности к ферментации лактозы и разжижению желатина. Посев термостатируют при температуре 37 ^{0} С в течение 18-24 ч. О ферментации лактозы свидетельствует желтое окрашивание среды и выделение пузырьков газа в толще среды. После учета ферментации лактозы пробирки с посевом выдерживают при температуре (4±2) ^{0}С в течение 1ч. Если среда вновь не застыла, то это свидетельствует о гидролизе желатина. При сохранении вязкости среды пробирку со средой вновь помещают в термостат с температурой 37 ^{0}С на 24ч. охлаждают при температуре (4±2)^0 С и дают окончательную оценку способности выделенной культуры к гидролизу желатина. С. perfringens ферментирует лактозу, разжижает желатин.

Подвижность, редукцию нитратов, разжижение желатина допускается определять путем посева 6-8 –часовой культуры на среду Роберта. Среду непосредственно перед использованием прогревают 20 мин на кипящей водяной бане, охлаждают до застывания в холодильнике. В подготовленную среду посев проводят уколом. Посевы инкубируют при температуре 37 ^{0}С в течение 24ч после этого посевы помещают на 20 мин в холодильник.

С. Perfringens на среде Роберта образуют прямую (вследствие неподвижности клеток) красную (вследствие редукции нитратов и появлению нитритов) линию, превращая среду в желеобразное состояние и не затвердевающую при температуре 2-4 ^{0}С в холодильнике (вследствие разжижения желатина.) (см. таблицу 16).

Таблица 16 - Характеристика колоний *C. perfringens* на селективных питательных средах

Название питательной среды	Характеристика колоний
1. Агар триптозо-сульфит-циклосериновый или агар сульфит-полимиксин-неомициновый, или Вильсон-Блера.	Колонии черного цвета различной интенсивности окраски, имеющие форму двояковыпуклой линзы, комочка ваты или «самолетика».

2. Сахарный кровяной агар по Цейсслеру с антибиотиками	Колонии зеленеющие на воздухе окружены одной или двумя зонами гемолиза. Одна полупрозрачная зона гемолиза обусловлена действием лецитиназы. При образовании двух зон гемолиза внутренняя прозрачная зона обусловлена действием гемолизинов, а наружная-действием лецитиназы.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИИ CLOSTRIDUM PERFRINGENS

Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений железосульфитсодержащие среды, инкубировании посевов при 37^0 С не более 72 ч., подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов по культуральным, морфологическим и биологическим признакам к сульфитредуцирующим клостридиям.

Метод определения количества сульфитредуцирующих клостридий посевом в агаризованную среду предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г более 150 или в 1 $см^3$ 15 сульфитредуцирующих клостридий, но в 100 $см^3$ более 3 сульфитредуцирующих клостридий. Требования настоящего стандарта являются обязательными.

Определение количества сульфитредуцирующих клостридий

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить в 1 г ($см^3$) предполагаемое количество сульфитредуцирующих клостридий или их количество, указанное в нормативно технической документации на конкретный продукт.

При определении количества спор сульфитредуцирующих клостридий навеску продукта или его исходное разведение перед посевом или приготовлением десятикратных разведением подогревают при температуре 80^0С в течение 20 мин. Для прогрева 50 $см^3$ исходного разведения или жидкого продукта помещают в стерильную колбу вместимостью 100 $см^3$ таким образом, чтобы анализируемая проба не размазывалась по стенкам колбы. Колбу с продуктом или его исходным разведением помещают в предварительно нагретую до 80^0 С водяную баню. При этом уровень находящейся в колбе должен быть на 2-3 см ниже, чем уровень воды в бане. Одновременно в водяную баню помещают контрольную колбу, содержащую 50$см^3$ исходного разведения или продукта и термометр. Время термообработки начинают отсчитывать с того момента, когда содержащееся в колбе исходное разведение или продукт достигнут указанной температуры. После термообработки колбу немедленно охлаждают под струей водопроводной воды.

При определении количества сульфитредуцирующих клостридий по методу НЧВ высеивают три последовательных навески и (или) его разведения,

отличающихся друг от друга по количеству высеваемого продукта в 10 раз. Каждую навеску продукта и (или) его разведение высеивают в пробирки с одной из вязких питательных сред. Соотношение количества высеваемого продукта или его разведения к питательной среде 1:9.

При определении количества сульфитредуцирующих клостридий методом посева в агаризованные среды по 1 $см^3$ навески продукта или его разведения вносят в чашки Петри. Посевы заливают одной из агаризованных сред, после затвердения среды в чашки Петри для образования второго слоя вливают еще 10$см^3$ голодного агара.

Определение присутствия или отсутствия сульфитредуцирующих клостридий

Определение присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий в определенной навески продукта или его эквивалентном разведении эту навеску или разведение вносят в одну из вязких питательных сред. Посевы инкубируют при 37^{0}С не более 72 ч. Посевы на чашках Петри инкубируют в анаэробных условиях. Ежедневно посевы просматривают для обнаружения признаков роста сульфитредуцирующих микроорганизмов – почерненения сульфитной среды. Из посевов в вязкие среды отбирают пробирки с признаками роста отдельными черными колониями или полностью почерневшей питательной средой на глубине свыше 1 $см^3$. Из отобранных пробирок проводят пересевы петлей в чашки Петри на поверхность одной их агаризованных сред, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют в анаэробных условиях при 37^{0}С в течение 24-48 ч. Из посевов на агаризованные среды отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее 5 овальных черных или окруженных черным или серым ореолом колоний диаметром 4-5 мм, высеивают раздельно в свежерегенерированную среду. Посевы инкубируют при 37^{0}С не более 48 ч.

Подтверждение принадлежности выделенных сульфитредуцирующих микроорганизмов к роду Clostridium

Из культур выросших готовят два препарата и окрашивают первый - по Грамму, второй для выявления бактериальных спор. Сульфитредуцирующие клостридии представляют собой грамположительные палочки, располагающиеся в одиночку, попарно, в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. При спорообразовании споры сульфитредуцирующих клостридий овальные или сферические, субтерминальные или терминальные.

Подтверждение анаэробного роста

Подтверждение анаэробного роста проводят посевом культур, выросщих в чашки Петри под стекло. Для посева используют одну из агаризованных питательных сред. Посевы инкубируют в аэробных условиях при 37^{0}С в

течение 18-27 ч. Для сульфитредуцирующих клостридий характерен анаэробный рост.

Допускается взамен подтверждения анаэробного роста проводить определение отсутствия роста в аэробных условиях. При этом культуры высеивают в чашки Петри на поверхность агаризованной среды. Посевы инкубируют в аэробных условиях при 37^0С в течение 18-27 ч.

Контрольные вопросы:

1 Определите принадлежность сульфитредуцирующих микроорганизмов к роду Clostridium?

2 Охарактеризуйте сульфитредуцирующие клостридии?

3 Как дифференцировать характерные колонии клостридий на питательных средах?

4 Как проводят выделение характерных колоний?

3.5 ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВИДОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, КОЛОНИИ КОТОРЫХ МОЖНО ОБНАРУЖИТЬ ПРИ ПОСЕВАХ

Цель: изучить колонии микроорганизмов с целью идентификации их при посеве

Микроорганизмы шаровидной формы

Представители царства прокариот

Отдел *Firmicutes*

Грамположительные кокки

Род Micrococcus **(**микрококки**).** Микрококки встречаются на коже человека и животных, представляя собой нормальную микрофлору наружных покровов, и поэтому могут находиться в воздухе закрытых помещений. Микрококками могут быть обсеменены и предметы обихода, оборудование. Микрококки выделены также из пищевых продуктов. Обычное местообитание этих микроорганизмов – почва и вода, оптимальная температура роста 25 – 37$_0$ С. Микроорганизмы растут при содержании в среде соли 5%, т.е. относятся к галотолерантным. Колонии микроорганизмов на питательной среде - белые или желтоватые, выпуклые, средних размеров, в диаметре 3–4 мм. Микроорганизмы видов *Micrococcus roseus* образуют колонии розового цвета, а *Micrococcus flava* – желтого. При микроскопическом исследовании клетки микрококков выглядят как мелкие, шаровидные, размером 0,5–2,0 мкм в диаметре, располагаются поодиночке и в парах, а также образуют неправильные скопления, тетрады или кубические пакеты, но не располагаются цепочками.

Род Sarcina (сарцины). Микроорганизмы этого рода широко распространены в природе, сапрофиты, встречаются в воздухе, почве, находятся на поверхности злаков, в кишечном тракте млекопитающих. Оптимальная температура роста 30 – 37$_0$ С. На питательной среде *Sarcina flava* дает крупные

колонии (до 4 мм в диаметре) – желтые, бугристые, непрозрачные, матовые. Типовой вид для микроорганизмов этого рода – *Sarcina ventriculi*, изолируемая из кишечного тракта. В препаратах, приготовленных из колоний, расположение кокков напоминает форму пакетов или тюков, состоящих из 8, 16 и более клеток. Это связано с особенностью деления микроорганизмов этого рода – делением их в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Другие представители этого рода – *Sarcina alba, Sarcina rosea.*

Род Staphylococcus (стафилококки). Стафилококки распространены повсеместно, колонизируют кожные покровы и поверхности слизистых оболочек человека и животных. Из 27 описанных к настоящему времени видов 14 видов обнаружены на коже и слизистых человека, температурный оптимум их развития 30 – 370С. Основные виды, обитающие на наружных покровах, относятся к непатогенным (*S. saprophyticus, S. hominis* и др.). Колонии стафилококков круглые, с ровным краем, крупные (4–5 мм). Для патогенных стафилококков типовым видом является золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus),* названный так в связи с продуцируемым им пигментом золотистого цвета. Находясь в воздухе, стафилококки хорошо переносят высушивание, сохраняя при этом свою вирулентность, долго не погибают при прямом воздействии солнечного света (в течение 10-12 ч). Они довольно устойчивы к нагреванию – при температуре 70-800С погибают за 20-30 мин. Стафилококки устойчивы к повышенному содержанию хлорида натрия и хорошо растут на средах с содержанием 5-10% NaCl, поэтому для их культивирования используют солевые среды (молочно-солевую, желточно-солевую). Стафилококки могут находиться не только в воздухе, но и в пищевых продуктах, в воде, в частицах пыли. Стафилококки представляют опасность для человека, так как вызывают многочисленные заболевания. Колонии золотистого стафилококка могут иметь как золотисто-желтый, так и эмалево-белый цвет, непрозрачные, влажные, блестящие. На кровяном агаре дают колонии, вокруг которых образуются зоны гемолиза. В микроскопических препаратах, приготовленных из колоний, микроорганизмы выглядят как сферические клетки диаметром 0,5 – 1,5 мкм, расположены в основном гроздьями, парами или одиночно, что связано с особенностью их деления.

Род Stomatococcus **(**стоматококки**) –** микроорганизмы, входящие в состав микробных ценозов ротовой полости и верхних дыхательных путей человека. В отличие от стафилококков, стоматококки не растут на питательных средах с повышенным содержанием хлорида натрия, а на кровяном агаре не дают зон гемолиза. Они растут в виде белых гладких колоний, трудно снимаемых с поверхности среды.

Род Streptococcus **(**стрептококки) – мелкие (1–2 мм), круглые, прозрачные, сероватого цвета, плоские колонии. Непатогенные виды встречаются в норме на слизистой полости рта и зева человека и животных. Но могут встречаться и стрептококки, паразитирующие на коже и слизистых оболочках млекопитающих. В тканях человека впервые стрептококки были обнаружены

при роже и раневых инфекциях. В мазках из колоний они располагаются парами или короткими цепочками.

Микроорганизмы палочковидной формы

Представители царства прокариот

Отдел *Firmicutes*

Палочковидные микроорганизмы имеют чаще всего цилиндрическую форму с резко обрезанными, заостренными или закругленными концами. Палочковидные формы, не образующие спор, называют бактериями, образующие споры – бациллами. Величина палочковидных бактерий находится в пределах 1-5 мкм в длину и 0,5-1,0 мкм в диаметре, бациллы значительно крупнее. Микроорганизмы палочковидной формы могут быть представлены в воздухе неспоровыми и споровыми организмами, попадающими в воздух с пылью из почвы, с пола.

Грамположительные палочки, образующие эндоспоры

Род Bacillus **(**бациллы**)** – колонии крупные (более 4 мм), непрозрачные, часто с неровным краем, шероховатые или морщинистые. Спорообразующие микроорганизмы.

В цитоплазме бактерий могут быть различные включения и отложения в виде капелек жира и серы, гранул метофосфатов, гликогена, скоплений пигмента. Гликоген и гранулеза являются запасными питательными веществами, относящимися к полисахаридам. Они часто обнаруживаются в клетках масляно-кислых и пектинразлагающих бацилл. Липопротеиновые включения встречаются в клетках *Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, Bacillus mesentericus*.

Кроме описанных микроорганизмов, в воздухе могут находиться споры актиномицетов и грибов, попадающие в него из почвы и пыли.

Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы

Отдел *Firmicutes*

Род Actinomyces **(**актиномицеты**).** Актиномицеты, или лучистые грибки (mycos – гриб, actis – луч), получили свое первоначальное название в связи с тем, что образуют мицелий, напоминая грибы. Сейчас доказано, что актиномицеты представляют собой клетку прокариот, поэтому по современной классификации они отнесены к царству прокариот и не являются грибами. Мицелий актиномицетов отличается от мицелия грибов толщиной нитей (гифов) – они значительно тоньше, чем у грибов. Колонии актиномицетов мелкие (1–2 мм), пушистые, белого цвета или окрашенные в самые различные цвета за счет образования пигментов. Колонии трудно снимаются петлей, так как врастают в среду за счет наличия субстратного мицелия. Имеют приятный фруктовый запах или запах свежевспаханной земли.
Это одноклеточные микроорганизмы, представляющие грифы – нити, 0,5-1,2 мкм в поперечнике и различной длины. Гифы имеют оболочку цитоплазмы со значительным количеством включений и ядерный аппарат.

Некоторые виды актиномицетов не образуют гиф, клетки могут быть палочковидной формы, чаще всего искривлены, с небольшими боковыми выростами, напоминающими ветви (род *Mycobacterium*). Размножение происходит путем распада мицелия на фрагменты – оидии, которые при благоприятных условиях могут дать начало новому мицелию, а также спорами. Споры формируются на ветках воздушного мицелия (спороносцах). Они легко отделяются от мицелия и, попадая на питательный субстрат, быстро прорастают.

Таким образом, по строению клетки, по отношению к краскам и питательным средам актиномицеты сходны с бактериями, а по характеру размножения и прорастания – с низшими грибами. Актиномицеты широко распространены в воздухе, в воде, навозе, и других субстратах. Почвенные актиномицеты преимущественно аэробы (развивающиеся при доступе кислорода воздуха), но бывают и факультативные анаэробы (жизнедеятельность проявляется при отсутствии свободного кислорода). Оптимальная температура для развития актиномицетов 23-37^{0}С.

Представители эукариот

Царство грибов

Микроскопические грибы – обширная группа эукариотических микроорганизмов, характеризующаяся следующими основными признаками: колонии крупные, занимающие почти всю чашку, с высоким пушистым мицелием белого, черного или зеленого цвета в зависимости от вида гриба. Легко снимаются бактериологической петлей, так как имеют воздушный мицелий. На воздушном мицелии обычно образуются органы плодоношения грибов. Попадание спор в продукты или корма приводит к развитию в них грибов, продуцирующих токсины, в результате чего может развиться тяжелое отравление, носящее общее название микотоксикоз.

Род Aspergillus. Для них типично бесполое размножение экзоспорами. Споры черного цвета. Представители этого рода в норме находятся в почве, где играют большую роль в разложении органических остатков и образовании почвенного гумуса, так как продуцируют сильные ферменты. Отдельные виды их могут вызывать аспергиллез дыхательных путей, глаз, уха, пищеварительного тракта и общее поражение у людей, сельскохозяйственных животных и птиц. Отдельные виды продуцируют сильнейшие токсины (афлатоксин и др.).

Род Penicillium имеет многоклеточный мицелий. Виды этого рода широко распространены в природе. Развиваясь на фруктах, овощах, продуктах, кожах, книгах, вызывают их порчу; отдельные виды являются патогенными для людей и животных, поражая кожу, ногти, дыхательные пути и другие органы, а некоторые виды используются для промышленного производства пенициллина.

Род Mucor характеризуется одноклеточным строением мицелия и органами размножения в виде спорангиеносцев. Спорангиеносцы неветвящиеся, отрастают от грибницы. Спорангии, сидящие на их верхушках, крупные,шарообразные, с массой спор. Этот род грибов широко распространен в природе. На продуктах растет в виде поверхностной тонкой пленки сероватого пушистого налета.

Патогенные кокки

Стафилококки. В этой обширной группе микроорганизмов встречаются как сапрофиты, обитающие в окружающей среде, так и патогенные виды. Стафилококки — это небольшие круглые клетки, после деления располагаются в мазках одиночно, парами или в виде гроздьев винограда. Сапрофитные стафилококки являются нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек человека. Для патогенных видов типовым является золотистый стафилококк. Известно более 100 клинических форм проявлений стафилококковых инфекций. Стафилококки способны поражать практически любые ткани и органы. Среди патогенных микроорганизмов стафилококки наиболее устойчивы в окружающей среде. Они хорошо переносят высушивание, замораживание. При попадании *Staphylococcus aureus* в пищевые продукты микроорганизмы размножаются и продуцируют энтеротоксин, вызывающий пищевую интоксикацию.

Стрептококки. Этот род представлен более 20 видами бактерий, среди которых встречаются как патогенные, так и представители нормальной микрофлоры человека. Стрептококки — это мелкие шаровидные клетки, в мазках располагаются парами или цепочками. В окружающей среде — в пыли, на различных предметах сохраняются долго. Основным механизмом передачи стрептококковой инфекции является контактно-бытовой. Также возбудители могут передаваться воздушно-капельным путём. Стрептококки вызывают у человека многие болезни: скарлатину (заражение происходит воздушно-капельным путём, характеризуется появлением высыпаний на шее и верхней части грудной клетки), ангину, ревматизм и др.

Менингококки. Возбудители менингококковой инфекции — мелкие диплококки, в мазках напоминают кофейные зёрна. Во внешней среде быстро погибают. Основной источник менингококковой инфекции – больной человек или бактерионоситель. Возбудитель передаётся воздушно-капельным путём. Менингит начинается остро. Отмечается высокая температура, рвота, судороги, очень сильная головная боль. Последствия менингита остаются, как правило, на всю жизнь.

Возбудители дифтерии. Коринобактерии дифтерии — это прямые или слегка изогнутые палочки. Спор не образуют, жгутиков не имеют, имеют микрокапсулу. Возбудители дифтерии достаточно устойчивы к различным факторам внешней среды. При комнатной температуре на различных предметах могут сохраняться от 1 до 2 мес. Наиболее восприимчивы к дифтерии дети от 1 до 7 лет. Заболевание начинается с повышения температуры тела, боли при глотании, появлении плёнки на миндалинах. Профилактика обеспечи-

вается путём ранней диагностики, своевременного выявления больных и их госпитализации, а также прививки.

Возбудители коклюша. Возбудители коклюша — мелкие палочки овальной формы. Во внешней среде не устойчивы. На солнечном свету погибают через час. Заражение коклюшем происходит через дыхательные пути. При коклюше у больного появляются приступы спазматического кашля, доводящего до рвоты, посинения, остановки дыхания. Таких приступов может быть 5–40 в сутки.

ВИРУСЫ В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ И ИХ ЭПИДЕМИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

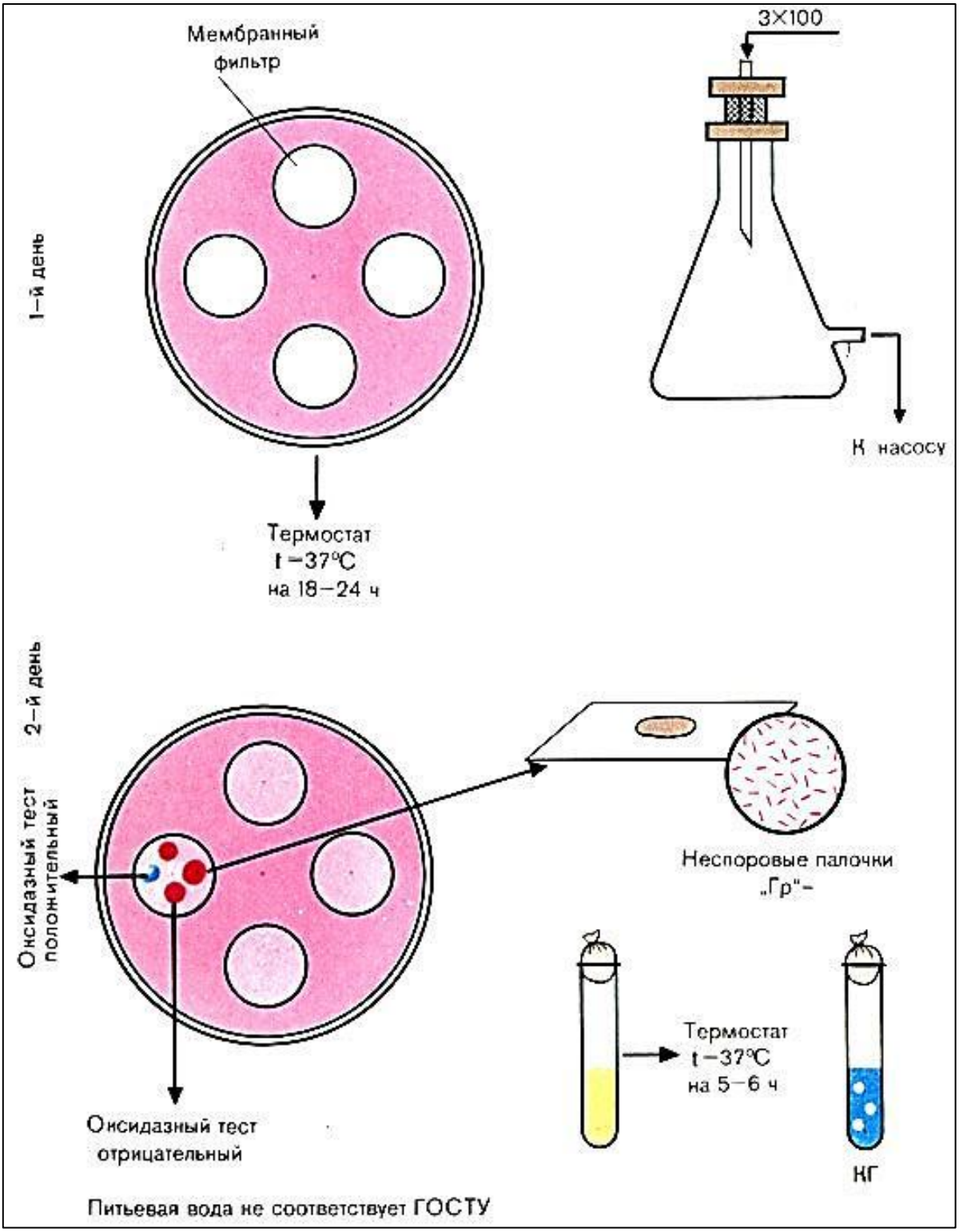
К вирусным инфекциям, для которых характерен воздушно-капельный механизм передачи, относится более полутора десятка нозологических форм. Среди них на первом месте стоят острые инфекции дыхательных путей, вызываемые респираторными вирусами (ОРВИ). Основным источником загрязнения воздушной среды респираторными вирусами являются люди — больные или вирусоносители. При ОРВИ возбудители размножаются и накапливаются в ворсинчатом эпителии слизистой оболочки дыхательных путей. При кашле, чиханье или разговоре больных вирусные частицы с каплями слюны, слизи или мокроты попадают в воздушную среду, где образуется дисперсная система — аэрозоль. Крупные капли аэрозоля (от 100 до 2000 нм) быстро оседают на поверхность окружающих предметов, и если вирионы, находящиеся в каплях аэрозоля, не попадут в организм восприимчивых лиц, то они могут потерять свое инфицирующее, эпидемическое значение. Однако осевшие крупные капли высыхают, образуется пыль, которая при определенных условиях поднимается в воздушную среду, образуя так называемую пылевую фазу аэрозоля. В этих частицах в воздухе находятся и вирусы. Мелкие капли (размером менее 100 нм) в течение нескольких секунд высыхают, образуя устойчивую аэродисперсную систему — капельные ядрышки, способные в течение длительного времени оставаться во взвешенном состоянии и переноситься воздушными потоками на значительные расстояния.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

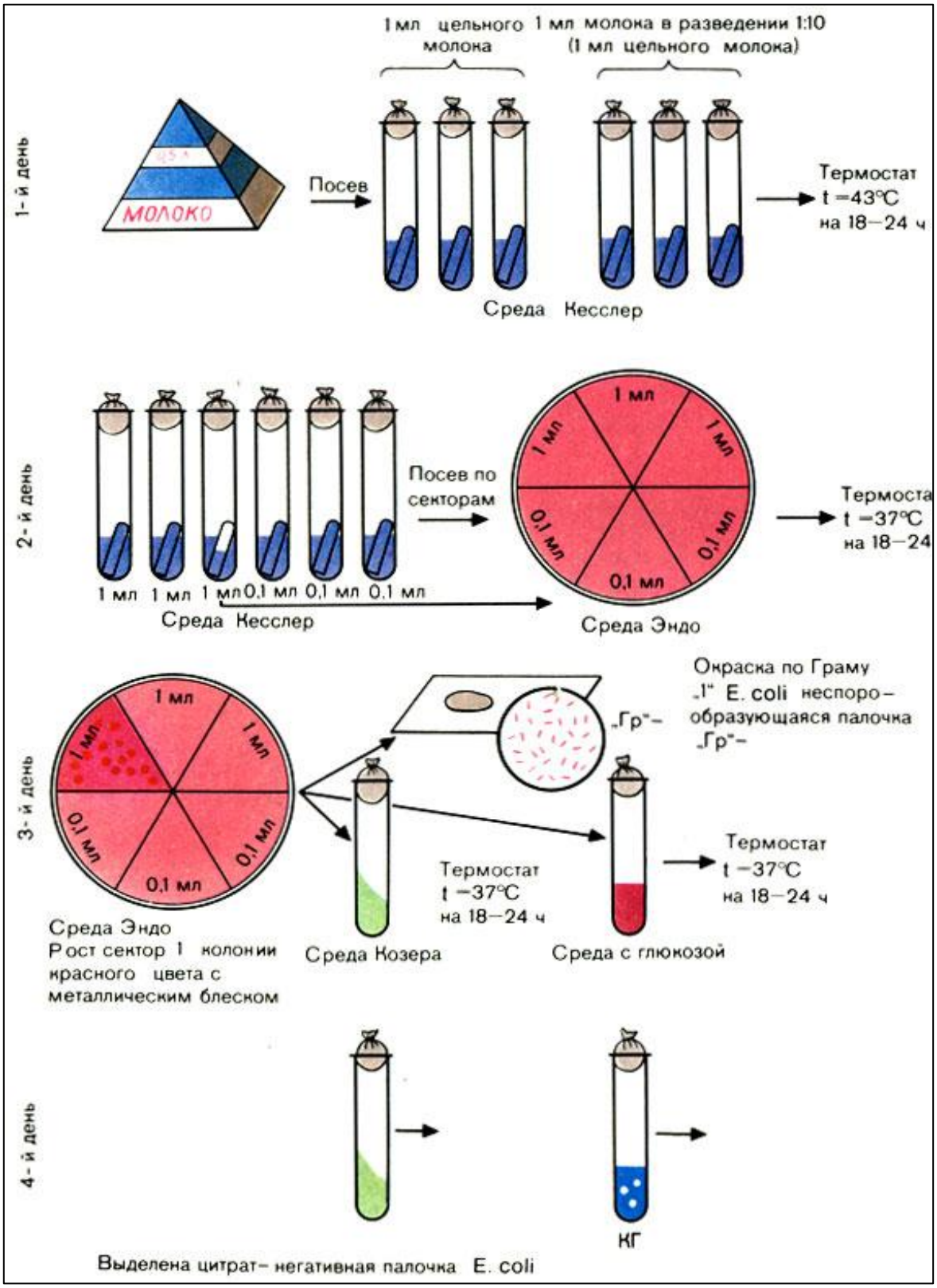
1. Булашов А.К., Гершун В.И., Туякова Р.К. Санитарная микробиология. Астана, каз. гос. агроуниверситет, 2007 г.
2. Толысбаев Б.Т. Большой практикум по ветеринарной и санитарной микробиологии. – Алматы, 2008. – 300с.
3. Никитина Е. В., Киямова С. Н. Микробиология – СПб.: «ГиоРд», 2008. – 361с.
4. Ильященко Н.Г. Микробиология пищевых производств. - М.: Колос, 2008. – 413 с.
5. Жарикова Г.Г. Микробиология продовольственных товаров: санитария и гигиена. – М.: Академия, 2007. – 304с.
6. Нетрусов А.И. Микробиология.- М.: «Академия», 2006г. – 351 с.
7. Сидоренко О. Д. Микробиология. - М.: ИНФА-М, 2009г. – 287 с.
8. Вольпе И.М., Кучеренко В.Д. Практическое руководство по санитарной микробиологии – М.: МГУ, 1970. – 180 с.
9. Клевакин В.М., Карцев В.В. Санитарная микробиология пищевых продуктов. – Л. Медицина, 1986. – 200 с.
10. Кочемасова З.Н. и соавт. Санитарная микробиология и вирусология. – М.: Медицина, 1987.– 304 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А - Бактериологическое исследование воды



Приложение В - Бактериологическое исследование молока и молочных продуктов



Приложение С

Правильные ответы на тестовые вопросы:

1 – в, г;
2 – б;
3 – а, в, д;
4 – г;
5 – б;
6 – а;
7 – в;
8 – в;
9 – б, в;
10 – б, г;
11 – б;
12 – в;
13 – г.

Ответы по теме «Санитарно-бактериологическое исследование пищевых продуктов»:

1 – A;
2 – A;
3 – E;
4 – C;
5 – B;
6 – D;
7 – D;
8 – A;
9 – A;
10 – B;
11 – A;
12 – A;
13 – B.