МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології

Кафедра зоогігієни та ветеринарії

САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до практичних занять та самостійної роботи студентів зі спеціальностей 7.18010001 та 8.18010001 – «Якість, стандартизація та сертифікація»

Миколаїв
2015

УДК 579.63:619.

ББК 48.41

С 18

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 26 11.2015 р., протокол № 3.

Укладачі:

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогігієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;

В. А. Кириченко – канд. с-г наук, доцент кафедри зоогігієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

І. В. Наконечний – д-р біол. наук, професор, завідувач кафедри екології, Миколаївський національний університет ім. В. О. Сухомлинського.

С. С. Крамаренко – д-р біол. наук, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Відповідальний за випуск:

С. П. Кот – канд. біол. наук, завідувач кафедри зоогігієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

© Миколаївський національний аграрний університет, 2015.

ЗМІСТ

Вступ	4
Заняття № 1. Мікробіологічна лабораторія. Предмет, завдання і загальні поняття санітарної мікробіології	5
Заняття № 2. Санітарно-мікробіологічний контроль повітря	16
Заняття № 3. Санітарно-мікробіологічний контроль грунту	25
Заняття № 4. Санітарно-бактеріологічний контроль змиву з одягу, рук, інвентаря, обладнання	36
Заняття № 5. Санітарно-мікробіологічне дослідження молока	41
Заняття № 6. Санітарно-мікробіологічне дослідження м'яса	50
Додаток 1	54
Додаток 2	56
Додаток 3	57
Список використаної літератури	58

ВСТУП

Мета даних методичних рекомендацій – сприяти розвитку і вдосконаленню практичних навичок у студентів при проведенні санітарно-мікробіологічної оцінки об'єктів (повітря, вода, ґрунт, обладнання, руки і т.п). При цьому передбачається, що вони будуть служити додатковим матеріалом при розгляді теоретичних питань з дисципліни «Санітарна мікробіологія»,

Методичні рекомендації складаються з основної частини та додатків. В основній частині розглядаються загальноприйняті методи санітарно-мікробіологічного контролю повітря, води, ґрунту, обладнання, молока, м'яса що дають повне уявлення про можливості контролю даних об'єктів з точки зору їх безпеки для здоров'я населення. Пропонуються завдання для виконання лабораторних робіт, що закріплюють методичний матеріал і дозволяють набути навички з санітарно-мікробіологічної оцінки об'єктів зовнішнього середовища. Для контролю засвоєння кожної теми пропонуються питання для самоперевірки.

Заняття № 1. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ. ПРЕДМЕТ, ЗАВДАННЯ І ЗАГАЛЬНІ ПОНЯТТЯ САНІТАРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

Вимоги до мікробіологічних лабораторій

Лабораторні заняття з курсу «Санітарна мікробіологія», проводяться в навчальній лабораторії, яка призначена для підготовки і проведення різних мікробіологічних досліджень. Обладнання та техніка проведення робіт у навчальній лабораторії повинні відповідати вимогам, що пред'являються до виробничих та інших лабораторій відповідного профілю.

До складу навчальної лабораторії входять: кімната для досліджень; автоклавна (стерилізаційна); мийна, обладнана для миття посуду; препараторська, де проводять підготовку лабораторного посуду і зберігають поживні середовища; матеріальна кімната, в якій зберігають запаси реактивів, посуд, апаратуру, прилади, господарський інвентар. Для проведення посівів, стерильного розливання середовищ та інших робіт з дотриманням правил асептики в приміщенні для досліджень влаштовують засклений бокс з передбоксником.

За кожним студентом в лабораторії закріплюють окреме робоче місце, на якому розміщують мікроскоп, імерсійну олію. На столику для фарбування розміщують штатив з бактеріологічною петлею і стерильною водою; пальник спиртовий; набір фарбувальних розчинів та реактивів для фарбування препаратів мікроорганізмів; предметні і покривні скельця; зливну чашку з містком для фарбування мазків; промивалку з водопровідною водою і посудину з дезинфікуючим розчином; вату і фланелеві серветки; олівці по склу; годинник; сірники та ін.

Робочі столи повинні бути завжди чистими, а використовувані для роботи предмети – акуратно розкладені або розставлені по місцях.

Правила роботи, поведінки і техніка безпеки в мікробіологічній лабораторії

При роботі в навчальних лабораторіях необхідно враховувати те, що об'єктом дослідження є мікроорганізми, які при невмілому поводженні з ними можуть викликати хвороби у людини. У зв'язку з цим матеріали і культури мікроорганізмів, які використовуються для навчальних занять, повинні розглядатися як потенційно небезпечні. Тому співробітники та студенти, які працюють в лабораторіях зобов'язані знати і дотримуватися правил, що забезпечують запобігання обсіменіння об'єктів зовнішнього середовища мікроорганізмами і особисту безпеку працюючого. На заняттях необхідно дотримуватися таких вимог:

- ✓ працювати в лабораторії дозволяється тільки в спеціальному одязі - халаті, шапочці або косинці. Причому халат повинен бути застебнутий на всі ґудзики, а волосся прибране під головний убір. Виходити за межі лабораторії в спецодязі, виносити з лабораторії пробірки з культурами, препарати (мазки) та інші предмети

категорично забороняється. У лабораторію не можна вносити сторонні речі. Книги, портфелі та інші необхідні для заняття предмети складають на окремий, спеціально відведений для цих цілей стіл;

- ✓ в лабораторії забороняється палити, приймати їжу і воду;
- ✓ студенти приступають до роботи тільки з дозволу викладача і всю роботу проводять у суворій відповідності з досліджуваною тематикою;
- ✓ використані піпетки, предметні і покривні скельця, шпателі, ватні тампони та інше поміщають у посуд з дезинфікуючою рідиною (1% - вий розчин хлораміну та ін.). Пінцети, бактеріологічні петлі, препарувальні голки та інші дрібні металеві предмети після контакту з культурою стерилізують шляхом прожарювання в полум'ї пальника і тільки після цього поміщають в штатив або банку. ***Категорично забороняється*** залишати зазначені предмети нестерилізованими і розкиданими по столу;
- ✓ відпрацьовані культури мікроорганізмів, а також інші забруднені матеріали і предмети за вказівкою лаборанта складають на спеціально відведений для цих цілей стіл або в спеціальні бюкси і потім стерилізують в автоклавах;
- ✓ у випадках, коли культура мікроорганізмів потрапляє на стіл та інші предмети, необхідно за допомогою ватного тампона, змоченого дезрозчином, зібрати її, а забруднене місце ретельно обробити дезинфікуючим розчином;
- ✓ студенти не повинні включати електроприлади і апаратуру без контролю викладача або лаборанта. Не можна торкатися металевими та іншими предметами проводів і контактних частин електромережі;
- ✓ кожен студент зобов'язаний дотримуватися охайності в роботі, тримати в чистоті робоче місце та обладнання;
- ✓ по закінченню заняття студенти здають бактеріальні культури і всі матеріали викладачеві, під контролем прибирають робочі місця, після чого черговий здає лабораторію лаборанту;
- ✓ перед виходом з лабораторії студенти знімають халати, руки обробляють дезинфікуючим розчином і ретельно їх миють.

З правилами студенти знайомляться на першому занятті, про що кожен з них розписується у спеціальному журналі з техніки безпеки.

Предмет і завдання санітарної мікробіології

Санітарна мікробіологія– наука, що вивчає мікрофлору навколишнього середовища (в тому числі патогенні бактерії і віруси), її життєдіяльність і процеси які вона викликає, які можуть безпосередньо чи опосередковано спричинити несприятливий вплив на навколишнє середовище та здоров'я людей.

Початком розвитку санітарної мікробіології як науки прийнято вважати 1888 рік, коли вперше французький лікар Е. Масе запропонував враховувати наявність

кишкової палички в якості показника фекального забруднення води. Як наука, санітарна мікробіологія базується на основних положеннях мікробіології, гігієни та епідеміології, постійно розробляючи методи контролю за санітарним станом води, ґрунту, харчових продуктів і предметів побуту.

Результати досліджень в області санітарної мікробіології використовуються в першу чергу в профілактичній та лікувальній медицині, а також практично у всіх галузях народного господарства. У зв'язку з цим перед санітарною мікробіологією стоять такі ***завдання***:

- *розробка*, вдосконалення методів дослідження об'єктів навколишнього середовища – води, повітря, ґрунту, харчових продуктів, предметів побуту і т.д. При цьому використовуються останні досягнення природничих наук;
- *оцінка* шляхів впливу людини і тварин на навколишнє середовище. В результаті суспільної й індивідуальної діяльності людей відбувається контамінація об'єктів довкілля патогенними мікроорганізмами, при цьому особлива увага приділяється вивченню порушень процесів самоочищення води, ґрунту. Знання законів розвитку живої матерії біосфери дозволяє оцінювати можливості самоочищення об'єктів навколишнього середовища (грунту, води), створювати методи активного втручання людини в процеси, що відбуваються в природі, з метою її збереження та оздоровлення;
- *розробка* нормативних документів, що визначають відповідність мікрофлори об'єктів навколишнього середовища гігієнічним вимогам, у тому числі характеристику за мікробіологічними показниками;
- *розробка* рекомендацій і заходів щодо оздоровлення об'єктів навколишнього середовища, контроль за їх виконанням.
- *охорона* навколишнього середовища. Це завдання є одним з головних, тому на основі закономірностей взаємодії людини з факторами навколишнього середовища, розробляються науково обґрунтовані рекомендації по збереженню здоров'я людини.

Загальні поняття санітарної мікробіології

Патогенність – здатність мікроорганізмів викликати захворювання. Цей принцип є властивістю виду. Наприклад, *Corynebacterium diphtheriae* (мікроорганізми, що викликають захворювання на дифтерію) вважаються патогенними для людини, проте окремі штами цього виду можуть сильно відрізнятися за ступенем патогенності (вірулентності). Отже, *вірулентність* – ознака штаму, а не виду. Тому можна говорити про високо-, низько- і навіть авірулентні штами певного виду. Вірулентність мікроорганізмів визначається двома факторами: *інвазивністю*, тобто здатністю розмножуватися в організмі господаря, і *токсигенністю*, тобто здатністю утворювати токсини – речовини, що ушкоджують органи (тканини) господаря. Деякі види патогенних мікроорганізмів ушкоджують

макроорганізм за допомогою непрямого механізму, що вступив в дію за умови попереднього контакту з тим же збудником. Це явище називається підвищеною чутливістю, або алергією. У цьому випадку відбувається імунна реакція чутливого господаря на компонент клітини паразита.

Токсигенність. Вперше це явище спостерігали дослідники в кінці XIX століття, працюючи з мікроорганізмами *Clostridium tetani* (збудник правця) і *Corynebacterium diphtheriae*. Фільтрати, звільнені від клітин мікроорганізмів, вводили дослідним тваринам. При розтині загиблих тварин виявлялися симптоми, характерні для відповідної інфекційної хвороби. Як з'ясувалося пізніше, не всі безклітинні фільтрати патогенних мікроорганізмів були токсичними, це дозволило припускати екзогенну і ендогенну природу бактеріальних токсинів.

Дослідження структури токсинів і їх локалізації стало можливим лише з розвитком хімічної та біологічної наук. Однак навіть в даний час ці дослідження часто бувають ускладнені внаслідок відмінності умов і кінцевих результатів культивування клітин *in vivo* та *in vitro*, а також зважаючи на складність підбору системи для культивування збудника тієї чи іншої хвороби. Наприклад, токсичні речовини збудників сибірки (*Bacillus anthracis*) і чуми (*Yersinia pestis*) – це комплекси двох або більше речовин, які не мають токсичної дії як в ізольованому стані, так і поза організмом-господаря. Наприклад, токсин збудника холери (*Vibrio cholerae*) був виявлений тільки при введенні фільтратів культури в ізольовану петлю кишечнику кролика.

Як правило, екзотоксини – речовини білкової природи, а ендотоксини – комплекси ліпополісахаридів з білками, що знаходяться в зовнішніх шарах клітинних стінок (для Грам (-) мікроорганізмів).

Патогенні мікроорганізми потрапляють у навколишнє середовище з виділеннями хворих людей і тварин, носіїв відповідних інфекцій, а також з трупами загиблих від інфекційних захворювань. Патогенні мікроорганізми можуть передаватися від одного господаря іншому, цей процес називається *інфекцією,* а при виникненні патологічного процесу – інфекційним захворюванням.

Хвороботворні мікроорганізми проникають в організм господаря різними шляхами:

- з їжею або водою;
- повітряно-крапельним шляхом;
- шляхом прямого контакту з хворим (носієм інфекції);
- через укус будь-якого носія інфекції;
- в результаті попадання на пошкоджені ділянки шкіри.

Безпосередньо виявлення збудників інфекційних хвороб в об'єктах довкілля (незважаючи на те, що в даний час розроблені методи прямого, прискореного та кількісного їх визначення) має цілий ряд труднощів. До них належать такі:

- патогенні мікроорганізми знаходяться в навколишньому середовищі не постійно – порівняно легко їх можна виявити в період епідемії тієї чи іншої інфекції, але дуже важко – в міжепідемічні періоди. Основна ж діяльність санітарних мікробіологів спрямована на попередження виникнення епідемій і тому вся робота ведеться в міжепідемічні періоди;
- концентрація патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі значно поступається непатогенним і розповсюдження їх в об'єктах нерівномірне;
- при виділенні патогенних мікроорганізмів методами культивування на живильні середовища, навіть інгібіторні, вони неминуче страждають від конкуренції сапрофітної флори.

У зв'язку з вищевикладеним очевидно, що отримання негативних результатів прямого визначення патогенних мікроорганізмів в об'єктах довкілля ще не вказує з достовірністю на їх відсутність.

В якості непрямих показників забруднення об'єктів навколишнього середовища використовують показники їх загального обсіменіння (КМАФАнМ – кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів) і наявність в них мікроорганізмів-коменсалів (сапрофітних мікроорганізмів) ссавців. Мікроорганізми-сапрофіти постійно мешкають в кишечнику або у верхньому відділі дихальних шляхів людини і тварин, багато з них відносяться до умовно-патогенної мікрофлори, тобто можуть проявляти свої патогенні властивості тільки за певних умов. Такі мікроорганізми називаються *санітарно-показовими*.

Основні вимоги до санітарно-показових мікроорганізмів, наступні:

1) постійне проживання в природних порожнинах організму людини і тварин (які є їх єдиним природним середовищем проживання – біотопом) і виділення їх у великій кількості в навколишнє середовище;
2) тривалість виживання їх у навколишньому середовищі повинна бути такою ж або більшою, ніж патогенних мікроорганізмів, виведених з організму тими ж шляхами;
3) не повинні розмножуватися в довкіллі;
4) не повинні значно змінювати свої біологічні властивості при попаданні в навколишнє середовище;
5) мають бути досить типовими, з тим, щоб їх диференційна діагностика здійснювалася без особливих зусиль;
6) індикація, ідентифікація та кількісний облік повинні проводитися сучасними, простими, легко доступними та економічними мікробіологічними методами.

Знаходячи в досліджуваному матеріалі представників мікрофлори порожнини рота, роблять висновок про попадання слизу з дихальних шляхів, у якій можуть міститися і збудники дифтерії, скарлатини, туберкульозу та інших інфекційних хвороб дихальних шляхів. До сапрофітних мікроорганізмів слизових оболонок

верхніх дихальних шляхів (що є санітарно-показовими мікроорганізмами) відносяться зеленящий стрептокок *Streptococcus viridans*, гемолітичний стрептокок *Streptococcus haemolyticus*, в окремих випадках стафілокок – *Staphylococcus pyogenes* (aureus).

Виявляючи в об'єктах довкілля представників мікрофлори кишечнику, роблять висновок про фекальне забруднення і можливу небезпеку присутності черевнотифозних, дизентерійних паличок, сальмонел та інших збудників кишкових інфекцій. З постійних мешканців кишечнику в якості санітарно-показових мікроорганізмів прийняті наступні: БГКП (бактерії групи кишкових паличок), ентерококи (*Enterococcus, Str. faecalis, Str. faecium*), сульфітредукуючі анаероби переважно *Clostridium perfringens*, бактерії групи *Proteus*, кишкові бактеріофаги. Причому, санітарно-показове значення бактеріофагів особливо зросло останнім часом у зв'язку зі спалахами вірусних захворювань, а в деяких країнах фаговий тест є обов'язковим при санітарно-мікробіологічному дослідженні води.

Принципи санітарно-мікробіологічних досліджень

Принципи, якими керуються мікробіологи при санітарно-мікробіологічних дослідженнях, виходять з основного завдання, визначення можливості присутності в досліджуваному об'єкті патогенних мікроорганізмів або токсинів, що утворюються при їх життєдіяльності, а також виявлення та оцінка ступеня псування досліджуваного об'єкта (особливо харчових продуктів). Ці принципи можна охарактеризувати наступним чином:

1. *Правильне взяття проб* для санітарно-мікробіологічних досліджень з дотриманням всіх необхідних умов, регламентованих для кожного досліджуваного об'єкта, і правил стерильності. Помилки, допущені при взятті проб, призводять до отримання неправильних результатів, і виправити їх вже не можна. При упаковці і транспортуванні проб необхідно створювати такі умови, щоб не допустити загибелі або розмноження вихідної мікрофлори в досліджуваному об'єкті. Збереження матеріалу допускається лише в умовах холодильника і не більше 6-8 год. Кожна проба супроводжується документом, в якому вказують назву досліджуваного матеріалу, номер проби, час, місце взяття, характеристику об'єкта, підпис особи, яка взяла пробу.
2. *Проведення серійних аналізів*. Цей принцип виходить з особливостей досліджуваних об'єктів. Як правило, вода, ґрунт, повітря та інші об'єкти містять різноманітні мікроорганізми, розподіл яких нерівномірний, до того ж мікроорганізми, перебуваючи в біоценотичних відносинах, піддаються взаємному впливу, що веде до загибелі одних і активного розмноження інших. Тому беруть серію проб з різних ділянок досліджуваного об'єкта, по можливості більшу кількість проб, що дозволить отримати більш достовірну характеристику об'єкта. Доставлені

в лабораторію проби змішують, потім точно відміряють необхідну кількість матеріалу – середнє по відношенню до досліджуваного матеріалу в цілому.

3. *Повторне взяття проб*. Дана операція необхідна для отримання порівнянних результатів. Це пов'язано насамперед з тим, що досліджувані об'єкти дуже динамічні (вода, повітря тощо), змінюваність мікрофлори в них в часі і просторі дуже велика. Патогенні мікроорганізми потрапляють у навколишнє середовище, як правило, в невеликій кількості, до того ж і розподіляються в ній нерівномірно. Тому повторне взяття проб дозволяє більш точно визначити біологічну контамінацію об'єктів навколишнього середовища.

4. *Застосування стандартних методів* дослідження, затверджених відповідними ДСТУ та інструкціями, що дає можливість в різних лабораторіях отримувати порівнянні результати.

5. *Використання одночасно комплексу тестів* для отримання різнобічної санітарно-мікробіологічної характеристики. Застосовують *прямий метод* виявлення патогенних мікроорганізмів і *непрямий*, що дозволяє мати уяву про забруднення об'єктів навколишнього середовища виділеннями людини і тварин і його ступеня. До непрямих тестів відноситься визначення загального мікробного числа, кількісного та якісного складу санітарно-показових мікроорганізмів. Застосування непрямих методів оцінки потенційної можливості забруднення об'єктів навколишнього середовища патогенними мікроорганізмами, використання обхідного шляху для вивчення обсіменіння матеріалів, є особливістю санітарно-мікробіологічних досліджень.

6. *Проведення оцінки досліджуваних об'єктів за сукупністю отриманих результатів* при використанні санітарно-мікробіологічних тестів з урахуванням інших гігієнічних показників, зазначених у відповідних ДСТУ і нормативах (органолептичних, хімічних, фізичних і т. д.). Завжди необхідно враховувати, що розвиток мікробів тісно пов'язаний з іншими факторами навколишнього середовища, які можуть мати як сприятливий, так і несприятливий вплив, посилюючи або обмежуючи можливості розмноження патогенних мікроорганізмів та накопичення їх токсинів. Слід враховувати і те, що майже будь-який об'єкт дослідження має власну мікрофлору, яка викликає специфічні біохімічні процеси, і ті зміни в об'єктах, які обумовлені сторонніми мікроорганізмами. Кваліфікований мікробіолог повинен добре знати хід біохімічних процесів, що відбувається в нормі в досліджуваному об'єкті (грунт, вода), технологію виробництва, вміти визначити характер шкідливого впливу мікробів які потрапили, можливі наслідки такого впливу і рекомендувати конкретні заходи щодо їх попередження.

7. *Відповідальність фахівців за точність обґрунтування висновків і заключних висновків* про стан досліджуваних об'єктів. При санітарно-мікробіологічному дослідженні виявляється ступінь псування харчових продуктів (або інших об'єктів),

придатність їх до вживання, можлива небезпека для здоров'я населення. Заборона використовувати харчові продукти, воду водоймищ тощо, закриття підприємства через санітарне неблагополуччя наносять певний економічний збиток. Відповідальність за таке рішення несе лікар санітарної служби.

З метою запобігання попадання і розвитку патогенних мікроорганізмів на харчові продукти на підприємствах харчової та переробної промисловості, громадського харчування постійно проводять санітарно-мікробіологічний контроль всіх об'єктів, що контактують з продукцією – повітря, води, обладнання, тари, пакувальних матеріалів, рук обслуговуючого персоналу, а також безпосередніх джерел обсіменіння продукції – сировини, допоміжних матеріалів.

Загальна характеристика методів санітарно-мікробіологічних досліджень

При організації планового санітарно-мікробіологічного контролю на підприємствах харчового профілю використовують, насамперед, непрямі методи визначення присутності патогенних мікроорганізмів. При цьому для оцінки санітарного стану об'єктів навколишнього середовища використовують кількісні та якісні мікробіологічні показники.

Кількісні показники характеризують ступінь обсіменіння даного об'єкта мікроорганізмами, тобто загальне мікробне число в одиниці ваги (обсягу) – зазвичай в 1г (1см^3). Існує два методи визначення мікробного обсіменіння: метод прямого підрахунку і метод кількісного посіву проб досліджуваного матеріалу або його розведень на поживні середовища.

Прямий підрахунок мікроорганізмів у досліджуваному об'єкті проводиться під мікроскопом в розрахункових камерах Горяєва або в камерах, спеціально сконструйованих для рахунку бактерій. Попередньо пробу досліджуваного об'єкта піддають обробці, щоб отримати гомогенну суспензію. Для кращого обліку бактерій в досліджувану суспензію додають барвник, найчастіше еритрозин. Можна проводити прямий підрахунок і на мембранних фільтрах, через які пропускають досліджувану рідину або суспензію.

Метод прямого підрахунку застосовується в екстрених випадках, коли необхідно терміново дати відповідь про кількісний вміст бактерій, наприклад, при аваріях в системі водопостачання, при оцінці ефективності роботи очисних споруд і т. п. Метод прямого підрахунку здається простим і зручним, проте він має ряд істотних недоліків, що знижують його цінність і через це досить рідко використовується. Істотним недоліком його є неможливість підрахувати бактерії, коли утворюються їх скупчення або коли вони «прилипають» до часток досліджуваного субстрату, не вдається підрахувати дрібні мікроорганізми, не кажучи вже про віруси. І нарешті, метод прямого підрахунку не дає можливості відрізнити живі мікроорганізми від загиблих. Створення автоматичних приладів для

реєстрації загального мікробного обсіменіння, таких як фотоелектричні і електронні лічильники, робить метод прямого підрахунку більш перспективним.

Метод кількісного посіву досліджуваного матеріалу на щільні поживні середовища застосовується найбільш часто. З приготованих серійних десятикратних розведень досліджуваної рідини або суспензії по 1 мл переносять у стерильні чашки Петрі (починаючи з більшого розведення, кожне розведення окремою піпеткою) і заливають розплавленим і охолодженим до 45-50 °С м'ясопептонним агаром – МПА (глибинний посів). Для рівномірного змішування чашки злегка рухають по поверхні столу і після застигання агару поміщають в термостат.

Після інкубації підраховують число виросших колоній і з урахуванням розведення вираховують число життєздатних мікробів в одиниці об'єму досліджуваного об'єкта. Якщо посіви вирощували при 30 °С, то показником загального обсіменіння досліджуваного матеріалу є КМАФАнМ (або МАФАнМ). КМАФАнМ не визначають тільки у продуктах, при виробництві яких використовують заквасочні культури. Залежно від виду продукту і способу його виробництва цей показник може свідчити про загальний санітарно-епідеміологічний стан продукту, свіжості або початковій стадії псування зовні доброякісного продукту, хоча в багатьох випадках метод вважається приблизним через неможливість виявити всі мікроорганізми в об'єкті на одному живильному середовищі, тому їх фізіолого-біохімічні властивості різні. Крім того, режим інкубації також не відповідає вимогам всіх мікроорганізмів в асоціації, не дають росту мікроби, що знаходяться в грудочках досліджуваного об'єкта, а якщо і спостерігається ріст колоній, то, можливо, не з однієї особини. Нарешті, частина мікроорганізмів втрачає здатність до розмноження в силу антагонізму, конкуренції та інших причин. Незважаючи на недоліки цього показника, для багатьох продуктів КМАФАнМ нормується.

В обов'язковому порядку контролюються санітарно-показові мікроорганізми, виявлення яких також є непрямим показником біологічної контамінації досліджуваного матеріалу патогенними мікроорганізмами. Перевищення нормативів по допустимому вмісту санітарно-показової мікрофлори свідчить про можливу присутність тих чи інших патогенних мікробів.

Для кількісної характеристики застосовуються дві групи методик: визначення титру та індексу.

Титр – це той найменший обсяг досліджуваного матеріалу (в мл) або вагова кількість (у грамах), в якому виявлено хоч одна особина санітарно-показового мікроорганізму. Наприклад, для визначення титру кишкової палички у воді засівають кілька різних об'ємів (від 100 до 0,1 або до 0,01 мл залежно від передбачуваного ступеня забруднення об'єкта) в рідкі цукрові живильні середовища. Розмноження в них кишкових паличок реєструється по наявності бродіння-

розщеплення вуглеводу до кислоти і газу. Посіви на щільні диференційно-діагностичні середовища та ідентифікація колоній, які виросли дозволяють з'ясувати ті обсяги, в яких присутня кишкова паличка. Потім за допомогою спеціальних таблиць, визначають колі-титр. Набір таблиць входить в ДСТУ.

Індекс – кількість особин санітарно-показового мікроба, виявленого в певному обсязі (кількості) досліджуваного об'єкта. Для води, молока, інших рідких продуктів – в 1 л, для грунту, та харчових продуктів – в 1 г. Індекс – величина, зворотна титру, тому перерахунок титру в індекс і назад можна проводити за формулою:

$$\text{титр} = \frac{100}{\text{індекс}};\ \text{індекс} = \frac{100}{\text{титр}} \qquad (1)$$

Індекс частіше визначають шляхом застосування мембранних фільтрів або посіву різних розведень досліджуваних субстратів на живильні середовища.

Вибір того чи іншого санітарно-показового мікроорганізму залежить від досліджуваного об'єкта і конкретного завдання. Відповідно говорять, наприклад, про титр або індекс протея або маслянокислих бактерій і т.п. В деяких випадках одночасно досліджується і ведеться кількісний облік двох або більше санітарно-показових мікроорганізмів.

Таблиця 1

Санітарно-показові мікроорганізми, які визначаються в об'єктах довкілля

Досліджувані об’єкти	Санітарно-показові мікроорганізми
Вода	БГКП *p.p. Enterococcus, Staphylococcus*
Грунт	БГКП, Термофіли *p.p.Enterococcus, Clostridium, (Cl. perfringens)*
Повітря	*p.p. Streptococcus, Staphylococcus*
Предмети і прилади	БГКП p.p. Enterococcus, Staphylococcus
Харчові продукти	БГКП бактерії групи Proteus, p.p. Enterococcus, Staphylococcus

Якісні показники вказують на відсутність (наявність) мікробів конкретних видів в певній масі продукту.

Пряме виявлення у харчових продуктах патогенних або умовно-патогенних мікробів і їх отрути проводиться у відповідності з існуючими нормативними документами. Зазвичай перевіряють наявність мікроорганізмів *p.p. Salmonella, Staphylococcus, CI.botulinum* та їх токсинів, *Cl. perfringens, Bac. cereus* та ін. Згідно з вимогами ДСТУ патогенні мікроорганізми та їх токсини повинні бути відсутніми в

певному обсязі (масі) матеріалу, який досліджували (25,50 г і т.д.).

Санітарно-мікробіологічне дослідження об'єкта на присутність патогенних мікроорганізмів проводиться в плановому порядку, а також позапланово – за епідемічними показаннями. Для визначення патогенних мікроорганізмів можуть бути використані такі методи:

• прямий посів досліджуваного матеріалу на поживні середовища;

• попередня концентрація патогенних мікроорганізмів пропусканням досліджуваного об'єкта (рідкої консистенції) через мембранні фільтри або посівом в середовища накопичення;

• виявлення патогенних мікроорганізмів методом зараження чутливих тварин (біопроба);

• застосування прискорених методів: серологічних, люмінесцентно-серологічних і радіоізотопного.

Для ілюстрації останньої групи методів нижче представлена загальна характеристика прискорених методів дослідження води. Найбільше застосування отримав метод люмінесцентно-серологічний, який в даний час рекомендується для виявлення у воді мікроорганізмів *р.р. Escherichia, Salmonella, Shigella, Vibrio* та ін. Метод імунофлюоресценції заснований на здатності антитіл, попередньо оброблених різними флюорохромами (флюоресцеїну ізотіоціанат, родаміну сульфохлорид, родаміну сульфофторид і ін.), абсорбуватися на поверхні мікробної клітини і викликати її світіння. Метод флуоресцентних антитіл застосовується в трьох модифікаціях: прямий, непрямий і непрямий метод з додаванням комплементу. *При прямому методі* – краплю досліджуваної води, в якій передбачається наявність патогенних бактерій, поміщають на предметне скло, обробляють специфічною до даного мікроорганізму люмінесцентною сироваткою і спостерігають під люмінесцентним мікроскопом. На темному тлі препарату при позитивному результаті видно яскраву флюоресценцію по периферії клітин. *При непрямому методі* обробка препаратів відбувається в два етапи: специфічною імунною сироваткою виявляють присутність відповідних бактерій, на наступному етапі виявляють комплекс що утворився обробкою міченою імунною сироваткою, що містить антитіла до глобулінів специфічної сироватки. Цей метод має істотну перевагу перед прямим, так як для виявлення будь-яких бактерій використовується одна мічена сироватка проти антитіл-глобулінів, що містяться у специфічній сироватці (як правило, глобулінів кролика).

При непрямому методі з додаванням комплементу препарат обробляють в 3 етапи: спочатку специфічною до мікробу що досліджують імунною сироваткою, потім – комплементом, який адсорбується на комплексі антиген-антитіло, і, нарешті, імунною протикомплементарною флуоресцентною сироваткою.

Для підвищення ефективності методу слід попередньо концентрувати бактерії

в досліджуваній воді на мембранних фільтрах центрифугуванням або посівом в середовища збагачення. У цьому випадку люмінесцентно-серологічним методом вдається виявити ентеробактерії при наявності в пробах води навіть поодиноких клітин в 1 мл. Метод флуоресцентних антитіл рекомендується застосовувати при індикації у воді збудників туляремії, чуми, бацил сибірки. Однак люмінесцентно-серологічний метод є тільки сигнальним методом індикації патогенних бактерій у воді, і при позитивному його результаті повинно проводитися ретельне бактеріологічне дослідження води.

Для прискореного виявлення БГКП у воді був запропонований радіоізотопний метод. Принцип методу полягає у визначенні кількості БГКП за кількістю метаболічного двоокису вуглецю, що виділяється при життєдіяльності бактерій з елективних середовищ, мічених ^{14}C. Результат можна отримати через 5-6 год.

Заняття 2. САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПОВІТРЯ

Повітря не є сприятливим середовищем для життєдіяльності мікроорганізмів. Однак, потрапляючи в повітря, багато мікроорганізмів здатні якийсь час перебувати в життєздатному стані. Серед них велика група патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Людина, яка хворіє інфекціями верхніх дихальних шляхів, виділяє мікроорганізми при розмові, чханні, кашлі і т.д. Через повітря передається група захворювань, яка так і називається – інфекції дихальних шляхів з повітряно-краплинним і повітряно-пиловим механізмами передачі. До таких інфекцій відносяться грип, кір, коклюш, скарлатина, дифтерія, натуральна віспа, легенева форма чуми, менінгіт, туберкульоз, вітряна віспа, паротит та інші.

Завданнями санітарно-мікробіологічного дослідження повітря є гігієнічна і епідеміологічна оцінка повітряного середовища, і, як наслідок, розробка комплексу заходів, спрямованих на профілактику аерогенної передачі збудників інфекційних хвороб. Об'єктами санітарно-мікробіологічного дослідження повітря закритих приміщень є: повітря лікарень (операційні, відділення реанімації, пологові зали пологових будинків, тощо), дитячих садків, шкіл, поліклінік, аптек, виробничих цехів та допоміжних приміщень на підприємствах різного профілю (харчових, мікробного синтезу тощо), а також місць масового скупчення людей – кінотеатрів, спортивних залів і т. д.

Останнім часом увагу санітарних мікробіологів приваблюють великі тваринницькі комплекси і птахофабрики. Так було показано, що в повітрі птахофабрик міститься велика кількість мікроорганізмів – до 8 млн в 1 $м^3$, які, потрапляючи в атмосферне повітря, переносяться потоками повітря на великі відстані; серед них мікроорганізми pp Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium,

Bacillus, гриби роду Aspergillus та ін.

Санітарно-мікробіологічне дослідження атмосферного повітря у великих містах проводиться в плановому порядку і в деяких випадках за епідемічними показаннями. Дослідження атмосферного повітря в місцях зрошення землеробських полів стічними водами методом дощування проводиться з метою виявлення мікроорганізмів pp Salmonella, Escherichia.

При оцінці санітарного стану закритих приміщень в залежності від завдань дослідження визначається загальна бактеріальна забрудненість (загальне мікробне число), присутність санітарно-показових мікроорганізмів (стафілококів, а- і ß - гемолітичних стрептококів), а також безпосередньо патогенних мікроорганізмів (залежно від характеру приміщень – мікобактерій туберкульозу, коринебактерій дифтерії, дріжджів і міцеліальних грибів та ін.). Наприклад, при дослідженні повітря медичних установ визначається присутність мікроорганізмів, що відносяться до умовно-патогенної флори (синьогнійна паличка, бактерії роду Proteus і ряд інших грамнегативних паличок), що викликають внутрішньолікарняні інфекції.

При дослідженні повітря на підприємствах харчового профілю, громадського харчування крім показника загального обсіменіння визначають ті групи мікроорганізмів, які є характерними збудниками псування даних видів продукції або можуть зустрічатися в даному виробничому приміщенні (дріжджі і гриби – в холодильниках, стафілококи – в цеху виробництва морозива і т.п.).

На підприємствах мікробіологічної промисловості, де у виробництві використовуються актиноміцети, гриби, спороутворюючі бацили, дріжджоподібні гриби роду Candida та ін., вивчається присутність і кількісний вміст у повітрі мікробів-продуцентів з метою попередження впливу їх на організм працюючих людей (можливість захворювання та розвитку сенсибілізації).

При вивченні присутності мікроорганізмів різних фізіологічних груп в повітрі використовують живильні середовища різного призначення (як стандартні, так і елективні або диференційно-діагностичні), залежно від мети дослідження.

Методи відбору проб повітря і прилади

Санітарно-мікробіологічне дослідження повітря можна розділити на 4 етапи:

1) відбір проб;

2) обробка, транспортування, зберігання проб, отримання концентрату мікроорганізмів (якщо необхідно);

3) бактеріологічний посів, культивування мікроорганізмів;

4) ідентифікація виділеної культури.

Відбір проб, як і при дослідженні будь-якого об'єкта, є найбільш відповідальним. Правильне взяття проб гарантує точність дослідження. У закритих приміщеннях точки відбору проб встановлюються з розрахунку на кожні 20 $м^2$

площі – одна проба повітря, по типу конверта: 4 точки по кутах кімнати (на відстані 0,5 м від стін) і 5-а точка – в центрі. Проби повітря забираються на висоті 1,6-1,8 м від підлоги – на рівні дихання в житлових приміщеннях. Проби необхідно відбирати вдень (в період активної діяльності людини), після вологого прибирання і провітрювання приміщення. Атмосферне повітря досліджують у житловій зоні на рівні 0,5-2 м від землі поблизу джерел забруднення, а також у зелених зонах (парки, сади і т.д.) для оцінки їх впливу на мікрофлору повітря.

Слід звернути увагу на те, що при відборі проб повітря в багатьох випадках відбувається посів його на живильне середовище.

Всі методи відбору проб повітря можна розділити на седиментаційні і аспіраційні.

Седиментаційний – найбільш старий метод, широко поширений завдяки простоті та доступності, однак є неточним. Метод запропонований Р. Кохом і полягає в здатності мікроорганізмів під дією сили тяжіння і під впливом руху повітря (разом з частинками пилу і крапельками аерозолю) осідати на поверхню живильного середовища у відкриті чашки Петрі. Чашки встановлюються в точках відбору на горизонтальній поверхні. При визначенні загальноїго мікробного обсіменіння чашки з м’ясопептонним агаром залишають відкритими на 5-10 хв або довше залежно від ступеня передбачуваного бактеріального забруднення. Для виявлення санітарно-показових мікробів застосовують середовище Гарро (для виявлення стрептококів), молочно-сольовий або жовтково-сольовий агар (для визначення стафілококів), суслоагар або середовище Сабуро (для виявлення дріжджів і грибів). При визначенні санітарнопоказових мікроорганізмів чашки залишають відкритими протягом 40-60 хв.

Після закінчення експозиції всі чашки закривають, поміщають в термостат на добу для культивування при температурі, оптимальній для розвитку мікроорганізму, потім (якщо цього вимагають дослідження) на 48 годин залишають при кімнатній температурі для утворення пігменту, який створюють пігменто-утворюючі мікроорганізмами.

Новий метод має ряд недоліків: на поверхню середовища осідають тільки грубодисперсні фракції аерозолю; нерідко колонії утворюються не з одиничної клітини, а зі скупчення мікробів; на застосовуваних поживних середовищах виростає тільки частина повітряної мікрофлори. До того ж цей метод зовсім непридатний при дослідженні бактеріальної забрудненості атмосферного повітря.

Більш досконалими методами є аспіраційні, засновані на примусовому осадженні мікроорганізмів з повітря на поверхню щільного поживного середовища або в уловлюючу рідину (м'ясо-пептонний бульйон, буферний розчин, ізотонічний розчин хлориду натрію та ін.). У практиці санітарної служби при аспіраційному взятті проб використовуються апарат Кротова, бактеріовловлювач Речменського,

прилад для відбору проб повітря (ПОВ-1), пробовідбірник аерозольний бактеріологічний (ПАБ-1), бактеріально-вірусний електропреціпітатор (БВЕП-1), прилад Кіктенко, прилади Андерсена, Дьяконова, МБ та ін. Для дослідження атмосфери можуть бути використані і мембранні фільтри № 4, через які повітря просмоктується за допомогою апарату Зейтца. Велика різноманітність приладів свідчить про відсутність універсального апарату і про більшою чи меншою мірою їх недосконаліть.

Прилад Кротова. В даний час цей прилад широко застосовується при дослідженні повітря закритих приміщень і є в лабораторіях СЕС.

Принцип роботи апарату Кротова (рис. 1) заснований на тому, що повітря, просмоктується через клиноподібну щілину в кришці апарату, вдаряється об поверхню живильного середовища, при цьому частинки пилу і аерозолю прилипають до середовища, а разом з ними і мікроорганізми, що знаходяться в повітрі. Чашку Петрі з тонким шаром середовища закріплюють на обертовому столику апарату, що забезпечує рівномірний розподіл бактерій на її поверхні. Працює апарат від електромережі. Після відбору проби з певною експозицією чашку виймають, закривають кришкою і поміщають на 48 год в термостат. Зазвичай відбір проб проводять зі швидкістю 20-25 л/хв протягом 5 хв.

Таким чином, визначається флора в 100-125 л повітря. При виявленні санітарно-показових мікроорганізмів обсяг досліджуваного повітря збільшують до 250 л.

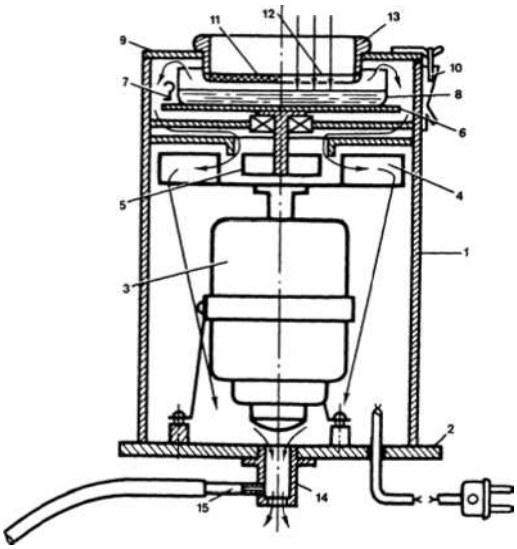


Рис. 1. Аппарат Кротова (схема конструкции):
1 - циліндричний корпус; 2 - основа корпуса; 3 - електромотор; 4 - центробіжний вентилятор; 5 - восьмилопастна крильчатка; 6 - диск; 7 - пружини; 8 - чашка Петрі; 9 - кришка приладу; 10 - накидні замки; 11 - диски из плексиглазсу; 12 - клиновидна щілина; 13 - розрізно кільце; 14 - штуцер с диафрагмою; 15 - вивідна труба.

Бактеріовловлювач Речменського являє собою порожнистий скляний

циліндр, усередині якого впаяна скляна воронка з капіляром, сполучених з приймачем (рис. 2).

Приймач перед відбором проби повітря заповнюється 3-5 мл уловлюючою рідиною (водою, мясопептонним бульйоном, фізіологічним розчином хлориду натрію).

Прилад Речменського працює за принципом пульверизатора: при проходженні повітря через вузький отвір лійки рідина з приймача через капіляр у вигляді крапельок піднімається в циліндр. Краплі рідини ще більше дробляться, б'ючись об скляну лопаточку і стінки посудини, створюючи хмарки з дрібних крапельок, на яких і адсорбуються мікроорганізми які знаходяться в повітрі. Насичені бактеріями краплі рідини стікають в приймач, а потім знову диспергуються, що забезпечує максимальне уловлювання бактерій з повітря. При роботі прилад поміщають під кутом 15-25°, що забезпечує стікання уловлюваної рідини в приймач. Швидкість відбору проб повітря через апарат Речменського – 10-20 л/хв. По закінченні роботи рідину з приймача забирають стерильною піпеткою і засівають (по 0,2 мл) на поверхню щільних живильних середовищ. Перевагою бактеріовловлювача Речменського є висока ефективність уловлювання бактеріальних аерозолів. Недоліки приладу полягають у труднощі його виготовлення, нестандартності одержуваних апаратів, їх великий крихкості і порівняно низької продуктивності.

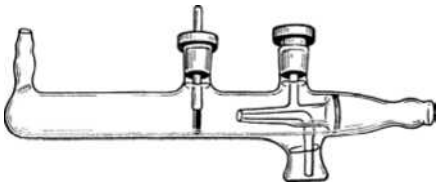


Рис. 2. Схема будови приладу Речменського

Прилад ПОВ-1 (прилад для відбору проб повітря). Відбір проб повітря за допомогою приладу ПОВ-1 (рис. 3). Заснований на тому ж принципі, що і в бактеріовловлювачі Речменського.

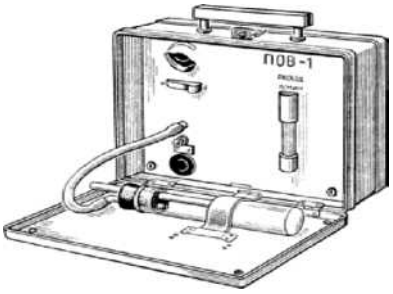


Рис.3. Прилад для відбору проб повітря ПОВ-1

Великою перевагою є серійний випуск цього приладу (що дало можливість оснастити їм лабораторії СЕС), його портативність, більш висока продуктивність (20-25 л/хв). Колба приладу, в яку поміщається уловлюєюча рідина, виготовляється з термостійкого плексигласу, капіляр з нержавіючої сталі. У колбу вмонтований

пульверизатор, що викликає диспергування уловлюючої рідини при просмоктуванні повітря. Такий пристрій дає можливість легко очищати і стерилізувати колбу з диспергуючим пристроєм простим кип'ятінням протягом 30 хв (автоклавування неприпустимо, тому що воно викликає деформацію циліндра).

Перед забором проб повітря в колбу вносять 5-10 мл уловлюючої рідини (найчастіше м'ясопептонний бульйон) і встановлюють її під кутом 10°, що забезпечує природне стікання рідини після диспергування. Повітря, проходячи через колбу і пульверизатор, викликає утворення дрібних крапельок уловлюючої рідини, на яких осідають мікроорганізми. Прилад ПОВ-1 застосовується для дослідження повітря закритих приміщень на загальну мікробну забрудненість, для виявлення патогенних бактерій (наприклад, мікобактерій туберкульозу) і респіраторних вірусів в повітрі лікарняних палат.

Пробовідбірник аерозольний бактеріологічний (ПАБ-1). Механізм дії ПАБ-1 заснований на принципі електростатичного осадження частинок аерозолю (а отже, і мікроорганізмів) з повітря при проходженні його через прилад, в якому ці частинки отримують електричний заряд і осідають на електродах з протилежним знаком. На електродах для уловлювання аерозолів поміщають в горизонтальному положенні металеві піддони з твердими середовищами в чашках Петрі або рідким живильним середовищем (15-20 мл). Прилад переносний з великою продуктивністю 150-250 л/хв, тобто за 1 год можна відібрати 5-6 $м^3$ повітря. Його рекомендують застосовувати для дослідження великих обсягів повітря при виявленні умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, наприклад, при виявленні в повітрі палат лікарень збудників внутрішньолікарняних інфекцій (Pseudomonas aeruginosa. Staph, aureus та ін.), визначенні сальмонел і ешерихій в атмосферному повітрі в місцях дощування при зрошенні землеробських полів стічними водами.

Бактеріально-вірусний електропреципітатор (БВЕП-1). Прилад заснований на аспіраційно-іонізаційному принципі дії. БВЕП-1 складається з осаджувальної камери, в яку вмонтовані електроди: негативний у вигляді трубки, через яку надходить повітря (і частинки аерозолю відповідно заряджаються негативно), і позитивний, на якому осідають бактерії.

Прилад являє собою металеву чашу з уловлюючою рідиною (рис. 4).

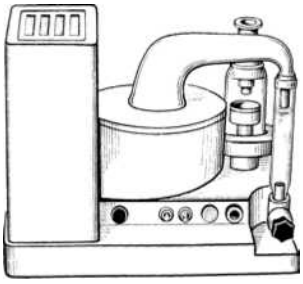


Рис.4. Бактеріально-вірусний електропреципітатор (БВЭП-1)

В якості уловлюючого середовища застосовують м’ясопептонний бульйон, 0,5 % м’ясопептонний агар, а при мінусових температурах – суміш 66,7 % гліцерину з 33,3 % м’ясопептонного бульйону. Прилад переносний, працює від електромережі і володіє значно більшою ефективністю впорівнянні з апаратом Кротова.

Прилад МБ. Цей прилад служить не тільки для визначення загального мікробного обсіменіння, але і для відбору проб повітря з аерозольними частками різних розмірів. Прилад МБ побудований за принципом «сита» і являє собою циліндр, розділений на 6 горизонтальних смуг, на кожну з яких поміщають чашки Петрі з МПА. Повітря проходить, починаючи з верхньої ступеня і, в пластині якої отвори найбільші, і чим нижче ступінь, тим менше розміром отвори (через останні проходять тільки тонкодисперсні фракції повітряного аерозолю). Прилад розрахований на уловлювання частинок аерозолю розміром більше 1 мкм при швидкості відбору повітря 30 л/хв. Зменшення числа отворів забезпечує більш рівномірний розподіл по живильному середовищі аерозолю з повітря. Для вловлювання ще більш дрібних частинок аерозолю можна додавати додатково фільтр з фільтруючого матеріалу АФА.

При використанні будь-якого з перерахованих приладів одержувані результати є приблизними, проте вони дають більш правильну оцінку обсіменіння повітря в порівнянні з седиментаційним методом. Оскільки відбір та санітарно-мікробіологічні дослідження повітря не регламентовані ДСТУ, то можна використовувати будь-який прилад для оцінки бактеріальної забрудненості повітря. У багатьох випадках відбір проб суміщений з етапом посіву.

Для зниження чисельності мікроорганізмів у повітрі закритих приміщень застосовують такі засоби:

а) хімічні – обробка озоном, двоокисом азоту, розпорошення молочної кислоти, б) механічні – пропускання повітря через спеціальні фільтри, в) фізичні – ультрафіолетове опромінення.

Визначення загальної чисельності сапрофітних бактерій

Загальна бактеріальна забрудненість повітря або мікробне число – це сумарна кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 $м^3$ повітря. Для визначення загальної кількості бактерій в повітрі закритих приміщень забирають дві проби (об'ємом по 100 л кожна) на чашки Петрі з МПА за допомогою будь-якого приладу (найчастіше апарата Кротова), або седиментаційним методом, розставляючи чашки з живильним середовищем за принципом конверта. Чашки з посівом поміщають в термостат на добу, а потім на 48 год залишають при кімнатній температурі. Експозиція чашок з посівами на світлі дає можливість підрахувати роздільно кількість пігментних колоній (жовтих, білих, рожевих, чорних, помаранчевих та ін.), кількість спороутворюючих бацил, грибів і актиноміцетів.

Підраховують кількість колоній на обох чашках, обчислюють середнє арифметичне і роблять перерахунок на кількість мікроорганізмів в 1 $м^3$ повітря. Бацили утворюють колонії, як правило, великі, круглі, з нерівними краями, сухі, зморшкуваті. Колонії грибів з пухнастим нальотом (mucor і Aspergillus) і щільні – зеленуваті або сіруваті (Pénicillium). Актиноміцети утворюють білуваті колонії, вросліі в агар. Кількість кожної групи колоній (пігментних, безпігментних, плесеней, бацил, актиноміцетів) виражають у відсотках по відношенню до загального числа.

При визначенні мікробного числа методом седиментації по Коху підраховуються колонії, що виросли на МПА в чашках Петрі, і розрахунок ведеться по В.Л. Омелянському. Якщо дотримуватися цієї методики, на чашку площею 100 $см^2$ за 5 хв осідає така кількість мікробів, яке міститься в 10 л повітря.

Визначення стафілококів

Стафілококи є одним з найбільш поширених мікроорганізмів у повітрі закритих приміщень, що обумовлюється значною стійкістю їх до різних факторів навколишнього середовища. Виявлення патогенних стафілококів у повітрі закритих приміщень має санітарно-показове значення і свідчить про епідемічне неблагополуччя. Відбір проб повітря проводиться за допомогою апарату Кротова в кількості 250 л на 2-3 чашки з молочно-жовтково-сольовим агаром (або молочносольовим, жовтково-сольовим) і на чашку з кров'яним агаром. Чашки інкубують при температурі 37 °С протягом 48 год. Вивчають культуральні ознаки всіх видів колоній (див. Додаток 3), з підозрілих готують мазки і фарбують за Грамом.

Крім якісної характеристики окремих колоній, підраховують кількість колоній стафілококів, що виросли в 1 $м^3$ повітря.

Визначення стрептококів

Стрептококи також є санітарно-показовими мікроорганізмами повітря, в який вони потрапляють від хворих на скарлатину, тонзилітами, ангіною і носіїв стрептококів. Відбір проб повітря при дослідженні на наявність а- і р-гемолітичних стрептококів проводять за допомогою апарату Кротова на чашки з кров'яним агаром, середовищами Гарро і Туржецького. Забирають 200-250 л повітря, чашки з посівами витримують в термостаті 18-24 год і потім ще 48 год при кімнатній температурі (після попереднього перегляду та обліку). Ідентифікацію проводять за загальноприйнятою методикою (див. Додаток 3).

Визначення патогенних мікроорганізмів у повітрі

Зважаючи на малу концентрацію патогенних мікроорганізмів у повітрі закритих приміщень, їх виділення є досить важким завданням.

При розшифровці внутрішньолікарняних інфекцій визначають в повітрі присутність стафілококів, стрептококів, синьогнійної палички, сальмонел, протеїв та ін. Відбір проб повітря проводять за допомогою ПАБ-1 в обсязі не менше 1000 л. Посів роблять на відповідні елективні середовища. Якщо використовується рідке середовище як уловлююча рідина, то пробірку з рідиною поміщають в термостат на добу для підрощування (одержання накопичувальної культури), а потім висівають на елективну середу.

При дослідженні повітря на наявність мікобактерій туберкульозу відбір проб проводять за допомогою приладу ПОВ-1 в обсязі 250-500 л повітря. В якості уловлюючої рідини беруть середу Школьникової, яку потім обробляють 3 % розчином сірчаної кислоти (для придушення супутньої мікрофлори) і центрифугують. Осад засівають в пробірки на одну з яєчних середовищ, частіше середу Левенштейна-Єнсена. Інкубують при 37 °С до 3 міс. Відсутність зростання протягом 3 міс дає можливість видати негативну відповідь. Пробірки перший раз переглядають через 3 тижні, потім кожні 10 днів. Виділену культуру ідентифікують, визначають її вірулентність (зараженням морських свинок – біопроба) і при необхідності визначають стійкість до лікарських препаратів.

При визначенні в повітрі коринебактерий дифтерії для посіву повітря використовують чашки з середовищем Клауберга.

В останні роки визначають в атмосферному повітрі при меліорації полів, при зрошенні їх стічними водами, сальмонели у разі появи захворювання серед персоналу станцій зрошення або населення. Відбір проб проводять за допомогою апарату Кротова на чашки з вісмут – сульфітним агаром. Досліджують не менше 200 л повітря. Виділена культура ідентифікується за звичайною схемою визначення сальмонел.

У зв'язку з розвитком мікробіологічної промисловості виникла необхідність дослідження повітря з метою виявлення грибів-продуцентів при виробництві антибіотиків, ферментних препаратів, при виготовленні кормових дріжджів та ін. Для дослідження повітря на плісняві гриби роду Candida відбір проб виробляють за допомогою апарату Кротова в обсязі від 100 до 1000 л на чашки з середовищем Чапека, суслоагаром (для виявлення цвілевих грибів) і з метабісульфіт-натрій-агаром (МБС-агар) з додаванням антибіотиків (для виявлення дріжджоподібних грибів роду Candida). Чашки інкубують в термостаті при температурі 26-27 °С протягом 3-4 діб (для цвілевих грибів) і при 35-37 °С протягом 2-3 діб (для грибів – продуцентів і дріжджоподібних роду Candida). Ідентифікація проводиться з урахуванням особливостей плодоносних гиф і характеру міцелію. Вважають, що концентрація дріжджоподібних грибів у кількості 500-600 клітин в 1 $м^3$ повітря робочого приміщення є граничною, перевищення її веде до розвитку алергічних реакцій у робітників.

Оцінка повітря за санітарно-мікробіологічними показниками відповідно до нормативів представлена в таблицях 1.1, 1.2 (додаток).

Заняття 3. САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ГРУНТУ

Мікрофлора грунту

З виділеннями людини і тварин, з різними господарсько-побутовими та промисловими відходами в грунт надходить величезна кількість різноманітних мікроорганізмів. Так, у фекаліях людини виявлено більше 60 видів мікроорганізмів, що відносяться до 8-10 різних сімейств. Переважною флорою є анаероби (до 96 % від усіх видів): біфідобактерії, лактобактерії, пептококи, бактероїди; в меншій кількості зустрічаються мікроорганізми Escherichia, Enterococcus, Proteus, Clostridium, гриби Candida, та ін. Біологічне забруднення грунту особливо велике в неканалізованих землях і на територіях тих підприємств, де можуть накопичуватися органічні відходи (наприклад, бойні і т. д.), на господарських дворах, в тваринницьких комплексах, на пляжах і прилеглих до них ділянках. Зі стічними водами мікроорганізми потрапляють в мулові осади, а потім при використанні недостатньо знезаражених мулових осадів та стічних вод на полях зрошення може відбуватися інфікування грунту, а потім ягідних культур і овочів, які вирощуються на таких полях. Бактерії, адсорбуючись на поверхні частинок і осадів стічних вод, можуть деякий час зберігати свою життєдіяльність і вірулентність.

До першої групи патогенних мікроорганізмів, які постійно живуть у грунті, відноситься невелика кількість мікроорганізмів. Серед них особливу увагу заслуговують клостридії ботулізму (Clostridium botulinum), які потрапляють у грунт з випорожненнями людини і тварин. Утворюючи спори, мікроорганізми залишаються в грунті на невизначено довгий час. Про це слід завжди пам'ятати при консервуванні (особливо домашньому) всіх овочів, грибів та інших продуктів, які можуть містити залишки землі, а отже, і спори.

Друга група включає спороутворюючі патогенні мікроорганізми (бацили сибірської виразки – Bacillus anthracis, клостридії правця – Clostridium tetani, газової гангрени – Cl.perfringens, Cl.novyi, які потрапляють у грунт з фекаліями людини і тварин, іншими виділеннями, а також з трупами загиблих тварин. Грунт для них є вторинним резервуаром, оскільки при сприятливих умовах клостридії можуть розмножуватися і зберігатися у вигляді спор тривалий час. Наприклад, спори бацили сибірської виразки виявляються в грунті лугів і випасів, забруднених спорами збудника через десятки років, причому B. anthracis виявилися здатними вегетувати в грунті. Вегетація мікроба в грунті здійснюється при температурі не нижче 12 °С, достатньої вологості і наявності гумусу і мікроелементів.

У третю групу включені патогенні мікроорганізми, що потрапляють у грунт з виділеннями людини і тварин і зберігаються протягом декількох тижнів або місяців. Всі ці мікроорганізми – сальмонели, шигели, вібріони, бруцели, мікобактерії, лептоспіри, збудники сапу та ін. Вони не утворюють спор і тому швидко гинуть в результаті впливу різних фізичних і біологічних факторів.

Більшість представників нормальної мікрофлори людини, потрапляючи в грунт, вступають в її біоценоз, беруть участь у біохімічних процесах, а окремі види бактерій залишаються постійними мешканцями ґрунту. Тому, важко розділити мікрофлору грунту на таку, що постійно і тимчасово мешкає в ній.

Якісний склад мікрофлори грунту дуже різноманітний: безліч видів бактерій (переважно спороутворюючих), актиноміцетів, спірохет, архібактерій, найпростіших, синьо-зелених водоростей, мікоплазм, грибів, вірусів. Різноманітні мікроорганізми грунту мешкають у водних і колоїдних плівках, які ніби вкривають грунтові частинки. Склад і співвідношення між різними групами мікроорганізмів змінюються залежно від виду грунту, способів її обробки, вмісту органічних речовин, вологи, від кліматичних умов і багатьох інших причин.

Мікроорганізми в ґрунті перебувають у складному біоценозі, що характеризується різними взаємовідносинами як між собою, так і з рослинами. У навколокореневій зоні рослин бактерій особливо багато: вони утворюють зону інтенсивного розмноження і підвищеної активності, яка називається *ризосферою*. Мікрофлора ризосферної зони грунту відрізняється специфічністю для кожного виду рослин. Мікроорганізми володіють позитивним хемотаксисом щодо кореневих виділень рослин і, беручи участь в процесах мінералізації органічних сполук (відмерлих клітин коренів, що накопичуються), забезпечують рослини легко-засвоюваними мінеральними речовинами, речовинами типу вітамінів і ауксинів, що сприяють активізації метаболізму рослин.

Кількість мікроорганізмів у грунті досягає декількох мільярдів в 1 г. Найбільше їх у грунті, що містить велику кількість добрив і в ґрунті, що піддається обробці (оранці та аерації), – до 4,8-5,2 млрд., менше – в лісовому грунті, в пісках – 1,2-0,9 млрд. Жива маса мікроорганізміву грунті на 1 га в середньому становить близько 1000 кг.

Мікроорганізми у грунті розподілені нерівномірно. На поверхні і в шарі товщиною 1-2 мм відносно мало мікробів, незважаючи на постійне обсіменіння грунту, що пояснюється згубною дією ультрафіолетових променів сонця і висушуванням. Найбільш багата мікрофлора на глибині 10-20 см. У цьому шарі протікають основні біохімічні процеси перетворення органічних речовин, обумовлені життєдіяльністю різноманітних мікроорганізмів, які послідовно змінюють один одного. У більш глибоких шарах грунту флора стає бідною і на глибині 4-5 м мікроорганізми виявляються в дуже малих кількостях. Вода, яку

отримують з артезіанських свердловин, практично стерильна, що можна пояснити фільтраційними властивостями грунтових грудочок і відсутністю необхідних органічних сполук для живлення бактерій.

У складі мікрофлори грунту прийнято виділяти фізіологічні групи мікроорганізмів, які беруть участь в різних процесах поступового розкладання органічних речовин: протеолітичні, ліполітичні, амілолітичні. Серед цих мікроорганізмів велику роль у псуванні харчових продуктів (переважно білкових) відіграють бактерії (і гриби) – амоніфікатори.

В окремих випадках (неправильна організація збору с/г сировини, порушення режимів зберігання тощо) сировина, яка використовується для виробництва продуктів харчування, може бути контамінована мікрофлорою грунту, яка зберігається в ньому. Тому, дуже важливо вивчати якісний склад мікроорганізмів грунту, їх фізіолого-біохімічні властивості, способи їх знешкодження.

Знання мікрофлори грунту і тих умов, в яких протікає її життєдіяльність, необхідно для оцінки санітарно-мікробіологічних досліджень не тільки власне грунту, але і об'єктів, що контактують (прямо чи опосередковано) з нею.

Особливий вплив на відмирання патогенних мікроорганізмів мають антагоністичні властивості представників мікрофлори грунту. Саме на останній властивості мікрофлори засновані роботи, спрямовані на підвищення антибіотичних властивостей грунту (озеленення травами територій населених місць, що сприяє розмноженню антагоністів-актиноміцетів), що поліпшують антибактеріальні властивості і підвищують активність процесу самоочищення грунту.

Патогенні мікроорганізми і представники нормальної мікрофлори, зокрема Escherichia, перебуваючи в навколишньому середовищі, де умови їхнього існування різко міняються, нерідко змінюють свої властивості. Загибель БГКП і деяких сапрофітних бактерій передує посиленню процесу нітрифікації – кінцевого етапу розкладання органічних речовин. Показником активності самоочищення грунту може вважатися збільшення мікрофлори, що бере участь в процесі нітрифікації.

Таким чином, природні процеси, що протікають у грунті під впливом її мікрофлори, обумовлюють самоочищення грунту від потрапивших в нього мікроорганізмів, знешкодження та знищення всіх нечистот. При правильному управлінні цими процесами небезпека передачі інфекційних хвороб через грунт може бути зведена до мінімуму.

Поряд з позитивною роллю мікрофлори грунту в синтезі і мінералізації органічних речовин, необхідно відзначити ті негативні наслідки, які завдають мікроорганізми грунту народному господарству, руйнуючи будівельні конструкції, піддаючи псуванню сільськогосподарську продукцію. Тому, при виробництві харчових продуктів дуже важливо не допускати попадання грунтової мікрофлори в сировину і в продукцію на будь-якому етапі виробничого процесу.

Мікробіологічне дослідження грунту є важливою ланкою в її санітарній оцінці.

Метою санітарно-мікробіологічного дослідження грунту є виявлення і запобігання розповсюдженню збудників інфекційних захворювань. Ці заходи складаються з декількох етапів, а саме: попереджувальний нагляд. Його проводять у таких випадках: 1) при плануванні, будівництві та реконструкції знову заселених ділянок і населених місць; 2) при виборі ділянок для будівництва дитячих дошкільних закладів, піонерських таборів, санаторіїв і т. д.; 3) при будівництві водосховищ; 4) при вирішенні питань водопостачання та каналізації населених територій; 5) при санітарній оцінці землі на полях зрошення, де використовуються гній, компости, стоки тваринницьких комплексів і т. д.; 6) при визначенні санітарного стану грунту, забрудненого різними отрутохімікатами; 7) при санітарній оцінці пляжів, місць колективного відпочинку і т. д.

Поточний санітарний нагляд здійснюється: 1) при оцінці санітарного стану поверхневих шарів ґрунту для встановлення ступеня впливу біологічної контамінації на здатність грунту до самоочищення; 2) при контролі за грунтовими і біотермічними методами знешкодження стічних вод і відходів; 3) за епідемічними показаннями для з'ясування можливого шляху передачі інфекційної хвороби через грунт, термінів виживання в ній патогенних мікроорганізмів, а також можливості зараження води (відкритих водойм і ґрунтових вод), овочів (вирощуваних на зрошуваних землях).

Залежно від поставленої мети санітарно-мікробіологічнедослідження грунту може бути проведено у вигляді короткого або повного аналізу.

Короткий аналіз рекомендується при здійсненні поточного санітарного нагляду і включає визначення бактерій групи кишкових паличок, загального числа сапрофітних бактерій, титру анаеробів – Clostridiumperfringens, термофільних бактерій, що характеризують характер контамінації (гноєм, фекаліями, стічною рідиною, компостом), нітрифікуючих бактерій.

В *повний санітарно-мікробіологічний аналіз,* проведений при попереджувальному санітарному нагляді, входять додаткові дослідження, які визначаються конкретними завданнями. В повний аналіз може включатися визначення загальної чисельності сапрофітів, чисельності та процентного вмісту спор (від загальної кількості мікроорганізмів), кількість актиноміцетів, грибів, целюлозорозкладуючих мікроорганізмів, основних груп ґрунтового мікробіоценозу. За епідемічними показаннями проводяться виявлення та ідентифікація патогенних мікроорганізмів – сальмонел, шигел, збудників правця, ботулізму, бацил сибірської виразки.

Відбір, зберігання і транспортування проб

Вивчення мікрофлори грунту дає надійні результати тільки в тому випадку, якщо відбір проб проводиться вірно. Перед взяттям зразків слід зробити опис місцевості, в якому зазначаються характер рельєфу, рослинність, клімат, наявність каналізації, відомості про застосовування агротехніки і т. д. При обґрунтуванні вибору ділянки для взяття проб санітарний лікар складає схематичний план обстежуваної території, визначає місцезнаходження джерела забруднення (туалети громадського користування, вигрібні ями, контейнери зі сміттям та ін.). При дослідженні території в 100 $м^2$ виділяють дві ділянки по 25 $м^2$: один – поблизу джерела забруднення і другий (контрольний) – вдалині. Зразки ґрунту забираються в 5 точках – на кшталт конверта: 4 – по кутах ділянки та 1 – у центрі. Взяті проби масою по 200-300 г перемішують в стерильному посуді і потім беруть середній зразок, який поміщають в стерильну посудину з ватно-марлевою пробкою (або пергаментний пакет). Обсяг зразка грунту повинен бути не менше 300 г, що необхідно для підтримки певної вологості в зразку при його транспортуванні. При взятті проб з поверхневих шарів землі знімають лопатою пласт ґрунту, потім з бічної, прямовисної поверхні фламбування ножем зрізають шар землі товщиною 1-1,5 см, ніж знову пропалюють і з глибини зрізаної ділянки набирають зразок грунту. Зразки з ораних грунтів беруть на всю глибину орного шару. З глибини шарів проби грунту забирають буром Некрасова, що представляє собою штангу з рукояткою, яка служить для обертання бура. У нижній робочій частині бура є коробка для забору ґрунту. Під час буріння порожнина коробки закрита, при досягненні наміченої відстані бур повертається у зворотний бік, порожнина відкривається і заповнюється грунтом. За допомогою бура можна брати проби з глибини до 3 м. Взяті проби грунту поміщають в стерильний посуд, маркують і забезпечують супровідним документом, в якому вказують номер зразка, місце і глибину взяття, дату відбору проби. Обробку проби бажано проводити в день дослідження, зберігання допускається протягом 24 годин при температурі 4-5 °С.

Підготовка проб грунту

Зразки грунту звільняють від великих включень: каменів, щебеню, осколків скла, коренів, листя рослин і т.д. Потім поміщають в стерильну порцелянову ступку, просівають через стерильне сито з діаметром отворів 3 мм і забирають наважки для приготування грунтової суспензії. Залежно від мети дослідження наважка може бути різною: 1-30 г для визначення санітарно-показових мікроорганізмів, 1-10 г для обліку грунтових мікроорганізмів, 50-60 г для виявлення патогенних ентеробактерій. Наважку ґрунту висипають в стерильну колбу і заливають стерильною водопровідною водою у співвідношенні 1:10. Отриману ґрунтову суспензію струшують протягом 10-15 хв з подальшим відстоюванням протягом

2-3 хв. За допомогою такої обробки вдається витягти мікроорганізми з грудочок землі і з поверхні ґрунтових частинок. З першого розведення (1:10) грунтової суспензії готують ряд наступних 10-кратних розведень: від 1:10 до 1: 1000 при дослідженні чистих грунтів і до 1: 1000000 і більше – при дослідженні сильно забруднених грунтів.

Визначення бактерій групи кишкових паличок

При дослідженні грунтів на присутність БГКП рекомендується застосувати титрувальний метод при передбачуванні невисокого ступеня фекального забруднення, метод мембранних фільтрів використовується при аналізі малозабруднених грунтів. При високому ступені фекального забруднення рекомендується робити прямий посів ґрунтової суспензії (1:10) на середовище Ендо.

Титрувальний метод. З приготованих розведень грунтової суспензії роблять посіви у флакони і пробірки з рідким поживним середовищем Кесслера: 10 мл (з розведення 1:10) – в 50 мл середовища, по 1 мл з наступних розведень – у 9 мл середовища. Посіви інкубують протягом 48 год при температурі 37 °С. За відсутності у флаконі і пробірках росту, що характеризується газоутворенням і помутнінням, дається негативна відповідь на присутність БГКП. Якщо в засіяних посудинах виявляється ріст у вигляді помутніння середовища або помутніння і газоутворення, слід зробити висів у чашки Петрі з середовищем Ендо, інкубувати 24 год при температурі 37 °С. Подальшої ідентифікації (аналогічно визначенню БГКП у воді) піддаються типові для Escherichia червоні або рожеві з металевим блиском колонії. Результат виражається в колі-індексі, тобто кількість БГКП, виявлених в 1 г грунту.

Метод мембранних фільтрів. Метод застосовується як прискорений для визначення БГКП. Грунтову суспензію 1:10 центрифугують при 2000 об/хв протягом 5 хв для осадження крупних частинок, потім 5-10 мл суспензії фільтрують через мембранні фільтри № 3. Подальший хід дослідження такий же, як при визначенні БГКП у воді.

Прямий посів ґрунту. Грунт з місць інтенсивного фекального забруднення засівається в кількості 0,1 або 0,05 мл суспензії, розведеної від 1:10 до 1: 1000000, в чашки Петрі на середовище Ендо. Метод прямого посіву використовується і при посіві менш забруднених ґрунтів, в цьому випадку береться грунтова суспензія в розведеннях від 1:10 до 1: 1000. Посіви вирощують в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 год. Подальша ідентифікація колоній, що виросли ведеться за загальноприйнятою методикою.

Визначення загальної чисельності сапрофітних бактерій

Загальне число сапрофітних бактерій визначається кількістю мікроорганізмів,

що виявляється в 1 г досліджуваного грунту. Цей показник має відносне значення, оскільки свідчить про біологічний стан грунту в момент дослідження. Санітарне значення чисельності сапрофітних бактерій враховується в комплексі з іншими санітарно-мікробіологічними показниками, виходячи з особливостей досліджуваної грунту.

Для визначення загальної чисельності ґрунтових сапрофітів можуть бути використані два методи: посів на щільні поживні середовища та метод прямої мікроскопії.

Посів ґрунтової суспензії виробляють на МПА глибинним способом. Розведення вибирають з урахуванням забрудненості ґрунту. Посіви інкубують при 28-30 °С протягом 72 год. і підраховують кількість колоній, що виросли. Для підрахунку беруть такі розведення грунтової суспензії, при яких на чашках виростає від 50 до 150 колоній. Якщо виростає більше 150 колоній, то ведеться рахунок на 1/4 площі чашки з наступним перерахунком на всю площу. Із суми колоній, підрахованих на всіх чашках, виводять середньоарифметичне і потім визначають число колоній на 1 г грунту (з урахуванням розведень).

Метод прямої мікроскопії грунту є дуже трудомістким і вимагає спеціальної апаратури. Найчастіше користуються методом капіляроскопії по Б.В. Перфильєву і Д.Г. Габе. Для мікроскопії до 1 мл ґрунтової суспензії в розведенні 1:10 додають 1-2 краплі 1 % розчину акридинового помаранчевого і потім поміщають краплю суспензії в спеціальну капілярну камеру. Капіляр кладуть на предметне скло і фіксують парафіном. Підрахунок мікроорганізмів ведеться за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Наступним перерахунком встановлюється кількість мікроорганізмів в 1 г грунту.

Визначення перфрінгенс-титру

Присутність CI. perfringens в грунті вказує на фекальне її забруднення і має певне індикаторне значення по відношенню до групи патогенних клостридій (C. tetani, C. botulinum), які також потрапляють у грунт з випорожненнями людини і тварин. Визначення перфрінгенс-титру є важливим критерієм для санітарної оцінки ґрунту і її самоочищення, так як при фекальному забрудненню грунту вже через 4-5 місяців E.coli зникають, а Cl. perfringens виявляються в титрі 0,01 м.

Запропоновано декілька методів визначення перфрінгенс-титру.

Посів ґрунтової суспензії в середовище Вільсона-Блера. З приготованих розведень ґрунтової суспензії (від 1:10 до 1: 1000000) переносять по 1 мл в два паралельних ряди стерильних пробірок. Один ряд пробірок з розведеннями суспензії прогрівають при температурі 80 °С протягом 15 хв (для придушення розмноження супутньої вегетативної мікрофлори грунту). Потім в пробірки обох рядів вносять по 9-10 мл середовища Вільсона-Блера, приготовленого безпосередньо перед

застосуванням. Суспензію перемішують із середовищем, обертаючи пробірки між долонями рук, потім для швидкого застигання агару і виходу кисню з середовища пробірки поміщають під струмінь холодної води. Інкубують в термостаті при температурі 43 °С протягом 24 год, але вже через 2-3 год при позитивному результаті можна спостерігати в товщі агару сформовані круглі колонії чорного кольору, що розривають агар в місці газоутворення. У мазках, приготовлених з чорних колоній, видно характерні грампозитивні палички.

У 1968 р Г.І. Сидоренко і Ю.І. Пивоваровим запропоновано використовувати замість середовища Вільсона-Блера сульфіт-поліміксин-неоміцинове середовище (СПН). Додані до нього антибіотики пригнічують супутню флору, тому що колонії, що виросли в цьому агарі при температурі 44-45 °С не вимагають подальшої ідентифікації. Час аналізу – 10-12 год.

Використання середовищ накопичення. По 1 мл прогрітих і нативних розведень ґрунтової суспензії висівають у пробірки з рідкими і напіврідкими поживними середовищами, попередньо регенерованими кип'ятінням (середовище Клодніцкого, Кітта-Тароцці, бульйон Мартена з ватою). Після 18-20 год інкубації в термостаті при 37 °С роблять висів в середовище Вільсона-Блера або СПН. Подальше дослідження ведеться за описаною вище методикою.

Визначення термофільних бактерій

Ступінь фекального забруднення грунту можна визначити за кількістю термофільних бактерій, температурний оптимум розвитку яких дорівнює 58-60 °С. Термофіли представлені в основному спороутворюючими грампозитивними бацилами і актиноміцетами, активно розмножуються в компостних купах, гної. Тому можна зробити висновок, що грунт, в якому виявляється велика кількість ешерихій і термофілів, були удобрені гноєм або компостом. Грунт, що містить багато ешерихій і незначну кількість термофілів, вважається забрудненим фекаліями, так як флора кишечника людини і тварин вкрай бідна термофілами. Термофільні мікроорганізми не властиві незабрудненим грунтам. Для виявлення термофілів роблять посів розведень ґрунтової суспензії (від 1: 10-1: 1000000) на 2-3 паралельні чашки з МПА, розлиті більш товстим шаром, ніж зазвичай (поверхневий посів). Інкубують при температурі 60 °С протягом 24 год. Кількість колоній, що виросли підраховують, перерахунок термофілів на 1 г грунту ведеться, як при визначенні загальної чисельності сапрофітів в грунті.

Визначення нітрифікуючих бактерій

Одним з показників процесу самоочищення грунту є нітрифікуючі бактерії, які беруть участь у перетворенні амонійних сполук у азотисту і азотну кислоти. Титр нітрифікаторів визначають посівом розведень ґрунтової суспензії від 1 : 100 до

1 : 10000 у флакони з рідким мінеральним середовищем Виноградського. В якості контролю в термостат поміщають два флакони з незасіяним середовищем. Посіви інкубують при температурі 28 °С протягом 14-15 діб. На 5-7-й день можна перевірити утворення азотистої або азотної кислоти за допомогою якісної проби з дифеніламіном. При додаванні до краплі середовища (вміщеній на скляну пластинку) кількох крапель розчину дифеніламіна (в концентрованій сірчаній кислоті) з'являється синє забарвлення, що вказує на присутність нітратів. Середовище в контрольних флаконах не повинно давати зміни забарвлення.

Визначення в ґрунті сальмонел і шигел

Забруднення грунту сальмонелами відбувається в результаті безпосереднього попадання фекалій, переважно тварин, меншою мірою – людини. Практично у всіх домашніх і багатьох диких тварин сальмонели виявлені як коменсали і як збудники гострих сальмонельозів. Шигели потрапляють у грунт з екскрементами людини.

Всі представники роду Salmonella є потенційно патогенними для людини, викликаючи захворювання, різноманітні по клінічній картині (від важких сальмонельозів до бактеріоносійства) та тривалості. Часто захворювання протікає легко, що призводить до швидкого одужання, тому хворі не звертаються до лікаря, залишаючись поза увагою санітарно-епідеміологічної служби і стаючи можливими носіями сальмонел. Звичайно, людина виділяє бактерій значно менше порівняно з тваринами, але виділяються нею сальмонели адаптовані до її організму і тому епідемічно більш небезпечні. Для визначення сальмонел в грунті можуть бути використані два методи: посів у середовище накопичення та метод коагуляції з наступним висівом на диференційно-діагностичні середовища.

Перший метод простіший: для виявлення сальмонел в підготовлену грунтову суспензію вносять інгредієнти магнієвого середовища «М» (з розрахунку обсягу суспензії), інкубують при температурі 37 °С протягом 18-20 год. Потім роблять висів на вісмут-сульфітне середовище (зазвичай 3-5 чашок). Ідентифікація колоній, що виросли проводиться за методикою визначення сальмонел. Шигели виявляють паралельно – посівом в селенітове середовище.

При виділенні сальмонел з грунту методом коагуляції і центрифугування по Фікеру до 500 мл грунтової суспензії додають 1,7 мл 10 %-вого стерильного розчину сульфату заліза і 2 мл 10 %-вого стерильного розчину бікарбонату натрію (для підлужування, яке сприяє коагуляції). Суспензію ретельно збовтують і ставлять в холодильник на 1 год для утворення пластівців, прозору рідину зливають, а осад і надосадову рідину з пластівцями переносять у центрифужні пробірки і центрифугують 5 хв при 5000 об/хв. Після центрифугування рідину над осадом зливають, а осад обробляють 1 мл 25 % -вого розчину виннокислого калію (додаючи по краплях до повного розчинення осаду) і роблять висів в чашки з вісмут-

сульфітним агаром і середовищем Плоскірєва. Паралельно осад, що залишився заливають жовчним бульйоном. Посіви поміщають у термостат при температурі 37 °С. Для виявлення сальмонел з жовчного бульйону через 5 і 20 год. роблять висів на диференційно-діагностичні середовища. Подальша ідентифікація сальмонел і шигел ведеться за звичайною схемою.

Для виявлення сальмонел і шигел можна безпосередньо вихідну грунтову суспензію фільтрувати через мембранні фільтри, потім їх переносять на диференційно-діагностичні середовища для підрощування.

Патогенні мікроорганізми в грунті можна виявляти, використовуючи іммунолюмінесцентний метод, постановку біопроби (при виявленні клостридій правця і ботулізму).

Санітарно-мікробіологічна оцінка грунту. Її проводять за комплексом показників: загальна кількість сапрофітних мікроорганізмів і наявність санітарно-показових мікробів – БГКП, перфрінгенс та ін. Велика чисельність грунтової сапрофітної мікрофлори свідчить про органічне забруднення грунту, при мікробній контамінації переважають санітарно-показові мікроорганізми. У природних умовах, як правило, мікробне і органічне забруднення відбуваєтьсяодночасно. Для санітарної оцінки ґрунту рекомендується користуватися показниками таблиці 1.4 (додаток 1).

Санітарно-мікробіологічне дослідження зразків грунту

Мета роботи: провести санітарно-мікробіологічне дослідження зразків грунту, вивчити морфологію мікроорганізмів грунту, дати оцінку її санітарного стану.

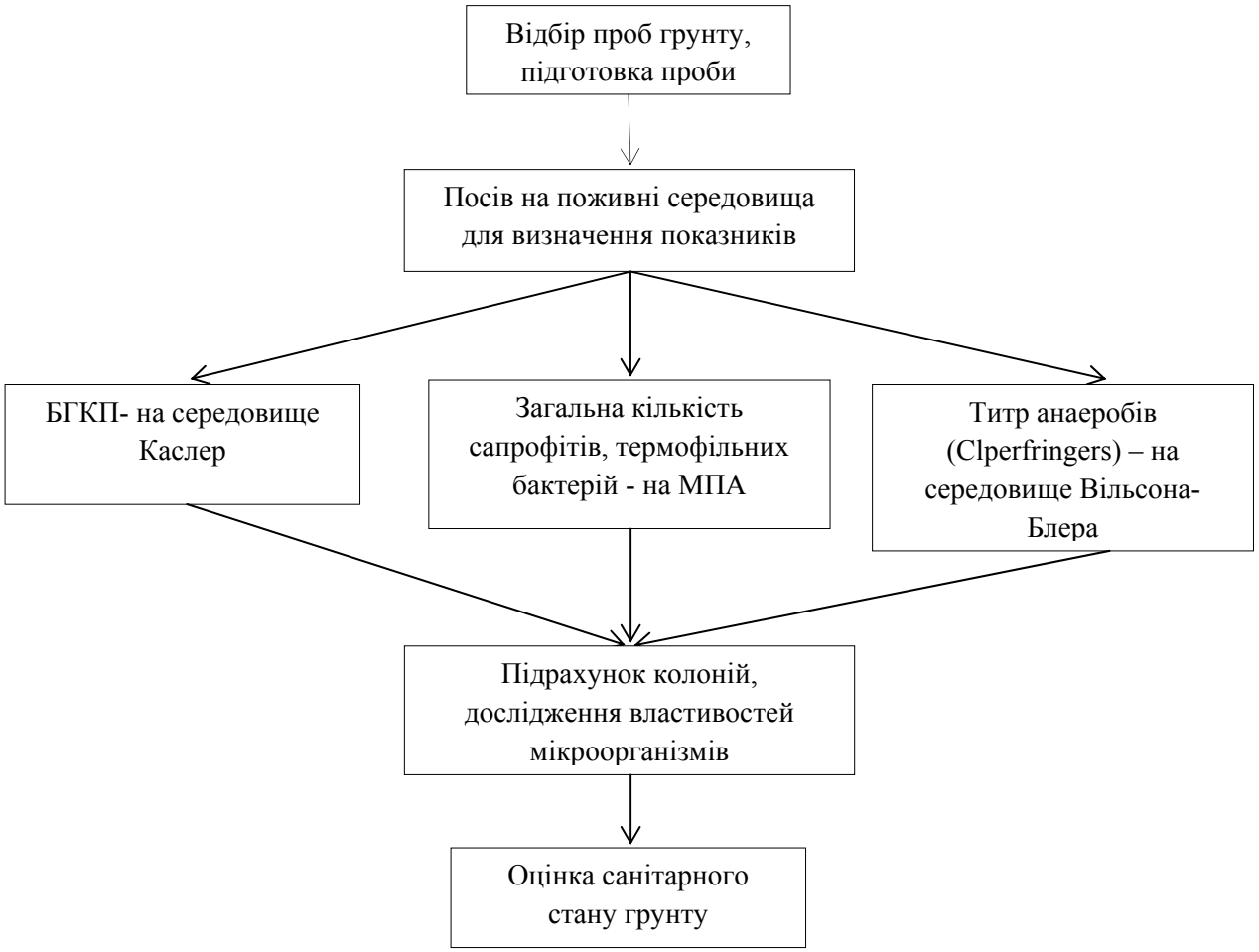
Завдання:

1. Виконати короткий санітарно-мікробіологічний контроль зразків ґрунту.
2. Провести культуральну морфологічну оцінку мікроорганізмів грунту, що ростуть на МПА.
3. Дати кількісну оцінку за всіма показниками.
4. Зробити висновки про санітарний стан зразка грунту.

Питання для самоконтролю

1. Які чинники можуть перешкоджати і сприяти для тривалого збереження патогенних мікроорганізмів у ґрунті?
2. Охарактеризувати процес самоочищення грунту (учасники процесу, сан.значення).

АЛГОРИТМ РОБОТИ



3. Як регламентуються правила відбору проб грунту, обсяг відібраної проби?
4. Охарактеризувати відмінності короткого і повного санітарно-мікробіологічного аналізу грунту.
5. Які мікроорганізми прийняті як санітарно-показові для оцінки санітарного стану грунту?
6. Методи і поживні середовища, які застосовуються для визначення санітарно-показових мікроорганізмів грунту. Характеристика методів.

Заняття 4. САНІТАРНО-БАКТЕОРОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЗМИВУ З ОДЯГУ, РУК, ІНВЕНТАРЯ, ОБЛАДНАННЯ

З метою здійснення постійного санітарно-бактеріологічного контролю на підприємствах громадського харчування, харчових галузей різного профілю за поверхнею об'єктів, що контактують з продукцією, застосовуються різні показники. Наприклад, визначають загальну кількість бактерій об'єкта (руки працівників, спецодяг, обладнання тощо), наявність санітарно-показової мікрофлори (БГКП,

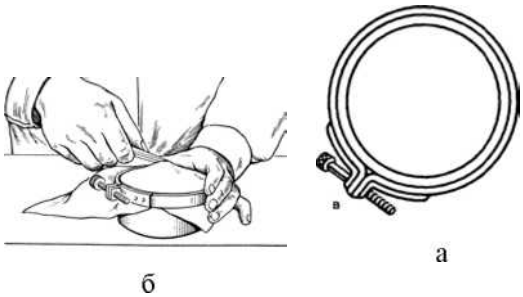
ентерококів), а також в окремих випадках наявність на поверхні досліджуваного об'єкта умовно-патогенної і патогенної мікрофлори, характерною для даного виробництва (при використанні м'ясної сировини – мікроорганізмів роду *Salmonella*, в кондитерському виробництві – *Staphylococcus*). Загальну кількість бактерій об'єкта визначають кількісно (зазвичай у перерахунку на 1см^2 поверхні – мікробне число), а також, в окремих випадках – якісно.

Дані показники визначаються як в плановому порядку в лабораторіях виробництва та працівниками СЕС, так і позапланово за епідемічними показаннями.

Відбір проб для санітарно-мікробіологічного дослідження предметів ужитку і устаткування проводиться за допомогою таких методів:

• змивів (тампонами або серветками);
• відбитків (контактний метод);
• агарової заливки.

Метод змивів. Цей метод є основним при відборі проб для дослідження твердих поверхонь. Змиви з великих плоских поверхонь (столи, підвіконня, підлога, стільці, обладнання, інвентар і т.д.) роблять перед початком робочого дня, або після санітарної обробки в санітарні дні. Загальна площа поверхні великих об'єктів, з якої береться змив – 100 см^2. Для обмеження поверхні використовують шаблон (трафарет) площею 25 см^2, виготовлений з металу, накладаючи його послідовно на 4 різних ділянки. Трафарети перед відбором змивів мають бути простерилізовані. Змиви з рук працівників слід проводити перед початком роботи. При взятті змивів з рук протирають тампоном обидві долоні рук, проводячи не менше 5 разів по одній долоні і пальцях, потім протирають ділянки між пальцями, нігті і під нігтями. При взятті змивів з санітарного одягу протирають 4 ділянки по 25 см^2: нижню частину кожного рукава і дві ділянки з верхньої і передньої частини спецівки. Змиви з посуду на підприємствах громадського харчування роблять, протираючи тампоном всю поверхню досліджуваних об'єктів – для тарілок, робочу поверхню – для ложок, виделок і т.д. (У кількості 2-3 штуки для дрібних об'єктів). Змиви з дрібних предметів можна отримати, занурivши їх безпосередньо в колбу зі стерильною рідиною. Протягом 10 хв їх струшують, потім отриману змивну середу використовують для посівів. У кожному випадку використовують стерильні ватні або марлеві тампони, які перед вживанням змочують стерильним фізіологічним розчином хлориду натрію, водою або живильним середовищем (частіше м’ясопептонним бульйоном або середовищем Кесслера). При контролі жирних поверхонь користуються сухими тампонами або серветками.



а

б

Рис. 5 а – кільце для закріплення тканини в зібраному вигляді;
б – взяття проб мікрофлори тканин

Серветки поміщають в колби із зволожуючою рідиною і транспортують у лабораторії з відповідним супровідним документом, де проводяться відповідні посіви: на загальну забрудненість змиву або його розведення, на присутність санітарно-показових (БГКП, ентерококів), патогенних (сальмонел, синьогнійної палички, протея) мікроорганізмів на відповідні середовища.

Метод відбитків, або контактний метод, застосовується для визначення біологічної контамінації рівної гладкої поверхні (як горизонтальної, так і вертикальної). Шматочки марлі (у вигляді кружків діаметром 3-6 см), мембранні фільтри або смужки фільтрувального паперу поміщають в чашки Петрі і заливають розплавленим щільним середовищем (3 % м'ясо-пептоним агаром або середовищем Ендо подвійної концентрації). Після охолодження стерильним пінцетом забирають кружечки або смужки і накладають стороною, просоченою середовищем, на досліджувану поверхню, притискаючи обережно пінцетом. Потім переносять у стерильну чашку Петрі для подальшої інкубації (нижньою поверхнею вгору). Метод відбитків вигідно відрізняється від методу змивів можливістю безпосереднього виявлення забруднення об'єктів навколишнього середовища і відсутністю втрати мікробів в досліджуваних предметах (що завжди відбувається при розподілі мікрофлори зі змитої поверхні в змочуваній рідини).

Метод агарової заливки застосовується для визначення мікрофлори різних горизонтальних поверхонь, а також тканин. Для відбору проби використовується спеціальна металева пластинка висотою 2 см у вигляді кільця усіченої форми з діаметром верхньої поверхні круга 5 см і нижньої меншою – 4 см (рис. 5 а). Перед дослідженням кільце фламбують обпаленням, охолоджують, поміщають на поверхню досліджуваного об'єкта нижнім краєм і заливають розплавленим і охолодженим до 45 °С м’ясопептонним агаром або середовищем Ендо. Через 5-10 хв після застигання середовища кільце обережно знімають і витрушують в стерильну чашку Петрі застиглу агарову пластинку вгору нижньою поверхнею, яка стикається з досліджуваним об'єктом. Метод зручний тим, що на поверхню середовища захоплюються всі мікроорганізми, що знаходяться на досліджуваній ділянці об'єкта, але він не дає уявлення про загальне обсіменіння предметів через обмеженість досліджуваної площі. Його рекомендують застосовувати при невеликій

бактеріальної забрудненості.

При оцінці санітарного стану предметів побуту, виготовлених з тканин (постільна білизна, ковдри, одяг і т. д.) можна застосовувати метод, що полягає у струшуванні ділянки забруднених тканин над чашкою Петрі з живильним середовищем. Досліджувану тканину затискають в спеціальній металевій обоймі, що складається з двох кілець, що вкладаються один в одне (рис. 5 б), і поміщають над чашкою Петрі з середовищем. Струшування тканини можна робити просто постукуванням по її зовнішній поверхні стерильним пінцетом або, закріпивши в центрі тканини стерильну шпильку, кілька разів її відтягують і відпускають. Разом з пилом з тканини на живильне середовище потрапляють і знаходяться в ній мікроорганізми. Чашку закривають і поміщають в термостат для інкубації.

Визначення загального мікробного обсіменіння об'єкта

Цей показник визначають зізмочуваної рідини, що застосовується при взятті змивів. Посів роблять за звичайною методикою визначення загального мікробного числа. У пробірках з тампонами або в колбах, що містять серветки (після проведення змивів), загальний обсяг рідини доводять до 10 мл, додаючи стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію і отримуючи вихідне розведення 1:10. Після інтенсивного 2-3- хвилинного струшування готують десятикратні розведення. Залежно від передбачуваного ступеня забрудненості посіви роблять з декількох розведень. Висновок за загального обсіменіння (на 1см^2 поверхні) дають на підставі підрахунків за формулою:

$$M = \frac{n \cdot 10}{S}, \qquad (2)$$

де М – загальна бактеріальна забрудненість (КУО/см^2);
n – кількість колоній в 1 мл вихідного розведення змиву;
10 – кількість мл змочуваної рідини;
S – площа, з якої зроблений змив (см^2).

Визначення титру БГКП у змивах

Визначення титру БГКП проводять бродильним методом. При передбачуваному малому ступені фекального забруднення попередньо проводять посів змиву на середовище Кесслера. Підрахунок титру проводять на 1см^2 поверхні. При виявленні БГКП контактним методом або методом агарової заливки використовують середовище Ендо. У цьому випадку можна провести розрахунок числа БГКП на 1 см^2 поверхні досліджуваного предмета (індекс БГКП). Ідентифікація виділених культур БГКП (якщо це необхідно) ведеться як при дослідженні питної води. Однак найчастіше на виробництві користуються більш суворим показником – по першій бродильній пробі. У цьому випадку послідовно

відбирають кілька десятків змивів з різних об'єктів (з обладнання великих розмірів – 2-4 змиву з різних місць) на середовище Кесслер або Кода. Після інкубації пробірок зі змивами в термостаті при 37 °С 18-24 год. вважають відсоток змивів з наявністю в них БГКП від загального числа взятих змивів.

Визначення ентерококів в змивах

Проводиться титраційним методом або методом мембранних фільтрів. Рясний ріст колоній ентерококів свідчить про свіжість фекального забруднення досліджуваного предмета побуту. За титр ентерокока приймається те граничне розведення змиву, в якому виявлені ентерококи.

Дослідження змивів на присутність патогенних стафілококів, сальмонел, протеїв, синьогнійної палички проводять так само, як при санітарно-бактеріологічному контролі харчових продуктів.

Оцінка санітарного стану об'єктів довкілля

При оцінці санітарно-мікробіологічного стану об'єктів виходять з мети обстеження та призначення цих об'єктів. Офіційних регламентацій про стан, склад мікрофлори різних об'єктів практично немає.

Наявні інструктивні матеріали з санітарно-мікробіологічного контролю підприємств суспільного харчування і торгівлі харчовими продуктами вказують на те, що фекальне забруднення повинно бути виключено, тобто не повинно бути БГКП на обладнанні (не контактуючи з сирими продуктами), на вимитому посуді. На всіх обстежуваних предметах побуту та обладнання не повинні виявлятися патогенні мікроорганізми: їх присутність вказує на реальну небезпеку зараження. На жаль, не завжди вдається уникнути фекального забруднення на виробництві, в лікарнях і т.д. У зв'язку з цим, виходячи з досвіду санітарної практики, якщо БГКП виявляються тільки в 5 % проб, узятих з предметів ужитку і устаткування, санітарно-гігієнічний стан обстежуваного підприємства (лікувальної установи) розцінюється як задовільний.

За показниками загального обсіменіння: санітарний стан поверхні вважається відмінним, якщо ОМЧ на 1см^2 не перевищує 100, хорошим – при мікробному числі від 100 до 1000, задовільним – більше 1000, поганим – більше 10000.

У той же час виділення патогенних стафілококів в клініках хірургічного профілю і в пологових будинках з предметів ужитку і від персоналу свідчить про санітарне неблагополуччя. У цьому випадку проводиться обов'язкове визначення фаговарів і антибіотикограми виділяючих стафілококів.

При обстеженні різних об'єктів на стерильність (перев'язувальний та шовний матеріал, системи переливання крові, шприци, голки, грудне молоко, рідину для пиття дітей і т. д.) не повинно бути зростання у всіх посівах.

При оцінці санітарно-гігієнічного стану предметів ужитку і устаткування можна орієнтуватися на критерії (табл. 1.5 додатка 1), розроблені і запропоновані Л. В. Григор'євою та ін. (1977).

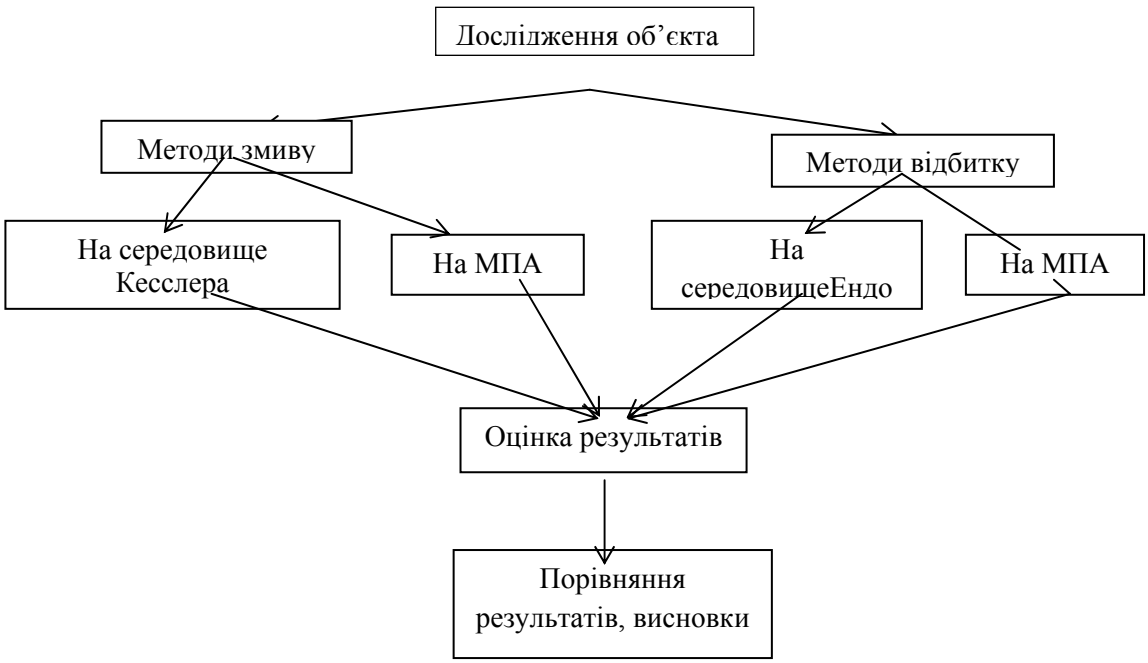
Санітарно-мікробіологічне дослідження змивів з об'єктів навколишнього середовища

Мета заняття: освоїти методи змиву і відбитка для дослідження санітарного стану об'єктів (столи лабораторні, руки студентів, шафи для посуду, термостати і т.д.).

Завдання:

1. Взяти змиви з різних об'єктів – столи, руки, стінита ін.
2. Зробити посів змивів на середовище МПА і середовище Кесслера або Кода.
3. Ці ж об'єкти (поруч з місцем взяття змиву) дослідити методом відбитку на середовища МПА і Ендо.
4. Інкубувати посіви при заданій температурі.
5. Провести кількісну оцінку (там, де це можливо) санітарного стану об'єкта і дослідити морфологічні властивості мікроорганізмів.
6. Порівняти результати санітарного стану об'єкта, отримані різними методами.

АЛГОРИТМ РОБОТИ



Питання для самоконтролю

1. Правила дослідження різних об'єктів методом змиву на показники загального обсіменіння, присутність санітарно-показової мікрофлори (якої?).

2. Сутність методу «відбитка» при визначенні санітарного стану об'єктів навколишнього середовища. Переваги і недоліки методу.
3. Розповісти про метод агарової заливки як одного із способів вивчення санітарно-мікробіологічного стану об'єкта. У яких випадках можна застосовувати цей метод?

Заняття № 5. САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛОКА

Збудники молочнокислого бродіння

Для **приготування і фарбування мазків.** Предметні скельця. Мікробіологічні петлі. Чашки зливальні, містки. Барвник – метиленовий голубий. Вода в колбах для змивання барвника. Олівці або чорнило по склу. Пальники, сірники. Мікроскопи. Кедрова олія. Пастеризоване молоко в колбах ємністю 250 мл по 100 мл у кожній. Заквaски: молочнокис-лого стрептокока і ацидофільної палички. Піпетки стерильні об’ємом до 5 мл. Термостати.

Таблиці: збудники молочнокислого бродіння (морфологія); ріст збудників молочнокислого бродіння на живильних середовищах (форма колоній).

Молочнокислі мікроорганізми розділяють на типові і нетипові. До типових (гомоферментативних) молочнокислих мікроорганізмам відносять ті з них, що при зброджуванні цукрів утворюють в основному молочну кислоту (85-95 %) і незначну кількість легких кислот. Нетипові (гетероферментативні) мікроби є слабкими кислотоутворювачами, поряд з молочною кислотою вони утворюють велику кількість побічних продуктів (оцтову кислоту, етиловий спирт, вуглецю діоксид). Молочнокислі мікроорганізми мають багато загальних ознак. Усі вони факультативні анаероби, грампозитивні, нерухомі, спор і капсул не утворюють. Серед молочнокислих мікроорганізмів розрізняють кулясті і палочкоподібні форми.

Кулясті (кокові) форми. Гомоферментативні молочнокислі стрептококи. Типовий представник цієї групи – молочнокислий стрептокок (Streptococcus lactis). Його клітини мають овальну форму, що у молодих культур розташовуються у вигляді коротких ланцюжків, а в старих – попарно (рис. 6). Молочнокислий стрептокок міститься у всіх кисломолочних продуктах і складає основу мікрофлори простокваш. Добре росте на агарі з гідролізованого молока і молочної сироватки. На щільних живильних середовищах утворює округлі і чечевицеподібні колонії. Округлі з'являються на поверхні, чечевицеподібні – у глибині (рис.7). На сусло-агарі з крейдою (САК) навколо колоній утворюється зона просвітління – результат взаємодії кислоти і крейди. У процесі життєдіяльності молочно-кислого стрептокока нагромаджується до 1% молочної кислоти, кислотність середовища підвищується до 120 °Т.

При оптимальній температурі (30-35 °С) Str. lactis сквашують молоко протягом 10-12 год. Продукт набуває приємного запаху і кислого смаку. Str. lactis має антимікробну дію, утворює поліпептидні антибіотики нізини. Вони стійкі до високої температури і затримують ріст багатьох грампозитивних мікробів, у тому числі і патогенних (Mycobacterium tuberculosis).

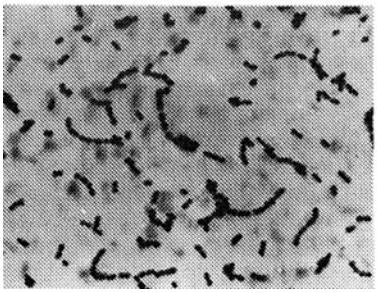


Рис.6. Молочнокислий стрептокок

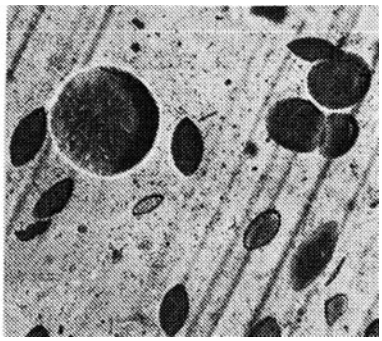


Рис.7. Колонії молочнокислого стрептокока

Вершковий стрептокок (Str. cremoris) утворює довгі ланцюжки (рис. 8). Росте так само, як і Str. lactis, але кислотність середовища нижче (110-115 °Т). Оптимальна температура 25-30 °С. При сброджуванні молока згусток набуває сметаноподібну консистенцію. Вершковий стрептокок входить до складу заквасок для приготування сметани, олії, сирів.

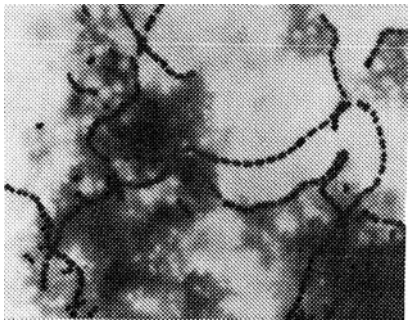


Рис. 8. Вершковий стрептокок

Гетероферментативні молочнокислі стрептококи, окрім молочної, утворюють леткі кислоти, ароматичні речовини, вуглецю діоксид. Деякі з них здатні зброджувати лимонну кислоту. Аромато-утворюючі стрептококи (Str. citrovorus, Str. paracitrovorus, Str. diacetilactis) додають кисломолочним продуктам приємного смаку і аромату. За формою вони подібні на Str. lactis, але клітини в них дрібніші і розташовуються ланцюжком. Для приготування кисломолочних продуктів ароматоутворюючі стрептококи змішують з гомо-ферментативними: молочнокислим і вершковим. Вони мають майже однакову оптимальну температуру росту (30 °С).

Серед гетероферментативних молочнокислих стрептококів є і термофіли (Str.

thermophilus), що розвиваються при температурі близько 45 °С. Це дозволяє використовувати їх разом з термофільними молочнокислими паличками при виготовленні південних простокваш, а також сирів (радянського, швейцарського). До гетероферментативних молочнокислих стрептококів відносять також рід Leiconostoc. Представники цього роду – Leiconostoc citrovorum, Leiconostoc dextranicum – мають округлі клітини, що потім приймають витягнуту форму. Збродживши цукри, вони утворюють невелику кількість молочної кислоти, надають специфічний запах кисломолочним продуктам, тому їх включають до складу деяких заквасок.

Палочкоподібні молочнокислі бактерії розділяють на гомоферментативні (термофільні і мезофильні) і гетероферментативні.

Гомоферментативные молочнокислі бактерії. Термофільні бактерії розвиваються при 40-45 °С; нижче 15 °С їх ріст припиняється. При зброджуванні цукрів утворюють до 3,5 % молочної кислоти, кислотність середовища досягає 300-400 °Т. Молоко згортається протягом 6-12 год. Бактерії мають вигляд довгих паличок розміром 1,5-10 Х 0,5-1 мкм, розташовуються вони поодиноко чи у вигляді ланцюжків. Грампозитивні, спор не утворюють.

У цитоплазмі клітин іноді видно зернистість. На щільному середовищі із сироваткою колонії утворять розгалуження, що нагадують шматочки вати з нерівними краями чи розгалуження коренів (рис.9).

Болгарську паличку (Lactobact. bulgaricum) (рис.10) виділяють з південних простокваш, *ацидофільну* (Lactobact. acidophilum) – із вмісту кишечника, *сирну* (Lactobact. helveticum) – із сирів. Ацидофільну паличку використовують для приготування ацидофіліну, який має лікувальну дію при шлунково-кишкових хворобах. Дія його більш тривала, ніж болгарського кисляку, тому що збудник знаходить більш сприятливі умови в тому середовищі, з якого він виділений.

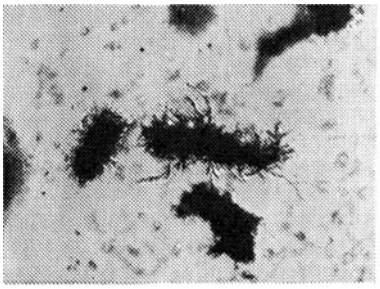


Рис. 9. Колонії ацидофільної палички

Рис. 10. Болгарська паличка

Мезофильні бактерії розвиваються при температурі 30 °С і розташовуються ланцюжком, вони утворюють менше продуктів життєдіяльності, кислотність середовища, у якому вони живуть, не перевищує 180 °Т.

Виділяють два види стрептобактрій: Lactobact. casei, що бере участь у

дозріванні сирів, і Lactobact. plantarum, що стимулює процеси силосування і квашення овочів. Молоко вони згортають повільно.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії. *Бета-бактерії* зустрічаються на рослинах, зброджують цукор з утворенням великої кількості етилового спирту і вуглецю діоксиду. Молоко не доводять до згортання, при цьому утворюється мало молочної, але багато летких кислот, що додають особливий аромат молочним продуктам (сирам, кефіру). Характерним представником бета-бактерій є вид Lactobact. brevis, штами якого зброджують гексози, деякі дисахариди, а також арабінозу і ксилозу.

Приготування препарату. Досліджуваний кисломолочний продукт (сироватку) мікробіологічною петлею наносять на предметне скло і розподіляють тонким шаром на його поверхні. Висушують і фіксують. Фіксувати краще спиртом-ефіром, при цьому розчиняються крапельки жиру, поліпшується фон. Але можна фіксувати і над полум'ям пальника. Мазок фарбують метиленовим голубим протягом 2-3 хв.

Мікроскопічна картина: на світло-блакитному тлі добре видно пофарбовані в синій колір ті форми мікробів, що містяться в досліджуваному продукті.

Кефірні грибки, чи кефірні зерна. Кефірні грибки являють собою зерна неправильної форми кольору, висушені – золотаво-жовтого кольору. Їх використовують для виготовлення кефіру. Висушені кефірні зерна попередньо оживляють у молоці. До складу кефірних зерен входять: молочнокислі стрептококи (Str. lactis, Str. cremoris) і ароматизуючі коки, молочнокислі палички (стрептобактерії), молочнокислі дріжджі (рис.11). Тіло кефірного грибка переплетене нитками палочкоподібного мікроба. Кефірні зерна служать материнською закваскою для одержання всіх наступних заквасок. Кефірні грибки одержують шляхом розмноження. Це продукт тривалого культивування молочнокислих організмів, в результаті чого відбувся стійкий симбіоз.

У кефірі, кумисі і інших подібних продуктах одночасно розвиваються спиртове і молочнокисле бродіння. Для виготовлення кефіру в пастеризоване й охолоджене до 20 °С молоко вносять 3-5 % грибної закваски, перемішують і залишають при такій же температурі для зброджування. При температурі 20 °С і вище переважає молочнокисле бродіння, нижче 15 °С – спиртове. Кількість спирту в кефірі коливається від 0,2 до 0,6 %. Чим триваліша витримка кефіру, тим більше в ньому спирту і вище кислотність.

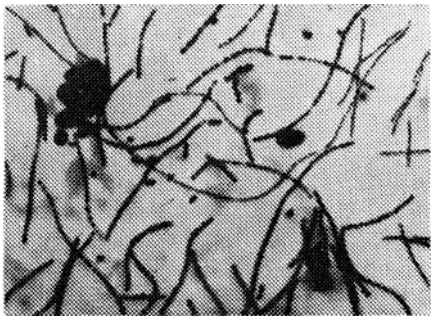


Рис.11. Мікрофлора кефіру

Приготування препарату. Шматочок кефірних грибків поміщають між предметними скельцями, придавлюють і розтягують уздовж. Таким чином, кефірна маса залишається на дотичних поверхнях скелець. Отримані мазки потім висушують, фіксують і фарбують метиленовим голубим протягом 2-3 хв. У полі зору мікроскопа видно переплетення палочкоподібних мікробів, на фоні яких розташовані молочнокислі стрептококи і молочнокислі палички, а також у невеликій кількості клітини дріжджів. Палочкоподібний мікроб, що переплітає тіло кефірного грибка, на звичайних середовищах не росте і у чистому виді поки не виділений.

Приготування кисломолочних продуктів. Кисломолочні продукти мають дієтичні і лікувальні властивості. У них містяться не тільки молочнокислі мікроорганізми, але також вітаміни, антибіотики і інші корисні речовини. Специфічна дія кисломолочних продуктів обумовлюється головним чином молочно-кислими мікробами, що є антагоністами гнильних. У залежності від складу мікрофлори, кисломолочні продукти поділяють на продукти молочнокислого бродіння (кисляк, ацидофілін, ацидофільне молоко; напої “Південний”, “Сніжок”) і змішаного (кефір, кумис, айран), у яких поряд з молочнокислими бактеріями можуть бути молочнокислі дріжджі і оцтовокислі бактерії.

Кисломолочні продукти одержують шляхом сквашування пастеризованого молока чистими культурами молочнокислих бактерій. Такі мікроорганізми містяться в заквасках, вони можуть бути сухими і рідкими. Спочатку готують первинну (материнську) закваску. Для цього в охолоджене пастеризоване молоко вносять порцію заводської закваски і ретельно його перемішують. Продукт ставлять при оптимальній температурі на 12-15 год. За цей час повинний утворитися, рівний щільний згусток, без міхурців газу. Якщо згусток не формується, то значить культура втратила життєздатність і її варто замінити.

У первинній заквасці культура буває малоактивною, тому для відновлення її активності готують вторинну закваску. У пастеризоване й охолоджене молоко вносять 5 % первинної закваски і ставлять при оптимальній температурі на 8-10 год. Робочу закваску готують із вторинної.

Закваска для звичайного кисляку повинна містити тільки чисту культуру Str.

lactis. Для приготування болгарського (мечніковського) кисляку використовують закваску, у яку входять Str. lactis (чотири частини) і Lactobact. bulgaricum (одна частина). Закваска для південного кисляку складається з Lactobact. bulgaricum (три-чотири частини), Str. lactis (одна-дві частини) і невеликої кількості молочних дріжджів. Для ацидофільного молока закваска повинна містити чисту культуру Lactobact. acidophilum. У закваску для ацидофіліну входять у рівних кількостях три культури: стрептококова, ацидофільна і кефірна. Для кефіру закваскою є кефірні грибки, що представляють симбіоз мікроорганізмів: молочнокислих, дріжджів, оцтовокислих і ін. Закваскою для кумису служить такий же продукт.

Для приготування кисломолочного продукту відразу ж після пастеризації й охолодження вносять 5 % закваски і витримують при оптимальній температурі того мікроорганізму, що входить до складу закваски. Оптимальна температура для гомоферментативних ароматоутворюючих стрептококів – близько 30 °С, для молочнокислих паличок і термофільного стрептокока – 40-45 °С. При культивуванні продуктів змішаного бродіння варто враховувати те, що збудники молочно-кислого бродіння розвиваються при більш високій температурі (25-40 °С), дріжджі – при більш низькій (20 °С і нижче).

У процесі сквашування накопичується молочна кислота, зв'язується вода, набухає казеїн і через 8-12 год. утворюється щільний згусток. Готовий продукт повинний мати приємний запах і смак. При мікроскопії в продукті повинна міститися чиста культура мікроорганізмів закваски.

Ацидофілін, ацидофільне молоко, кефір і інші кисломолочні продукти корисно згодовувати молодняку сільськогосподарських тварин, тому що вони профілактують шлунково-кишкові хвороби і сприяють більш швидкому росту і розвитку організму. З препаратів, до складу яких входять молочнокислі мікроби, у тваринництві застосовують: АБК, ПАБК і ін.

Ацидофільно-бульйонну культуру (АБК) готують у ветеринарних лабораторіях. Її вирощують при 40 °С в суліях на середовищі, у яке входять: молочна сироватка, кров від тварин, натрію хлорид, вода. Пропіоново-ацидофільну бульйонну культуру (ПАБК) також готують у лабораторіях. Крім ацидофільної палички, у цей продукт входять пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну B_{12}. Таким чином, ПАБК – комплексний препарат і найбільш ефективний при лікуванні хвороб молодняка і дорослих тварин. У 1 л ПАБК повинно міститися не менш 1000 мкг вітаміну B_{12}. Культуру застосовують при гіпоавітамінозах групи В, аліментарній анемії, шлунково-кишкових розладах, а також для кращого росту і розвитку молодняка сільськогосподарських тварин.

Облік мікроорганізмів у молоці

Для постановки проби на редуктазу. Пробірки великі (на 20 мл молока). Метиленовий голубий (робочий розчин), резазурин (робочий розчин), по 100 мл кожного. Піпетки на 10 мл – 6 шт. Піпетки на 1 мл – 2 шт. Три проби різного молока в колбах і номера на них. Редуктазник. Електрична плитка. Водяна баня. Термометри.

Таблиці: поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого; визначення якості молока по його знебарвленню і фарбуванню (проба з резазурином).

Визначення чисельності і групового складу мікрофлори молока методом посіву. Взяття проб. Після ретельного перемішування молока його наливають в стерильну колбу 500 мл. Проба молока повинна знаходитися в холодному місці, приблизно при температурі + 6°С. Посів молока на живильні середовища краще робити відразу ж і не пізніше ніж через 4 год.

Посіви. Чисельність мікробів у молоці встановлюють шляхом посіву його на щільні і рідкі живильні середовища На щільних живильних середовищах чисельність мікробів визначають по кількості виросліх колоній; на рідких живильних – середовищах по найменшому розведенню, у якому з'явився ріст. Тому що універсального середовища, на якому могли б рости всі мікроорганізми немає, то посіви молока проводять: на МПА – для визначення гнильної мікрофлори; на СА – цвілевих грибів і дріжджів; у пробірки зі стерильним молоком – для визначення молочно-кислих мікробів; На САК (сусло-агар із крейдою) висівають ті з молочнокислих продуктів, де припускають наявність головним чином молочнокислого стрептокока.

Перш ніж приступити до приготування розведень молока, необхідно знати приблизний вміст у ньому мікробів: у 1 мл свіжого молока від окремих корів містяться десятки тисяч мікробів, збірного молока – сотні тисяч мікробів, збірного заводського молока – сотні тисяч і мільйони мікробів. Чим вища чисельність мікробів у молоці, тим більше треба робити розведень, з таким розрахунком, щоб в останньому розведенні було від 1 до 10 живих мікробних клітин. Розведення готують у пробірках на стерильній воді чи ізотонічному розчині натрію хлориду.

Приготування розведень. Стерильною піпеткою вносять у першу пробірку з 9 мл стерильної води 1 мл досліджуваного молока. Виходить розведення 1:10. Новою стерильною піпеткою перемішують розведення 1:10 і 1 мл його переносять у другу пробірку з 9 мл стерильної води. Виходить розведення 1 : 100 і т.д. Звичайно роблять 6-7 розведень молока. З метою економії піпеток одночасно по 1 мл необхідного розведення можна вносити й у чашки Петрі. По 1 мл кожного розведення можна, вносити і однією піпеткою, але при цьому треба починати внесення молока з найбільшого розведення. Для того щоб знати, на які середовища і

з яких розведень необхідно вносити по 1 мл, написи на чашках Петрі роблять заздалегідь.

Схема посіву. Приготувати вісім розведень досліджуваного молока (від 1:10 до 1 : 100 млн). Зробити посів: на чашки Петрі з МПА з розведень II, III, IV; на чашки Петрі із СА з розведень I, II, III; у пробірки зі стерильним молоком з розведень III, IV, V, VI, VII; на лактозу з розведень I, II, III, IV, V, VI.

Після внесення розведеного молока (по 1 мл) розплавляють живильні середовища і при охолодженні їх до 45 °С виливають у чашки Петрі. Круговими рухами чашок живильні середовища рівномірно розподіляють з досліджуваним матеріалом і залишають для охолодження. Потім усі чашки перевертають догори дном. Чашки з МПА ставлять у термостат при температурі 37 °С, із сусло-агаром (СА) – при 25-28 °С на 2-3 доби чи при кімнатній температурі на більш тривалий час. Пробірки з молоком (для обліку молочно кислих мікробів) і лактозою (для обліку газоутворюючих мікробів) поміщають у термостат при температурі 30-40 °С. На чашках Петрі і пробірках роблять написи з указівкою дати, живильного середовища, розведення, прізвища студента і інше.

Визначення мікробного забруднення молока непрямим методом. Постановка проби на редуктазу. Проба з метиленовим голубим. Редуктаза (анаеробна дегідрогеназа) – фермент, що мікроорганізми виділяють у середовище. Він має редукуючі (відновлюючі) властивості. Чим більше мікроорганізмів у досліджуваному продукті (сирому молоці), тим більше повинно бути ферменту. На цій властивості засноване визначення забруднення молока мікробами і його класності непрямим методом. Як індикатор на редуктазу вперше (1912 р.) був використаний метиленовий голубий. Проба з індикатором дозволяє лише приблизно визначити кількість мікробів у молоці.

Приготування робочого розчину метиленового голубого. Спочатку готують насичений спиртовий розчин метиленового голубого: 10 г метиленового голубого змішують з 100 мл 96 %-ного етилового спирту. Розчин ставлять на добу в термостат при температурі 37 °С, а потім фільтрують. Робочий розчин готують з насиченого: до 5 мл такого розчину додають 195 мл дистильованої води і перемішують.

Постановка досліду. У великі мікробіологічні пробірки наливають по 1 мл робочого розчину метиленового голубого і по 20 мл досліджуваного молока. Пробірки закривають гумовими корками, змішують шляхом повільного перевертання пробірок і ставлять у водяну лазню при температурі 38-40 °С. Зміну кольору в молоці враховують через 20 хв, 2 год. і 5 год. 30 хв. У залежності від часу знебарвлення метиленового голубого молоко розділяють на чотири класи (табл. 2).

Верхній шар може бути пофарбованим, тому що молоко контактує з киснем повітря, але це в розрахунок не приймають.

Таблиця 2

Поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого (ДСТ 9225—59)

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість знебарвлення	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Понад 5 год. 30 хв.	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Понад 2 год. до 5 год. 30 хв.	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Понад 20 хв. до 2 год.	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	20 хв. і менше	20 млн. і вище

Прискорена проба з метиленовим голубим. Для постановки прискореної проби на редуктазу робочий розчин метиленового голубого розводять у 10 разів, а кількість молока зменшують у 2 рази.

Постановка досліду. У чисті пробірки наливають по 1 мл розведеного метиленового голубого і з кожної партії вносять по 10 мл молока. Пробірки закривають гумовими корками, перемішують і ставлять у водяну лазню, температура якої 38-40 °С. Облік знебарвлення метиленового голубого у молоці проводять через 5, 10, 15 хв. Молоко, знебарвлене протягом цього часу, містить десятки мільйонів мікро-організмів у 1 мл, головним чином газоутворюючих.

Проба з резазурином запропонована пізніше (1929 р.). За допомогою резазурина визначають не тільки чисельність мікробів, але і лейкоцитів у молоці. Окрім того, резазурин має деякі переваги перед метиленовим голубим – аналіз молока проводиться протягом 1 год, що дозволяє заощаджувати час і з більшою вірогідністю встановлювати його класність. Відновлення резазурина йде в двох стадіях.

Приготування робочого розчину. Спочатку готують основний розчин: 50 мг резазурина розчи-няють у 100 мл прокип'яченої і охолодженої дистильо-ваної води. Термін зберігання основного розчину при 3-5 °С не більше 20 діб. Робочий розчин готують з основного шляхом розведення його прокип'яченою і охолодженою дистильованою водою у співвідношенні 1:10. Для приготування 100 мл робочого розчину до 10 мл основного розчину додають 90 мл води.

Постановка досліду. У стерильні пробірки наливають 10 мл досліджуваного молока і 1 мл робочого розчину резазурина. Пробірки закривають чистими гумовими корками і 3 рази повільно перевертають, після чого їх поміщають у водяну лазню при температурі 38° С. Облік результатів проводять через 20 хв. і через 1 год. Через 20 хв. пробірки зі знебарвленим молоком видаляють, а інші один раз перевертають і знову ставлять у водяну лазню до кінця досліду. Якість молока визначають по його знебарвленню і колбору з урахуванням часу.

Таблиця 3

Визначення якості молока за його знебарвленням і кольором (проба з резазурином)

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість зміни кольору	Забарвлення молока	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Через 1 год.	Синьо-сталеве	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Через 1 год.	Бузкове чи синьо-фіолетове	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Через 1 год.	Рожеве чи біле	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	До 20 хв.	Біле	Більше 20 млн.

Безпосередній підрахунок мікробів під мікроскопом. Метод Драйєра — Корольова. Цей метод заснований на зіставленні клітин у стандартній суспензії з кількістю мікробів у досліджуваному молоці. Стандарт являє собою суміш убитих фіксованих клітин якого-небудь мікроба (наприклад, дріжджів), у 1 мл якого міститься 10 млн клітин. Після ретельного збовтування беруть 1 мл суспензії стандарту і досліджуваного молока і змішують їх. На знежирене предметне скло наносять краплю суміші і розподіляють на його поверхні. Після фіксації і фарбування проводять роздільно підрахунок клітин стандарту й іншої мікрофлори в полі зору мікроскопа. Підрахунок ведуть у 10-20 полях зору (чим більше полів, тим точніше результати). Після підрахунку визначають середнє число клітин мікробів у молоці в зіставленні із середнім числом клітин стандарту.

Приклад. У 20 полях зору виявлено 60 клітин стандарта і 80 клітин мікробів досліджуваного молока. При наявності в 1 мл стандарта 10 млн. клітин у 1 мл досліджуваного молока буде міститися приблизно 13 млн. клітин.

Заняття № 6. САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ М'ЯСА

Екстракт із м'яса № 1 і 2. Апарат Михаеліса (макро чи мікро). Індикатор паранітрофенол. Вода дистильована. Піпетки. Реактив Неслера. Сухі чисті пробірки. Мілілітрові піпетки (для реактива Неслера, екстракта з проби м'яса № 1 і 2, дистильованої води).

Таблиця: визначення якості м'яса по реакції на аміак з реактивом Неслера (по В. Ю. Вольферцу).

Мікрофлора м'яса. Мікробіологічне дослідження м'яса проводять для визначення мікробного забруднення, мікробів-збудників різних хвороб і придатності його в їжу. Поряд з мікробами в м'ясі можуть бути продукти їхньої життєдіяльності. Спочатку проводять органолептичне дослідження м'яса, потім, у залежності від ступеня свіжості, мікроскопіюють мазки-відбитки і роблять посіви на МПБ і МПА.

Мікроскопія мазків-відбитків із проби м'яса № 1 і 2. На предметному склі роблять два відбитки: один з поверхневого, інший із глибинного шару м'яса. Для приготування мазка-відбитка з поверхневого шару м'яса стерильними ножицями вирізують шматочок і зрізаною стороною прикладають до поверхні профламбованого і охолодженого предметного скла. Для виготовлення мазка-відбитка з глибинних шарів поверхню м'яса припікають шпателем, роблять розріз, із глибини витягають шматочок м'яса, який і прикладають до поверхні скла. Препарати-відбитки висушують на повітрі, фіксують над полум'ям пальника, фарбують за Грамом і мікроскопіюють. Переглядають не менше п'яти полів зору, у кожному полі окремо підраховують кокові і палочкоподібні форми мікробів. Середню кількість мікробів визначають шляхом додавання всіх клітин і ділення їх на число полів.

Облік результатів дослідження. *М'ясо абсолютно свіже,* охолоджене – відбитків тканин м'яса на склі майже немає, фарбування мазка непомітне. У препараті-відбитку з поверхневого шару можна бачити одиничні коки і палички. У препараті-відбитку з глибинних шарів м'яса – мікроби відсутні.

М'ясо умовне придатне – мазки-відбитки пофарбовані задовільно, тому що тканевий сік містить більше щільних речовин (початок розпаду тканин). У полі зору можна бачити коки і невелике число паличок.

М'ясо несвіже – мазки сильно пофарбовані, тому що до скла прилипає велика кількість тканини, що розпалася. У полі зору багато паличок і коків. При сильному розкладанні коки майже відсутні, у полі зору палочкоподібні форми мікробів.

Визначення загальної кількості мікробів. З кожної проби за допомогою стерильних ножиців вирізують по 1-2 г м'яса і поміщають у стерильні бюкси. Після їх зважування вміст переносять у ступку із стерильним товкачиком і розтирають. Потім додають 10 мл стерильної води. Перемішують. У чашку Петрі вносять по 1 мл суспензії і 10-12 мл розплавленого й охолодженого до 45°С мясопептонного агару. Обертальними рухами суміш розподіляють по дну чашки і залишають до охолодження. Перевернені чашки поміщають на добу в термостат при температурі 37 °С. Число мікробів визначають у 1 г (1 мл) досліджуваного м'яса. Для цього підраховані колонії множать на розведення.

Визначення концентрації водневих іонів (pH). *Приготування фільтрату-екстракту.* З поверхні м'яса зрізують шматочок, звільняють його від жиру і

сухожиль. Зважують 10 г, дрібно нарізають і заливають 100 мл дистильованої води, енергійно струшують. Через 15 хв фільтрують через паперовий фільтр. Витяжку досліджують колориметричним методом за загальною методикою з паранітрофенолом. У свіжому м'ясі pH досягає 5,9-6,4; у сумнівному – 6,6; у непридатному – 6,7 і вище. Витяжка зі свіжого м'яса повинна мати pH 5,8-6,7 і, як виняток, 6,4.

Примітка. Для визначення pH універсальним індикатором беруть 1 мл фільтрату-екстракту й одну краплю індикатора. Змішують. Концентрацію водневих іонів визначають за шкалою.

Визначення аміаку реактивом Неслера (краплинний метод). Реакцію ставлять у двох пробірках: в одну з них наливають 1 мл м'ясного фільтрату-екстракту, в іншу – 1 мл дистильованої води (контроль). Реактив Неслера вносять у пробірки по краплях. Зміна кольору і появу осаду враховують після додавання кожної краплі. Результат оцінки реакції вказують хрестами (табл. 4).

Таблиця 4

Визначення якості м'яса за реакцією на аміак з реактивом Неслера (за В. Ю. Вольферцом)

Число капель реак-тива	Зміна кольору і випадіння осаду	Приблизний вміст аміаку, мг %	Оцінка реакції	Якість м'яса
10	Колір не міняється, помутніння і осаду немає	До 16	–	свіже
10	Пожовтіння і слабке помутніння, осаду немає	16-20	±	Початкова стадія псування, м’ясо підлягає терміновій реалізації
10	Пожовтіння, незначне помутніння і незначний осад	21-30	+	–“–
6-9	Пожовтіння або помаранчевий відтінок і осад	31-45	++	Умовно придатне, термінова реалізація після зачищення підозрілих ділянок
1-5	Різке пожовтіння або помаранчево-червоний колір і осад	Більше 45	+++	Непридатне, підлягає технічній утилізації

Реакція визначення аміаку реактивом Неслера є демонстративною і може служити одним із критеріїв при оцінці якості м'яса.

Приготування реактиву Неслера. 5 г калію йодиду розчиняють у 5 мл гарячої дистильованої води; 15 г калію гідроокисі (КОН) розчиняють у 40 мл дистильованої води. Розчини змішують і додають 1-2 мл насиченого розчину ртуті дихлориду (сулема). Після охолодження об′єм розчинів дистильованою водою доводять до 100 мл. Зберігають реактив Неслера в банці з темного скла.

ДОДАТОК 1

Таблиця 1.1.

Критерії оцінки повітря закритих приміщень

Оцінка повітря	Загальне обсіменіння (на 1 $м^3$)	Кількість стрептококів в 1$м^3$
Літо		
Чисте	до 1500	до 16
Забруднене	1500-2500	16-36
Зима		
Чисте	до 45003	до 36
Забруднене	4500-7000	36-124

Таблиця 1.2.

Санітарно -мікробіологічна оцінка холодильних камер

Оцінка	Повітря	Стіни
	загальна кількість спор міцел. гри-бів, що осіли на чашкі Петрі за 5 хв	загальна кількість спор міцел, грибів на 1 $см^2$ поверхні
Добре	0-10	0-20
Задовільно	11-50	21-100
Погано	> 50	> 100

Таблиця 1.3.

Критерії оцінки води

Категорія води	Показники		
	мікробне число	колі-титр	колі-індекс
Питна вода водопровідна	не більше 100	не менше 300	не більше 3
Вода плавальних басейнів	» » 100	» » 300	» » 3
Вода водопроводів і ін. великих міст, артезіанських свердловин	» » 100	» » 500	» » 2
Вода питна із колодязів і каптажів джерел		» » 100	» » 10

Таблиця 1.4.

Орієнтовна схема оцінки санітарного становища грунту по бактеріальним показникам*

Грунт	Титр			Кількість термофілів (в 1 г)
	кишкової палочки	перфрингенс	нітрифікуючих бактерій	
Чистий	10 і вище	0,01 і вище	0,1 і вище	100-1000
Забрудненний	0,9—0,01	0,009—0,0001	0,09-0,001	1001-100000
Сильно забруднений	0.009 і нижче	0.00009 і нижче	0.0009 і нижче	100001-4 000 000

(*Отримані дані співставляються з гельмінтологічними і хімічними показниками)

Таблиця 1.5.

Критерії оцінки предметів побуту і обладнання по санітарно-мікробіологічним тестам

Оцінка об'єкта	Загальне мікробне обсіменіння	Титри	
		колі	ентерокока
Чистий	До 10000	> 1	>1
Помірно забрудненний	10000-100000	1-0,1	>1
Сильно ззабрудненний	100 000	<0,1	<1

ДОДАТОК 2

Способи приготування поживних середовищ

Середовище для виявлення гемолітичного стрептокока (ср. Туржецкого). До розплавленого гарячого 2 % МПА з 0,5 % глюкози і pH = 7,4 додають при постійному перемішуванні 8 % дифібринованої крові. Агар (не доводити до кипіння!) прогрівають на спиртівці і перед розливанням у чашки до нього додають до 100 мл середовища 0,2 мл 0,1 % водного розчину генціанового фіолетового.

Середовища для виявлення БГКП (ОКБ)

(ГПС – глюкозопептонне середовище). Концентроване. В 1 л води розчиняють 100 г пептона, 50 г хлориду натрію, 50 г глюкози, суміш нагрівають до кипіння, фітрують, встановлюють pH 7,4-7,6. Нормальної концентрації. Готують так само, як концентровану, тільки кількість інгредієнтів в 10 разів менше. Стерилізують при 112 °С 12 хв (у флаконах). При охолодженні в середовище додають індикатор Андреде.

Середовище Ендо з молоком. Середовище готують з сухого порошку, але води береться менше на 10 %, її замінюють стерильним молоком. До 100 мл середовища додають 0,2 мл 5 % -ного спиртового розчину основного фуксину, 0,2 мл 5 % -ного розчину розолової кислоти.

Жовчно-лактозний бульйон з діамантовим зеленим. До 700 мл дистильованої води додають 10 г пептона, 10 г лактози, 200 мл жовчі, 13,3 мл 1 % -ного водного розчину брилянтового зеленого і доливають воду до загального об'єму 1 л. Розливають у колби з поплавками. Стерилізують при 112 ° С, 12 хв.

ФКП-1. Готують так само як жовчно-лактозний бульйон, але лактози беруть 1 г і додають 1 г триптофану.

Середовище для виявлення клостридії (ср. Вільсона-Блера). До 100 мл цукрового (з 1 % глюкози) розплавленого і охолодженого до 600 °С МПА додають 5-10 мл 20 % -ного розчину сульфіту натрію і 1 мл 8 % -ного розчину хлориду заліза, приготовані на стерильній дист. воді.

Середовище для виявлення стафілококів, (молочно-сольовий агар). До 1 л МПБ додають 65 г хлориду натрію, 20 г агар-агару. Розливають, стерилізують при 1200 °С 20 хв. Перед посівом до розплавленого й охолодженого до 450 °С агару додають 10 % -ного стерильного молока, перемішують і розливають у чашки Петрі.

ДОДАТОК 3

Тести для ідентифікації патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів

Стафілококи

Морфологічно Staphylococcus- грампозитивні коки, розташовані у вигляді характерних «виноградних грон». Патогенні стафілококи на кров'яному агарі утворюють колонії діаметром 2-3 мм, оточені прозорою зоною гемолізу; на молочно- або жовчно-сольовому агарі – колонії, оточені зоною просвітління (протеолітична активність) і райдужним віночком (наявність ферментації лецітовітеллази).

З підозрілих колоній роблять посів на скошений мясопептонний агар для виділення чистої культури. Після 24 год інкубації при температурі 37 °С перевіряється *плазмокоагулююча активність* культури посівом в пробірки з 0,5 мл цитратної плазми (людської або кролячої) в розведенні 1: 4. Патогенні стафілококи коагулюють плазму протягом 2-24 год в умовах термостата. Облік проводять через 1, 2, 4 і потім 24 год за утворенням невеликого желеподібного згустку на дні пробірки. Виділені стафілококи піддаються фаготипуванню при необхідності встановлення джерела виникнення стафілококової інфекції та шляхів поширення.

Стрептококи

Один з представників – Str.viridans (зелений стрептокок) – постійний непатогенний мешканець зіву. На кров'яному агарі Streptococcus утворюють дрібні (точкові) сіруваті колонії з прозорою зоною гемолізу (Р- гемолітичні) і колонії з зеленувато-бурим ореолом і підвищеною прозорістю середовища. На кров'яному агарі нерідко зростання стрептококів пригнічується швидкозростаючою іншою мікрофлорою повітря. Тому облік краще вести на чашках з елективного середовища – Гарро і Туржецкого, в які для придушення супутньої флори додається генціан фіолетовий, що володіє бактеріостатичними властивостями у відношенні до сапрофітів повітря. Культивування проводять при 37 °С. Після підрахунку колоній, що виросли з підозрілих на стрептококи роблять мазки (стрептококи розташовуються короткими ланцюжками або скупченнями) і потім пересівають на кров'яний агар або в цукровий бульйон. У бульйоні стрептококи утворюють ланцюжки, в чому необхідно переконатися за допомогою мікроскопії мазків, приготовлених з характерного придонного осаду (у вигляді пластівців або крихіт на дні пробірки при прозорому бульйоні).

Дослідним шляхом встановлено наступна залежність: якщо в 2-х чашках після експозиції в 20 хв розвинулося 2 колонії, то повітря вважають чистим, якщо 3-4- слабо забрудненим. У класах після занять дослідниками вловлювалося до 50000 клітин зеленого стрептокока в 1м^3.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ветеринарна мікробіологія та імунологія / А. В. Демченко, В. А. Бортнічук, В. Г. Скибіцький, В. М. Апатенко. – К. : Урожай, 1996. – 368 с.
2. Бортнічук В. А. Ветеринарна мікробіологія : практикум / В. А. Бортнічук, В. Г. Скибіцький, Ф. Ж. Ібатулліна. – К. : Вид-во УСТА, 1993. – 345 с.
3. Ветеринарно-санітарна експертиза харчових продуктів в Україні : Нормативні документи : довідник. – в 3-х т. – Т. 1. – Львів : НІЦ Леонорм, 2000. – 283 с.
4. Ветеринарно-санітарна експертиза харчових продуктів в Україні : Нормативні документи : довідник. – в 3-х т. – Т. 2. – Львів : НІЦ Леонорм, 2000. – 294 с.
5. Ветеринарно-санітарна експертиза харчових продуктів в Україні : Нормативні документи: довідник. – в 3-х т. – Т. 3. – Львів : НІЦ Леонорм – 2000. – 288 с.
6. Горленко В. М. Екологія водних мікроорганізмів / В. М. Горленко, Г. А. Дубина. – К. , 1997.
7. Кочемасова З. Н. Санитарная микробиология и вирусология / З. Н. Кочемасова, С. А. Єфремова, А. М. Рыбакова. – М. : Медицина, 1987. – 352 с.
8. Мікробіологія молока та молочних продуктів / [В. Г. Скибіцький, В. В. Власенко, І. Г. Власенко та ін.]. – Вінниця, 2008. – 412 с.
9. Мікробіологія м’яса та м’ясних продуктів (практикум) / [В. В. Власенко, В. Г. Скибіцький, І. Г. Власенко та ін.]. – Вінниця, 2008. – 308 с.
10. Микробиология продуктов животного происхождения. / [Г. - Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др.] ; пер.с нем. – М. : Агропромиздат, 1985. – 592 с.
11. М’ясо і м’ясні продукти: довідник у запитаннях і відповідях / [В. І. Семанюк, З. В. Крушельницький, М. В. Козак та ін.] ; за заг. ред. В. І. Семанюка. – Львів, 2007. – 742 с.
12. Семанюк В. І. Мікробіологічні дослідження об’єктів довкілля, харчових продуктів тваринного походження, кормів : методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з курсу „Ветеринарна мікробіологія” / В. І. Семанюк, О. Я. Захарів. – Львів, 2004. – 54 с.

Навчальне видання

САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладачі: **Кот** Стах Петрович

Кириченко Віктор Анатолійович

Формат 60х841/16 Ум. друк. арк. 4,8

Тираж _30__ прим. Зам. № ___

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №4490 від 20.02.2013р.