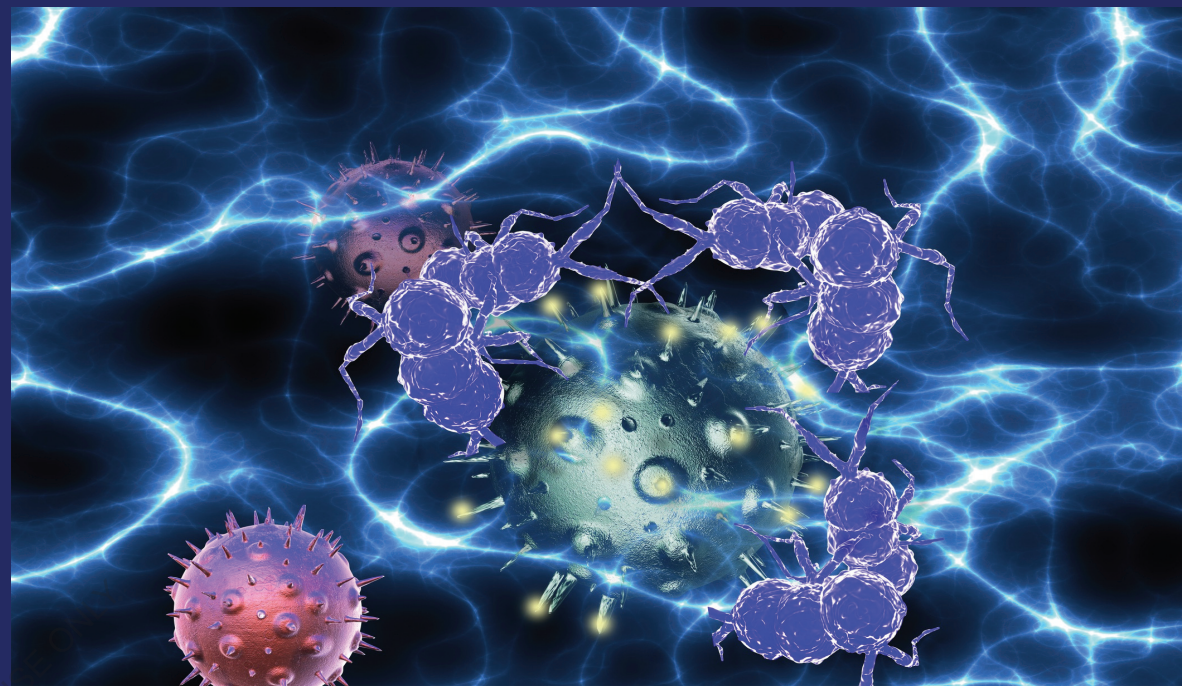


Учебное пособие написано по практическим материалам и экспериментальным исследованиям, и предназначен для токсикологов, врачей микробиологов, врачей лаборантов, врачей санитарно-эпидемиологических служб, ветеринаров, экологов и организаторов здравоохранения. Учебное пособие содержит сведения, необходимые для организации и проведения экспертизы микробиологического исследования при поражении атмосферного воздуха, почвы и водных объектов различными химическими веществами, а также в продуктах питания с изучением числа содержащих микроорганизмов в нем, как основного биологического субстрата.



Гамаль Каримович Аширбеков

Пособие к практическим занятиям по санитарной микробиологии

Аширбеков Гамаль Каримович - профессор кафедры «Патологии человека», Международный казахско-турецкий университет имени Х.А. Ясави. В 2001 г. защитил кандидатскую, в 2010 г. докторскую диссертацию. Имеет более 180 научных работ.

FOR AUTHOR USE

Гамаль Каримович Аширбеков



Гамаль Каримович Аширбеков

**Пособие к практическим занятиям по санитарной
микробиологии**

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

Гамаль Каримович Аширбеков

**Пособие к практическим
занятиям по санитарной
микробиологии**

FOR AUTHOR USE ONLY

LAP LAMBERT Academic Publishing RU

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

LAP LAMBERT Academic Publishing

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd., member of the OmniScriptum S.R.L
Publishing group

str. A.Russo 15, of. 61, Chisinau-2068, Republic of Moldova Europe

Printed at: see last page

ISBN: 978-620-5-49278-9

Copyright © Гамаль Каримович Аширбеков

Copyright © 2022 Dodo Books Indian Ocean Ltd., member of the
OmniScriptum S.R.L Publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

Г.К. Аширбеков

**Пособие к практическим занятиям по
санитарной микробиологии**

Учебное пособие

FOR AUTHORITY USE ONLY

УДК 614.4:576.8

Рецензенты:

Ишигов И.А. – профессор кафедры Морфология и физиология человека, факультета общей медицины Международного казахско-турецкого университета им. Х.А. Ясави;

Баймуратова М.А. – профессор кафедры Общественное здоровье и социальные науки, Казахстанский медицинский университет Высшей школы общественного здравоохранения.

В настоящем учебном пособии излагается основные методические приемы санитарно-микробиологических исследований применительно к программе обучения студентов профилактической медицины и экологов, также может служить практическим руководством для врачей-бактериологов противозидемических учреждений – Туркестан: Международный казахско-турецкий университет имени Х.А. Ясави, 2022. – 150 с.

ISBN 978-620-5-49278-9

Учебное пособие написано по практическим материалам и экспериментальным исследованиям, и предназначен для токсикологов, врачей микробиологов, врачей лаборантов, врачей санитарно-эпидемиологических служб, ветеринаров, экологов и организаторов здравоохранения.

Учебное пособие содержит сведения, необходимые для организации и проведения экспертизы микробиологического исследования при поражении атмосферного воздуха, почвы и водных объектов различными химическими веществами, а также в продуктах питания с изучением числа содержащих микроорганизмов в нем, как основного биологического субстрата.

РЕЦЕНЗИЯ

На учебное пособие Аширбекова Г.К. по теме: «Пособие к практическим занятиям по санитарной микробиологии»

Одним из основных вопросов остается определение санитарно-эпидемиологического состояния и экологии, а также возможность оценки и прогнозирования в изменении происходящих окружающей среде: в водно-хозяйственных объектах, в почве и в атмосферном воздухе – это санитарная микробиология.

Эксплуатация любой агроэкосистемы и промышленного освоения предполагает наличие постоянной антропогенной нагрузки на открытые водоемы, почву и атмосферный воздух, которая может быть разной по интенсивности и продолжительности. При этом изучаемая среда является основным «базовым» компонентом агроэкосистемы, функционирование которой во многом обусловлено деятельностью микроорганизмов. Одним из важнейших свойств экосистем в целом и микробного комплекса в водных объектах, в почве, а также и атмосферного воздуха в частности являются сохранение и поддержание значений своих параметров и структуры.

Снижение продуктивности сельскохозяйственных культур указывает на потерю стабильности агроэкосистемы. Однако это уже конечная стадия ее реакции на антропогенное воздействие, которой предшествовали изменения других показателей: физико-химических свойств почвы, воды и атмосферного воздуха, сбалансированности биохимических процессов, фитотоксической активности микробных сообществ в водно-хозяйственных объектах, почве и атмосферном воздухе.

Одна из задач санитарной микробиологии - это разработка предельно допустимых концентраций химических веществ в водных объектах, почве и в атмосферном воздухе, где учитывается стабильность микроорганизмов, механизмы миграции их из почвы в открытые водоемы и атмосферный воздух, или в обратную сторону, т.е. в различных вариациях - контактирующие между собой в окружающей среде (вода, воздух, растения, почва и т.д.). Норматив устанавливается по лимитирующему, т.е. минимальному из четырех количественных показателей соответствующего признака вредности: общесанитарного, водно-миграционного, воздушно-миграционного и транслокационного.


Практическая значимость учебного пособия предложенное доктором медицинских наук Аширбековым Гамалем Каримовичем заключается в том, что раскрыт один из вариантов изучения водных объектов, почвы и атмосферного воздуха по общесанитарному показателю вредности, а также в продуктах питания.

Учебное пособие написано простым и доступным языком, построено по четкой схеме, требуемое к методическим пособиям, поэтому легко воспринимается. Применение методики исследований в учебном процессе

среди студентов медиков профилактической медицины и санитарных врачей, а также экологов возражений не вызывает.

Данное учебное пособие может быть рекомендовано к представлению и утверждению в Научном комитете Международного казахско-турецкого университета имени Х.А Ясави.

Профессор кафедры «Морфологии и физиологии человека»
медицинского факультета
Международного казахско-турецкого
университета им. Х.А. Ясави
Доктор медицинских наук, профессор

 И.А. Ишигов



РЕЦЕНЗИЯ

На учебное пособие Аширбекова Г.К. по теме: «Пособие к практическим занятиям по санитарной микробиологии»

Одним из основных вопросов современной санитарной микробиологии и экологии дает возможность оценки и прогнозирования изменений, происходящих в целинной почве после ее вовлечения в сельскохозяйственное и промышленное освоение. Эксплуатация любой агроэкосистемы предполагает наличие постоянной антропогенной нагрузки, которая может быть разной по интенсивности и продолжительности. При этом почва, вода и атмосферный воздух является основным «базовым» компонентом агроэкосистемы, функционирование которой во многом обусловлено деятельностью микроорганизмов. Одним из важнейших свойств экосистем в целом и микробного комплекса почвы, водных объектов и атмосферного воздуха в частности являются сохранение и поддержание значений своих параметров, без изменения характера функционирования.


Снижение продуктивности сельскохозяйственных культур указывает на потерю стабильности агроэкосистемы. Однако это уже конечная стадия ее реакции на антропогенное воздействие, которой предшествовали изменения других показателей: физико-химических свойств почвы, воды, атмосферного воздуха и особенно на продукты питания первой необходимости, сбалансированности биохимических процессов, фитотоксической активности микробных сообществ вышеперечисленных объектах.

Одна из задач санитарной микробиологии - это разработка предельно допустимых концентраций химических веществ в почве, в водных хозяйственных объектах, в воздухе атмосферном и рабочей зоны, где учитывается стабильность микроорганизмов, механизмы миграции их из объектов в контактирующие с ней среды (вода, воздух, растения, почва и продукты питания). Норматив устанавливается по лимитирующему т.е. минимальному из четырех количественных показателей соответствующего признака вредности: общесанитарного, водно-миграционного, воздушно-миграционного и транслокационного.

Практическая значимость учебного пособия предложенное Аширбековым Гамалем Каримовичем заключается в том, что раскрыт один из вариантов изучения почвы, воды, воздуха и в продуктах питания по общесанитарному показателю вредности.

Учебное пособие написано простым и доступным языком, построено по четкой схеме, требуемое к методическим пособиям, поэтому легко воспринимается. Применение методики исследований в учебном процессе среди студентов медиков и санитарных врачей возражений не вызывает.

Учебное пособие может быть рекомендовано к представлению в Академический комитет Международного казахско-турецкого университета имени Х.А Ясави.

Профессор кафедры «Общественное
здоровье и социальные науки»,
КМУ, «ВШОЗ», кандидат медицинских наук  М.А. Бекмуратова



Перечень сокращения, условных обозначений, символов, единиц и терминов

ПДК – предельно допустимая концентрация
ПДОК - предельно допустимой общесанитарной концентрации
ТМ – тяжелые металлы
ЭХВ - экзогенные химические вещества
МПЭ - модельный почвенный эталон
ПВ – полная влагоёмкость
МПА – мясо-пептонный агар
ПДУ – предельно допустимый уровень
БПК – биохимический показатель кислорода
ОС – окружающая среда
КОЕ – колония образующие единицы
КА – кровяной агар
НДМГ - несимметричный диметилгидразин

FOR AUTHOR USE ONLY

1. Санитарно-бактериологическое исследование воды

Методы санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды имеют важное значение в системе противоэпидемических мероприятий в нашей жизни.

Вода является средой обитания самых разнообразных микроорганизмов. Численность микробов в воде определяется, главным образом, содержанием в ней органических веществ и колеблется в зависимости от сезона и погоды. При всех прочих условиях максимальное количество микробов приходится на летний, а минимальное на зимний период. Когда в связи с понижением температуры воды замедляется скорость их размножения.

В прибрежной зоне микроорганизмов содержится больше, чем в отдалении от берега, особенно в поверхностных слоях воды. Число микробов в водоемах зависит также и от глубины. Все это определяется совокупностью ряда факторов, среди которых наибольшее значение имеют, по-видимому, действие солнечного света, температура воды, содержание растворенных газов, общая глубина водоемов, наличие водорослей.

Основным источником первичного загрязнения водоемов являются сточные воды, в особенности канализационные стоки, а также стоки кожевенных, шерстеобрабатывающих, хлопковых предприятий, боен и биофабрик.

Вода может играть значительную роль в возникновении и распространении многих инфекционных заболеваний. Установлено, что через воду могут передаваться возбудители холеры, брюшного тифа, дизентерии, туляремии, лептоспирозов, полиомиелита, эпидемического гепатита, Ку-лихорадки и некоторые другие инфекционные заболевания. Передача инфекции через воду особенно опасна тем, что ведет к возникновению массовых случаев заболеваний среди лиц, потребляющих зараженную воду.

В связи с этим систематический контроль за водоснабжением является весьма важным звеном в системе санитарно-профилактических мероприятий в городах, аулах, военных городках и в условиях полевой обстановки [1, 2].

В настоящее время в Республике для выполнения санитарно-бактериологического исследования воды существует стандартная единообразная методика, которую должны в обязательном порядке применять все лаборатории. Она описана в государственном стандарте, имеющем силу закона на территории нашего государства. Регламентируются также соответствующим стандартом и правила отбора проб воды для санитарно-бактериологического исследования и транспортировки этих проб от места забора до лаборатории. Единообразие методики исследования необходимо для сравнения результатов, полученных в разных лабораториях различными исследователями или в одной лаборатории, но в разное время.

1.1 Санитарно-показательные микроорганизмы

Возбудители инфекционных заболеваний кишечной группы могут попадать в воду, главным образом, с испражнениями больных и бактерионосителей. Непосредственное обнаружение патогенных микробов в воде наталкивается, к сожалению, на значительные трудности. Это связано с тем, что количество патогенных микробов в воде значительно уступает непатогенным, и при высеве на питательные среды возникают невыгодные для патогенных видов условия конкуренции. Применение элективных сред или иных методов культивирования также далеко не всегда гарантирует успех.

Санитарные врачи и бактериологи в поисках объективных показателей загрязнения воды патогенными микробами вынуждены были обратиться к методам исследования, позволяющим получить косвенное свидетельство возможного присутствия в воде патогенных микробов кишечной группы. Таким косвенным свидетельством служит доказательство самого факта фекального загрязнения воды с одновременной количественной оценкой степени этого загрязнения.

Для установления факта загрязнения воды фекалиями определяется микробное число воды и наличие в ней представителей нормальной микрофлоры кишечника, которые могут служить индикаторами загрязнения, то есть выполнять роль санитарно-показательных микроорганизмов [3, 4].

Микробное число воды. Микробное число воды – это количество колоний микробов, выросших на мясо-пептонном агаре в чашках Петри после 24-часовой инкубации при 37°C из 1 мл исследуемой воды.

Вырастить одновременно все микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом образце воды, практически невозможно, т.к. разные микробы требуют и различных условий питания, аэрации, температур, pH и т.п. В связи с этим ограничиваются выделением и подсчетом только аэробных метатрофных мезофильных микробов, вырастающих на обычных питательных средах. Эту группу составляют преимущественно сапрофитные бактерии, к ним принадлежит и обитатели кишечника человека, которые используют в качестве источника азотного питания белок и продукты его распада и являются главными потребителями органического вещества, вносимого в воду в процессе её загрязнения человеком и животными. Этим определяется и санитарно-показательное значение сапрофитных микробов, число которых возрастает в процессе загрязнения воды органическими веществами. Такое загрязнение чаще всего возникает при попадании в водоем фекальных масс, поступающих из систем канализации или со сточными водами.

Определение микробного числа широко применяется для санитарной оценки воды, так как позволяет составить достаточно четкое представление о содержании сапрофитных микробов в исследуемой воде. Однако следует иметь в виду, что для достоверного суждения о самом факте фекального загрязнения воды, как и степени этого загрязнения, микробное число все же

служить не может. Поэтому этот показатель является ориентировочным и имеет лишь относительную ценность.

Вместе с тем из приведенного выше определения микробного числа следует, что чем выше это число, тем интенсивнее микробная обсемененность воды, причиной которой чаще всего является фекальное загрязнение. Поэтому, чем выше микробное число воды, тем более осторожной должна быть санитарная оценка качества питьевой воды.

Санитарно-показательные микроорганизмы воды. Среди бактерий кишечника человека и теплокровных животных как санитарно-показательные микроорганизмы наиболее исследованы кишечная палочка и её разновидности, энтерококки и спорообразующие анаэробы, преимущественно *Cl. perfringens*.

Изучение географического распределения этих бактерий кишечника показало, что они, как правило, встречаются в зоне обитания человека: в почве, воде, кишечнике домашнего скота и птицы и даже диких животных, длительно пребывающих в окружении человека. И, наоборот, эти бактерии встречаются весьма редко в почве, водоемах и кишечном канале животных, в местностях, не заселенных людьми. Все это и позволило рассматривать присутствие указанных бактерий в окружающей среде, как свидетельство загрязнения её фекалиями человека.

Для решения вопроса о том, какому конкретному представителю из кишечных бактерий отдать предпочтение как санитарно-показательному микроорганизму, важно сопоставить сроки их выживания во внешней среде со сроками сохранения патогенных микробов кишечной группы в тех же условиях. *Cl. perfringens* в виде спор сохраняется вне кишечника весьма длительно, причем это срок несоизмеримо больше возможного выживания патогенных микробов. Поэтому наличие этого микроорганизма в воде может указывать лишь на происшедшее когда-то загрязнение, но не позволяет судить о свежести загрязнения. Энтерококк, наоборот, во внешней среде мало устойчив, и некоторые возбудители кишечных фекалий могут переживать его в воде. Вследствие этого, хотя энтерококк и является показателем свежего фекального загрязнения, его отсутствие в исследуемом материале ещё не гарантирует доброкачественности питьевой воды.

В результате многочисленных исследований было установлено, что только сроки выживания бактерий из группы кишечной палочки в наибольшей степени совпадают со сроками сохранения в воде патогенных бактерий. Поэтому обнаружение кишечной палочки и её разновидностей в воде действительно может служить показателем фекального загрязнения её.

В настоящее время группу кишечной палочки по главным биохимическим признакам подразделяют на следующие подгруппы: *E. coli communis*, *E. coli citrovorum* и *E. coli aerogenes*. Эта классификация бактерий группы кишечной палочки построена в основном с учетом интересов санитарной бактериологии. Наряду с основными биохимическими группами существует и ряд промежуточных, характеризующихся измененным отношением к тому или иному приведенным тестам. Но по численности

атипичные штаммы составляют лишь небольшую часть культур, выделяемых из кишечника и из внешней среды.

Для правильной оценки значение отдельных разновидностей кишечной палочки как показателей фекального загрязнения необходимо знать, какая существует связь между сроками выживания патогенных энтеробактерий и превращениями кишечной палочки в тех же условиях. Имеются основания считать, что кишечная палочка *E. coli communis* может превратиться в *E. coli citrovogum* и даже в *E. coli aerogenes* скорее, чем наступит отмирание патогенных микробов. Поэтому все разновидности кишечной палочки не лишены санитарно-показательного значения. Однако степень их показательности различна. Наиболее важное значение в эпидемиологическом отношении имеет факт обнаружения *E. coli communis*, свидетельствующий о свежем фекальном загрязнении. Выделение же *E. coli citrovogum*, а тем более *E. coli aerogenes* также является доказательством фекального загрязнения, но большей частью имеющего некоторую давность.

Особо должны быть отмечены лактозодефективные кишечные палочки. В основном они формируются во внешней среде, но есть много наблюдений, свидетельствующих о том, что эти бактерии часто появляются в испражнениях людей, болеющих дизентерией или брюшным тифом. Поэтому их присутствие в воде нередко сигнализирует о свежем и опасном фекальном загрязнении. Следовательно при санитарно-бактериологическом исследовании воды необходимо учитывать все разновидности кишечной палочки.

Однако важно не только зарегистрировать факт наличия кишечной палочки в воде, но не менее важно учесть и количественную сторону этого явления, что необходимо для суждения об интенсивности фекального загрязнения. Для этой цели установлены два показателя:

- 1 Титр кишечной палочки (коли-титр);
- 2 Индекс кишечной палочки (коли-индекс).

Коли-титр – это наименьший объем воды, выраженный в миллилитрах, в котором обнаружено присутствие кишечной палочки или её разновидностей. Из содержания этого определения вытекает, что чем выше коли-титр, тем меньше фекальная загрязненность воды и, наоборот, чем ниже коли-титр, тем интенсивнее фекальная загрязненность воды. Следовательно, вода будет тем лучше, чем выше её коли-титр.

Коли-индекс – это количество особей кишечной палочки или её разновидностей, обнаруженное в одном литре воды. Очевидно, что коли-индекс представляет собой лишь способ численного выражения степени обсемененности воды кишечной палочкой и связаны они друг с другом обратной зависимостью – чем выше коли-индекс, тем ниже коли-титр и наоборот.

Понятие о титре энтерококка и о титре *Cl. perfringens* совершенно аналогично понятию о титре кишечной палочки. Определение этих показателей имеет вспомогательное значение и к ним прибегают в тех случаях, когда желательнее получить дополнительную характеристику

фекального загрязнения в отношении его свежести, а стало быть, и эпидемиологической актуальности.

Обнаружение энтерококка является доказательством свежести фекального загрязнения. Напротив, находка только *Cl. perfringens* свидетельствует о том, что фекальное загрязнение имеет уже значительную давность. Наиболее демонстративные результаты получаются при сопоставлении титров названных бактерий с титром кишечной палочки.

1.2 Методика санитарно-бактериологического исследования воды (Правила отбора, хранения и транспортировки проб)

Пробы воды отбирают в стерильные склянки ёмкостью 0,5 л с притертой (либо ватной) пробкой или в полиэтиленовые ёмкости.

Чисто вымытые и высушенные склянки для отбора проб закрывают перед стерилизацией ватными пробками горлышки склянок покрывают бумажными колпачками и завязывают ниткой. Склянки с притертыми пробками при необходимости должны стерилизоваться отдельно, для чего склянку закрывают плотной ватной пробкой, а стеклянную пробку заворачивают в отдельный бумажный пакет и привязывают к горлышку соответствующей склянки. Каждую склянку упаковывают в отдельный пакет и стерилизуют при 160°C в течение часа.

Место отбора пробы воды определяется в зависимости от характера водоисточника и цели исследования:

а) При использовании открытого водоёма для проектируемого централизованного водоснабжения проба должна отбираться в той точке водоема и на той глубине, которые намечаются для будущего забора воды для водопровода;

б) При существующем водозаборе – непосредственно из водоприемного отверстия;

в) При использовании для проектируемого водоснабжения подземных источников – из того водоносного горизонта, где намечается будущий водозабор;

г) При отборе проб воды из вновь сооружаемой скважины (колодца, каптажа), при отсутствии постоянного излива воды, проба должна отбираться после предварительной откачки при эксплуатационной мощности в течение не менее 2 часов;

д) при действующем водозаборе из подземного источника проба должна отбираться из того источника, который используется для водоснабжения. При наличии нескольких скважин пробы отбираются из каждой в отдельности. Все пробы отбираются в часы наибольшего расхода воды при соблюдении правил асептики. Перед забором воды из водопроводных сооружений краны обжигают пламенем, затем спускают воду в течение 10 минут при полностью открытом кране.

Поверхностные пробы воды из открытых водоемов, бассейнов, баков и т.п. отбирают с глубины 10-15 см от поверхности, а при малой глубине – не

менее 10-15 см от дна. При наличии течения пробы отбираются по возможности на быстрине, при падении струи – из падающей струи. Из проруба вода забирается на глубине 10-15 см от нижней поверхности льда. Забор воды производится с помощью батометра.

Отбор проб хлорированной воды производится в склянки с дехлоратором. Для этого в простерилизованную склянку вносится 2 мл 1,5-ного стерильного раствора серноватотистокислого натрия (Na_2SO_3).

Количество отбираемых проб, место и время их выемки предусматриваются планом текущего санитарного надзора за водоснабжением, а в случае появления инфекционных заболеваний планом противоэпидемических мероприятий. При подозрении на какие-либо нарушения санитарного режима водосточника или неисправности водопроводной сети производится внеплановый отбор проб в экстренном порядке. Посуду для взятия проб воды необходимо вынимать из бумажных пакетов, в которых она стерилизовалась только перед самым моментом забора проб.

При отборе пробы составляется сопроводительный документ, в котором должны содержаться следующие сведения:

- а) наименование источника и его местонахождение;
- б) дата забора пробы (год, месяц, число и час);
- в) место и точка взятия пробы: для открытых водоемов – расстояние от берега, глубина водоема и точка отбора; для скважин и колодцев – продолжительность и интенсивность откачки, глубина скважины или колодца;
- г) метеорологические условия: температура воздуха, осадки в день отбора пробы и осадки за предшествующие 10 дней, сила и направление ветра (при отборе из открытого водоема);
- д) особые обстоятельства, имевшие место при отборе пробы, могущие повлиять на результат анализа;
- е) цель исследования воды;
- ж) место службы, должность и подпись лица, производившего отбор пробы воды.

Проба должна быть исследована тотчас же после её отбора или не позднее чем через 2 часа после взятия пробы. При невозможности выполнения этого условия анализ должен быть произведен не позднее чем через 6 часов после отбора воды при условии сохранения её при температуре в пределах от 1 до 5°C тепла (по госту).

В период транспортировки проб склянки должны находиться в вертикальном положении, чтобы ватные пробки не смачивались водой. Пробы должны быть предохранены от действия прямых солнечных лучей и нагревания, а зимой от замораживания, для чего их укладывают в специальные ящики или корзины, желательно с теплоизоляционной прокладкой. При этом температура в ящике (корзине) с пробами должна поддерживаться в пределах 15°C с помощью резиновых мешков, наполненных летом льдом, а зимой – теплой водой.

Приведенные выше требования имеют целью предотвратить изменения в количественном и качественном составе микрофлоры воды в период от забора пробы до момента начала исследования. в противном случае размножение одних микроорганизмов и отмирание других, наступающее в сосуде, особенно при повышении температуры воды, можно резко исказить результаты санитарно-бактериологического анализа воды [5, 6].

1.3 Определение микробного числа воды

Приготовление разведений. Пробу воды тщательно перемешивают, избегая смачивания пробки, после чего из неё отбирают стерильной пипеткой требуемое для посева количество воды. Для чистых вод необходимо взять от 1 до 0,1 мл, для сравнительно грязных – от 0,01 до 0,001 мл. Объемы от 1 до 0,1 мл вносят непосредственно в чашки с питательной средой, количество воды менее 0,1 мл получают путем разведения исследуемой воды стерильной водой. Разведения производят следующим путем: в пробирку с 9 мл стерильной воды вносят 1 мл исследуемой воды и тщательно перемешивают, затем из этой пробирки переносят 1 мл в следующую пробирку с 9 мл стерильной воды и так до тех пор, пока не будет получено требуемое конечное разведение.

Непосредственный высеv на чашку со средой объемов воды более 1 и менее 0,1 мл не допускается. Поэтому как цельную, так и разведенную воду засевают в объемах не более 1 мл.

Посев. Посев производят с таким расчетом, чтобы на чашках с питательной средой выросло от 30 до 300 колоний. Из каждой пробы должно быть использовано для посева не менее двух различных разведений, в зависимости от степени предполагаемого загрязнения исследуемой воды.

Примечание: В случае производства анализа заведомо чистых вод с содержанием бактерий до 300 в 1 мл производится посев на двух чашках по 1 мл неразведенной воды.

Перед посевом исследуемая вода тщательно перемешивается как до предполагаемых разведений в исходной склянке, так и после соответствующих разведений в пробирках. Перемешивание производится стерильной пипеткой путем продувания через неё воздуха. Тотчас же после перемешивания из склянки с неразведенной водой или из пробирок с соответствующими разведениями отбирают по 1 или по 0,1 мл исследуемой воды и вносят в стеклянную чашку под слегка приподнятую крышку. Затем в каждую чашку вливают по 15 мл остуженного до 45°С МПА (мясо-пептоного агара), слегка вращая и наклоняя чашку, быстро смешивают агар с исследуемой водой. При этом необходимо избегать образования комков или пузырьков воздуха в толще МПА и попадания среды на борт чашки.

Засеянные чашки оставляют на строго горизонтальной поверхности до полного затвердевания агара. После этого на дне чашек делают восковым карандашом надписи с указанием номера или названия пробы, разведения, засеянный объем и дату посева. Чашки с посевами помещают в термостат

вверх дном (крышкой вниз) небольшими стопками, по 3-4 штуки каждая при 37°C на 24 часа. Из проб воды открытого водозабора, кроме того, делают посе́вы, которые выращивают 48 часов при 20°C.

Счет колоний. Счет колоний удобнее производить с помощью лупы, отмечая каждую сосчитанную колонию чернилами на доньшке чашки. Должен быть произведен подсчет всех колоний, выросших на чашках. Если же на чашках выросло более 300 колоний и сосчитать все колонии практически трудно, а анализ повторять нельзя, допускается подсчет колоний на отдельных участках с помощью счетной пластинки (счетная камера). Чтобы получить достоверные результаты, необходимо подсчитать не менее $\frac{1}{4}$ площади чашки. Затем высчитывают среднее количество колоний на 1 см² и умножают на всю площадь чашки. Радиус чашки измеряется с помощью той же пластинки.

После подсчета колоний полученные результаты необходимо пересчитать на 1 мл воды, помножив полученное число на коэффициент разведения. Например, если подсчет производится в чашке, в которую был засеян объем воды, равный 0,01 мл, то найденное число колоний необходимо умножить на 100 и т.д. Конечный результат исследования, т.е. искомое микробное число, следует приводить в протоколах анализов в округленной форме (таблица 1).

Таблица 1 – Протокол результата исследования

При количестве колоний в 1 мл	Результат анализа записывается
От 1 до 1 000...	Как было подсчитано
От 101 до 1 000...	Округляя до ближайших 10
От 1001 до 10 000...	Округляя до ближайших 100
От 10 000 до 100 000...	Округляя до ближайших 1 000
От 100 000 до 1 000 000...	Округляя до ближайших 10 000

При санитарной оценке воды с микробным числом до 100 вода считается чистой (по госту 2874-54), вода с микробным числом от 100 до 1000 признается сомнительной. Однако, для колодцев и открытых водоемов допускается микробное число, не превышающее 1000. Загрязненной считается вода, микробное число которой больше 1000. Однако необходимо подчеркнуть, что строить санитарную оценку качества питьевой воды на одном лишь микробном числе, как отдельно взятом показателе, не следует. Для окончательного заключения требуется обязательное сопоставление с результатами количественного анализа определения кишечной палочки как основного санитарно-показательного микроорганизма, достоверно свидетельствующего о фекальном загрязнении [7, 8].

1.4 Определение количества бактерий – показателей фекального загрязнения (группы кишечной палочки)

К группе кишечной палочки в соответствии с ГОСТом относятся микроорганизмы, имеющие следующие обязательные признаки:

а) короткие грамтрицательные неспороносные палочки;
б) аэробы или факультативные анаэробы;
в) сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа в течение 24 часов при 43-45°С;

г) растущие на фуксин-сульфитном агаре с образованием красных с металлическим блеском колоний или темно-красных и розовых с темным центром и прозрачных неокрашенных колоний.

Результаты санитарно-бактериологического анализа воды выражаются в двух значениях – коли-титре или коли-индексе.

Для количественного учета кишечной палочки в исследуемой воде (определение коли-титра) первоначально служил только классический метод: бродильная проба при 43°С на среде Эйкмана или Булижа, последующий высев на плотную дифференциальную среду Эндо и идентификация выросших на ней характерных колоний с применением вторичной бродильной пробы (при такой же температуре, на той же среде) и окраской мазков. Классический метод бродильных проб требовал для выполнения анализа около 72 часов.

В настоящее время вместо этого классического метода для количественного учета кишечной палочки и её разновидностей применяются следующие методы:

а) двухфазный бродильный метод с применением двухсахарного розового агара (РДА);

б) метод мембранных фильтров.

Оба эти метода узаконены действующим ГОСТом и внесенным позднее изменениям.

1.5 Определение коли-титра воды двухфазным бродильным методом

Первый этап исследования. Исследуемая вода подвергается разведению по методу, указанному выше, и высевается на глюкозопептонную среду (Эйкмана). Посев малых объемов воды производится отдельными для каждого объема стерильными градуированными пипетками соответствующей ёмкости (от 1 до 10 мл). Посев больших объемов воды производится, согласно ГОСТу, стерильными пипетками ёмкостью 50 и 100 мл (пипетками Мора). Среда Эйкмана готовится в двух концентрациях; разведенная, которая содержит 1% пептона, 0,5 хлористого натрия и 0,5% глюкозы, и концентрированная, с содержанием тех же ингредиентов, но в десятикратном количестве.

Разведенную среду Эйкмана разливают в пробирки с поплавками по 10 мл в каждую. Она служит для посева малых объемов воды (1 мл и меньше), так как от добавления таких объемов концентрация питательных веществ и осмотические свойства среды существенно не изменяются.

Концентрированную среду Эйкмана разливают в пробирки с поплавками по 1 мл. Эти пробирки служат для посева воды по 10 мл. Среду разливают также в колбы или флаконы по 10 мл. Эти сосуды с поплавками предназначены для посева по 100 мл исследуемой воды. В данном случае расчет основан на том, что после добавления в среду указанных больших объемов исследуемой воды конечная концентрация её станет оптимальной для роста бактерий и выявления их бродильной способности, то есть будет равна концентрации разведенной среды.

Вопрос о том, какие именно объемы исследуемой воды необходимо засеять и сколько нужно посеять тех или иных объемов этой воды, каждый раз решается в зависимости от задачи анализа и характера водоисточника. При ориентировочном анализе, например, засевают по четыре объема, которые в зависимости от подозреваемой степени загрязнения водоисточника берутся в миллилитрах в следующих количествах:

- а) для сильно загрязненных водоисточников – 1,0; 0,1; 0,01 и 0,001;
- б) для менее загрязненных – 10,0; 1,0; 0,1; 0,01;
- в) для относительно чистых – 100; 10; 1,0; 0,1.

При исследовании относительно чистых вод производится посевы следующих объемов:

а) для воды водопроводной и колодезной (грунтовые колодцы) – общий объем 300 мл, в том числе 2 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл;

б) для воды артезианских скважин и водопроводов крупных городов – общий объем 500 мл, в том числе 4 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл;

кроме того, если в постоянно контролируемом водоисточнике установлены при длительном наблюдении лишь незначительные колебания коли-титра воды, то в таких случаях гостом предусмотрена возможность посева следующих объектов:

- общий объем 500 мл (5 объемов по 100 мл);
- общий объем 300 мл (3 объема по 100 мл);
- общий объем 100 мл (10 объемов по 10 мл).

Выбор общего объема здесь будет зависеть от того,

В каких пределах колеблется коли-титр, то есть от степени чистоты воды.

После посева ряда объемов воды на среду Эйкмана посевы помещают в термостат при 42-43°C на 24 часа.

Второй этап исследования. По истечении 24 часов инкубации, а в случае срочного анализа и через 7-12 часов из всех бродильных проб независимо от наличия признаков роста (газообразование, муть) производят пересев на розоловый двухсахарный агар. Для этого материал из среды накопления захватывают петлей, переносят в пробирку со средой, слегка растирают в конденсационной жидкости и высевают уколом в столбик и по

скошенной поверхности агара. Пробирки помещают при 37°C на 18-24 часа, после чего производится учет результатов высева.

Результаты исследования на наличие кишечной палочки считаются положительными, если на среде Эйкмана имеются муть и газообразование или только муть, на скошенной поверхности розолового агара вырастают изолированные желтые колонии или имеется рост в виде желтого штриха на пожелтевшей среде, а столбик агара окрашивается в желтый цвет и разрывается. Для подтверждения наличия кишечной палочки производится исследование выросшей культуры на розоловом агаре в мазках по Граму. При наличии в мазке грамотрицательных палочек результат анализа считается положительным.

При исследовании воды, подвергнутой хлорированию, результат исследования считается положительным, если в среде Эйкмана имеется муть и газообразование или только муть, и на розоловом агаре вырастают серые колонии, не изменяющие цвета среды и не разрывающие столбик агара, но грамотрицательные в мазках по грамму и слабоподвижные. Все эти изменения могли возникнуть у типичных представителей кишечных палочек под влиянием хлора.

При исследовании природных вод и вод в процессе очистки результат считается отрицательным, если на среде Эйкмана имеется муть и газообразование или только муть, но при этом розоловый агар не изменяется.

Необходимо также отметить, что в некоторых случаях, в пересевах со средой Эйкмана, сделанных через 7-12 часов, роста на розоловом агаре может и не быть, а на среде Эйкмана через 24 часа обнаружится газообразование или только муть (рост без газообразования). Это может иметь место при задержке роста кишечной палочки в первичном посеве под влиянием каких-либо бактериостатических факторов. В таких случаях необходимо повторить посев на розоловый агар из тех пробирок или флаконов, в которых появилось брожение.

При применении двухфазного бродильного метода результаты анализа выражают в виде коли-титра, который первоначально выводился непосредственно из результатов анализа. Например, при засевах ряда объемов воды за коли-титр принимали тот наименьший объем, в котором ещё отмечалось брожение. Однако часто возможны случаи, когда в больших объемах брожения нет при наличии такового в меньших. Это может зависеть от неравномерного распределения искомых бактерий или от антагонистического влияния других микробов, или от каких-либо иных случайных причин. При этом создаются трудности для выражения коли-титра, возникают различные толкования результатов, что приводит к разнобою в выводах.

В связи с этим вопросом о распределении искомых микробов в различных объемах воды при тех или иных результатах анализа пришлось решать математически на основе теории вероятности.

На основании этих расчетов были составлены специальные таблицы 2-7. С помощью этих таблиц можно выразить коли-титр (либо коли-индекс) при

любом возможном сочетании положительных и отрицательных результатов в исследуемых пробах. Эти таблицы по госту являются обязательными для пользования при оформлении результатов анализа.

Доброкачественная водопроводная вода должна согласно требованиям госта 2874-54 иметь коли-титр не менее 333 (соответственно коли-индекс, не превышающий 3).

Таблица 2 – Ориентировочный анализ. Объемы: 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 мл

1,0	0,1	0,01	0,001	Коли-индекс	Коли-титр
-	-	-	-	Менее 900	Более 1,11
-	-	+	+	900	1,11
-	-	+	-	900	1,11
-	+	-	-	950	1,05
-	-	+	+	1800	0,56
-	+	-	+	1900	0,53
-	+	+	-	2200	0,46
+	-	-	-	2300	0,43
-	+	+	+	2800	0,36
+	-	-	+	9200	0,11
+	-	+	+	19 400	0,10
+	-	+	+	18 000	0,06
+	+	-	-	23 000	0,04
+	+	-	+	96 000	0,01
+	+	+	-	238 000	0,004
+	+	+	+	Более 238 000	Менее 0,004

Таблица 3 - Ориентировочный анализ. Объемы: 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 мл

10,0	1,0	0,1	0,01	Коли-индекс	Коли-титр
-	-	-	-	Менее 90	Более 11,1
-	-	-	+	90	11,1
-	-	+	-	90	11,1
-	+	-	-	95	10,5
-	-	+	+	180	5,6
-	+	-	+	190	5,3
-	+	+	-	220	4,6
+	-	-	-	230	4,3
-	+	+	+	280	3,6
+	-	-	+	920	1,7
+	-	+	-	940	1,0
+	-	+	+	1800	0,6
+	+	-	-	2300	0,4
+	+	-	+	9600	0,1
+	+	+	-	23 800	0,04
+	+	+	+	Более 23 800	Менее 0,04

Для воды артезианских скважин, поступающей в водопроводную сеть без очистки и обезвреживания, а также для воды туркестанского водопровода установлены более высокие требования: коли-титр не менее 500 (коли-индекс не более 9).

Таблица 4 - Ориентировочный анализ. Объемы: 100; 10; 1,0; 0,1 мл

100	10	1,0	0,1	Коли-индекс	Коли-титр
-	-	-	-	Менее 9	Более 111
-	-	-	+	9	111
-	-	+	-	9	111
-	+	-	-	9,5	105
-	-	+	+	18	56
-	+	-	+	19	53
-	+	+	-	22	46
+	-	-	-	23	43
-	+	-	+	28	36
+	-	+	+	92	11
+	-	+	+	94	10
+	-	-	-	180	6
+	+	-	+	230	4
+	+	+	-	960	1
+	+	+	+	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

Таблица 5 – Вода водопроводная, грунтовые колодцы и т.п.
Общий объем 300 мл (2 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл)

Количество положительных объемов по 10 мл	Количество положительных объемов по 100 мл					
	0		1		2	
	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр
0	Менее 3	Более 333	4	250	11	91
1	3	333	8	125	18	56
2	7	143	13	77	27	37
3	11	91	18	56	38	26
4	14	71	24	42	52	19
5	18	56	30	33	70	14
6	22	45	36	28	92	11
7	27	37	43	23	120	8
8	31	32	51	20	161	6
9	36	28	60	17	230	4
10	40	25	69	14	Более 230	4

Таблица 6 – Вода артезианских скважин, водопровод г. Туркестан
Общий объем 500 мл (4 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл)

Кол-во положительных объемов по 10 мл	Кол-во положительных объемов по 100 мл									
	0		1		2		3		4	
	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр	Коли-индекс	Коли-титр
0	Менее 2	Более 500	2	500	5	200	9	111	16	62
1	2	500	5	200	8	125	13	77	22	46
2	4	250	7	141	11	91	17	59	30	33
3	6	167	9	111	14	71	21	49	38	26
4	8	125	12	83	17	59	26	38	53	19
5	11	91	15	67	20	50	31	32	70	14
6	13	77	17	59	24	42	37	27	92	11
7	15	67	20	50	28	36	44	23	120	8
8	17	59	23	43	32	31	52	19	161	6
9	20	50	26	38	37	27	60	17	230	4
10	22	46	29	35	41	24	69	14	Более 230	Менее 4

Таблица 7 – Для небольших колебаний титра. Объемы: 500, 300 и 100 мл

Общий объем, мл		Кол-во положительных объемов										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
500 (5 объектов по 100)	Коли-индекс	Менее 2	2	5	9	16	Более 16					
	Коли-титр	Более 455	455	196	109	62	Менее 62					
300 (3 объема по 100)	Коли-индекс	Менее 4	4	11	Более 11							
	Коли-титр	Более 250	250	91	91							
100 (10 объемов по 10)	Коли-индекс	Менее 11	22	22	36	51	69	92	120	151	230	Более 230
	Коли-титр	Более 91	46	46	28	20	15	11	8	6	4	Менее 4

Примеры пользования таблицами:

1. При схеме посева 100; 10; 1,0; 0,1 мл забродили сосуды, засеянные 100 и 0,1 мл испытуемой воды. В таблице 2 для такой ситуации находили коли-индекс 92 и коли-титр 11 мл.

2. При схеме посева 2 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл (общий объем 300 мл) забродили 2 объема по 100 мл и два объема по 10 мл. В таблице 3 на месте пересечения вертикального ряда, находящегося под числом забродивших объектов по 100 мл (в данном случае 2), с горизонтальным рядом числа забродивших сосудов по 10 мл находим значение коли-индекса 27 и коли-титра 37.

В соответствии с Правилами санитарной охраны прибрежных районов морей, озер, рек и т.д., которые распространяются на прибрежные районы, отведенные для купания, водного спорта и культурного отдыха, пляжей и водных станций, в границах населенных мест, пригородов, курортов и

санаториев, домов отдыха, туристических и других баз, возбудители инфекционных заболеваний не должны обнаруживаться в воде, а её коли-индекс не должен превышать 10 000 (коли-титр не менее 0,1 мл).

1.6 Определение коли-индекса воды методом мембранных фильтров

Для определения коли-индекса воды методом мембранных ультрафильтров исследуемую воду фильтруют в аппарате Зейтца через специальные фильтры. Мембранные ультрафильтры выпускаются пол пятью номерами, характеризуемыми различным диаметром пор и скоростью фильтрации через них воды.

Для санитарно-бактериологического исследования воды в соответствии с ГОСТом 5216-50, должен применяться фильтр № 3, хотя считаются пригодными и № 1 и 2. Мембранные фильтры стерилизуются 10-15 минутным кипячением в дистиллированной воде. Рабочая часть фильтровального аппарата, с которой входит в соприкосновение вода или фильтр, стерилизуется обжиганием или кипячением. После охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата следует наложить стерильный мембранный ультрафильтр, взяв его обожженным пинцетом.

Во избежание повреждений под ультрафильтр подкладывают простерилизованный кружок из фильтровальной бумаги, предварительно смоченной стерильной водой.

На фильтр накладывается и закрепляется верхняя часть прибора. Через мембранный фильтр должно быть пропущено такое количество воды, чтобы на фильтре с диаметром фильтрующей поверхности около 30 мм выросло не более 50 колоний кишечных палочек.

Для чистых вод (централизованное водоснабжение, артезианские скважины и т.п.) общие объемы, подлежащие фильтрации, варьируют от 300 до 500 мл в зависимости от общей предполагаемой характеристики источника водоснабжения.

При анализе загрязненных вод следует применять фильтрацию после предварительного разведения. Для этого в 100 мл стерильной воды следует внести 1 мл испытуемой воды и профильтровать после перемешивания 1 и 10 мл полученного разведения, что будет соответствовать посеву 0,01 и 0,1 мл испытуемой воды. По окончании фильтрации снимают верхнюю часть прибора, осторожно обожженным пинцетом захватывают фильтр за край и накладывают его на поверхность фуксие-сульфитного агара (Эндо) в чашке. При этом следует избегать образования пузырьков воздуха между поверхностью агара и фильтра. Чашки с фильтрами помещают крышками вниз в термостат при 37°C.

Через 18-24 часа инкубирования в термостате производят подсчет выросших колоний, характерных для группы кишечной палочки, с последующим выборочным изучением в мазках по Граму 2-3 колоний, типично окрашенных и бесцветных. При этом, если в мазках по Граму не

удается обнаружить грамотрицательных неспороносных палочек, то ответ на наличие кишечной палочки дается отрицательный.

При наличии в мазках грамотрицательных неспороносных палочек необходимо перейти ко второму этапу анализа. С этой целью из тех же колоний, которые были использованы для изготовления мазков по Граму, производятся высевы в бродильные сосуды с 10 мл среды ГПС. Посевы выращивают 24 часа в термостате при 43°C. При наличии газообразования в среде дается окончательный положительный ответ на наличие кишечной палочки.

При отсутствии газообразования в бродильных сосудах дается окончательный отрицательный ответ.

Результаты анализа выражают в виде коли-индекса и заносят в протокол анализа. В этом же протоколе должно быть сделано примечание об особых обстоятельствах, имевших место при отборе проб, их транспортировке и обработке [9, 10].

2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

2.1 Микрофлора воздуха

Микроорганизмы в воздухе находятся во взвешенном состоянии. Они обычно фиксированы на частичках пыли или мельчайших капельках воды. Так формируется естественный бактериальный аэрозоль, который перемещается в воздухе в горизонтальном и вертикальном направлениях. Чем выше в воздухе концентрация бактериального аэрозоля, тем он считается более загрязненным.

Воздух постоянно обогащается различной микрофлорой, попадающей в него с поверхности почвы и водоемов. В него также поступают микроорганизмы из дыхательных путей человека, выделяющиеся со слюной и мокротой при кашле, чихании, разговоре, среди которых могут встречаться и возбудители многих инфекционных заболеваний.

В воздухе городов микроорганизмов больше, чем в воздухе лесов или полей; над окультуренной, богатой органическим веществом почвой микробов больше, чем над почвой пустынь; в одной и той же местности до выпадения осадков их больше, чем после дождя или снега. В воздухе закрытых помещений, имеющих хорошую вентиляцию, количество микроорганизмов обычно ниже, чем в воздухе неventилируемых или слабо вентилируемых помещений. В последних чаще обнаруживаются патогенные микроорганизмы.

Микрофлора воздуха чрезвычайно разнообразна и зависит в количественном и качественном отношении, главным образом, от состояния почвы, погоды, времени года, а в помещениях – от их содержания, способа уборки, вентиляции и т.д. Например, после сухой уборки помещения количество микробов в воздухе возрастает во много раз.

Микроорганизмы, находящиеся в воздухе, относятся, в основном, к сапрофитным видам, причем в большинстве они представлены кокками, споровыми палочками, пигментными бактериями, грибами и плесенями. Чаще всего встречаются в воздухе следующие микроорганизмы: *Micrococcus candidus*, *M. roseus*, *Sarcina utea*, *Bact. subtilis*, *Bact. mesentericus*, *Bact. megatherium*, *Bact. prodigiosum*, *Torula alba*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Actinomyces* и др.

Из патогенных микроорганизмов в воздухе встречаются стрептококки, стафилококки, пневмококки, дифтерийные и туберкулезные палочки, вирусы гриппа, оспы, кори, паротита и др.

В воздух патогенные микроорганизмы в естественных условиях попадают двояким путем:

1 С мельчайшими капельками слюны и слизи в момент физиологических актов – кашля, чихания и разговора (капельная инфекция);

2 При высыхании и последующем распылении различных выделений человека и животных, содержащих болезнетворные микробы (пылевая инфекция).

Кроме того, в случае бактериологического нападения или диверсии, воздух может искусственно заражаться самыми разнообразными патогенными микроорганизмами.

Попавшие в воздух микробы в состоянии бактериального аэрозоля способны сохранять жизнедеятельность от нескольких часов до нескольких суток, а в отдельных случаях до нескольких месяцев. На сроки выживания бактерий в аэрозолях влияют температура и влажность воздуха, солнечная и ультрафиолетовая радиации и другие причины.

Бактериальные аэрозоли в воздухе могут находиться в виде трех фаз: капельный, капельно-ядерный и пылевой. Санитарно-эпидемиологическое значение имеют пылевые бактериальные аэрозоли с величиной частиц от 0,5-1 до 30-50 мк, которые способны легко проникать в верхние дыхательные пути и в легкие человека.

Воздушный путь передачи заразного начала является одним из наиболее опасных. Доказано широкое распространение аэрогенных инфекций, которые по своему удельному весу занимают первое место в инфекционной патологии. Поэтому в их профилактике важную роль играет санитарно-бактериологический контроль за состоянием воздушной среды.

Для санитарно-эпидемиологической оценки воздуха, так же как и для воды, необходимо определить санитарно-показательные микроорганизмы, которые являются постоянными обитателями слизистой верхних дыхательных путей человека. Их количественное содержание в воздухе должно косвенно сигнализировать о степени загрязнения воздушной среды патогенными микроорганизмами.

При исследовании воздуха с целью санитарно-эпидемиологической оценки по микробиологическим показателям достаточно бывает определения общего числа микроорганизмов в 1 м³ воздуха (микробное число).

Количественные показатели микрофлоры в воздухе свидетельствуют на возможное загрязнение его патогенными микробами.

Для выявления эпидемиологического неблагополучия возникает необходимость обнаружения в воздухе патогенных микроорганизмов. Однако непосредственное обнаружение их сопряжено со значительными трудностями и проводится, как правило, в окружении больного или бактерионосителя, или по специальным эпидемиологическим показаниям. В связи с этим наиболее важное значение приобретает метод обнаружения в воздухе санитарно-показательных микроорганизмов.

В качестве санитарно-показательных микроорганизмов воздуха приняты *Streptococcus viridians* – зеленающий стрептококк (тип α) и *Streptococcus haemolyticus* – гемолитический стрептококк (тип β). Эти стрептококки являются обычными обитателями носоглотки человека. По мнению ряда исследователей, они могут служить такими же индикаторами загрязнения воздуха, как кишечная палочка служит индикатором бактериологического загрязнения воды.

В воздухе обитаемых помещений стрептококки, как правило, не обнаруживаются. Напротив, в жилых помещениях стрептококки встречаются постоянно и количество их возрастает в зависимости от увеличения общей обсемененности микроорганизмами [11, 12].

Для санитарной оценки воздуха в жилых неветилируемых помещениях предложено А.И. Шафиром следующие примерные показатели в виде таблицы.

Таблица 8 – Критерий для санитарной оценки воздуха жилых помещений (числа микроорганизмов в 1 м³ воздуха)

Оценка воздуха	Летний режим		Зимний режим	
	Всего микроорганизмов	Зеленающего и гемолитического стрептококков	Всего микроорганизмов	Зеленающего и гемолитического стрептококков
Чистый	1500	16	4500	36
Загрязненный	2500	36	7000	124

2.2 Методы бактериологического исследования воздуха

Бактериологическое исследование воздуха проводят со следующими целями:

- 1) определить общее число микроорганизмов в 1 м³ воздуха;
- 2) установить стрептококковые индексы, то есть содержание в воздухе зеленающих и гемолитических стрептококков, как санитарно-показательных микроорганизмов;
- 3) обнаружить патогенные микробы (по эпидемиологическим показаниям).

В настоящее время предложено большое количество методов и приборов для улавливания бактериальных аэрозолей при санитарно-

бактериологическом исследовании воздуха. Систематизированная сводка их представлена в расширенной классификационной схеме В.М. Никитина.

Все методы улавливания бактериальных аэрозолей в зависимости от принципа действия, примененного для улавливания микробов, делятся на группы: 1 – седиментационную, 2- аспирационную, 3 – фильтрационную.

Группы методов улавливания разделены, в свою очередь, на конкретные методы, которые реализованы в определенных конструкциях приборов и аппаратов, применяемых для улавливания воздушной микрофлоры.

При исследовании воздуха с целью получения более полных данных об его бактериальной загрязненности необходимо придерживаться следующих положений.

1. Использовать по возможности высокочувствительные приборы, способные улавливать различные фазы бактериального аэрозоля, т.е. уловить и определить не только вегетативные, но и фильтрующиеся формы бактерий и вирусов.

2. Взятие проб воздуха производить периодически в максимальных объемах (не менее 0,25-0,5 м³) и одновременно в нескольких пунктах исследуемого объекта.

2.3 Седиментационные методы

Седиментационные методы исследования воздуха основаны на осаждении микроорганизмов на открытые поверхности питательных сред, физиологического раствора или стерильных стекол.

На основании характера действующих на воздушную микрофлору побудительных (осаждающих) сил в этой группе можно выделить следующие конкретные методы:

а) метод самопроизвольной седиментации (осаждение частиц аэрозоля происходит под действием силы их тяжести);

б) метод побудительной седиментации (прибывание током воздуха);

в) метод электропреципитации (осаждение под действием электрических сил в поле высокого напряжения).

Чашечный метод Коха. Он получил широкое распространение. Метод заключается в следующем: стерильные чашки Петри с мясо-пептонным агаром оставляют открытыми в местах отбора проб воздуха в течение определенного времени (от нескольких минут до получаса, в зависимости от загрязненности воздуха). По окончании экспозиции чашки закрывают крышками, помещают их в термостат при 37°С на 24 часа и затем выдерживают ещё сутки при комнатной температуре. Вместе с пылинками и мелкими капельками влаги микроорганизмы оседают на питательную среду и здесь образуют колонии. По количеству выросших колоний судят о загрязнении воздуха микробами.

Для приблизительного подсчета количества бактерий в 1 м³ воздуха с помощью метода Коха обычно исходят из данных, что на поверхность

питательной среды площадью в 100 см² в течение 5 минут оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 3 л воздуха.

Положительным качеством метода Коха являются его несложность и доступность, а также возможность одновременного забора большого числа проб воздуха. К отрицательным сторонам метода следует отнести то, что с помощью его не улавливается большая группа мельчайших микроорганизмов, а именно: вирусы и риккетсии. Метод не позволяет быстро забирать и исследовать большие объемы воздуха, поэтому он мало пригоден для полевых условий.

Наиболее эффективными оказались приборы и аппараты, основанные на принципе побудительной седиментации, когда воздушная струя прибавляет микробы к поверхности питательной среды или предметного стекла. Среди различных аппаратов, предложенных для этой цели рядом исследователей (Уэльс, Шафир, Бурдильон, Кротов и др.), наиболее совершенным является прибор Кротова.

Прибор Кротова. Он предназначен как для определения общего бактериального обсеменения воздуха, так и для выделения из него различных патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Использование в нем обычных чашек Петри делает его особенно пригодным для этой цели. Прибор позволяет пропускать от 15 до 45 л воздуха за 1 минуту, что дает возможность в течение небольшого отрезка времени брать большое количество проб.

Прибор Кротова смонтирован в виде цилиндра и состоит из трех основных узлов: а) узла отбора пробы воздуха; б) ротаметра; в) питающего устройства. Он представляет собой цилиндрической формы корпус, закрываемый сверху съемным крышечкой, под которой на вращающемся диске устанавливается чашка Петри с плотной питательной средой. Внутри цилиндра помещается электрический мотор с центробежным восьмиллопастным вентилятором. Последний, вращаясь со скоростью 4-5 тысяч оборотов в минуту, обеспечивает аспирацию воздуха. Прибор питается электрическим током. В питающем устройстве имеется автотрансформатор, позволяющий подключить прибор к сети переменного тока напряжением в 127 или 220 в. Ротаметр предназначен для определения количества литров воздуха, проходящего через прибор в 1 минуту.

Внутрь прибора воздух попадает через клиновидную щель, расположенную над чашкой по её радиусу. В результате турбулентного потока воздуха, внутри цилиндра вращается и диск с чашкой Петри со скоростью 60 оборотов в минуту. Это обеспечивает равномерное распределение микрофлоры по всей поверхности питательной среды.

Для исследования воздуха на общую бактериальную загрязненность обычно используют 2%-ный мясо-пептонный агар. Через прибор пропускают 50 л воздуха в течение 2 минут. Для выделения патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов обычно употребляют различные избирательные среды, и через прибор пропускают до 250 л воздуха.

После взятия проб чашки закрываются и помещаются в термостат при 37°C на 24 часа, затем чашки вынимают и оставляют при комнатной температуре ещё на 24 часа. Всего инкубация продолжается 48 часов. По истечении инкубации производят подсчет выросших колоний и приведение их числа к 1 м³ воздуха. Например: на чашки Петри выросло 180 колоний, воздух просасывался 2 минуты со скоростью 25 л/мин. Всего пропущено 50 л воздуха.

$$\text{Число микробов в 1 м}^3 \text{ воздуха} = \frac{180 \times 1000}{50} = 3600$$

Импакторы – это приборы, имеющие конические сопла-каскады, через которые просасывается воздух. Перед узким концом каждого сопла-каскада помещают улавливающую пластинку (предметное стекло) обычно перпендикулярно или под некоторым углом к направлению струи воздуха. Поток воздуха, выходящий из узкого отверстия сопла, ударяется о поверхность предметного стекла, смазанного какой-нибудь клейкой жидкостью (смесь глицерина с физиологическим раствором и т.п.). Микробы, ударяясь, прилипают к поверхности стекла. Поток воздуха из первого каскада устремляется во второй и т.д. (он проходит все каскады, имеющиеся в импакторе). Причем выходные отверстия каждого сопла последовательно уменьшаются – это способствует увеличению скорости тока воздуха и прибивной силы воздушной струи. В результате происходит не только осаждение бактериального аэрозоля на предметных стеклах, но и его фракционирование по степени дисперсности. Сначала (на первых стеклах) оседают крупнодисперсные частицы аэрозоля, а на последующих – частицы с уменьшающейся дисперсностью.

После забора воздуха предметные стекла вынимают из импактора, и исследуют осевший бактериальный аэрозоль либо с помощью методов микроскопии, либо делают смыв со стекла в физиологическом растворе, из которого затем делают высевы на питательные среды.

Метод термореципитации и электропреципитации ввиду их несовершенства, малой эффективности, дороговизны и технической сложности конструкций предложенных аппаратов не нашли широкого применения в санитарно-бактериологической практике при исследовании бактериальной загрязненности воздуха.

2.4 Аспирационные методы

Аспирационные методы исследования воздуха основаны на просасывании (аспирации) его через жидкости, порошки или водные аэрозоли, адсорбирующие микрофлору.

В настоящее время создано большое число приборов и аппаратов (приборы Дьяконова, Речменского, Розбери, Руденко и др.), основанных на принципе аспирации зараженного воздуха через различного рода среды.

Прибор Дьяконова. Основан на принципе аспирации воздуха через стерильную жидкость (вода, физиологический раствор, бульон).

Он состоит из стеклянного цилиндра ёмкостью 100-200 мл. Цилиндр закрывается хорошо пригнанной пробкой, через которую проходят две стеклянные трубки, причем одна приводящая, длинная, заканчивается у самого дна, а другая – отводящая, короткая – непосредственно под пробкой.

При исследовании воздуха в прибор заливают 10-20 мл воды, причем нижний конец приводящей трубки должен быть погружен в воду. Отводящая трубка соединяется с вакуум-насосом, при помощи которого засасывается исследуемый воздух. Последний входит через приводящую трубку и проходит через воду, которая адсорбирует микрофлору воздуха.

Для измерения объема просасываемого воздуха между вакуум-насосом и прибором Дьяконова включается реометр. Просасывание воздуха ведется со скоростью 10-20 и более литров в минуту. Всего просасывается 100-250 л воздуха. После пропускании через прибор необходимого объема воздуха цилиндр встряхивается и жидкость забирают для исследования.

Для определения микробного числа воздуха в стерильную чашку Петри вносят 1 мл исследуемой жидкости, а затем заливают в неё 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C простого или кровяного мясо-пептонного агара. Смесь перемешивают и дают агару застыть. Чашки с посевами инкубируют в термостате при 37°C в течение 1-2 суток. Затем подсчитывают количество выросших колоний и определяют общую обсемененность воздуха.

Результат подсчета колоний путем умножения приводится к объему 1 м³ воздуха. Например, воздух просасывается через прибор 5 минут по 20 л в минуту. Всего пропущено 100 л воздуха. В прибор было налито 10 мл стерильной воды. Для подсчета взят 1 мл. Число выросших колоний - 20

$$\text{Число микробов в } 1 \text{ м}^3 \text{ воздуха} = \frac{20 \times 10 \times 1000}{100} = 2000$$

С целью обнаружения вирусных агентов исследование жидкости производится согласно специальным схемам вирусологического анализа.

Прибор Речменского. Он основан на принципе аспирации зараженного воздуха через капельный аэрозоль, частички которого адсорбируют на себе микрофлору воздуха.

Бактерио-уловитель представляет собой стеклянный цилиндр длиной 20-25 см, диаметром около 5 см. Внутри цилиндра находится распылительное устройство, нижний конец которого погружен в резервуар, заполняемый стерильной жидкостью. Входной конец цилиндра имеет воронку, которая, постепенно суживаясь, переходит в капиллярную горизонтальную трубку распылителя. Вертикальная трубочка смонтирована так, что верхний конец её находится на уровне и посередине отверстия горизонтально расположенной трубочки, а нижний конец погружен в резервуар с жидкостью.

В.М. Хилько предложил использовать съемные резервуары в аппарате Речменского. В верхней части цилиндра имеются 2 отверстия. Одно – над резервуаром – служит для заполнения последнего жидкостью, а второе – отверстие прибора служит для соединения его с реометром и вакуум-насосом.

Перед отбором пробы воздуха бактерио-уловитель стерилизуется в автоклаве. Затем, соблюдая правила асептики, в резервуар наливают пипеткой стерильный физиологический раствор в количестве 4-5 мл. Отверстие, через которое наливается улавливающая жидкость, закрывается резиновой пробкой со вставленной в неё стеклянной лопаточкой, выполняющей роль отражателя капелек аэрозоля. При отборе пробы прибор закрепляется в штативе и подключается к вакуум-наосу. Распыление жидкости обычно происходит по 30 л в минуту.

В момент действия бактерио-уловителя струя воздуха вызывает распыление жидкости, находящейся в резервуаре, образуя капельный аэрозоль. Взвешивание в воздухе микрофлора и частицы пыли адсорбируются мелкими капельками аэрозоля распыляемой жидкости. В свою очередь капельки аэрозоля осаждаются на внутренних стенках цилиндра и в дальнейшем стекают обратно в резервуар. По окончании отбора пробы воздуха жидкость извлекается стерильной пипеткой и исследуется по общепринятой методике.

Положительной стороной приборов, основанных на принципе аспирации, является высокая скорость забора проб воздуха и возможность улавливания бактериальных и вирусных аэрозолей.

2.5 Фильтрационные методы

Они основаны на механической задержке и адсорбции бактериальных аэрозолей на фильтрующих поверхностях.

Для исследования воздуха применяются как нерастворимые фильтры – ватные, бумажные, мембранные и др., так и растворимые – пеножелатиновые и т.п.

Фильтровальная пластинка из соответствующего материала, чаще всего вырезанная по диаметру фильтровального устройства Зейтца, вставляется в него и плотно фиксируется. С помощью вакуум-насоса, присоединенного к аппарату, просасывают через фильтр определенное количество воздуха. Затем фильтр извлекают и используют для исследования. с этой целью фильтр погружают в небольшой объем стерильного физиологического раствора и путем встряхивания производят реадсорбцию микробов. В результате уловленная на фильтрах микрофлора поступает целиком в раствор, который и подвергается количественному исследованию по общим правилам, принятым в бактериологии.

Мембранные фильтры после забора пробы воздуха могут, кроме того, целиком засеиваться путем их накладывания на мясо-пептонный агар в чашки Петри [13, 14].

3. Санитарно-бактериологическое исследование почвы

3.1 Микрофлора почвы

Нормирование различных веществ в почве началось в нашей стране несколько позже, чем исследования по регламентированию атмосферных и водных загрязнений, производственных условий. Наиболее остро данная проблема встала перед гигиенистами в связи с накоплением в почве отходов промышленных предприятий и в первую очередь тяжелых металлов, радиоактивных веществ, интенсификацией применения минеральных удобрений и пестицидов в сельском и лесном хозяйстве, а также необходимостью удаления твердых бытовых отходов.

По приоритетности нормирования химические вещества располагаются в следующей последовательности: пестициды и их метаболиты, тяжелые металлы, микроэлементы, нефтепродукты, сернистые соединения и другие вещества органического синтеза при систематическом их поступлении в почву как загрязнителей. При разработке предельно допустимых концентраций (ПДК) химических веществ в почве необходимо учитывать их стабильность, механизмы миграции из почвы в контактирующие с ней среды (вода, воздух, растения). Норматив устанавливается по лимитирующему, т.е. минимальному из четырех количественных показателей соответствующего признака вредности: обще санитарного, водно-миграционного, воздушно-миграционного и транс локационного. ПДК химического вещества в почве - это то максимальное количество химического вещества (в мг/кг почвы), которое не вызывает опосредованного отрицательного воздействия на человека через контактирующие с почвой среды и не угнетает само очищающую способность почвы. Пороговая концентрация химического вещества по обще санитарному показателю вредности - это та концентрация, при которой наблюдаются достоверные изменения биохимических показателей (до 25% по сравнению с аналогичными показателями контрольных проб), наблюдаемые в течение 7 дней, и микробиологических показателей (до 50% по сравнению с показателями контрольных проб). Пороговое содержание вещества в почве по водно-миграционному (воздушно-миграционному) показателю вредности - это такая количественная нагрузка вещества на почву, при которой гарантируется переход его из почвы в грунтовые воды без превышения ПДК химического вещества в воде водоемов (атмосферном воздухе). Пороговое количество химического вещества в почве по транслокационному показателю вредности - это такое его количество, при котором гарантируется переход его из почвы в растения и накопление в них в количествах, не превышающих ПДОК (предельно допустимой общесанитарной концентрации) для растительных продуктов. При выборе индикаторных растений предпочтение отдается растениям-концентраторам, избирательно накапливающим данное вещество и широко представленным в пищевом рационе населения (зерновые, бобовые, картофель, капуста, морковь). Определение порогового

количества химического вещества по токсикологическому показателю вредности производится в тех случаях, когда нет утвержденных ПДК и ПДОК для контактирующих с почвой сред (вода, воздух, растения).

Таблица 9 - Предельно допустимые концентрации некоторых химических веществ в почве

Вещество	ПДК, мг/кг	Лимитирующий показатель вредности
Бенз(а)-пирен	0,02	Общесанитарный
ГХ ЦГ (линдан)	0,1	Переход в растения
Медь	3,0	Общесанитарный (влияние на биологическую активность и почвенный микробиоценоз)
Нитраты	130,0	Водно-миграционный
Толуол	0,3	Воздушно-миграционный и транслокационный
Цинк	23,0	Транслокационный

Существуют нормативы (условные дозы) вносимых в почву пашни минеральных удобрений и пестицидов. Повышенная нагрузка последних определяется в сравнении с бывшей со среднесоюзной дозой (1,3 кг/га - для большинства соединений и 0,22 кг/га - для особо опасных).

В качестве показателя биологической активности проб почвы была выбрана ферментативная активность почвы.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, образуемые живыми организмами и характеризующиеся лабильностью и специфичностью действия. Ферменты играют важнейшую роль в обмене веществ в живой клетке.

В почве содержатся различные экзо- и эндоферменты, выделяемые после лизиса клеток. Ферменты, выделяемые в почву, значительное время сохраняют свою активность. Они определяют интенсивность и направленность биохимических процессов, протекающих в почве [14, 15].

3.2 Методика постановки опытов по определению ПДК химического вещества в почве по общесанитарному показателю вредности

Под общесанитарным показателем вредности понимают показатель, характеризующий изменение биологической активности почвы, определяющее самоочищение почвы от экзогенных химических веществ (ЭХВ). Под пороговой концентрацией ЭХВ по этому показателю вредности понимают то максимальное количество соединения (мг/кг абсолютно сухой почвы), которое вызывает на 5-7-е сутки, как изменения общей численности почвенных микроорганизмов, так и численности микроорганизмов основных физиологических групп (спорообразующие бактерии, грибы, актиномицеты и др.) не более чем 50%, а также ферментативной активности почвы (инвертазной, дегидрогеназной, нитрифицирующей и др.) не более чем на 25% по сравнению с аналогичными показателями контрольных проб.

Для соблюдения принципа экстремальности исследований эксперимент проводят на модельном почвенном эталоне (МПЭ) № 1 при температуре 20-30°C и влажности (60% от полной влагоёмкости (ПВ) почвы), максимально способствующих выявлению воздействия ЭХВ на почвенный микробиоценоз. Указанные выше температуры почвы обеспечивают наибольшую численность почвенной микрофлоры при воздействии ЭХВ. Об этом свидетельствуют данные Э. Расселя и Х. Хатчинсона (1970) по изучению влияния толуола на общую численность почвенной микрофлоры, активность процессов аммонификации, нитрофикации, скорость разрушения органических удобрений и др.

При изучении воздействия ЭХВ на почвенный микробиоценоз за исходную рабочую концентрацию для химических средств защиты растений, минеральных удобрений и другие принимают ту, которая создается в почве при максимальных нормах расхода. Для тяжелых металлов, а также соединений, которые поступают в почву с промышленными сточными водами и выбросами, за исходную концентрацию принимают их фоновое содержание в почве. Последующие испытываемые концентрации берут с десятикратным превышением: (например, 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мг/кг). Затем проводят повторную серию исследований в пределах: от недействующих до действующих концентраций. Например, если изучаемое химическое вещество оказывает воздействие на почвенный микробиоценоз в концентрации 10 мг/кг, то в дальнейшем проводят исследования со следующими концентрациями: 1,0; 2,0; 3,0 и т.д. до 10 мг/кг. При необходимости возможно еще большее уточнение действующей концентрации.

После выбора исходной рабочей концентрации изучаемое ЭХВ вносят в почву. С этой целью берут 10-15 навесок воздушно-сухой МПЭ № 1 массой 0,5 кг. Определяют его полную влагоёмкость, а затем рассчитывают количество воды, необходимое для создания влажности почвы, равное 60% от ПВ.

Навеску изучаемого химического препарата растворяют в расчетном объеме стерильной водопроводной воды. В том случае, если изучаемое химическое вещество нерастворимо в воде, следует предварительно растворить его в минимальном объеме (0,5 мл) какого-нибудь органического растворителя (ацетон, гексан и др.), а затем этот раствор добавить к расчетному объему стерильной водопроводной воды. После испарения органического растворителя в расчетном объеме стерильной водопроводной воды образуется однородная взвесь изучаемого химического вещества. Весь расчетный объем воды с изучаемым препаратом в виде его раствора или взвеси добавляют к 0,5 кг воздушно-сухой почвы, помещенной в фарфоровую ступку. Затем содержимое ступки растирают пестиком до состояния однородной массы. Этим приемом исследователи обеспечивают одновременное распределение, как влаги, так и изучаемого препарата. Содержимое ступки переносят в стерильный стеклянный стакан вместимостью 750 мл. Стакан с исследуемым образцом почвы (с разными

заданными концентрациями, а также с контрольной почвой – тот же тип почвы, та же влажность, но без изучаемого препарата) помещают на фарфоровые подставки в сообщаемые с атмосферным воздухом эксикаторы, на дне которых находится раствор серной кислоты плотностью 1,5.

В результате установления динамического равновесия между влагой почвенного образца и водяными парами в эксикаторе влажность почвы поддерживается постоянной в течение всего эксперимента. При отсутствии серной кислоты для поддержания постоянной влажности почвы на дно эксикатора наливают стерильную водопроводную воду.

Постоянную влажность в почвенных образцах можно создать также следующим приемом. Стаканы с почвой, с влажностью доведенной до 60% от ПВ, взвешивают не менее 3 раз в неделю и добавляют стерильную водопроводную воду до исходной массы стакана. Опыты повторяют трехкратно. Продолжительность опытов должна составлять не менее одного месяца, а в отдельных случаях (малотоксичные, стабильные соединения и другие) до 2 месяцев. Влияние изучаемого вещества на микрофлору изучают с помощью анализа образцов почвы, отобранных в первые часы после внесения препарата, через 1, 3, 6 и 12 часов, а затем ежедневно в течение недели и один раз в 7 дней в течение месяца. При необходимости дальнейшего изучения взаимодействия химического вещества и почвенного микробиоценоза пробы отбирают и изучают один раз в месяц.

Для изучения воздействия ЭХВ на почвенный микробиоценоз могут быть использованы группы тестов.

С целью выявления групп почвенных микроорганизмов, обладающих избирательной чувствительностью к отдельным химическим веществам, и разработки наиболее адекватных критериев для оценки влияния химических веществ на биологическую активность почвы желательно проводить исследования по изучению влияния химических веществ на различные физиологические группы почвенного микробиоценоза (бактерии, актиномицеты, грибы, спорообразующие бактерии), а также на выживаемость санитарно-показательных (*E. coli*, энтерококки, споровые бактерии) и патогенных микроорганизмов в почве.

В тех случаях, когда неизвестны тест-микроорганизмы (максимально чувствительные к данной группе химических веществ), необходимо изучать влияние исследуемого химического вещества на почвенный микробиоценоз и самоочищающую способность по следующим показателям: а) динамике общей численности почвенных микроорганизмов в пересчете на 1 г абсолютно сухой почвы; б) динамике «ферментативного зеркала» почвы (под «ферментативным зеркалом» почвы мы понимаем набор ферментативных реакций, являющихся индикаторами интенсивности протекания биологических процессов в почве).

Этот набор ферментативных реакций, подлежащих изучению, не является строго определенным во всех случаях. Он может применяться по усмотрению экспериментатора в зависимости от природы изучаемого

химического вещества и механизма его действия. Наиболее часто о биологической активности почвы судят по ферментам, характеризующим важнейшие процессы материально-энергетического обмена в почве: окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназа, каталаза); ферменты, осуществляющие превращение азота (протеаза, уреаза), фосфора (нуклеаза, фосфатазы), углеводов (целлюлаза, инвертаза), серосодержащих органических соединений (арильсульфатазы).

Согласно исследованиям А.Ш. Галастьяна (1974, 1978) [16, 17], внутри этих групп активность ферментов коррелятивно связана друг с другом, поэтому можно ограничиться определением активности всего одного фермента или одного представителя каждой группы, например, дегидрогеназы, уреазы, фосфатазы, инвертазы, арильсульфатазы.

По данным Ф.Х. Хазиева (1976, 1990), активность всей цепи метаболизма каких-либо соединений в почве (фосфорорганических, азотсодержащих органических соединений, углеводов) определяют по активности полимераз, которые осуществляют начальное специфическое звено трансформации поступающих в почву высокополимерных органических соединений – нуклеиновых кислот, протеинов, целлюлозы и т.д. последующие превращения деполимеризованных продуктов осуществляются набором менее специфических ферментов, таких как фосфатазы, амидазы, инвертазы и так далее, поэтому изучение активности деполимераз при воздействии на почвенный микробиоценоз ЭХВ представляет существенный интерес. В то же время, чтобы получить более полное представление об изменениях биокаталитических процессов в почве в условиях воздействия на почвенный микробиоценоз химических соединений, необходимо изучать активность ферментов, осуществляющих разные этапы трансформации эндогенных и экзогенных соединений.

Таким образом, при дальнейшем совершенствовании нормирования химических веществ в почве, оптимальным является вариант изучения ферментативных систем, характеризующих все основные циклы обмена веществ в почве. Однако для установления предельно допустимой концентрации (ПДК) химического вещества в почве вполне допустимо судить о ее биологической активности по динамике таких ферментов, как протеаза, целлюлаза, инвертаза, а также по дыханию почвы (уровень выделения CO_2) и динамике содержания в почве аммиака и нитритов.

Исследования по общесанитарному показателю вредности проводят в два этапа: предварительные (ориентировочные) и основные экспериментальные исследования.

3.3 Предварительные исследования по общесанитарному показателю вредности

Целью предварительных исследований является: а) выбор рабочих концентраций для проведения основных экспериментальных исследований; б) выявление необходимости проведения исследований с санитарно-

показательными микроорганизмами; в) определение группы наиболее чувствительных микроорганизмов почвенного микробиоценоза.

Продолжительность предварительного этапа исследований составляет 14 дней. При этом первые две задачи можно решить постановкой кратковременного опыта капельным методом с использованием культуры кишечной палочки. Выбор наиболее чувствительной группы микробиоценоза осуществляют методом реплик.

А. Капельный метод определения жизнеспособности кишечной палочки. Для выполнения исследований достаточно 0,5 кг почвы на одну изучаемую концентрацию. Следовательно, для проведения этого теста с одним ЭХВ достаточно 2,5-3,0 кг почвы, включая контрольные исследования. Методика эксперимента сводится к следующему: 0,5 кг воздушно-сухой почвы, в которой предварительно определена ПВ, распределяют равномерным слоем почву стерильным шпателем на листе плотной стерильной бумаги размером 60×40 см. В объеме стерильной водопроводной воды, необходимой для создания в почве влажности, равной 60% от ПВ, создают требуемую концентрацию изучаемого ЭХВ по вышеуказанной методике. Затем в этот же объем воды добавляют суспензию клеток *E. coli*. Пульверизатором равномерно орошают почву и тщательно ее перемешивают. Равномерно увлажненную массу почвы с ЭХВ и внесенной культурой кишечной палочки помещают в стерильный стакан. Контролем в этом эксперименте является почва без нормируемого ЭХВ.

Следует обратить внимание на приготовление культуры кишечной палочки для заражения почвы. Для приготовления суспензии клеток кишечной палочки желательно иметь не менее 3-5 штаммов, чтобы индивидуальная чувствительность отдельных штаммов не отразилась на результатах исследований. Модельные штаммы кишечных палочек (музейные и свежевыделенные) выращивают в течение суток на мясопептонном агаре (МПА) при 37°C. Затем на стерильной воде готовят бактериальную суспензию, плотность которой по стандарту мутности должна быть равной 10 единиц. Из суспензии каждого штамма отбирают равные количества и смешивают в одном объеме. Полученную взвесь микроорганизмов с плотностью 10 единиц по стандарту мутности используют для проведения опыта, внося на 1 кг почвы 1 мл этой суспензии.

За поведением кишечных палочек в почве, загрязненной нормируемым ЭХВ, наблюдают в течение 7 дней, производя на 1, 2, 5 и 7-е сутки посев капельным методом. С этой целью из средней пробы берут в стерильных условиях навеску 10 г, переносят в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды. После взбалтывания в аппарате для встряхивания в течение 10 мин из полученной почвенной суспензии без отстаивания делают ряд последовательных разведений.

Методика приготовления разведений состоит в том, что из приготовленной суспензии с первоначальным разведением 1:10 берут стерильной пипеткой 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Получают разведение почвы 1:100. Тщательно

перемешивают содержимое и другой стерильной пипеткой переносят 1 мл в следующую пробирку с 9 мл стерильной воды и так далее до 1:100 000 - 1:10 000 000 разведений.

При постановке эксперимента капельным методом используют 5-6-е десятичное разведение почвенной суспензии. Микропипеткой наносят 6-8 капель (0,01 мл) почвенной суспензии на поверхность чашки Петри с плотной, хорошо подсушенной средой Эндо.

Посевы до подсыхания капель выдерживают на столе, а затем чашки со средой помещают в термостат крышкой вниз. При работе этим методом нужно строго соблюдать режим подсушивания среды в чашке Петри. Рекомендуется подсушивание проводить не менее 1 часа при 37°C или одни сутки при комнатной температуре (18-20°C). Относительная простота метода позволяет изучить действие вещества в широком интервале концентраций (от фоновых величин до максимальных уровней внесения в почву, или концентраций, находящихся в логарифмически-кратной зависимости от фоновых).

Результаты опыта оценивают сопоставлением числа жизнеспособных клеток в почве опытных и контрольных стаканов. Действующей концентрацией химического вещества считается та, которая оказывает выраженное угнетающее действие, вызывая снижение количества кишечных палочек не менее чем на 50% по отношению к контролю. При выявлении в ориентировочных исследованиях угнетающего действия химического вещества на культуру кишечных палочек дальнейшее изучение его воздействия на динамику этих микроорганизмов в почве проводить не целесообразно. Установление же тенденций к стимуляции жизнедеятельности индикаторных микроорганизмов служит основанием для продолжения исследования на основном этапе.

Б. Метод реплик используют для выделения из почвы тест-микроорганизмов – типичных почвенных микроорганизмов, наиболее чувствительных к изучаемому ЭХВ, с последующим обоснованием пороговой концентрации ЭХВ в почве по общесанитарному показателю вредности с использованием этого теста. Эксперимент проводят в два этапа (Прокопович А.С., 1979 г. изложенного в методическом указании в 1981 г.) [18, 19].

На I этапе готовят суспензию чистой почвы без ЭХВ и ее разведения и производят посев десятичных разведений на плотные питательные среды, необходимые для выращивания различных физиологических групп микроорганизмов (актиномицетов, грибов, спорообразующих бактерий). В питательные среды вводят в виде ацетонового или водного раствора изучаемого ЭХВ в концентрации, соответствующей максимальной концентрации, определяемой в реальных условиях загрязнения почвы изучаемых ЭХВ. Чашки, засеянные почвенной суспензией, помещают в термостат при температуре, оптимальной для развития данной физиологической группы микроорганизмов. Учет результатов сводится к

тому, что сравнивают количество выросших колоний в опыте и контроле (питательная среда без ЭХВ).

На основе этого сравнения выделяют физиологическую группу микроорганизмов, наиболее чувствительную к изучаемому ЭХВ. В чашках, где росли микроорганизмы этой группы, наблюдается стимуляция или замедление (угнетение) роста микроорганизмов по сравнению с их ростом в контрольной пробе. В исследованиях второго этапа используют только микроорганизмы, относящиеся к физиологической группе, наиболее чувствительной к данному ЭХВ.

На II этапе разведения чистой почвы (без ЭХВ) засевают твердую питательную среду, необходимую для оптимального роста микроорганизмов наиболее чувствительной физиологической группы. Чашки помещают в термостат. После того как на поверхности твердой питательной среды появляются колонии, имеющие в диаметре около 1 мм, выбирают чашку, на которой не более 50-100 колоний. С помощью специального стерильного штампа круглой формы, изготовленного из ворсистой ткани (например, нейлоновый вельвет), диаметр которого равен диаметру чашки Петри, исследователь переносит посев с чашки, в которой нет ЭХВ, на чашки, содержащие ту же питательную среду, но с изучаемыми концентрациями ЭХВ. Контролем эксперимента является посев на ту же среду, но без внесения изучаемого химического вещества. Методика посева заключается в следующем.

Прикоснувшись штампом один раз к поверхности твердой питательной среды с выросшими на ней колониями, исследователь легкими движениями касается штампом поверхности других чашек, идя от чашек с большими концентрациями изучаемого вещества к чашкам с меньшими концентрациями. В том случае, если посев проводят в обратном порядке, возможно появление кажущегося угнетающего эффекта ЭХВ за счет уменьшения внесенной дозы микроорганизмов. Положение чашек при посеве фиксируется отметкой на их стенках. После инкубации чашек в течение 1-2 суток в термостате при температуре, оптимальной для данного вида микроорганизмов, учитывают результаты.

Если вещество не оказало воздействия на данные группы микроорганизмов, то в опытных и контрольных чашках Петри вырастают одинаково расположенные и идентичные по своим свойствам колонии микроорганизмов. Если же вещество оказывает воздействие, то на среде, содержащей его, обнаруживают рост более обильный (стимуляции) или более слабый (угнетающее действие) по сравнению с контрольной пробой. Для дальнейших исследований производят отсев из контрольной чашки тех микроорганизмов, рост которых был угнетен (или стимулирован) при самой малой из изученных концентраций ЭХВ (в чашке с ЭХВ отсутствует колония, которая имелась в контрольной чашке, или в опыте появилась дополнительная колония по сравнению с контролем).

После этого идентифицируют выделенный микроорганизм по общепринятым методам [20, 21].

Для окончательного ответа на вопрос о воздействии ЭХВ на тест-микроорганизмы готовят несколько колб (минимум 6) с жидкой питательной средой, оптимальной для выращивания данного микроорганизма. В колбы вводят различные концентрации изучаемого ЭХВ и засеивают их выделенным наиболее чувствительным микроорганизмом (тест-микроорганизмом). Колбы помещают в термостат и затем через 1, 2, 6, 12, 24 часов определяют с помощью плоских капилляров Перфильева и фазово-контрастного микроскопа динамику роста (количество) данных микроорганизмов.

Концентрация изучаемого ЭХВ в питательной среде, при которой количество клеток тест-микроорганизма отличается от их количества в контрольной пробе на 50%, принимается за пороговую. Такой вывод правомочен только в том случае, если микробиологическими исследованиями доказано, что изучаемый тест-микроорганизм является типичным почвенным микроорганизмом, следовательно, его угнетение или стимуляция может оказать существенное воздействие на весь почвенный микробиоценоз. В том случае, если не получены такие доказательства, пороговую концентрацию по данным тесту, а также бактерицидную дозу ЭХВ для данного микроорганизма, полученную в исследованиях на твердых средах, используют вместе со всем комплексом показателей (тестов) в основных исследованиях. Исходной концентрацией при проведении этих исследований является концентрация, установленная в опыте методом реплик.

3.4 Основные экспериментальные исследования по общесанитарному показателю вредности

Для проведения основных экспериментальных исследований берут навески МПЭ № 1 по 0,5 кг, в отдельных случаях почвы легкого механического состава. Подготовка навесок (увлажнение, внесение изучаемого вещества) описана в начале главы. Из навесок отбирают пробы в первые часы после внесения вещества, а также на 1; 7; 15; 20 и 30-е сутки. Объем проб определяют количеством изучаемых тестов. Как уже указывалось, к обязательным тестам относят динамику общей численности почвенной микрофлоры, кишечной палочки, а также тест-микроорганизмов, которые были выявлены в результате предварительных опытов.

А. Определение общей численности почвенной микрофлоры.

Наиболее достоверные результаты относительно общей численности почвенной микрофлоры могут быть получены при использовании методов непосредственного учета микроорганизмов (прямая микроскопия почвы). Наиболее применим при этом метод капиллярскопии по Перфильеву (1971) с последующей люминесцентной микроскопией.

Почвенную суспензию в этом случае обрабатывают акридином оранжевым. Метод дает возможность не только подсчитать общее

количество микробных клеток в 1 г почвы, но и выявить микроорганизмы, находящиеся в адсорбированном почвенными частицами состоянии.

Навеску почвы в 1,0 г растирают с 10 мл 1% раствора пиррофосфата натрия для снижения адсорбционных свойств почвы и десорции микроорганизмов. Затем суспензию обрабатывают акридином оранжевым, добавляя к 1 мл суспензии 1-2 капли 1% раствора красителя. Через 5 секунд (за это время оседают грубые минеральные частицы) в почвенную суспензию, обработанную акридином оранжевым, помещают 2-2,5-сантиметровый отрезок счетного капилляра. После заполнения капилляра его помещают на предметное стекло и фиксируют двумя каплями расплавленного парафина, нанеся их на концы отрезка капилляра. Парафиновые капли одновременно защищают содержимое каналов от высыхания. Затем приступают к подсчету общей численности почвенных микроорганизмов с помощью люминесцентного микроскопа при увеличении 90×10 .

Численность микроорганизмов в 1 г почвы определяют по формуле:

$$Q = \frac{N \times 10^{12}}{u} \times C;$$

где Q – количество микроорганизмов в 1 г изучаемого образца почвы;

N – среднее количество микроорганизмов в одном ходе капилляра;

10^{12} – объем 1 мл в кубических микронах;

u – объем одного хода капилляров в кубических микронах;

C – кратность разведения суспензии, которая обычно равна 10.

Весьма перспективным является изучение численности микроорганизмов в почве методом электронной микроскопии. Применение этого метода расширяет наши представления о воздействии химических веществ на микрофлору почвы, так как чувствительность его приблизительно на порядок выше метода люминесцентной микроскопии. Кроме того, этот метод позволяет выявить качественные изменения в микробном населении почвы, например, исчезновение одних форм, появление других, в том числе спор, цист, капсульных организмов, возникновение морфологической изменчивости.

Кроме вышеперечисленных методов, для учета общей численности почвенной микрофлоры можно воспользоваться методом Виноградского в модификации О.Г. Шульгиной, изложенным в «Большом практикуме по микробиологии» (1962).

В том случае, если нет возможности изучить общую численность почвенных микроорганизмов методами прямой микроскопии, можно рекомендовать посев и учет на средах, в состав которых входят почвенные экстракты или почвенные вытяжки. Почвенный агар для этой цели готовят следующим образом: воздушно-сухую почву очищают от растительных остатков и других включений, измельчают в ступке и просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм. Измельченную почву помещают в колбу и

заливают дистиллированной водой в соотношении почвы к воде, равном 1:9. В почвенную суспензию добавляют агар (2% от массы почвенной болтушки). Стерилизуют в автоклаве двукратно при 1 атм в течение 1 часа. В слегка остуженную среду добавляют 1 мл дрожжевого автолизата на 100 мл среды. Затем среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Посев осуществляют поверхностным методом (А.Ф. Перцовская).

Б. Определение нитрифицирующей активности следует производить следующим образом: навеску почвы (50-100 г), в которую внесены 0,1 г сульфата аммония, 0,2 г углекислого кальция и изучаемое химическое вещество, инкубируют при 27-28°C 30 дней, поддерживая постоянную влажность. Контролем служит почва без сульфата аммония. После инкубации контрольные и опытные образцы переносят в широкогорлые колбы, добавляют по 500 мл дистиллированной воды и, закрыв пробкой, взбалтывают 3-5 минут. Суспензию почвы фильтруют через бумажные фильтры и в фильтрате определяют количество нитратов (мг/кг) по методу Грандваль-Ляжу с сульфифеноловой кислотой.

В. Определение дегидрогеназы, которая характеризует общую метаболическую активность почвенной микрофлоры, можно проводить, используя следующие методы:

Метод Галстяна: 1 г почвы помещают в вакуумную колбу на 50 мл, добавляют 10 мг мела, 1 мл 0,1 М раствора глюкозы и 1 мл 1% раствора хлорида тетразолия. После откачивания воздуха колбу помещают в термостат при 30°C на 24 часа. Образующийся формазан экстрагируют 25 мл этанола. Раствор колориметрируют при длине волны 500-600 нм. Активность дегидрогеназы рассчитывают в микрограммах формазана на 10 г почвы за 24 часа.

Метод Петерсона и Курьяляка: 5 г почвы помещают в пробирку, заливают 5 мл 0,2 М трис-НСI-буфера (рН 7,4-7,6), содержащего хлорида тетразолий в концентрации 40 мг/кг. В контрольные пробирки сразу вносят 1 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирки с реакционными смесями помещают в вакуум-эксикатор и воздух из него откачивают. После выдерживания в термостате в течение 1 часа при температуре 25°C в опытные пробирки вносят 1 мл уксусной кислоты и образующийся формазан экстрагируют 20 мл ацетона в течение 2 часов. Ацетоновый раствор формазана колориметрируют при длине волны 485 нм. Активность дегидрогеназы выражают в микрограммах на 10 г почвы.

Г. Определение каталазы, осуществляющей распад различных перекисей с образованием кислорода и в определенных условиях играющей существенную роль в кислородном балансе почвы, особенно при анаэробнозе, приводят по газометрической методике в модификации Галастяна. Почву (1 г) помещают в катализатор прибора и смешивают с 0,5 г мела и 5 мл 3% раствора перекиси водорода. Объем выделившегося в процессе реакции кислорода измеряют по шкале газометра (обычно через 2 минуты). Опыт проводят при температуре 18-20°C. Активность каталазы выражают в миллилитрах O₂ за 1 минуту на 1 г почвы.

Д. Определение фосфогидролаз, гидролизующих фосфор-органические соединения с отщеплением фосфорной кислоты в стадии дефосфорилирования. Наибольший интерес из этой группы ферментов представляют нуклеазы, расщепляющие нуклеиновые кислоты, фитазы, гидролизующие различные производные инозитфосфорной кислоты, и фосфатазы, гидролизующие моноэфиры фосфорной кислоты. Нуклеазную активность (РНК-аза и ДНК-аза) рекомендуется определять методом Паникова. Согласно этому методу 1 г почвы в 50 мл колбе смешивают с 2,5 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 6,5) и раствором нуклеиновой кислоты в концентрации 2 мг/мл (плотность раствора около 50 оптических единиц при 260 нм). Смесь инкубируют при 30°C в течение 1 часа в зависимости от активности фермента. В качестве контроля используют такую же реакционную смесь, но без почвы.

По окончании инкубации почву отделяют центрифугированием. В стеклянную центрифужную пробирку переносят 0,75 мл надосадочной жидкости с 1 мл 95% этанола, добавляют 0,15 мл 0,25 М MgCl₂ и оставляют в ледяной бане на 30 минут, затем центрифугируют, аликвоту надосадочной жидкости разбавляют водой в 10 раз и фотометрируют при 230, 260 и 300 нм против воды. Истинную величину оптической плотности продуктов реакции (D_{260}^1) за вычетом фонового поглощения и контроля (D_{260}^k) рассчитывают по формуле:

$$D_{260}^1 = \frac{D_{260} + D_{220} + D_{300}}{D_{260}^k}$$

где D_{260} , D_{230} , D_{300} – оптические плотности при 260, 230 и 300 нм;

D_{260}^k – оптическая плотность контроля при 260 нм.

Величину нуклеиновой активности выражают в микрограммах деполимеризованной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) за 1 час в расчете на 1 г почвы и вычисляют по приросту величины оптической плотности в опытной пробе (по сравнению с контролем) с учетом разведений и времени инкубации.

Коммерческие препараты нуклеиновых кислот перед приготовлением рабочих растворов обязательно должны быть очищены от деполимеризованных продуктов. Рабочие растворы хранят в холодильнике под толуолом.

Нуклеазную активность почвы можно определять методом, основанным на непосредственном определении активности нуклеотидаз, что позволяет судить об активности всего комплекса нуклеаз.

Для определения фосфатазной активности предложены методы, основанные на использовании различных субстратов. Наиболее пригодными считают те, в которых в качестве субстрата на фосфатазу служат фенолфосфаты (после ферментативного гидролиза последних измеряют количество образующегося фенола) и п-нитрофенилфосфат (гидролизующийся с образованием) п-нитрофенола, удобного для количественного определения).

Метод Хазиева: 5 г почвы в колбе обрабатывают 0,5 мл толуола и заливают 20 мл 0,3% раствора фенолфосфата. Смесь инкубируют 1 час при 30°C. Затем объем доводят до 100 мл и в фильтрате определяют количество фенола. Для этого в мерной колбе на 50 мл к 5 мл фильтрата прибавляют 5 мл боратного буфера (рН 9), 3 мл 2,5% раствора железосинеродистого калия и 3 мл 0,5% раствора 4-аминоантипирина. Через 10-15 минут раствор колориметрируют при 510 нм. Активность фосфатазы выражают в миллиграммах фенола или фосфата на 1 г почвы. В последнем случае обнаруженное количество фенола умножают на 0,32.

Метод в модификации Галстяна Табатабаи и Бремнера: к 1 г почвы (колбе на 50 мл) добавляют 1 мл 1% раствора п-нитрофенилфосфата натрия. При определении активности щелочной фосфатазы в среде с помощью 2 мл трис-буфера создают рН 8,0; при определении кислой фосфатазы ацетатным буфером создают рН 5,4. Если активность фосфатазы определяют в почве с рН, равным 7, то вместо буферных растворов добавляют 2 мл воды. Смесь инкубируют при 30°C 1 час. По истечении времени инкубации в колбу добавляют 22 мл воды, содержимое колбы фильтруют и к части фильтрата в 25 мл колбе приливают 0,5 мл 1 н. NaOH. Окрашенный раствор колориметрируют при 450-480 нм. Активность фосфатазы выражают в миллиграммах п-нитрофенола или фосфата на 1 г почвы. В последнем случае количество п-нитрофенола, установленное по калибровочному графику, умножают на 0,233.

Е. Определение протеазной активности. Трансформация азотсодержащих органических соединений, которые поступают в почву преимущественно в форме протеиновых комплексов, начинается под действием протеиназ и пептидаз. Дальнейшее их превращение осуществляют гидролитические амидазы в окислительно-восстановительные дезаминирующие ферменты.

Для определения протеазной активности рекомендуется следующие методы:

А) Метод Купревича и Щербаковой: 1 г почвы в колбе на 100 мл смешивают с 20 мл 0,5% раствора казеина и с 0,5 мл толуола, помещают в термостат на 24 часа при 30°C. После инкубации негидролизовавшийся казеин осаждают равным объемом 0,15% раствора уксусной кислоты. В фильтрате определяют содержание аминокислот, для чего в центрифужных пробирках к 5 мл фильтрата добавляют 5 мл суспензии фосфата меди $[\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2]$, в течение 5 минут перемешивают и центрифугируют при 2000 оборотах. В мерную колбу на 50 мл переносят 5 мл центрифугата и доливают дистиллированной водой до метки. Затем 10 мл этого раствора переносят в цилиндр с притертой пробкой, смешивают с 0,1 мл диэтилдитиокарбамата и 20 мл бутанола. После энергичного встряхивания смесь центрифугируют 5 минут при 2000 оборотах. Окрашенный верхний слой бутилового спирта колориметрируют при 413 нм. Стандартную шкалу готовят из смеси 10 аминокислот. Протеазную активность выражают в миллиграммах аминного азота на 1 г почвы за 24 часа.

Б) Метод Хазиева: 1 г почвы в колбе на 50 мл смешивают с 0,5 мл толуола, 5 мл 1,5% раствора казеина в трис-НСI буфере (рН 8,0). Смесь инкубируют 24 часа при 30°C и центрифугируют при 6000 оборотов. К 2,5 мл центрифугата добавляют 0,5 мл 1,5% раствора ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолийхлорид) и осадок отфильтровывают. Затем 1 мл фильтрата смешивают с 0,1 мл 10% раствора NaOH и 5 мл медного реактива, через 10 минут – с 0,5 мл реактива Фолина-Чиокальтеу. Голубая окраска появляется в течение 30 минут. Раствор колориметрируют при 750 нм. Количество кислоторастворимых аминокислот, образующихся при протеолитическом гидролизе казеина в почве, выражают в тирозиновом эквиваленте (в миллиграммах тирозина на 1 г почвы) и находят с помощью стандартных растворов тирозина.

Ж. Определение активности уреазы, гидролизующей мочевины, проводят по методу Галстяна: 5 г почвы в 50-миллиметровой колбе заливают 10 мл 10% раствора мочевины, 10 мл фосфорного буфера (рН 6,7) и 0,5 мл толуола. Смесь инкубируют при 30°C 24 часа, объем доводят до 50 мл 1 н. раствором хлорида калия. В фильтрате количество аммиачного азота за вычетом почвенного определяют или методом микроотгона, или с помощью реактива Несслера. Активность уреазы выражают в миллиграммах нитратного азота на 1 г почвы за 24 часа.

О метаболизме в почве углеводов можно судить по активности двух ферментов: целлюлазы и инвертазы.

З. Определение активности целлюлазы аппликационным и химическим методами; при аппликационном учитывают убыль массы заложённых в естественную почву целлюлозных материалов.

А) Метод Вострова и Петровой. В сосуде, заполненном почвой, широким стерильным ножом производят на глубину 20 см разрез и раздвигают почву. В эту щель к стенке на уровне поверхности почвы плотно прикладывают полоску льняной ткани размером 10×20 см с прикрепленной к наружной стороне полиэтиленовой пленкой. Защитная полиэтиленовая пленка должна выступать на 1 см за края льняного полотна, утрамбовывая почву, щель ликвидируют. Через 20-30 суток полотно извлекают, очищают от почвы, обрабатывают последовательно 1% раствором хлористо-водородной кислоты и соды, затем дистиллированной водой и высушивают. Льняную ткань разрезают на полоски по 5 см, взвешивают и рассчитывают убыль сухой массы. Изменение массы льняной ткани характеризует целлюлазоразрушающую способность почвы.

При определении целлюлазной активности химическим методом используют модификацию метода Кислицыной. К навеске почвы (5 г) приливают 0,5 мл толуола, 5 мл 1% раствора карбоксилметилцеллюлозы, 7,5 мл 0,0067 М фосфатного буфера (рН 6,8) и помещают в термостат на 7 суток при температуре 30°C. Затем 2,5 мл фильтрата смешивают с 5 мл 0,2% раствора антраона, приготовленного на концентрированной серной кислоте. Окрашенный раствор колориметрируют при 625 нм. Активность целлюлазы выражают в микрограммах глюкозы на 1 г почвы.

К. Определение активности инвертазы по методу Галстяна. Почву (1 г) помещают в колбу на 50 мл, добавляют 0,5 мл толуола, 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 10 мл 5% раствора сахарозы. Реакционную смесь 24 часа инкубируют при 30°C. Затем объем доводят до 100 мл и фильтруют. В 20 мл фильтрата редуцирующие сахара определяют по методу Бертрана. Активность инвертазы выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за 24 часа.

При оценке результатов исследований следует исходить из того положения, что увеличение или уменьшение общей численности почвенной микрофлоры на 50% или ферментативной активности почвы на 25% по сравнению с аналогичными показателями контрольной пробы следует расценивать как наличие влияния изучаемого химического вещества на почвенный микробиоценоз. В том случае, если эти изменения сохраняются более 5-7 дней, можно говорить о неблагоприятном воздействии. Минимальная концентрация химического вещества в почве, которая вызывает такие изменения, является пороговой по общесанитарному показателю вредности.

Примером изучения воздействия ЭХВ на микроорганизмы являются исследования, проведенные с гардоной (Малашевский В.В., 1978).

Первые серии исследований по изучению воздействия гардоны на почвенную микрофлору и биологическую активность почвы проводили с концентрацией пестицида в почве на уровне доз, применяемых в агропромышленной практике (0,1; 0,3 и 0,7 мг/кг абсолютно сухой почвы по действующему веществу). При этих концентрациях не было обнаружено отклонения, как в численности почвенной микрофлоры, так и в показателях биологической активности почвы. В связи с необходимостью установления пороговой концентрации по общесанитарному показателю вредности было проведено исследование с более высокими концентрациями (1; 5; 10; 20; 50 и 100 мг/кг абсолютно сухой почвы по действующему веществу).

Результаты экспериментального определения изменения общей численности почвенной микрофлоры черноземной суглинистой почвы под воздействием различных доз гардоны можно представить в виде графического рисунка. В первые часы эксперимента у авторов при концентрациях гардоны 5 и 15 мг/кг наблюдалось увеличение численности почвенной микрофлоры относительно уровня контрольной пробы. Кратковременное угнетение почвенной микрофлоры при концентрации гардоны 10 мг/кг (первые часы эксперимента) сменилось незначительной стимуляцией и последующим угнетением с выравниванием числа микроорганизмов в опытной и контрольной пробах. Наиболее значительные изменения зарегистрированы в пробе с содержанием гардоны 15 мг/кг. Количество микроорганизмов в этой пробе было более низким в течение всего эксперимента; к 7-м суткам оно составляло около 70% от аналогичных показателей контрольной пробы. Эту концентрацию, угнетающую почвенные микроорганизмы на 30%, можно принять в качестве пороговой для данной почвы по изучаемому показателю. Концентрация гардоны (20 мг/кг) оказывала на почвенный микробиоценоз

более выраженное угнетающее действие: содержание микроорганизмов к 7-м суткам снизилось приблизительно до 48%, что превышает минимально достоверный уровень.

Динамика общей численности микрофлоры песчаной и черноземной суглинистой почвы при воздействии различных доз гардоны представляется в виде графического рисунка, где микробные тела, млн/г (обозначены в абсциссе), время, суток (обозначены в ординате), с данными: 1- контрольная почва; 2 – 5 мг/кг; 3 – 10 мг/кг; 4 – 15 мг/кг.

Исследования проведенные на МПЭ № 1, выявили те же закономерности в динамике почвенной микрофлоры, однако количественные изменения в этом случае были более выражены. Так, при концентрации гардоны 15 мг/кг через сутки после начала эксперимента было обнаружено 220 000 микроорганизмов на 1 г абсолютно сухой почвы, что соответствует снижению численности микрофлоры на 78% по сравнению с уровнем контрольной пробы. Более значительное снижение количества почвенных микроорганизмов, наблюдавшееся в МПЭ № 1, можно объяснить, с одной стороны, меньшей численностью сапрофитных микроорганизмов в песчаной почве, а с другой – защитными свойствами коллоидов и высокой буферностью черноземной почвы, богатой органическим веществом. Сорбированный почвенными частицами пестицид, по всей вероятности, менее токсичен для почвенной микрофлоры. Кроме того, в почве, богатой органическим веществом (черноземная суглинистая), присутствует большое число микроорганизмов, потенциальных разрушителей гардоны. Обнаруженные более значительные изменения общей численности почвенной микрофлоры в МПЭ позволяют считать, что пороговой концентрацией по общесанитарному показателю вредности, установленной с учетом результатов исследований на этом типе почвы, является 10 мг/кг.

Была изучена также динамика нитрифицирующих микроорганизмов. Угнетающий или стимулирующий эффект пестицида не был выявлен при содержании препарата от 1,0 до 50,0 мг/кг. Для выявления влияния гардоны на биохимическую активность этой группы микроорганизмов была изучена нитрифицирующая активность почвы. Исследования подтвердили данные литературы (Кожина Л.А., 1974) о том, что при неизменном количестве нитрификаторов в почве может наблюдаться нарушение их биологической активности. Изменения нитрифицирующей активности при изученных концентрациях гардоны были зарегистрированы только в песчаной почве.

При концентрации препарата 10 мг/кг содержание аммония в почве отличается от контроля на 12%. Повышение концентрации до 15 мг/кг вызывает более выраженные сдвиги. По показателям нитрифицирующей активности критическая концентрация гардоны в почве равна 10 мг/кг абсолютно сухой почвы по действующему веществу.

Были также изучены показатели каталазной и протеолитической активности почвы. Показана динамика каталазной активности почвы в черноземной суглинистой и модельном почвенном эталоне (МПЭ № 1), при различных концентрациях гардоны.

Таблица 10 – Динамика нитрифицирующей активности почвы под воздействием гардоны

Время от начала эксперимента, сутки	Показатели нитрифицирующей активности, мг/кг	Доза гардоны в почве, мг/кг				
		0	1	5	10	15
1-е	аммиак	22,0	24,0	20,0	24,0	25,3
	нитраты	2,0	2,2	2,0	1,2	1,2
3-е	аммиак	20,0	23,0	22,0	26,0	30,0
	нитраты	4,2	3,6	4,4	3,2	2,8
7-е	аммиак	24,2	23,8	23,4	26,0	28,2
	нитраты	6,5	6,2	6,6	5,0	4,1
15-е	аммиак	0,5	0,8	0,8	0,2	0,6
	нитраты	3,4	3,7	3,6	3,7	4,0
30-е	аммиак	0,2	0,3	0,5	0,7	0,4
	нитраты	6,8	6,6	6,7	6,2	6,1

Наиболее значительные изменения активности каталазы зарегистрированы в черноземной суглинистой почве при концентрации гардоны 100 мг/кг. Более низкие концентрации (50; 10 мг/кг) препарата не оказывали длительного и выраженного эффекта.

Динамика каталазной активности черноземной суглинистой почвы при воздействии различных доз гардоны представляется виде графического рисунка, где микробные тела, млн/г (обозначены в абсциссе), время, суток (обозначены в ординат), данные - 1 – контрольная почва; 2 – 1 мг/кг; 3 – 10 мг/кг; 4 – 100 мг/кг.

Изучаемый пестицид стимулирует каталазную активность почвы. Чем выше концентрация препарата в почве, тем более выраженный стимулирующий эффект наблюдается. Наиболее характерные изменения каталазной активности черноземной суглинистой почвы под воздействием гардоны отмечаются впервые 7 суток эксперимента. В более длительные сроки от момента внесения препарата в почву происходит приближение величины каталазной активности в опытных образцах почвы к аналогичным показателям контрольной пробы. Иначе обстоит дело при применении МПЭ № 1. После 7 суток и на протяжении всего дальнейшего эксперимента стимулирующее воздействие гардоны сменяется на угнетающее. Наиболее выраженный угнетающий эффект определен при концентрации 100 мг/кг.

Динамика каталазной активности песчаной почвы при воздействии различных доз гардоны представляется виде графического рисунка, где микробные тела, млн/г (обозначены в абсциссе), время, суток (обозначены в ординат), данные 1 – контрольная почва; 2 – 1 мг/кг; 3 – 10 мг/кг; 4 – 50 мг/кг; 5 – 100 мг/кг.

Изменения каталазной активности, вызванные гардоной в концентрации 50 мг/кг, находятся на уровне, характеризующем пороговую концентрацию химического вещества в почве по данному критерию. Вполне закономерно,

что для чернозема суглинистого концентрация, вызывающая аналогичный эффект, значительно больше (100 мг/кг).

Пороговые концентрации, определенные на основании исследований каталазной активности, значительно превышают значение этих же показателей, установленных при изучении динамики общей численности почвенных микроорганизмов и динамики нитрифицирующей активности.

Такие же высокие пороговые концентрации установлены при изучении протеолитической активности почвы. Наиболее выраженное воздействие изучаемого пестицида на протеолитическую активность зарегистрировано, как и при изучении других показателей, при максимальной концентрации гардоны (100 мг/кг). Эта концентрация препарата в отличие от других изученных вызвала на протяжении всего эксперимента (60 суток) стимулирующий эффект, который можно объяснить тем, что высокие дозы гардоны, угнетающие микроорганизмы, избирательно стимулируют микроорганизмы, разлагающие гардону и обладающие протеолитической активностью.

Динамика протеолитической активности черноземной суглинистой почвы при воздействии различных доз гардоны представляется виде графического рисунка, где микробные тела, млн/г (обозначены в абсцисс), время, суток (обозначены в ординат), данные 1 – контрольная почва; 2 – 1 мг/кг; 3 – 10 мг/кг; 4 – 100 мг/кг.

Более низкие концентрации гардоны действуют угнетающе на протеолитическую активность как черноземной суглинистой почвы, так и модельного эталона.

При сравнении эффекта воздействия гардоны на протеолитическую активность черноземной суглинистой почвы и МПЭ № 1 выявлено более значительное абсолютное отклонение от уровня контрольной пробы (в МПЭ № 1), где почвенная микрофлора меньше защищена от воздействия изучаемого пестицида вследствие незначительного содержания органического вещества.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Почвенная микрофлора МПЭ № 1 является более чувствительной к гардону по сравнению с черноземной суглинистой почвой. Это свидетельствует о том, что исследования по общесанитарному показателю вредности для соблюдения принципа экстремальности должны проводиться на МПЭ № 1;

2. Исследования по влиянию ЭХВ на почвенный микробиоценоз чернозема суглинистого или почвы другого типа могут быть использованы для обследования величины поправочных коэффициентов при расчете ПДУВ и БПК для конкретных почвенно-климатических условий;

3. В рассмотренном примере наиболее чувствительными из изученных почвенно-микробиологических показателей к воздействию гардоны были нитрифицирующая активность и общая численность почвенной микрофлоры. Пороговая же концентрация гардоны по действующему веществу в почве по

общесанитарному показателю вредности составила 10 мг/кг абсолютно сухой почвы.

В данной работе для оценки биологической оценки активности почвы выбрана инвертазная ферментативная активность

Определение инвертазной активности проб почвы показало незначительное различие активности инвертазы в исследуемых пробах.

Определение допустимой концентрации химических веществ в почве по общесанитарному показателю вредности целесообразно проводить в 2 этапа:

А. Предварительные ориентировочные исследования.

Б. Основные экспериментальные исследования.

Опыты ставятся на почве, подготовленной в соответствии с положениями раздела предварительные ориентировочные исследования.

3.5 Экспериментальные исследования общесанитарного показателя

Для опытов берется 2-3 кг подготовленной почвы на сосуд, что является оптимальным объемом. В каждый экспериментальный сосуд, кроме контрольных, вносят нормируемое вещество в концентрациях, уточненных на предварительном этапе исследования. Одновременно, чтобы создать условия для нормального процесса нитрификации, в почву вносят соли из расчета на 100 г почвы: сернокислый аммоний - 21,53 мг, калий фосфорнокислый однозамещенный - 7,84 мг, магний сернокислый - 3,9 г, гидрат окиси кальция - 100 мг и для обогащения почвы бактериями-нитрификаторами - болтушка перегнойной почвы (листовой перегной) в количестве 1% от веса почвы. Болтушка вносится при соотношении: почва-вода как 1:50. Например, на 1 кг почвы для приготовления болтушки берут 10 г перегнойной почвы и готовят из нее болтушку в 50 мл воды. Для каждого варианта опыта применяется не менее чем 3-кратная повторность. Для тех веществ, для которых на предварительном этапе исследования была установлена целесообразность подключения кишечных палочек, в основные исследования в опытные сосуды вносят их суспензию. При приготовлении суспензии используют приемы, описанные ранее. Влажность почвы в течение опыта поддерживается на постоянном уровне (60% от полной влагоёмкости) путем регулярного (не менее 3 раз в неделю) добавления дехлорированной стерильной водопроводной воды. Все сосуды с почвой выдерживают при комнатной температуре. Продолжительность опыта 60 дней. Отбор проб на все показатели проводится в следующем порядке: первый отбор - только из контрольных сосудов в день закладки опыта для снятия фона по микробиологическим и биохимическим показателям, затем отбор из всех сосудов на 3, 7, 10, 14, 20, 30 суток от начала опыта и далее регулярно через каждые 14 дней до конца опыта.

В отобранных образцах почвы определяют следующие показатели. Для учета изменения интенсивности биохимических процессов рекомендуется определять в динамике: 1) ферменты - протеаза, целлюлаза; 2) дыхание почвы - по уровню CO_2 ; 3) содержание аммиака и нитратов.

Из микробиологических показателей определяют динамику численности сапрофитных бактерий, кишечных палочек (если предварительные опыты указывают на необходимость такого определения) и численность наиболее чувствительной группы почвенного микробоценоза, которая была выявлена в результате предварительных опытов методом реплик.

Данный набор показателей может быть дополнен экспериментатором в зависимости от природы нормируемого вещества.

Так, при нормировании тяжелых металлов целесообразно определение инвертазы. Кроме перечисленных ферментов высокочувствительным и информативным показателем является азотфиксация (ацетиленовый метод). Возможность использования последнего показателя определяется техническими возможностями лаборатории.

При нормировании нефтепродуктов, различных средств защиты растений целесообразно расширить рекомендуемый набор изучаемых ферментов определением дегидрогеназ, уреаз, каталаз и др.

В результате проведенных экспериментальных исследований устанавливается пороговая (минимально действующая) концентрация нормируемого вещества. Пороговой является та концентрация нормируемого вещества, которая вызывает любые достоверные отрицательные изменения нескольких показателей (более 1) в пределах: для биохимических показателей - 25% и более относительно величины контроля, наблюдаемых не менее 7 дней; для микробиологических показателей (численность кишечных палочек, сапрофитных бактерий и других групп почвенного микробоценоза), которые учитываются методом посева почвенной суспензии, пределом считается действие не менее 50%.

Вопрос критериальной оценки действия различных загрязнений на микробиологические и биохимические показатели является не до конца разработанным. Однако опыт экспериментального нормирования и данные литературы позволяют уточнить, какие изменения можно считать отрицательными для некоторых показателей, входящих в схему исследований [8-18]. К несомненно отрицательным изменениям под влиянием изучаемой концентрации нормируемого вещества прежде всего необходимо отнести торможение процесса самоочищения почвы от кишечных палочек, которые служат индикатором поведения в почве патогенной микрофлоры, а также угнетение численности сапрофитных бактерий, ферментативной активности, дыхания, азотфиксации и накопления азота нитратов. К несомненно отрицательному действию можно отнести также стимуляцию почвенных грибов, в результате чего происходит разбалансировка комплекса почвенных микроорганизмов в сторону доминирования в нем этой группы микроорганизмов, являющихся активнейшими токсинообразователями.

Концентрация нормируемого вещества, приводящая к изменению в те же сроки наблюдения любого из показателей до указанных пределов, т.е. до 25% для биохимических показателей и до 50% для микробиологических, является подпороговой, т.е. предельно допустимой концентрацией (ПДК).

Учитывая, что экспериментальные исследования проводятся в экстремальных условиях, установленная величина ПДК по общесанитарному показателю вредности обладает значительным запасом надежности.

Для определения общесанитарного показателя вредности рекомендуется использовать следующие методы определения.

Учет всех групп почвенного комплекса (микробоценоза) проводится путем поверхностного посева разведений почвенной суспензии на соответствующие среды стандартными способами в соответствии с «Методическими указаниями по санитарно-микробиологическому исследованию почвы», М., 1977 г., и описанием, приведенном в руководстве «Методы санитарно-микробиологических исследований среды», М., 1978 г.

Учет бактерий группы кишечных палочек проводится как стандартными методами (поверхностный и титрационный), так и модифицированным (капельный). Использование стандартных методов осуществляется в соответствии с вышеперечисленными руководствами.

Определение выделяющегося из почвы углекислого газа (CO₂) проводят методом Штанова В.И. в модификации Оганова Г.М. «Почвоведение», № 9, 1961 г., С. 110-111.

Активность азотфиксации определяется ацетиленовым методом в модификации Умарова М.М. «Почвоведение», № 11, 1976 г., С. 119-122.

Определение аммиака и нитратов проводится в динамике при компостировании почвы в лабораторных условиях. Аммиак определяется в солевой вытяжке из почвы с дисульфобензоловой кислотой (Аринушкина Е.В., 1970 г.).

Определение ряда важнейших почвенных ферментов рекомендуется проводить в соответствии с методиками авторов поссоветского пространства [22, 23, 24].

Результат исследования 1

Известно, что уровень ферментативной активности может служить эффективным диагностическим показателем при возникновении в почве стрессовой ситуации, особенно при загрязнении почв тяжелыми металлами (ТМ). Исследования последних лет позволили предположить, что ферментативная активность почвы является отражением взаимодействия ТМ и микроорганизмов, а активность ферментов можно рассматривать в качестве индикаторного показателя состояния антропогенных почв.

Так, исследования на выявления индикаторной функции некоторых ферментов загрязненных ТМ почв можно посмотреть на примере мегаполиса города Алматы.

Для биохимического мониторинга пробы почв были взяты в городе Алматы 5 точек, вдоль проспекта Райымбек - с востока на запад, исходя из зональности почвенного покрова (зона светло-каштановых почв): точка 1 - проспект Райымбека/ул. Пушкина, контроль; точка 2 - проспект

Райымбека/пр. Сейфуллина; точка 3 - проспект Райымбека/ул. Розыбакиева; точка 4 - район ТЭЦ-1; точка 5 - 25 км от города, фоновая зональная почва.

Пробы почв отбирали в течение 2005–2009 гг. весной и осенью (50 образцов) согласно общепринятой методике отбора проб для проведения почвенного мониторинга на глубине 0–25 см методом «конверта» в 5 повторностях [19, 20]. Активность каталазы измеряли по методике Галстяна газометрическим методом: субстрат - 5 мл 5% H_2O_2 , время инкубации - 1 мин, температура инкубации - 30°C, активность выражали в мл O_2 /мин/г почвы. Активность инвертазы определяли титрометрическим методом: субстрат - 5% сахара, время инкубации - 24 час, температура инкубации - 30°C, активность выражали в мг глюкозы/сут по А.Ш. Галстяну с колориметрическим окончанием по Ф.Х. Хазиеву. Аппликационными цифровыми методами были изучены: активность протеаз по убыванию желатинового (протеин) слоя рентгенпленки при инкубировании ее в почвенных образцах в течение 14 дней; целлюлаз - по степени разложения хлопчатобумажного полотна, экспонированного в почвенных образцах в течение 30 дней. Все данные по ферментативной активности почв приведены для воздушно-сухих образцов и статистически обработаны в программах «Microsoft Excel for Windows 2000» и «Statistics for Windows 6,0».

Результаты исследования и обсуждение. В пределах установленного загрязнения различных форм ТМ почвенных образцов урбаноземов проводили определение активности некоторых почвенных ферментов за все годы. Исследованиями некоторых авторов было установлено, что 7-летнее хранение образцов почв приводит к некоторому уменьшению активности почвенных ферментов, но результаты исследователей показали значительное уменьшение ферментативной активности образцов 2005 и 2006 гг., поэтому для анализа были взяты данные 2007–2009 гг., что позволило усреднить полученные данные в пределах достоверного статистического отклонения.

Активность каталаз уменьшалась в урбаноземах по сравнению с фоновой почвой. Максимальное уменьшение их активности (на 30% по сравнению с фоновыми значениями и на 26% - по сравнению с контрольными) обнаружено в точке 3 (перекресток с интенсивным транспортным движением). Отмечена тенденция снижения активности каталаз от уровня загрязнения почв ТМ.

Для определения степени разложения белка на рентгенопленке был использован метод цифрового определения по массе пятен, перенесенных на кальку: падение активности протеаз было наиболее значительным из всех исследуемых ферментов (необходим рисунок с Места отбора проб почв и Содержание тяжелых металлов (мг/кг)).

Уменьшение активности было максимальным в районе ТЭЦ-1 (точка 4): почти на 70% по сравнению с фоновой почвой и на 40% по сравнению с контролем; остальные 2 почвенных образцов показали снижение от 39 до 59% по сравнению с фоном.

Определение активности целлюлаз проводили на основе учета остаточного количества не разрушенной целлюлозы (аппликационный

метод), и исследователями была отмечена тенденция снижения их активности в городских почвах в течение всего исследуемого периода. Отмечен токсический эффект: снижение разложения клетчатки 20% по сравнению с фоном и 17% по сравнению с контролем наблюдали в почвенных образцах из точек 3, в остальных – в пределах 10%.

Таблица 11 - Изменение активности каталазы в почвах города Алматы

Каталазная активность	мл O ₂ /мин/г почвы	Pb	Cd	Cu	Zn
точка 1 (контроль)	31,8±5,3	0,31±0,06	29,5±5,2	48,2±8,5	8,7±1,4
точка 2	31,3±5,0	0,28±0,04	33,1±6,2	47,5±7,7	7,2±1,1
точка 3	56,0±7,2	0,46±0,05	44,5±7,8	58,5±8,8	6,5±1,3
точка 4	52,7±6,5	0,29±0,05	38,2±7,1	55,2±8,0	6,8±1,2
точка 5 (фон)	17,8±3,1	0,11±0,02	18,9±3,2	34,9±6,2	9,3±1,3

Состояние фоновых почвенных образцов по обогащенности инвертазой оказалось очень бедным (2,5 мг глюкозы/сут), но и это содержание под действием ТМ еще больше уменьшалось в урбаноземах, особенно в точках 2 и 4 на 36 и 40% по сравнению с фоном.

Подавление биохимической активности загрязненных городских почв, исследователи обнаружили, что происходящие под действием ТМ нарушения в структуре почвенных сообществ, привели к падению уровня активности 4 ферментов (каталазы, инвертазы, протеазы, целлюлазы) в урбаноземах, особенно инвертазы и протеазы (от 30% и больше). Следовательно, показатели активности протеаз и целлюлаз, имеющие самые низкие значения в урбаноземах, можно отнести к индикаторным.

Результат исследования 2

Собственные исследования автора с коллективом лаборатории экспериментальной и профилактической токсикологии Научного центра гигиены и эпидемиологии имени Х. Жуматова МЗ РК.

Исследовалось влияние красного фосфора на развитие водной сапрофитной флоры при концентрации красного фосфора в воде на уровне 5 мг/л, 20 мг/л и 40 мг/л. Посевы делались на свежеприготовленной пробе, на 1-е и 5-е сутки.

Пробы для последующего подсчета колоний разводили стократно стерильным физиологическим раствором и засевали по 0,1 мл на чашки со средой МПА (мясо-пептонный агар), средой Эндо, средой Плоскирева. Равномерное распределение исследуемого материала на поверхности сред осуществляли стеклянными бусами. Исследуемый материал помещали в термостат и выдерживали в течение 18-20 часов при температуре 37,5°C. Затем проводился подсчет выросших колоний. Пересчет производили с учетом стократного разведения.

Таблица 12 - Динамика БПК при содержании красного фосфора в различных дозах

Красный фосфор	БПК	
	1 сутки	5 сутки
40 мг/л	0,42	0,24
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	67,74	37,5
20 мг/л	1,45	1,62
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	233,8	253,13
5 мг/л	1,66	1,81
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	267,74	282,81
0,5 мг/л	0,72	0,65
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	16,13	1,56

Результаты исследования представлены в таблице 5. На чашках, куда заседали свежеприготовленные пробы воды с добавлением красного фосфора, выросло от дозы 5 мг/л 7500 колоний микроорганизмов, от 20 мг/л красного фосфора – 1930 колоний, и от 40 мг/л – 1040. В контрольных пробах выросло 8700 колоний микроорганизмов.

Таблица 13 - Содержание общего количества микроорганизмов в пробах сточной воды с добавлением красного фосфора и без него по срокам наблюдения

Пробы сточной воды		Экспозиция во времени		
		Свежеприготовленная проба	1-е сутки	5-е сутки
С красным фосфором	5 мг/л	7500	56400	14800
	20 мг/л	1930	29200	12000
	40 мг/л	1040	13100	9800
Контрольная проба		8700	80000	23000

В последующие сроки: после 24 часов, общее количество микроорганизмов в пробах воды с добавлением красного фосфора было от 5 мг/л в 1,4 раза ниже, от дозы 20 мг/л в 3 раза ниже, и от 40 мг/л в 6 раз ниже, чем в контроле.

На 5 сутки, количество колоний из проб воды с добавлением красного фосфора составило от дозы 5 мг/л в 1,6 раза ниже, от дозы 20 мг/л – в 2 раза ниже, и от 40 мг/л – 2,4 раза ниже, чем в контрольных пробах.

Таким образом, красный фосфор при содержания в питьевой воде на уровнях 5 мг/л, 20 мг/л и 40 мг/л оказывал умеренное статическое действие

на рост водных сапрофитных микроорганизмов, поэтому предварительно можно отнести его к малоопасному химическому веществу.

Результат исследования 3

Исследования проводились тем же коллективом и на той же базе. Исследовалось влияние метафосфорной кислоты на развитие водной сапрофитной флоры при концентрации метафосфорной кислоты в воде на уровне 5,0 мг/л и 50,0 мг/л. Посевы делались на свежеприготовленной пробе, на 1-е и 5-е сутки.

Таблица 14 - Динамика БПК при содержании метафосфорной кислоты в различных дозах

Метафосфорная кислота	БПК	
	1 сутки	5 сутки
50,0 мг/л	0,42	0,24
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	67,74	37,5
5,0 мг/л	1,66	1,81
Контроль	0,62	0,64
в % к контролю	267,74	282,81

Пробы для последующего подсчета колоний разводили стократно стерильным физиологическим раствором и засевали по 0,1 мл на чашки со средой МПА (мясо-пептонный агар), средой Эндо, средой Плоскирева. Равномерное распределение исследуемого материала на поверхности сред осуществляли стеклянными бусами. Исследуемый материал помещали в термостат и выдерживали в течение 18-20 часов при температуре 37,5°C. Затем проводился подсчет выросших колоний. Пересчет производили с учетом стократного разведения.

Результаты исследования: на чашках, куда засевали свежеприготовленные пробы воды с добавлением метафосфорной кислоты, выросло от дозы 5,0 мг/л 550 колоний микроорганизмов, от 50,0 мг/л метафосфорной кислоты – 840 колоний. В контрольных пробах выросло 1500 колоний микроорганизмов.

В последующие сроки: после 24 часов, общее количество микроорганизмов в пробах воды с добавлением метафосфорной кислоты было от 5,0 мг/л в 4 раза ниже, от дозы 50,0 мг/л в 9 раз ниже, чем в контроле.

На 5-е сутки, количество колоний из проб воды с добавлением метафосфорной кислоты составило от дозы 5,0 мг/л в 2,3 раза ниже, от дозы 50,0 мг/л – в 6,2 раза ниже, чем в контрольных пробах.

Таким образом, метафосфорная кислота при содержания в питьевой воде на уровнях 5,0 мг/л и 50,0 мг/л оказывали сильное статическое действие на

рост водных сапрофитных микроорганизмов, поэтому предварительно можно отнести его к опасному химическому веществу.

Таблица 15 - Содержание общего количества микроорганизмов в пробах сточной воды с добавлением метафосфорной кислоты и без него по срокам наблюдения

Пробы сточной воды		Экспозиция во времени		
		Свежеприготовленная проба	1-е сутки	5-е сутки
С метафосфорной кислотой	5,0 мг/л	550	56400	14800
	50,0 мг/л	40	13100	9800
Контрольная проба		1500	82500	23000

3.6 Подготовка единого модельного почвенного эталона

Модельный почвенный эталон (МПЭ) позволяет:

1. Обеспечить проведение исследований по миграции экзогенных химических веществ в растения в единых сопоставимых почвенных условиях;
2. Обеспечить максимальную миграцию изучаемого вещества в выращиваемые растения;

Осуществлять при необходимости проведения специальных исследований изменение почвенных условий, характерных для того или иного почвенного типа.

В качестве основы для единого МПЭ используется среднезернистый песок, подготавливаемый следующим образом.

Доставляемый из любого песчанного карьера с глубины 2-3 метров чистый песчаный грунт просеивают через сито Кноппа № 4. Фракции среднезернистого песка, прошедшие через сито № 4, подвергают затем обработке однонормальной соляной кислотой для окисления органических примесей. После этого фракции песка промывают водой до нейтральной реакции среды ($pH=7,0$), обеспечивая одновременное удаление илистой фракции. Контроль за нейтральной реакцией промытого водой структурного скелета единого МПЭ проводят путем определения pH промывных вод с помощью pH -метра. Свидетельством удаления илстых фракций является прозрачность промывных вод, которая должна быть не менее 10 см. Промытые фракции среднезернистого песка доводятся до воздушно-сухого состояния. Высушенный до воздушно-сухого состояния среднезернистый песок с нейтральной реакцией среды представляет собой нежизнеспособный структурный скелет МПЭ. Для обеспечения плодородных свойств почвенного эталона к структурному скелету добавляют питательные смеси.

В настоящее время широко известны питательные смеси Прянишникова, Кноппа, Гельригеля и другие (см. Приложение и таблица 16), применяющиеся при выращивании растений на искусственных субстратах (песчаных и водных

культурах). Как видно из таблицы 8, смеси включают в себя необходимые для нормальной вегетации химические элементы – азот, фосфор, калий, кальций, сера, железо. Применение той, или иной питательной смеси на МПЭ дает возможность моделировать почвенные условия, характерные для той или иной почвенной зоны. Так, например, рН смеси Гельригеля (3,6) близка по значению к рН почвенного раствора дерновоподзолистых почв, широко распространенных в средней полосе СНГ, реакция среды смеси Прянишникова (6,5) близка к рН почвенного раствора черноземных почв, широко распространенных в ЦЧО РФ, на Северном Кавказе, Украине и в Молдавии.

Исследования показали, что для приготовления единого МПЭ целесообразнее использовать среду Прянишникова, так как она дает наиболее сопоставимые результаты с натурными условиями. Однако при необходимости проведения специальных исследований можно также использовать среды Кноппа и Гельригеля.

Питательную смесь Прянишникова вносят в структурный скелет МПЭ в сухом виде из расчета на 1 кг грунта.

Таблица 16 - Питательные смеси (г/кг)

Компоненты смеси	Смесь Гельригеля	Смесь Кноппа	Смесь Прянишникова
Ca (CO ₃) ₂	0,492	1,0	-
NH ₄ NO ₃	-	-	0,24
KH ₂ PO ₄	0,136	0,25	-
CaHPO ₄	-	-	0,172
MgSO ₄	0,060	0,25	-
KCl	0,075	0,12	0,16
FeCl ₃	0,025	следы	следы
рН	3,6	5,5	6,5

Для внесения навески питательных веществ специально подготовленные фракции песка распределяются тонким слоем на листе бумаги. На всю поверхность распределенного грунта равномерно вносится навеска питательной смеси и перемешивается. Подготовленный таким образом МПЭ является основой для проведения дальнейших исследований.

3.7 Определение допустимой концентрации нитрозодиметиламин и тетраметилтетразен по их влиянию на биологическую активность почвы

Свободноживущие микроорганизмы заселяют атмосферу, гидросферу и литосферу, обитая в виде сообществ. Внутри и вне сообществ образуются экологические связи, как между собой, так и с растениями, животными, человеком, а также с абиогенными факторами окружающей среды (ОС).

Микрофлора объектов ОС делится на собственную (аутохтонную) и транзитную (заносную), т.е. поступающую из других частей биосферы, от живых микроорганизмов.

Почва является естественной средой обитания микроорганизмов и вместе с растениями и животными образует сложные и многообразные биогеоценозы, состав, плотность, функциональная активность и прочие характеристики которых зависят от типа и структуры почвы.

Почвенные микроорганизмы участвуют во всех процессах трансформации веществ и энергии. Через почву могут передаваться возбудители многих инфекционных заболеваний. Для возбудителей ботулизма, актиномикоза, глубоких микозов почва является естественной средой обитания. Хотя и почва и вода не очень способствуют существованию болезнетворных микроорганизмов, многие из них способны выживать в неблагоприятных условиях.

Наибольшее количество микроорганизмов отмечается в верхнем слое почвы на глубине 5-15 см, затем их число снижается.

Результат исследования 4

В качестве экологических загрязнителей почвы в работе использованы водные растворы НДМА, где растворы превышали 50 ПДК в воде водоемов в начальных пробах - начало опыта (26.09.08) и конец опыта (29.09.08), а также водные растворы ТМТ, превышающий 10 ПДК по воде водоемов начального исследования – начало (8.10.08) и ТМТ - конечный (10.10.08).

Для дозированного посева опытного материала на среды использованы одноразовые стерильные бактериальные петли производства Хаймеда (Индия) и объемом 10 мкл. В работе использованы неразведенные растворы и дополнительные разведения испытуемых материалов в физиологическом растворе: 10^3 и 10^5 степени.

Из приготовленных разведений делали посева на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов с применением следующих сред: кровяной агар, мясопептонный агар, а также для выращивания энтеробактерий – среда Эндо, кокков – Чистовича, возбудителей микозов – среда Сабуро, приготовленных в соответствии с прилагаемой общепринятой рецептурой и помещенных в чашки Петри.

Все среды инкубировали в термостате при t 37,5°C в течение 24-48 часов. Чашки со средой Сабуро оставляли еще на 2 суток при комнатной температуре.

Проводились микроскопические исследования. Для этой цели «фиксированные» мазки окрашивали по методу Грамма и микроскопировали «под иммерсией». Проводился подсчет выросших колоний.

Отсутствие роста на среде Эндо свидетельствует, что энтеробактерий в опытных пробах нет. Также как не выявлено роста кокковых форм на среде Чистовича и возбудителей микозов на среде Сабуро.

Микроскопия показала наличие в пробах на кровяном и мясопептонном агарах наличие роста сапрофитных микроорганизмов и отсутствие роста патогенных.

Таблица 17 - Показатели роста микроорганизмов на питательных и элективных средах неразведенных водных образцов с добавлением НДМА и ТМТ.

Используемые среды	Водный раствор НДМА		Водный раствор ТМТ	
	Начало	Конец	Начало	Конец
Кровяной агар	480 кое	832 кое	541 кое	21 кое
Мясо-пептонный агар	Нет роста	700 кое	400 кое	Нет роста
Среда Эндо	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Среда Чистовича	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Среда Сабуро	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Примечание: кое – колония образующие единицы				

Таким образом отмечается, что от водных растворов ТМТ (превышающий ПДК в 10 раз) и от водного раствора НДМА, превышающий ПДК в 50 раз, в начале опыта микрофлоры было меньше, чем конечной в 2 раза.

3.8 Протеазная активность загрязненных НДМА и ТМТ почв

В качестве показателя биологической активности проб почвы была выбрана ферментативная активность почвы.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, образуемые живыми организмами и характеризующиеся лабильностью и специфичностью действия. Ферменты играют важнейшую роль в обмене веществ в живой клетке.

В почве содержатся различные экзо- и эндоферменты, выделяемые после лизиса клеток. Ферменты, выделяемые в почву, значительное время сохраняют свою активность. Они определяют интенсивность и направленность биохимических процессов, протекающих в почве.

Протеазы – ферменты, катализирующие гидролиз белков, пептонов, полипептидов и аминокислот. С активностью протолитических ферментов тесно связан круговорот азота в почве.

В данной работе для оценки биологической оценки активности почвы выбрана инвертазная ферментативная активность

Определение инвертазной активности проб почвы показало в опыте незначительное различие активности инвертазы в исследуемых пробах НДМА и ТМТ [25, 26, 27].

3.9 Определение влияния керосина на биологическую активность почв

Современный этап развития общества характеризуется интенсивным вмешательством человека в природные процессы, что приводит к нарушению естественного функционирования экосистем в первую очередь отражается на плодородии почв, физико-химических параметрах воды и структуре биоценозов. Одним из самых сложных видов технологического воздействия на почвы является загрязнение нефтью и нефтепродуктами: мазут, машинное и моторное масла, дизельное и авиационное топлива, бензин, керосин и др. На протяжении нескольких десятилетий нефтепродукты остаются приоритетными загрязнителями окружающей среды, нарушающими экологическое состояние почвенных покровов и в целом деформирующими структуру биоценозов.

Возрастающее антропогенное воздействие требует новых эффективных методов диагностики. Биологическая диагностика почв позволяет определить характер и степень антропогенного воздействия на почвенный покров на ранних стадиях развития процессов.

Оценить антропогенное воздействие можно по многим показателям, в том числе и по реакции почвенных микроорганизмов. Это обусловлено их обилием, сложной структурой образуемых сообществ, ролью и значением в почвообразовательных процессах и высокой чувствительностью к различным факторам, как локально действующим экологическим, имеющим место в природе, так и антропогенным.

Микроорганизмы играют важную роль в плодородии почвы. При их участии происходят процессы превращения веществ, обуславливающие как накопление элементов минерального питания растений, так и синтез органического вещества почвы. В результате жизнедеятельности микроорганизмов образуются соединения, которые могут стимулировать или подавлять рост и развитие растений. Почва как среда способствует массовому развитию микроорганизмов и является богатейшим резервуаром разнообразных по своим биохимическим функциям представителей низших организмов. В почве развиваются различные группы микроорганизмов (бактерии, грибы, актиномицеты) и водоросли. Их количество колеблется в широких пределах — от миллионов до миллиардов в 1 г почвы. Содержание микрофлоры и ее активность подвержены определенной динамике в годичном цикле почвообразования в связи с изменением гидротермического режима и многократными повторяющимися генерациями микроорганизмов. Бактерии - наиболее распространенная группа микроорганизмов в почве. Их количество колеблется от десятков и сотен миллионов до нескольких миллиардов в 1 г почвы и зависит от свойств почвы и их гидротермических условий. Бактерии осуществляют разнообразные процессы превращения органических и минеральных соединений в почвах. Актиномицеты, иногда называемые лучистыми грибами (*Actinomycetes*), используют в качестве источника углерода разнообразные органические

соединения. Они могут разлагать клетчатку, лигнин, перегнойные вещества почвы. Участвуют в образовании гумуса. Актиномицеты лучше развиваются в почвах с нейтральной или слабощелочной реакцией, богатых органическим веществом и хорошо обрабатываемых. К актиномицетам относят родственно близкие к ним проактиномицеты, микобактерии, микромоноспоры и микококки. Грибы - нитевидные гетеротрофные сапрофитные микроорганизмы, обильно населяющие почву (до 1 млн на 1 г почвы), особенно горизонты, обогащенные мертвыми растительными остатками (лесная подстилка, опад). Они активно участвуют в процессах минерализации и гумификации органических веществ. При этом имеет место последовательная смена одних групп грибов другими в процессе разложения органических веществ.

Основным показателем, характеризующим воздействие загрязняющих веществ на окружающую природную среду, являются предельно допустимая концентрация (ПДК). В настоящее время разработана и утверждена в Российской Федерации ПДК для бензина в почве, равная 0,5 мг/кг и для нефтей Каражанбаского месторождения в Республике Казахстан.

В соответствии со степенью устойчивости против загрязняющих веществ выделяются почвы: очень устойчивые; устойчивые; среднеустойчивые; малоустойчивые; очень мало устойчивые. По степени чувствительности к загрязняющим веществам почвы можно разделить следующим образом: очень чувствительные; чувствительные; среднечувствительные; малочувствительные; устойчивые.

Чувствительность, или устойчивость почв по отношению к загрязняющим веществам, целесообразно определять в соответствии с содержанием гумуса; его качеством; биологической активностью; глубиной гумусового горизонта; содержанием фракции <0,01 мм и учетом содержания фракции <0,001 мм (механический состав почвы); глинистых минералов; глубиной почвенного профиля. Поступающие в почву химические соединения накапливаются и приводят к постепенному изменению химических и физических свойств почвы, снижают численность живых организмов, ухудшают ее плодородие.

Серые лесные почвы характеризуются высоким уровнем естественного плодородия. Питательный потенциал этих почв достаточен, чтобы обеспечить лесные культуры необходимыми микро- и макроэлементами. Серые лесные почвы на ненарушенных участках характеризуются высоким уровнем естественного плодородия, хорошими свойствами для накопления и проявления активности каталазы, уреазы и инвертазы и др. ферментов.

Керосин относится к группе веществ губительно действующих на растения, но не стерилизующих почву.

Результат исследования 5

Исследование проводилась автором с коллективом отдела медицинских программ РГП «НИЦ «Гарыш-Экология» Аэрокосмического комитета РК, цель которого было, выявление влияния авиационного керосина на

численность почвенных микроорганизмов и ферментативную активность почвы.

Материал и методы исследований. Высев произведен из 19 проб почвы, обработанных керосинами в концентрациях 10 мл/кг, 50 мл/кг, 100 мл/кг после первого, пятого и десятого дней воздействия керосинами марок Т-1 и ТС-1. Контролем служила почва не обработанная керосином.

Взвешивание почвенных образцов проводили на весах 54-S/A, 51g/0,1mg cat.-Mettler-Toledo-Nr. 11103007.

Для выделения микроорганизмов произведен высев почвенных образцов на питательный агар (МПА) следующего состава (г/л): пептон – 5,0; натрия хлорид – 5,0; мясной экстракт – 1,5; дрожжевой экстракт – 1,5; агар – 20,0 и крахмало-аммиачный агар (КАА), г/л: фосфат калия двухзамещенный – 1,0; сульфат аммония – 1,0; сульфат магния - 1,0; хлорид натрия - 1,0; карбонат кальция - 1,0; крахмал нерастворимый - 10,0; агар – 20,0. Для выделения спорообразующих микроорганизмов высев почвенного образца проводили после предварительного его прогрева на водяной бане в течение 15 мин при температуре 87⁰С.

Для выделения актиномицетов использовали среду 2 Гаузе (г/л): - бульон Хоттингера – 50 мл; пептон – 5; хлорид натрия – 5; глюкоза – 10; для грибов - среду Чапека (г/л): сахароза – 30; нитрит натрия – 2; фосфат калия двухзамещенный – 1; сульфат магния – 0,5; хлорид калия – 0,5; железо сернокислое – 0,01.

Отсев выросших колоний производили на косяки питательного агара того же состава.

Выращивание микроорганизмов проводили в термостате при температуре - 28-30⁰С в течение 3 (бактерии) - 7 суток (актиномицеты, микромицеты).

Подсчет численности микроорганизмов проводили путем ряда последовательных разведений в стерильной водопроводной воде и высева их в агаризованную питательную среду с последующим подсчетом выросших колоний.

Инвертазную, дегидрогеназную, нитрифицирующую активности определяли общепринятыми методами [28]. Повторность опытов трехкратная.

3.10 Подсчет численности микроорганизмов в почвах, обработанных различными концентрациями керосина

Проведен высев на твердые питательные среды почвенных образцов, обработанных керосином. После выращивания в термостате подсчитана численность микроорганизмов.

Выделение микроорганизмов производили из описанных выше образцов почвы.

Установлено, что в исследуемых образцах почв присутствуют различные группы микроорганизмов.

Представленные образцы почв отличаются по количественному и качественному составу микроорганизмов.

Результаты проведенного эксперимента - установлено, что под влиянием керосина происходит изменение количественного состава микроорганизмов.

Таблица 18 - Численность микроорганизмов в исследуемых образцах почвы

Образцы Почв	ОМЧ на МПА	ОМЧ на КАА	Актиноми- цеты	Микроскопи- ческие грибы	Спрообразующие микроорганизмы
	Количество колонеобразующих единиц в грамме (КОЕ/г)				
Контроль	$10,0 \times 10^8$	$10,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^4$	$6,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
Почва, обработанная керосином Т-1					
1-й день, 10мл/кг	$2,3 \times 10^5$	$6,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
1-й день, 50мл/кг	$2,6 \times 10^5$	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
1-й день, 100 мл/кг	$5,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$9,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$
5-й день, 10мл/кг	$1,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^4$
5-й день, 50мл/кг	$3,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$
5-й день, 100 мл/кг	$3,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
10-й день, 10мл/кг	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^4$
10-й день, 50мл/кг	$5,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$
10-й день, 100 мл/кг	$4,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^4$	$4,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$

Таблица 19 - Численность микроорганизмов в исследуемых образцах почвы

Почва, обработанная керосином ТС-1					
1-й день, 10мл/кг	$2,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$
1-й день, 50мл/кг	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^4$
1-й день, 100 мл/кг	$3,0 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^4$
5-й день, 10мл/кг	$3,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^4$
5-й день, 50мл/кг	$3,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^4$
5-й день, 100 мл/кг	$2,6 \times 10^4$	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^1$	$2,6 \times 10^4$
10-й день, 10мл/кг	$1,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^4$

10-й день, 50мл/кг	$3,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$
10-й день, 100 мл/кг	$5,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$

Общее число микроорганизмов на МПА в 1-й и 5-й день загрязнения керосином снизилось на 3-4 порядка. Через 10 дней количество их повысилось $\times 10^6$, но не достигло исходного уровня. Отмечено более сильное снижение общего числа микроорганизмов на среде КАА (3-5 порядков). На 10-й день так же отмечено увеличение количества бактериальных клеток.

Снижение числа актиномицетов отмечено с первого дня наблюдений. При этом количество их снизилось в 10 раз на 10-день отмечено восстановление исходного содержания этих микроорганизмов.

Снижение количества микроскопических грибов отмечено также на 1-й и 5-й дни эксперимента на 2 порядка. На 10-й день число их повысилось на 1 порядок, но не достигло исходного уровня.

Содержание спорных микроорганизмов под влиянием керосина снизилось на 1 порядок и оставалось на прежнем уровне в период наблюдений.

Таким образом, загрязнение почвы керосином приводит к снижению всех определяемых групп микроорганизмов. Наибольшее снижение микробных клеток отмечено при определении количества на МПА и КАА. Через 10 дней после начала эксперимента установлено повышение количества всех групп микроорганизмов, однако их число не достигло исходного уровня, за исключением актиномицетов.

3.11 Определение ферментативной активности почвенных образцов, загрязненных керосином

А) Определение инвертазной активности. Определялась инвертазная активность почвенных образцов, загрязненных керосином в концентрациях 10, 50, 100 мг/кг после 1-го, 5-ти и 10- дней воздействия.

Результаты проведенного эксперимента - установлено, что инвертазная активность в загрязненной керосином Т-1 почве повышается по сравнению с контролем на 3,1-42,9%. Так, если в контрольной почве активность была равна 12,8 мг глюкозы на 1 кг почвы, то в образцах почвы с загрязнением 10 мл/кг – 15,2, через 5 суток 16,5, а через 10 суток – 13,2 мг глюкозы на 1 кг почвы. При загрязнении почвы 50 мл/кг в первые сутки инвертазная активность близка к почве, загрязненной в концентрации 10 мл/кг: в первые сутки 15,4; 2-е сутки – 16,7; 10-е сутки – 14,0 мг глюкозы на 1 кг. При содержании в почве 100 мг/кг инвертазная активность была значительно выше. В первый день она составила 18,3 на пятый день – 18,5, на десятый – 17,4 мг глюкозы на 1 кг почвы.

Так же установлено, что инвертазная активность в загрязненной керосином ТС-1 почве повышается по сравнению с контролем. Почва,

содержащая 10 мг/кг керосина имела в первый день активность инвертазы 16,5, на пятый день – 14,3, десятый день – 13,4 мг/кг. В почве, содержащий керосин в концентрации 50 мг/кг инвертаза в первый день составила 17,8, на пятый – 17,5, на десятый день – 14,0 мг глюкозы на 1 кг почвы. Инвертазная активность почвы, содержащей 100 мг/кг керосина в первый день составила 18,4, на пятый – 18,6 и на десятый день – 16,5 мг глюкозы на 1 кг почвы.

Таблица 20 – Инвертазная активность почв, загрязненных керосином

Варианты	мг глюкозы на 1 г почвы за 24 часа			
	Почва, обработанная керосином Т-1		Почва, обработанная керосином ТС-1	
Контроль	12,8	100%	12,8	100%
1-й день, 10мл/кг	15,2	18,7	16,5	28,9
1-й день, 50мл/кг	15,4	20,3	17,8	39,0
1-й день, 100 мл/кг	18,3	42,9	17,8	39,0
5-й день, 10мл/кг	16,5	28,9	14,3	11,7
5-й день, 50мл/кг	16,7	30,5	17,5	36,7
5-й день, 100 мл/кг	18,5	44,5	18,6	45,3
10-й день, 10мл/кг	13,2	3,1	13,4	4,7
10-й день, 50мл/кг	14,0	9,4	14,0	9,4
10-й день, 100 мл/кг	17,4	35,9	16,5	28,9

Таким образом, во все вариантах загрязненной почвы отмечено значительное повышение активности инвертазы по сравнению с контролем. При этом к концу периода наблюдений она снижается, но не достигает уровня контроля, особенно в варианте с содержанием керосина 100 мг/ кг почвы.

Б) Определение дегидрогеназной активности. Определялась дегидрогеназная активность почвенных образцов, загрязненных керосином в концентрациях 10, 50, 100 мг/кг после 1-го, 5-ти и 10- дней воздействия.

Результаты проведенного эксперимента - установлено, что под воздействием керосина происходит небольшое (в пределах 8-12%) уменьшение дегидрогеназной активности. При этом различий в вариантах опыта не отмечено.

В) Определение нитрофицирующей активности. В таблице приведены результаты проверки влияния керосина на нитрофицирующую активность почв.

Как видно из таблицы происходит увеличение нитрифицирующей активности при всех нагрузках керосина. На пятые сутки отмечается восстановление ферментативной активности.

Таблица 21 – Дегидрогеназная активность почв, загрязненных керосином

Варианты	Единиц оптической плотности			
	Почва, обработанная керосином Т-1		Почва, обработанная керосином ТС-1	
Контроль	5,0	100 %	5,0	100%
1-й день, 10 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
1-й день, 50 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
1-й день, 100 мл/кг	4,4	-12	4,4	-12
5-й день, 10 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
5-й день, 50 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
5-й день, 100 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
10-й день, 10 мл/кг	4,6	-8	4,6	-8
10-й день, 50 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10
10-й день, 100 мл/кг	4,4	-12	4,5	-10

Таблица 22 – Нитрифицирующая активность почв, загрязненных керосином

Варианты	Соотношение изменений с контролем, принятым за 100%			
	Почва, обработанная керосином Т-1		Почва, обработанная керосином ТС-1	
Контроль	100,0	рост, %	100,0	рост, %
1-й день, 10 мл/кг	143,7	43,7	144,6	44,6
1-й день, 50 мл/кг	146,2	46,2	148,2	48,2
1-й день, 100 мл/кг	149,4	49,4	150,4	50,4
5-й день, 10 мл/кг	100,0	0	101,0	1,0
5-й день, 50 мл/кг	101,1	1,1	103,2	3,2
5-й день, 100 мл/кг	103,7	3,7	104,5	4,5
10-й день, 10 мл/кг	106,0	6,0	107,0	7,0
10-й день, 50 мл/кг	109,0	9,0	109,0	9,0
10-й день, 100 мл/кг	110,0	10,0	111,0	11,0

3.12 Определение допустимой концентрации несимметричного диметилгидразина по их влиянию на биологическую активность почвы

Свободноживущие микроорганизмы заселяют атмосферу, гидросферу и литосферу, обитая в виде сообществ. Внутри и вне сообществ образуются экологические связи как между собой, так и с растениями, животными, человеком, а также с абиогенными факторами окружающей среды.

Несимметричный диметилгидразин (НДМГ) начало и конец опыта (14.11.08), с превышением ПДК в воде водоемов в 50 раз, начальном водном растворе.

При посеве всех проб с НДМГ как неразведенных, так и разведенных в 10^3 и 10^5 при посеве на среды Эндо и Сабуро роста микроорганизмов не обнаружено.

Таким образом отмечается, что от водных растворов ТМТ (превышающий ПДК в 10 раз, из раздела 8) и НДМГ (превышающий ПДК в 50 раз) от начальных растворов имелось больше колоний из микрофлоры, чем от конечных. Которые «прошли» миграцию через метровый слой МПЭ. От водного раствора НДМА, превышающий ПДК в 50 раз, в начале опыта микрофлоры было меньше, чем конечной, в 2 раза.

Таблица 23 - Показатели роста микроорганизмов на средах при использовании проб, содержащих НДМГ

Используемые среды	Водный раствор НДМГ		Проба разведенная 10^3		Проба разведенная 10^5	
	Начало	Конец	Начало	Конец	Начало	Конец
Кровяной агар	752 кое	612 кое	12 кое	15 кое	7 кое	2 кое
Среда Эндо	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Среда Сабуро	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
кое – колония образующие единицы						

При разведении НДМГ в 10^3 и 10^5 степени, картина оставалась несколько стабильной. При разведении 10^3 колонии образующие единицы были незначительно равны, и даже несколько больше в конце опыта. А при 10^5 – в конечном опыте меньше в 3 раза.

Если сравнивать с исследованиями Канаева А.Т., Каратаева М.Б. и других, 2003 года, где ПДК НДМГ превышал в 15 раз, деструкция под влиянием культур микроорганизмов на 2-е сутки составляла 2 – 10%, можно говорить, что в почве и вводно-почвенной суспензии с данными нашими исследованиями можно провести равенство.

Определение инвертазной активности проб почвы показало несущественное различие активности инвертазы в исследуемых пробах НДМГ.

3.13 Эпидемиология почвы и её микрофлора

Почва вместе с почвенными водами является естественной средой обитания для подавляющего большинства сапрофитных микроорганизмов, многие из которых обуславливают важнейшие процессы круговорота различных веществ (азота, серы, углерода, фосфора) в природе.

Органические компоненты почвы (гумус) представляют собой остатки животных и растительных макро- и микроорганизмов. Гумус – чрезвычайно ценная составная часть почвы, определяющая плодородие последней. Такие продукты разложения гумуса, как органический азот и мочевины, под влиянием биохимической активности соответствующих микроорганизмов превращаются в газообразный азот, который частично выделяется в

атмосферу, а частично ассимилируется с помощью азотфиксирующих бактерий растениями.

Таким образом, за счет взаимодействия многих синтрофных групп микроорганизмов происходит самоочищение почвы от продуктов белкового распада [28, 29].

В то же время состав микрофлоры почвы во многом зависит и от географических, геологических условий, а также от времени года и интенсивности контакта почвы с животным миром и человеком. С испражнениями последних в почву попадает большое количество микробов – как нормальных обитателей кишечника, так и возбудителей инфекционных заболеваний. Это бактерии группы кишечной палочки, ряд спорозоносных анаэробных видов, патогенные бактерии, риккетсии, вирусы, бактериофаги, простейшие.

Зараженная почва является резервуаром возбудителей инфекционных болезней людей и животных. Инфекция распространяется через воду, овощи, фрукты, предметы обихода, а также мухами, грызунами. Кроме того, почва может быть и непосредственным источником раневых инфекций (газовая гангрена, столбняк), спорообразующие возбудители которых способны длительное время сохраняться в самых неблагоприятных условиях. Многие годы способны сохранять в почве жизнеспособность споры возбудителей сибирской язвы и ботулизма.

Попавшие в почву неспорозоносные патогенные бактерии, риккетсии, вирусы и бактериофаги довольно быстро отмирают. Однако и они при определенных условиях могут выживать в почве от нескольких часов до нескольких месяцев. При этом благоприятствующим моментом является попадание микробов в почву с большим количеством органических веществ, например, с экскрементами.

Патогенные микроорганизмы обычно находятся лишь в самых поверхностных слоях почвы (до 5-15 см). В распределении сапрофитных микроорганизмов (бактерий, актиномицет, плесеней, дрожжей, простейших, водорослей), населяющих почву, также наблюдаются определенные закономерности в зависимости от глубины залегания исследуемого слоя. Так, наиболее обильно представлена микрофлора в верхних слоях почвы, особенно на глубине 10-20 см. Количество микроорганизмов здесь достигает десятки и сотен миллионов особей на 1 грамм почвы. Однако с увеличением глубины залеганий слоя количество микроорганизмов резко сокращается и уже на 5-6 метровой глубине практически равно нулю. Это связано прежде всего с высокой поглотительной способностью почвы, обусловленной целым рядом механических, физических, физико-химических, химических и биологических факторов.

О степени загрязнения почвы микроорганизмами обычно судят по результатам санитарно-бактериологического исследования, предусматривающего обнаружение санитарно-показательных микробов и (при необходимости) возбудителей ряда инфекционных заболеваний.

3.14 Оценка санитарно-бактериологического состояния почвы

Санитарно-бактериологические исследования почвы проводят:

1 при определении пригодности участка для строительства жилых зданий, детских и медицинских учреждений. Лагерей, водопроводных сооружений;

2 при эпидемиологических обследованиях для выяснения путей заражения почвы, грунтовой воды и открытых водоемов, а также для установления сроков выживаемости патогенных микроорганизмов почвы;

3 для характеристики процесса самоочищения почвы и санитарной оценки различных методов обезвреживания отходов;

4 при комплексной характеристике санитарного состояния почвы (помимо энтомологических и гельминтологических исследований).

В военное время пробы могут подвергаться исследованию как объекты внешней среды в условиях применения противником бактериальных средств.

В зависимости от поставленных задач применяют краткий и полный санитарно-бактериологический анализ. Краткий санитарно-бактериологический анализ почвы включает определение: а. кишечной палочки; б. общего числа сапрофитных бактерий почвы.

Полный анализ почвы включает определение: а. кишечной палочки; б. общего числа сапрофитных бактерий; в. количества анаэробов; г. протея и некоторых других микроорганизмов.

При специальных эпидемиологических обследованиях производят определение в почве патогенных микроорганизмов: бактерий тифо-паратифозной и дизентерийной групп, возбудителей сибирской язвы и столбняка, ботулизма и других микроорганизмов.

Таким образом, главными показателями для санитарно-бактериологической оценки почвы являются следующие:

1 микробное число;

2 титры кишечной палочки и *Cl. perfringens* (как санитарно-показательных микроорганизмов почвы). При этом *Cl. perfringens*, как более устойчивый во внешней среде по сравнению с бактериями кишечной группы, является показателем давности фекального загрязнения;

3 наличие патогенных микроорганизмов и токсинов [30, 31, 32].

3.15 Методы бактериологического исследования почвы

Взятие проб. Для получения более полного представления о санитарно-гигиеническом состоянии почвы рекомендуется исследовать как участки наибольшего предполагаемого загрязнения, так и свободные от загрязнения (для контроля). При этом существуют определенные нормативы отбора проб с исследуемых участков. Например, при изучении небольшой площадки (до 1000 м²) намечают два участка (по 25 м²) и с каждого отбирают по 4-5 проб.

Пробы отбирают следующим образом: выкапывают лопатой ямку до нужной глубины, затем с одной ее стороны набирают стерильным ножом или шпателем в стерильную банку 100-200 г почвы. Банку закрывают пробкой, обертывают бумагой и перевязывают у горловины шпагатом, затем маркируют и заполняют соответствующий сопроводительный документ. В ряде случаев для отбора проб почвы можно пользоваться стерильными полиэтиленовыми мешочками, входящими в специальные укладки.

Для выемки пробы из глубоких слоев используют почвенный бур системы Некрасова, который представляет собой штангу с рукояткой для вращения бура. Рукоятка с удлинителем позволяет производить забор проб почвы с глубины до трех метров. Внутри бура имеется коробка, в которую набирается почва, вырезаемая спиральным ножом при вращении рукоятки. Перед забором новых проб почвы коробка стерилизуется обжиганием.

Проба почвы для бактериологического исследования должна доставляться в лабораторию не позже чем через 2 часа после её взятия. Если исследование производится не сразу, допускается хранение проб почвы в холодильнике, но не более 24 часов. Чем больше вес пробы почвы, тем лучше в ней сохраняются микроорганизмы.

Подготовка почвы для анализа. Исследуемую почву размельчают и просеивают через стерильное сито с ячейками диаметром до 3 мм. Готовят навеску пробы почвы в 10 г, помещают в стерильную ступку и растирают пестиком в течение 5 минут при добавлении небольшого количества физиологического раствора (10-15 мл) или стерильной воды. Перевод микроорганизмов в жидкую фазу заканчивается добавлением в колбу с почвенной суспензией воды до объема в 100 мл. После 10-15 минутного встряхивания почвенной суспензии в шотгеллааппарате (при отсутствии последнего допускается ручное встряхивание) из полученной почвенной суспензии без отстаивания готовят последующие десятикратные разведения: для чистых почв 3-4 разведений, для загрязненных - до 4-7.

В ряде случаев при исследовании на патогенные микроорганизмы применяют методы концентрации возбудителей из надосадочной жидкости 10%-ной почвенной суспензии (фильтрование, осаждение микроорганизмов коагулянтами, центрифугирование и т.п.).

Определение микробного числа почвы. Определение микробного числа в почве (общее количество микробов на 1 грамм почвы) является косвенным показателем загрязнения почвы и самостоятельного значения не имеет.

Ввиду наличия в почве большого количества сапрофитных микроорганизмов для посевов берут малые количества почвенной суспензии. С этой целью из первоначальной 10%-ной почвенной суспензии готовят ряд разведений (1:1000; 1:10 000; 1:100 000; 1:1 000 000), из которых производят высевы на чашки с мясо-пептонным агаром глубинным или поверхностным методом.

При глубинном посеве 1 мл соответствующих разведений почвенной суспензии вносят в стерильные чашки Петри, затем заливают расплавленным

и охлажденным до 45° мясо-пептонным агаром. Легкими круговыми движениями добиваются равномерного распределения суспензии в агаре и оставляют чашку в строго горизонтальном положении до образования геля.

При поверхностном методе посева 0,1 мл почвенной суспензии равномерно распределяется шпателем по поверхности заранее подготовленного в чашках Петри мясо-пептонного агара.

Посевы во всех случаях инкубируют при 28-30° в течение 48 часов. После подсчета количества колоний микроорганизмов на чашках выводят микробное число для каждого разведения почвенной суспензии, а затем – средний показатель микробного числа для данной пробы почвы в перерасчете на 1 грамм последней.

При оценке санитарного состояния почвы по микробному числу следует учитывать особенности типа почвы. Так, черноземная почва значительно богаче микрофлорой, чем подзолистая. Поэтому сравнивать по степени загрязнения можно только пробы почв того же типа.

Институтом общей и коммунальной гигиены АМН СССР ещё в прошлом веке было рекомендована для санитарной оценки почв подзолистой зоны по микробному числу примерная схема (таблица 24).

Следует отметить, что при проведении исследования по описанной методике с посевом на мясо-пептонный агар мы получаем представление о численности метатрофной группы микробов в почве. Для санитарной оценки состояния почвы этих данных, как правило, достаточно. При необходимости более детального изучения микробной ассоциации почвы применяют специальные питательные среды и методики, излагаемые в соответствующих руководствах.

Таблица 24 - Нормативы микробного числа для подзолистых почв

Исследованная почва	Микробное число (в миллионах) в почве	
	незагрязненной	загрязненной
Канализационных домовладений	до 1-3	свыше 3
Неканализационных домовладений	1-3	свыше 3
Садов и парков	до 1-2,5	свыше 2,5
Территорий промышленных предприятий	до 1-2,5	свыше 2,5
Свалок и сильно загрязненных мест	-	до 10 и выше

Определение титра кишечной палочки в почве. Одним из основных показателей фекального загрязнения почвы, как и воды, является обнаружение в ней бродильным или другим методом кишечной палочки.

Коли-титром почвы называется то наименьшее количество почвы, выраженное в граммах, в котором обнаруживается кишечная палочка.

Для определения коли-титра почвы чаще применяют бродильный метод.

При этом оценку фекального загрязнения необходимо проводить, пользуясь определением не только типичной кишечной палочкой, но и всех ее разновидностей, способных вызвать газообразование на жидких средах с

глюкозой при 43°C. Бактерии, относящиеся к этой группе, характеризуются следующими признаками: короткие грамотрицательные неспороносные палочки; аэробы или факультативные анаэробы, способные вызвать сбраживание глюкозы с образованием кислоты и газа в течение 24 часов при 43°C.

Наличие в почве большого количества разнообразных микроорганизмов, способных подавлять рост кишечной палочки или самостоятельно сбраживать с образованием газа многие углеводы, требует применения вместо глюкозо-пептонной среды (ГПС) специальных питательных сред. Из группы сред, содержащих для подавления развития других микробов желчь и генциан-виолет (последние не препятствуют росту кишечной палочки), наиболее употребительной является среда Кесслер (смотри приложение). Среда применяется в концентрированном виде (для посева навесок почвы в 1,0; 0,5 и 0,1 г) и в разведенном виде (для посева разведенной почвенной суспензии).

Для определения коли-титра засевают 10 мл почвенной суспензии (1:10), что соответствует 1 г почвы, в колбы с 50 мл среды, а 1 мл суспензии (соответствует 0,1 г почвы) и по 1 мл дальнейших ее разведений – в пробирки с 5 мл среды.

После суточной инкубации посевов в термостате при 42-43°C производят учет первичной бродильной пробы (муть и газообразование).

Дальнейший ход анализа таков: контрольные высевы на чашки со средой Эндо из забродившихся с газообразованием посевов; учет с выборочным бактериоскопическим контролем характера роста на этой среде после инкубации при 37°C в течение 20-24 часов; постановка вторичной бродильной пробы на ГПС с инкубацией при 37°C в течение 24 часов.

Предельное разведение почвенной суспензии, в которой обнаружено наличие кишечной палочки или ее разновидностей (по бродильным пробам и морфологии), указывает на титр кишечной палочки, т.е. на интенсивность фекального загрязнения данной пробы почвы.

В последнее время находят применение и другие методы определения кишечной палочки в почве, такие, как бродильный метод с использованием трифенил-тетразолхлорида (ТТХ) и метод мембранных фильтров.

Бродильный метод с использованием ТТХ основан на способности бактерий кишечной палочки восстанавливать бесцветный ТТХ в трифенил-формазан, выпадающий в виде осадка и придающий среде кирпично-красный цвет. Кишечная палочка довольно устойчиво к влиянию формазана, в то время как развитие другой сопутствующей микрофлоры им несколько тормозится.

Разведения почвы готовят как обычно. Почвенную суспензию (1:10) в количестве 10 мл засевают в 50 мл лактозного бульона с ТТХ (рецепт среды смотри в приложении), меньшие количества почвы засевают внесением по 1 мл соответствующих разведений почвенной суспензии в 9 мл среды. Последующий анализ ведется по методу, аналогичному исследованию воды.

Метод мембранных фильтров. При исследовании незагрязненных почв суспензию пропускают через мембранные фильтры № 3 по 1 мл из разведений 1:100 и 1:1000. Если исследуют загрязненную почву, то фильтруют разведения от 1:1000 до 1:1 000 000. Для задержки почвенных частиц при исследовании небольших разведений на мембранный фильтр № 3 накладывают планктонный предварительный фильтр. Дальнейшие исследования и учет результатов соответствуют аналогичной методике исследования воды. Количество колоний, выросших на фильтрах, пересчитывают на 1 кг почвы, получая таким образом величину коли-индекса почвы (число кишечных палочек в 1 кг почвы). Для перевода коли-индекса в коли-титр необходимо 1000 разделить на число, выражающее коли-индекс.

Обнаружение в почве кишечной палочки и ее разновидностей свидетельствует о наличии относительно свежего фекального загрязнения, хотя по имеющимся литературным данным (Л.И. Мац, 1965; Г.П. Калина, 1965) в зависимости от типа и состояния почвы в определенных условиях возможно активное размножение кишечной палочки в естественных условиях, что в значительной мере увеличивает сроки ее выживания во внешней среде.

При необходимости получения более точных данных выделенные из почвы культуры подлежат подробной идентификации с использованием общепринятых методик.

Определение титра *Cl. perfringens* в почве. Как уже отмечалось, *Cl. perfringens*, как и кишечная палочка, является постоянным обитателем кишечника человека и животных. Однако, как спорообразующий, этот микроб имеет значительно большую устойчивость во внешней среде, чем кишечная палочка, и поэтому может служить показателем фекального загрязнения почвы, когда-либо имевшего место, а также характеризовать степень возможного загрязнения почвы патогенными анаэробами.

Степень загрязнения почвы *Cl. perfringens* определяется с помощью количественного показателя *perfringens*-титра, под которым понимают то наименьшее весовое количество почвы (выраженное в граммах), в котором обнаруживается *Cl. perfringens*.

Для определения *Cl. perfringens* в почве используют железо-сульфидный агар (среда Вильсона-Блера). Посев почвы производят из тех же разведений почвенной суспензии, что и для определения коли-титра. Для освобождения от неспорозной микрофлоры пробы с разведениями почвенной суспензии прогревают при 80°C в течение 15 минут.

Из соответствующих разведений берут стерильной пипеткой 1 мл материала и вносят его в пробирку с расплавленной и охлажденной примерно до 45° агаровой средой. Вращением пробирки между ладонями равномерно распределяют материал в среде. Посевы выращивают в термостате при 43°.

Появление в течение первых 18 часов роста в глубине агара черных колоний, нередко разрывающих среду вследствие газообразования, свидетельствует о наличии *Cl. perfringens*. Черное окрашивание среды зависит от восстановления бактериями сульфита натрия (Na_2SO_3) до

сернистого натрия (Na_2S), который, взаимодействуя с хлорным железом (Fe_2Cl_6), входящим в состав среды, образует сернистое железо (FeS), имеющее черный цвет. Предельное разведение почвенной суспензии, при посеве которого развиваются колонии *Cl. perfringens*, показывает титр этого микроба.

В некоторых случаях для более простой и быстрой индикации *Cl. perfringens* в почве рекомендуется применять посеvy исследуемого материала в стерильное молоко – 1 мл каждого разведения почвенной суспензии засевают в пробирки с молоком, разлитым по 5 мл. После прогревания при 80°C в течение 15 минут посеvy помещают в термостат (43°C) на 18-20 часов. Наличие *Cl. perfringens* регистрируют по наступившему свертыванию молока с полным отделением сыворотки и выбрасыванию губчатого свертка на поверхность в связи с энергичным газообразованием [32, 33].

При необходимости рост *Cl. perfringens* подтверждается бактериоскопическим исследованием. В мазках, окрашенных по Граму, бациллы имеют вид толстых крупных грамположительных палочек с обрубленными концами, часто располагающимися цепочкой.

Обнаружение в почве *Cl. perfringens* свидетельствует о давности фекального загрязнения, особенно если это сочетается с обнаружением таких разновидностей кишечной палочки, какаэробактер и цитробактер (*E. Coli aerogenes*, *E. Coli citrovorum*).

Для оценки санитарного состояния почвы по коли-титру и *perfringens*-титру пользуются разработкой Институтом общей и коммунальной гигиены ещё АМН СССР схемой.

Таблица 25 – Санитарная оценка почвы по титру *E. coli* и титру *Cl. perfringens*

Исследуемая почва	титр <i>E. Coli</i> , г	титр <i>Cl. perfringens</i> , г
Сильно загрязненная	до 0,001	до 0,0001
Умеренно загрязненная	0,01-0,001	0,001-0,0001
Слабо загрязненная	1,0-0,01	0,01-0,001
Чистая	выше 1,0	выше 0,1

Обнаружение некоторых видов возбудителей инфекционных заболеваний в почве. Необходимость бактериологического исследования почвы на присутствие патогенной микрофлоры в повседневной практике встречается редко и может относиться только к эпидемиологически опасному объекту.

Необходимость микробиологического исследования почвы как объекта внешней среды может возникнуть при индикации бактериальных средств в случае их применения противником. При этом работу ведут по правилам и по методикам, приведенным в специальной инструкции.

Обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний по эпидемиологическим показаниям проводят с применением классических и ускоренных методов бактериологического и вирусологического анализа, излагаемых в соответствующих руководствах.

Следует отметить, что для повышения эффективности анализа после перевода пробы почвы в жидкую фазу проводят концентрацию микрофлоры одним из методов (центрифугирование, фильтрация, осаждение).

Таким образом, урбанизированные территории являются специфическим образованием, формирующимся под воздействием населенных мест, градообразующих предприятий, транспортных сооружений. К концу XXI века ожидается вовлечение в урбанизацию до 20% всей жизненно пригодной территории суши. Исторический процесс повышения роли городов в жизни общества предопределил их воздействие на окружающую среду не только в пределах занимаемой площади, но и на значительном удалении от неё. По этой причине почвенный покров городских и пригородных зон обречен на существенные изменения структуры, функций: биоэкологической, азотно-белковой, биогеохимической, санитарной, а также свойств: ценогенетических, литогенетических, палиногенетических. Следы былого развития почвенного покрова встречаются часто, но его реконструкция осложняется антропогенной эволюцией почв.

Санитарно-микробиологическая оценка почвенного покрова городских и пригородных зон свидетельствует об антропогенных нарушениях биологических механизмов самоочищения, в том числе фоновых почв, что предоставляет интерес для служб санитарного надзора.

Микрофлору почвы можно разделить на метаболически активные организмы (R-стратегии), которые ассимилируют неорганические, низкомолекулярные органические вещества и быстро ферментируют высокомолекулярные органические соединения белки, целлюлозу, пектин, хитин («зимогенная» микрофлора), и метаболически малоактивные организмы (k-стратегии), способные к деструкции и синтезу гумусовых веществ («аутохтонная» микрофлора).

Почва - естественная среда микроорганизмов, принимающих участие в круговороте веществ в природе. Микробы из почвы попадают в воздух и воду. В 1 г почвы находится несколько миллиардов самых разнообразных микроорганизмов: гнилостные аэробные и анаэробные бактерии, азотфиксирующие, нитрофицирующие и другие бактерии, актиномицеты, грибы, простейшие. Особенно длительно в почве находятся споры бактерий и грибов. Наибольшее количество микробов содержится на глубине 5-10 см. Почвенные микроорганизмы осуществляют процесс минерализации органических отходов с образованием гумуса, обеспечивающего плодородие почвы.

Блезнетворные микроорганизмы попадают в почву с выделениями больных людей и животных, с отбросами, с трупами крыс и других животных. Возбудители кишечных инфекций могут находиться в почве от нескольких дней до месяца, иногда дольше. Споры сибирской язвы,

ботулизма, столбняка и газовой гангрены могут сохраняться в почве десятки лет. Загрязнение продуктов болезнетворными микробами из почвы представляет большую опасность заболевания людей. Отсюда проблема микробиологии почвы, как ореал нашей жизнедеятельности на сегодняшний день остается актуальным [34, 35].

4. Санитарно-бактериологическое исследование мяча и мясных продуктов

Организация производства мяса в государственном и в масштабе частного предпринимательства предусматривает широкий ветеринарно-санитарный надзор. Только с его разрешения осуществляется реализация продуктов.

Мясо здорового животного обычно стерильно, так как в физиологических условиях стенка кишечника непроницаема для микроорганизмов. Утомление, длительное голодание и болезни животных, предназначенных к убою, способствуют нарушению физиологических барьеров и проникновению микроорганизмов из кишечного тракта через кровеносную и лимфатическую системы в органы и ткани животных.

При горизонтальном обескровливании животных микроорганизмы могут проникать в венозную систему и распространяться по тканям.

Одним из важнейших условий защиты мяса от обсеменения микробами является строгое выполнение всех требований ветеринарного надзора за животными в предубойном периоде и соблюдение санитарно-эпидемиологического режима на технологических линиях мясокомбинатов.

В предубойном периоде осуществляются:

- поголовный ветеринарный осмотр;
- изоляция больных и подозрительных животных;
- сильно утомленные животные после длительной транспортировки выдерживаются 48 часов, т.е. то время, которое необходимо для отдыха;
- крупный и мелкий рогатый скот выдерживается дополнительно без корма 24 часа, а свиньи – 12 часов;
- в день убоя крупный рогатый скот поголовно термометрируется, а температура тела мелких животных и свиней измеряется выборочно.

Впервые часы после убоя мясо здоровых животных обладает бактерицидными свойствами. В дальнейшем, в процессе созревания мяса, в тканях накапливается молочная кислота, в результате чего происходит снижение рН до 5,6-5,8, тем самым создаются неблагоприятные условия для жизни и размножения микробов.

Мясо больных и утомленных животных не обладает защитными свойствами, и бактерии, проникшие в ткани, могут быстро размножаться.

Обсемененность микробами поверхности туши после снятия шкуры и разделки в среднем составляет десятки тысяч бактерий на 1 см², но после обработки туши теплой водой под давлением и осушения её стерильной тканью количество микроорганизмов снижается до сотен на 1 см².

При хранении туш в холодильниках при температуре около 0°C и влажности 85% поверхностная микрофлора медленно проникает в толщу мышечных слоев. Микроорганизмы обсеменяют глубокие слои мяса, распространяясь по межфасциальным промежуткам, около костей и по кровеносным сосудам.

Нарушение технологии обработки туш животных и птиц, хранение мяса вне холодильника, нарушение правил транспортировки, измельчение мяса способствуют быстрому его обсеменению микроорганизмами и порче.

Бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов производят во всех случаях, предусмотренных действующими правилами ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов, а также по требованию ветеринарной или санитарной инспекции [36, 37].

4.1 Правила отбора проб

Гост предусматривает следующие образцы проб:

а) сгибатель и разгибатель передней и задней конечностей туши, покрытые фасцией, длиной не менее 8 см или кусок мышцы размером не менее 8×6×6 см;

б) лимфатические узлы – глубокий паховый и поверхностный шейный, предлопаточный вместе с окружающей их соединительно-жировой тканью (от свиней дополнительно подчелюстной узел);

в) селезенку, почку, долю легкого, долю печени с печеночными лимфатическими узлами, трубчатую кость, желчный пузырь, освобожденный от желчи.

Для бактериологического исследования на сибирскую язву, помимо перечисленных образцов, направляют патологически измененные отечные ткани, измененные лимфатические узлы, через которые проходят лимфа из пораженных тканей.

При исследовании полутуш и четвертей туш берут кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатую кость.

При исследовании солонины берут образцы мяса из верхней, средней и нижней частей бочки, а также рассол. В случаях исследования солонины на костях – направляют трубчатую кость.

Лимфатические узлы и трубчатую кость направляют целиком.

При взятии части печени, селезенки, легкого поверхность разреза следует прижечь раскаленным ножом.

Отбор проб мяса птицы производят в соответствии с требованиями госта. Отбираются цельные тушки и упаковываются в микро-боне-проницаемую тару.

Пробы колбасных изделий – фаршированные, вареные, полукопченые, ливерные и кровяные колбасы, мясные хлебцы, сосиски и сардельки, ветчина в форме, рулеты, окорока, копчености, бекон соленый в полутушках, зельцы и студни (по госту) – отбираются от каждой однородной партии продукта. Однородной же партией считают колбасные изделия и копчености одного

вида, сорта и наименования, выработанные в течение одной смены, подвергнутые одинаковому режиму технологической (в том числе термической) обработки.

Однородной партией бекона соленого считают свиные полутоши, одновременно посоленные в одно чане.

Для бактериологического исследования отбирают не менее двух образцов от изделий в оболочке и копченостей и не менее трех образцов от изделий без оболочки (мясной хлеб, студень).

Количество образцов может быть увеличено до пяти, если при наружном осмотре продукт вызывает сомнение в доброкачественности.

От образцов копченостей и бекона отбирают пробы с включением жировой и мышечной тканей.

Из образцов колбасных изделий пробы отрезают в поперечном направлении на расстоянии не менее 5 см от края; от зельцев и изделий в пузырях пробы отрезают в виде сегментов, от языков – вдоль языка.

Срезы делают по всей ширине окороков, а затем отрезают пробу – кусок 200-250 г.

Среднюю пробу составляют: для изделий в оболочке и копченостей – не менее чем из двух проб весом 200-250 г каждая; для изделий без оболочки – не менее чем из трех проб весом 200-25 г каждая.

Среднюю пробу от соленого бекона отбирают из двух полутош, причем от каждой полутоши вырезают 4 пробы: от грудинки, лопатки, корейки и окорока весом 200-250 г каждая. От лопатки срез делают по всей ширине её в направлении от лопаточной кости к шее, затем отрезают половину вырезанного куска. От заднего окорока срез делают в направлении от позвоночного столба к головке бедренной кости. От корейки и грудинки срез делают между VI и VII ребрами по всей ширине полутоши, полученный срез разделяют на две пробы.

Кулинарные изделия и полуфабрикаты из рубленного мяса (гост 4288-65) отбирают для бактериологического исследования в виде средней пробы от каждой партии, т.е. часть однородной партии, приготовленной из одной массы одновременно и одним предприятием. Из разных лотков отбирают по одному образцу, не менее 10 штук кулинарных изделий и не менее 15 штук полуфабрикатов.

Все срезы делаются стерильным ножом и берутся стерильными инструментами. Пробы упаковываются в стерильную пергаментную бумагу – каждая отдельно, мягкие образцы – в стерильные стеклянные банки, а затем в общую тару, ящик, банку, все это опечатывают или пломбируют.

К пробам прилагается акт, в котором указывается:

- а) наименование организации, в систему которой входит предприятие;
- б) наименование предприятия, выработавшего продукт;
- в) наименование вида и сорта; дата выработки продукта;
- г) номера технических условий, по которым выработан продукт;
- д) размер партии, от которой отобраны пробы;

- е) результат наружного осмотра партии и цель направления продукта на исследование;
- ж) место и дата отбора пробы;
- з) должность и фамилия лиц, принимавших участие в осмотре партии продукции и отборе проб.

4.2 Подготовка проб к исследованию

В лаборатории полученные для исследования пробы следует тщательно зарегистрировать в лабораторном журнале, отметив время поступления проб. Если лаборатория не может тотчас приступить к исследованию, то следует хранить пробы минимальное время в холодильнике при температуре 0+4°C.

Мясо, птица (по госту) подлежат бактериологическому исследованию с целью определения общей обсемененности микроорганизмами. Из проб мяса, дважды погруженного в спирт и обожженного, стерильно вырезаются куски и срезом прикладываются к стерильному предметному стеклу. Лимфатические узлы разрезаются вдоль и срезом делают отпечатки на стекле (от 2 до 10). Стекла с отпечатками высушиваются на воздухе, фиксируются, окрашиваются по Граму и бактериоскопируются.

В соответствии с требованиями госту колбасные изделия в оболочке протираются спиртом и обжигаются. Бекон разрезают продольно с соблюдением правил асептики, не рассекая противоположную разрезу часть оболочки. С обеих частей по всей длине делают тонкий срез фарша. Из бекона и копченостей при соблюдении тех же условий вырезают из глубины ближе к костям несколько кусочков из разных участков.

Все пробы помещают в стерильные бюксы и взвешивают. Растирают в ступках с физиологическим раствором, добавляя раствор постепенно до конечной концентрации 1:10. Лучшее раздробление и эмульгирование достигается при растирании пробы со стерильным песком.

Кулинарные изделия и полуфабрикаты из рубленого мяса (гост) берутся для исследования в виде 5-граммовых навесок из наружной и внутренней части изделий, растираются в ступке с физиологическим раствором и получают 10%-ную взвесь продукта (5 г пробы на 45 мл физиологического раствора) [38, 39].

4.3 Бактериологическое исследование

Мясо млекопитающих и птиц в соответствии с гостами в основном исследуются с целью обнаружения возбудителей сибирской язвы и салмонелл, а также возбудителей рожистой септицемии, листереллеза, пастереллеза. Возможны также исследования на кишечную палочку и протей.

Гост на колбасные изделия предусматривает определение общего количества микробов, качественного состава аэробной микрофлоры, группы кишечной палочки, салмонелл, протей и анаэробов.

По госту производится определение общего числа бактерий в 1 г, исследование на кишечную палочку, салмонелл и протей (по методу Шукевича).

Для определения общего количества микробов в 1 г продукта берут примерно 0,2 или 1 мл 1%-ной взвеси из верхнего слоя жидкости, переносят в стерильную чашку Петри и заливают 15 мл расплавленного МПА с температурой 50°C. Осторожно покачивая чашку, материал равномерно смешивают с МПА. Чашки оставляют на 20 минут при комнатной температуре, а затем помещают в термостат с температурой 37°C на 48 часов. Подсчитывают общее число колоний (на поверхности и в глубине агара) и пересчитывают на 1 г исходного продукта.

Исследование на присутствие бактерий группы кишечной палочки по госту производят непосредственным посевом пробы на среду Эндо. Гост предусматривает использование трехэтапного бродильного метода, но с заменой среды Эйкмана средой Хейфеца.

Бактерии рода салмонелл (по госту) обнаруживаются посевом на среды Эндо и Левана и в жидкие среды накопления (селенитовая, Кауфмана, Мюллера).

На плотные питательные среды материал наносится в виде исследуемых кусочков мяса с последующим втиранием материала в поверхность среды. В жидкие питательные среды вносят измельченные образцы мяса и внутренних органов до 5 г на каждые 50 мл среды.

Посевы инкубируются при 37°C на 24 часа. Далее путь бактериологического исследования обычный.

Присутствие протей определяется по методу Шукевича. Исследуемый материал в виде кусочка или 10%-ной взвеси вносится в конденсационную жидкость свежекошенного МПА так, чтобы не коснуться поверхности агара. Инкубировать при 37°C в течение 24 часов. Голубоватый налет на поверхности скола агара указывает на наличие протей.

Обнаруженные в указанных продуктах анаэробов осуществляется бактериоскопическим и бактериологическим методами.

Первичный посев производится в среду Китт-Тароцци. Инкубация при 37°C в течение 8-10 суток. При обнаружении роста производится бактериоскопия и пересев в полужидкий сахарный агар. Дальнейшее исследование и идентификация выделенных микробных культур осуществляется по правилам работы с анаэробными микроорганизмами.

4.4 Оценка качества продукта по результатам исследования

В соответствии с ГОСТом оценка качества мяса осуществляется по 25-балльной системе. В этом комплексе каждому показателю отводится определенная количество баллов.

Отпуская санитарные тесты, оцениваем качество мяса по бактериоскопии.

В зависимости от окончательной балльной оценки мясо может быть отнесено к одной из трех категорий (по госту):

- свежее мясо – 21-25 баллов;
- сомнительной свежести – 10-20 баллов;
- несвежее – 0-9 баллов.

Таблица 26 – Критерии оценки качества по 25-балльной системе (по госту)

Показатели	Количество баллов
Органолептические показатели	13
Количество летучих жирных кислот	4
Реакция с сернокислой медью в бульоне	4
Количество аминок-аммиачного азота	2
Бактериоскопия	2
Итого:	26

Таблица 27 – Оценка качества мяса по бактериоскопии (по госту)

Показатели	Скидка баллов
На мазках-отпечатках микрофлоры не обнаружено или видны единичные экземпляры кокков, палочек в поле зрения препарата. Нет остатков разложившихся тканей	0
На отпечатках несколько десятков кокков (20-30), несколько палочек в поле зрения. Помимо микроорганизмов ясно заметны следы распада тканей	1
На отпечатках масса микроорганизмов с преобладанием палочек (почти все поле усеяно ими). Большое количество распавшихся тканей	2
Примечание: при расхождении между результатами лабораторных исследований и органолептической оценкой мясо подлежит бактериологическому исследованию. Мясо, забракованное на основании органолептической оценки, бактериологическому исследованию не подвергают.	

При бактериологическом исследовании общее бактериальное загрязнение сапрофитной микрофлорой обозначают:

- отсутствие роста, знаком –
- количество колоний до 2 +
- количество колоний от 20 до 50 ++
- количество колоний свыше 50 +++

На элективных средах такой же количественный учет колоний производят с обозначением роста микроорганизмов:

- кишечной палочки – красными крестами;
- паратифозной группы – желтыми крестиками;
- всех остальных – черными крестами.

Как следует из приведенных материалов по гостам.

Оценки результатов бактериологических исследований являются крайне субъективными, что также отмечает Г.П. Калина. Поэтому никаких практических выводов в госте не делается.

Ветеринарно-санитарный надзор за всем комплексом подготовки животных к убою и технологическим процессам на мясокомбинатах, а также на путях реализации мяса должен не допустить заражения продукта патогенными для человека микроорганизмами. Отсутствие общесанитарных бактериологических показателей не может считаться явлением отрицательным, так как оценка качества мяса производится по сумме санитарных показателей [35, 36].

Когда же обсуждается вопрос об общесанитарных бактериологических показателях для широкого ассортимента изделий из мяса, потребность в точных показателях и основных на них нормативах является очевидной.

В таблицах 28 и 29 (по Г.П. Калине) производятся предлагаемые нормы как основа для санитарно-бактериологической оценки мяса и мясных продуктов.

Таблица 28 – Нормы содержания микроорганизмов и некоторых показателей фекального загрязнения в мясных изделиях (по Г.П. Калине)

Автор	Год	Вид изделия	Общее количество микробов в 1 г изделия	Кишечная палочка в 1 г изделия	Другие показатели в 1 г изделия
А.И. Лезник	1955	Колбаса варенная	Не больше 2000	Отсутств.	
	1958	Жареное мясо (котлеты, битки, шницель)	Не более 500		
А.Е. Ямполенко	1958	Колбаса вареная а) отличного качества б) хорошего... в) удовлет... г) плохая ... д) выпуску не подлежит	До 100 До 1000 До 3000 До 5000 5000		
А.И. Реут, Н.Н. Крицкая и В.Ф. Сядук	1958	Колбаса вареная	1000	Отсутств.	Отсутств.
	1965	Колбаса вареная	1000	Отсутств.	
	1955	Ветчина в банках (пастеризованная)	10	Отсутств.	
	1960	Ливерная колбаса	5000	От 100 до 1000	
	1962	Колбаса вареная	100 000		
1964	Разные мясные и рыбные мороженые продукты (с предварительной варкой, поджариванием, тушением)	100 000			

Таблица 29 – Сводка нормативов санитарно-бактериологической оценки мяса и мясных продуктов (по Г.П. Калине)

Показатели	Категория мяса и мясных продуктов		
	Мяса и «сырые» мясопродукты	Пастеризованные мясопродукты (после инкуб. 48 часов при 41°С и 5 суток при 28-32°С)	Консервы («стерильные» мясные продукты)
Патогенные микробы, учитываемые прямым посевом	Отсутствует в 1 г		
Патогенные микробы, учитываемые посевом в среды накопления	Отсутствует в 25 г		
Токсигенные бактерии (Cl. botulinum и его токсин, энтеротоксический Cl. perfringens, золотистый коагулазаположительный стафилококк)	Отсутствует в 0,1 г		
Escherichia coli	Не более 10 в 1 г	Отсутствует в 0,1 г	
Бактерии группы кишечной палочки	Не более 100 в 1 г	Отсутствует в 0,1 г	
Стрептококки группы Д	Не более 100 в 1 г		
Cl. perfringens (не токсигенный)	Не более 100 в 1 г		
Общее кол-во аэробных бактерий	Не более 100 000 в 1 г		
Общее кол-во «инертных» бактерий (не изменяющих органолептических свойств)		Не более 10 000 в 1 г	
Неспорогенные виды или вегетативные формы спорогенных видов		Отсутствует в 1 г	
Споры бактерии родов Bacillus и Clostridium (в том числе апатогенные, атоксичные и инертные)		Не менее 10 в 1 г	

5. Санитарно-бактериологическое исследование рыбы и рыбных продуктов

В ассортименте пищевых продуктов рыба и рыбопродукты занимают значительное место.

Рыба – продукт скоропортящийся. Оценка качества и безвредности рыбы и продуктов, приготовленных из рыбы, осуществляется по госту

(правила приемки и отбора проб) и госту (методы химического и физического исследования). бактериологическое исследование рыбы и рыбопродуктов гостом не предусматривается, но тем не менее потребность в использовании методов бактериологического исследования этого рода продуктов возникает не реже, чем при исследовании мяса.

Для санитарной бактериологии особо важное значение имеет то обстоятельство, что ткани рыб при несоблюдении необходимых условий хранения чрезвычайно быстро обсеменяются гнилостными, а также всеми другими микробами, которые находят в мясе рыб на редкость подходящую питательную среду с $pH=6,8-7,2$. Нередкие случаи инфицирования рыб психрофильными гнилостными микроорганизмами особенно быстро приводят к порче рыбы, что обусловлено беспрепятственным размножением психрофилов при низких температурах.

В кишечнике, жаберных щелях, на чешуе, обильно покрытой слизью, содержится большое количество микроорганизмов, особенно, когда рыба выловлена из водоемов, обильно загрязненных органическими отбросами. Видовой состав микрофлоры обычно довольно разнообразен: *Bact. rosycaneum*, *Bact. fluorescens liquefaciens*, *Bact. punctatum*, *Bact. proteus* и др.

Некоторые примеры инфекционных болезней рыб, имеющих значение при санитарной экспертизе рыбы.

Краснуха карпов и сазанов. Причина болезни – вирус. Болезнь характеризуется подкожными кровоизлияниями, ерошением чешуи, покраснением всей поверхности тела рыбы. В острой форме может наблюдаться асцит, в хронической – изъязвления на чешуе.

Лимфоцистит камбал вызывается вирусом. На поверхности тела появляются язвы и узлы.

Головные разрастания у угрей являются результатом инфицирования вирусом, которому сопутствует грибок *Saprolegnia*. поражаются нижняя челюсть и носовая часть угря. Внешние разрастания напоминают цветную капусту.

Чума щук и судаков – вирусное заболевание. На чешуе появляются серые пятна, которые затем краснеют, изъязвляются и некротизируются.

Жаберная гниль (бронхомироз) – грибковое заболевание. Возбудители – *Branchiomycetes sanguinis*, *Bg. demigans* развиваются в кровеносных сосудах жабер. Жаберной гнилью поражаются карпы, караси, щуки, лини. На жабрах появляются красные и белые пятна, пораженные ткани распадаются [37, 38].

Перечисленные болезни рыб не представляют опасности для здоровья человека. Такая рыба пригодна к употреблению, но товарная цена продукта значительно ниже.

В водоемах, орудиями лова, в процессе обработки и хранения, при транспортировке и при кулинарной обработке рыба может быть инфицирована патогенными микроорганизмами *Salmonella* и *Shigella*.

Экспериментально доказана возможность инфицирования некоторых пород рыб лептоспирами II типа с длительным сроком выделения патогенных лептоспир от зараженных рыб (до 25 дней).

Исследованиями установлено, что многие породы рыб (особенно красной рыбы) обсеменены *Cl. botulinum* – преимущественно тип А. От 18 до 20% образцов красной рыбы, выловленной в Каспийском и Азовском морях, инфицированы возбудителем ботулизма. Отмечено, что *Cl. botulinum* содержит в кишечнике рыб, свободно живущих в море. При отборе сырья для изготовления балыков не допускаются экземпляры рыб с повреждениями, нанесенными орудиями лова.

Во времена Союза, был запрещен посол красной рыбы, так как соль медленно проникает в мышечную ткань, и *Cl. botulinum* в первые дни засола продуцирует токсин в течение всего времени, пока концентрация соли достигает необходимого уровня, достаточного для задержки процесса образования токсина.

Важно помнить, что рыба, зараженная бациллами ботулизма и уже содержащая токсин, обезвреживается кипячением в течение часа. Ботулинический токсин в этих условиях разрушается, но споры остаются жизнеспособными. После такой термической обработки через 12-24 часа в рыбе может вновь образовываться токсин, если продукт хранился при температуре 15-17°C. Только хранение рыбы в холодильнике может служить гарантией её доброкачественности.

Малейшие нарушения технологии разделки и кулинарной обработки рыбы влекут за собой значительное обсеменение продукта микроорганизмами, как показана в таблице 30.

Таблица 30 - Изменение количества бактерий в процессе изготовления полуфабрикатов

Рыба	Число бактерий в 1 г мяса, рыбы			
	На поверхности		В глубине	
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки
Свежая ...	1000-900 000	113 000-2 755 000	120-89 000	2730-600 000
Соленая ...	300-80 000	3200-1 000 000	0-4200	133-1 355 000

При разделке рыбы и приготовлении из неё кулинарных полуфабрикатов важно строго соблюдать санитарные правила. К этому следует добавить, что ещё большее значение для предотвращения микробного обсеменения рыбы и рыбопродуктов имеют правильное хранение (при низких температурах) и транспортировка.

Отбор проб для исследования осуществляется в соответствии ГОСТом.

Наиболее вероятными местами скопления микроорганизмов являются участки мышечной ткани около головы и позвоночника. Пробы для исследования поверхностной обсемененности рыбы берутся таким же методом, как при исследовании мяса.

Если экспертизе подвергаются большие партии рыбы, проводится совместно с санитарными врачами, в таком случае для лабораторного исследования отбирают исходный образец и среднюю пробу продукта.

Исходным образцом называется сумма отдельных выемок, отобранных из различных мест партии. Часть исходного образца представляет собой среднюю пробу.

Гост предусматривает, что образцы продукции должны отбираться совместно с поставщиком или с представителем инспекции по качеству, или бюро товарных экспертиз, а при отсутствии – с представителем местных органов власти.

Рыба охлажденная, отварная, печеная, рыбные рулеты, котлеты, сосиски, колбасы, фаршированная рыба, студень, зельц, заливная рыба, изделия из икры и другое отбираются для санитарных исследований по 3 куску весом до 100 г каждый. Разумеется, для бактериологического исследования продукты следует брать с соблюдением правил асептики. Условия и сроки доставки образцов в лабораторию обычные, т.е. сроки минимальные, а в жаркое время года продукты необходимо охлаждать.

В сопроводительном акте указываются:

- 1) вид рыбопродукта;
- 2) наименование предприятия – изготовителя или склада;
- 3) дата отбора пробы;
- 4) цель исследования;
- 5) фамилия и должность лица, отобравшего пробу.

В лаборатории навеску рыбы и рыбопродуктов плотной консистенции стерильно растирают в ступке, добавляя стерильную водопроводную или дистиллированную воду до конечной 10%-ной концентрации взвеси.

Для определения общего количества аэробной микрофлоры 1 и 0,1 мл приготовленной взвеси вносят в стерильные чашки и заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА. Взвесь осторожно смешивают с МПА и помещают в термостат при 37°C на 48 часов. Учет результатов производится по общей методике определения микробного числа.

Бактерии группы кишечной палочки могут быть определены бродильным методом на среде Кесслер.

Исследование образцов рыб и рыбопродуктов с целью определения патогенных для человека микроорганизмов (сальмонелл, шигелл, токсигенных стафилококков, возбудителей ботулизма и др.) осуществляется обычными бактериологическими методами.

В настоящее время не существует утвержденных нормативов, определяющих содержание микроорганизмов в рыбных кулинарных изделиях. Считается, что общее количество аэробных микроорганизмов в 1 г продукта не должно превышать 1000, а в 10 г не должно содержаться кишечная палочка.

6. Санитарно-бактериологическое исследование молока и молочных продуктов

Для санитарной оценки натурального и пастеризованного молока и кисломолочных продуктов (сливки, мороженное), а также консервов из

молока и сливок пользуются, определением общей микробной обсемененности и количественным определением содержания кишечной палочки (микробное число и коли-титр). При оценке же кислых молочных продуктов (ацидофильное молоко, простокваша, варенец, кефир, кумыс, мацони, творог, сыры) определения микробного числа обычно не требуется, достаточным является обследование на коли-титр. Общая микробная обсемененность этих кислых продуктов заведомо обильна за счет присутствия в них размножившейся молочнокислой микрофлоры, что представляет здесь нормальное явление.

Исследование молока и его продуктов на обнаружение патогенных микробов (бактерии тифозно-паратифозной и дизентерийной групп, бруцеллы, микобактерии туберкулеза, возбудитель Ку-рикетсиоза) выполняется только по эпидемиологическим показаниям. Методика исследования молока и молочных продуктов на патогенную микрофлору совпадает с указанной для исследования патологического материала и представлена в соответствующих главах пособия по частной медицинской микробиологии.

6.1 Микрофлора молока и молочных продуктов

Молоко является весьма благоприятной питательной средой для многих микроорганизмов. Различают специфическую и неспецифическую микрофлору молока и молочных продуктов.

К специфической микрофлоре молока и молочных продуктов относят микробов-возбудителей молочнокислого, спиртного и пропионовокислого брожения. Микробиологические процессы за счет жизнедеятельности этих микроорганизмов лежат в основе приготовления кисломолочных продуктов (творога, кефира, простокваши, ацидофилина и др.).

Бактерии молочнокислого брожения считаются нормальной микрофлорой молока и молочных продуктов. Главную роль при скисании молока и молочных продуктов играют молочнокислые стрептококки *Str. lactis*, *Str. cremaris* и другие. Менее активные расы молочнокислых стрептококков (*Str. citrovorus*, *Str. diacetylactis*) продуцируют летучие кислоты и ароматические вещества и поэтому широко используются при получении сыров. В группу молочнокислых бактерий также входят молочнокислые палочки: *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium casei*, *Lactobacterium acidophilum* и т.д.

Основными возбудителями спиртового брожения в молоке и молочных продуктах являются дрожжи (*Saccharomycetes lactis* и др.).

Бактерии, вызывающие пропионовокислое брожение, характеризуются медленным развитием, поэтому образование достаточного количества продуктов их жизнедеятельности наблюдается в сырах с длительным периодом созревания [39, 40].

Неспецифическую микрофлору молока составляют гнилостные бактерии (*Proteus*), аэробные и анаэробные бациллы (*Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*,

Bac. putrificus) и многие другие. Эти микроорганизмы разлагают белок молока, участвуют в молочнокислом брожении и придают молоку неприятный вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов плесенью: *Mucor*, *Oidium*, *Aspergillus* и др. придают им вкус прогорклого масла. Бактерии кишечной группы, попадая в молоко, вызывают изменение вкуса и запаха молока. Другие виды грамотрицательных бактерий (*B. fluorescens*, *liguefaciens*, *Pseudomonas putrificaciens* и т.д.) обладают различной степенью протеолитической активности и придают молоку и молочнокислым продуктам прогорклый или горький вкус и гнилостный запах.

Микробное обсеменение молока начинается уже в вымени. В процессе дойки происходят добавочное его обсеменение с поверхности кожи вымени, с рук доильщицы, из сосуда, куда оно поступает и из воздуха помещения. Понятно, что большая или меньшая интенсивность этого добавочного обсеменения зависит от того, насколько соблюдаются элементарные санитарно-эпидемиологические условия при получении молока. Плохие условия хранения молока способствуют дальнейшему нарастанию в нем микрофлоры.

Свежесцеженное молоко, хотя и содержит уже сотни микробов в 1 мл (главным образом, стафилококки и стрептококки), обладает бактерицидными свойствами за счет присутствия в нем нормальных антител. Поэтому в течение некоторого периода развитие бактерий в молоке задерживается. Этот период называют бактерицидной фазой. Длительность бактерицидной фазы измеряется часами, колеблясь от 2 до 36 часов в зависимости от физиологических особенностей животного и от того, в каком периоде лактации молоко получено (в раннем периоде бактерицидность молока выше).

Хранение молока при повышенной температуре (30-37°C) резко сокращает продолжительность бактерицидной фазы. Такое же влияние оказывает и интенсивное добавочное обсеменение молока микробами.

После того, как бактерицидная фаза закончилась, наступает развитие микрофлоры. Оно протекает по определенной закономерности, выражающейся в том, что видовой состав микрофлоры меняется во времени под влиянием изменений биохимических свойств среды и вследствие антагонистических и симбиотических взаимоотношений между микробными видами.

1 Фаза смешанной микрофлоры. Она длится около 12 часов. В этот период ещё не наступает преобладания каких-либо видовых групп микробов, так как обилие питательного субстрата и пространственные возможности позволяют достаточно свободно развиваться многим видам микроорганизмов.

2 Фаза молочнокислых стрептококков. В этой фазе получают преобладание микроорганизмы названной группы (*Str. lactis*, *Str. termophilus*, *Str. cremoris*). Лактоза усиленно превращается ими в молочную кислоту, реакция изменяется в кислую сторону. Накопление молочной кислоты ведет в дальнейшем к отмиранию молочнокислых стрептококков и мене их более

кислотоустойчивыми молочнокислыми бактериями. Это наступает через 48 часов, знаменуя начало третьей фазы.

3 Фаза молочнокислых палочек. В них господствующее положение приобретает палочковидные формы молочнокислых бактерий (*Lactobacterium lactis*, *Lactobacterium casei*, *Lactobacterium bulgaricum* и др.). Происходит постепенное отмирание даже кишечных бактерий коли-аэрогенной группы, хотя они довольно устойчивы к кислой реакции среды, что позволяет им сохранять жизнеспособность в течение второй фазы.

К концу третьей фазы дальнейшие возможности развития молочнокислой микрофлоры исчерпываются, а на смену приходят грибки, для которых молочная кислота служит питательным веществом.

4 Фаза грибковой микрофлоры. В этот период развиваются плесени и дрожжи, жизнедеятельность которых приводит к утрате продуктов своей пищевой ценности. Дрожжи представлены, главным образом, видами из рода *Torula*, реже обнаруживаются некоторые виды сахаромикетов.

Из плесеней встречаются молочная плесень (*Oidium lactis*), покрывающая в виде пушка поверхность простокваши и сметаны, а также аспергилловые, пеницилловые и мукоровые.

Действие грибковой флоры ведет к нейтрализации среды, а это делает её вновь пригодной для бактерий. Наступает развитие гнилостных бактерий, вызывающих протеолиз казеина, и, наконец, группы анаэробных спорообразующих маслянокислых бактерий.

Деятельность сменяющейся микрофлоры прекращается только с наступлением полной минерализации всех органических веществ молока.

При некоторых условиях процесс смены микробных биоценозов может отклоняться от вышеприведенной схемы. Так, молочнокислые бактерии могут быть с самого начала угнетены микробами группы кишечной палочки, если последние присутствуют в большом количестве. Дрожжи могут вырабатывать заметные концентрации спирта, что имеет место в таких продуктах, как кефир (от 0,2 до 0,6%) и, особенно, кумыс (от 0,9 до 2,5%). Наличие спирта создает условия для последующего развития уксуснокислых бактерий, сбраживающих спирт в уксусную кислоту.

Кисломолочные продукты получают двумя способами:

1) путем самопроизвольного сквашивания (например, домашняя простокваша, в скисании которой главную роль играет молочнокислый стрептококк);

2) посредством внесения в молоко особых заквасок, представляющих собой чистые или смешанные культуры определенных микроорганизмов (например, при приготовлении кефира – так называемый кефирный грибок или кефирные зерна, т.е. крупинки казеина, содержащие ассоциацию молочнокислых бактерий и дрожжей *Torula kefir*, а при приготовлении ацидофильного молока – культура *Lactobacterium acidophilum*).

Ароматизирующие бактерии из группы , играя малую роль в скисании молока, имеют, однако, существенное значение в приготовлении молочных продуктов и масла, сообщая этим продуктам специфический приятный запах.

Некоторые пороки молока и молочных продуктов имеют бактериальное происхождение. Так, ослизнение или тягучесть молока вызывается *Bact. viscosus lactis*, *Bact. cloacae*, *Bact. aerogenes*, *Str. cremoris* и другие. Вкус молока при этом не изменяется. Напротив, для некоторых молочнокислых продуктов тягучая консистенция является нормальной. Она достигается искусственным внесением культуры слизееобразующих штаммов молочнокислых бактерий.

Развитие в молоке *Bact. lactis saponacei* сообщает ему мыльный вид.

При продолжительном хранении молока в условиях относительно низкой температуры молочнокислые бактерии не могут развиваться, а некоторые виды дрожжей и гнилостных бактерий находят возможность развития. Они вызывают пептонизацию белков, в результате которой молоко приобретает горький вкус (*Torula amara*, *Bact. fluorescens liquefaciens*, а в сгущенном молоке *Torula lactis condensis*).

Пигментообразующие микробы могут придать молоку необычный цвет: *Bact. cyanogenes* - синий, *Bact. prodigiosum* – розовый.

Прогоркание сливок и сливочного масла обуславливается жизнедеятельностью липолитических (жироращепляющих) микробов (грибок *Oidium lactis*, *Bact. fluorescens liquefaciens* и др.).

Вспучивание сыров в ранние сроки их созревания вызывается бактериями коли-аэрогенной группы, а в поздний период – споровыми анаэробами.

Горький вкус и мажущуюся консистенцию сыру придает маммококк (*Mammococcus acidoproteolyticus*), вызывающий протеолиз (расщепление белка) и кислотообразование. Попадание в молоко с шерсти животных и из навозной пыли большого количества кишечной палочки сообщает ему характерный запах хлеба.

Патогенные микроорганизмы могут попадать в молоко в процессе его получения, хранения и транспортировки (грибы) с рук бактерионосителей и из окружающей среды (сальмонеллы, шигеллы), либо содержаться в молоке, полученном от больных животных (бруцеллы, микобактерии туберкулеза).

В отличие от воды и почвы, где патогенные грибы лишь сохраняются жизнеспособными более или менее длительный срок, в молоке они находят условия для обильного размножения.

В результате при потреблении молока, зараженного патогенными микробами, доза заразного начала может оказаться огромной, что представляет особую опасность. Санитарный контроль за молочной продукцией, включающий бактериологическое исследование, имеет поэтому важное профилактическое значение.

По санитарно-бактериологическим показателям к молоку предъявляются следующие требования:

- 1) оно не должно содержать патогенных микробов;
- 2) общая микробная обсемененность и коли-титр молока не должны превышать норм, установленных государственными стандартами.

Более высокие требования в настоящее время предъявлены к молоку, предназначенному для детского питания.

Для детских молочных смесей – пастеризованных и вареных, готовящихся в молочных кухнях, микробное число не должно превышать 500, коли-титр – более 11 мл. Молочнокислые продукты для детского питания, выпускаемые этими кухнями, должны иметь коли-титр выше 11,1 мл.

Необходимо иметь в виду, что пастеризация молока и сливок не приводит к полной стерильности этих продуктов, в них всегда сохраняется некоторое количество остаточной микрофлоры. Это объясняется высокой микробной обсемененностью исходного продукта, особенно при ручной дойке, и мягким температурным режимом процесса пастеризации. Стерилизующий эффект кипячения несравненно выше, но ведет к значительной денатурации продукта. Пастеризованное молоко должно подвергаться скорейшему охлаждению с целью задержки размножения остаточной микрофлоры.

Приведенные выше нормы микробной обсемененностью пастеризованного молока характеризуют численность именно остаточной микрофлоры.

Следует особо отметить, что кишечная палочка (по крайней мере некоторые её штаммы) может иногда проявить и болезнетворное действие, поскольку она принадлежит к числу условно патогенных микробов.

Кроме того, кишечная палочка вместе с гнилостными бактериями относится к микробам, вызывающим порчу кислых молочных продуктов, так как она способна разлагать пептоны с образованием сероводорода и доводить распад белка до газообразных веществ [41, 42].

6.2 Молочные консервы

Молочные консервы в настоящее время находят широкое применение, особенно в войсковых условиях, в полевых лечебных учреждениях. К ним относятся: сгущенное молоко с сахаром, сливки сгущенные с сахаром, кофе и какао со сгущенным молоком с сахаром, сгущенное молоко стерилизованное, сухое молоко, сливки сухие и сливки сухие с сахаром.

В консервировании этих продуктов нашли применение два разных принципа: **анабиоза** и **абиоза**. По первому принципу приготовлены молочные консервы с высоким содержанием сахара, большая концентрация которого (64,5%) создает неблагоприятные осмотические условия, препятствующие развитию микроорганизмов. На этом же принципе основано и консервирование молока высушиванием, т.е. обезвоживанием, которое лишает микробов возможности развития. Как при использовании высокой концентрации сахара, так и при высушивании консервированное этим способом молоко (сливки, кофе с молоком и т.п.) отнюдь не является стерильным. Напротив, стерилизованное сгущенное молоко (без сахара) представляет собой продукт, подвергнутый термическому обеспложиванию,

т.е. консервированный по принципу абиоза. В нем совершенно не должно быть жизнеспособных микроорганизмов.

Существует два способа приготовления сухого молока:

1) пленочный – высушивание на поверхности барабанов, нагреваемых паром;

2) распылительный – разбрызгивание из форсунок в струе горячего воздуха.

Первый способ обеспечивает более интенсивный прогрев и большой процент гибели микроорганизмов.

Так называемое «восстановленное молоко», т.е. растворенное в воде сухое молоко, подвержено быстрой порче, так как молочнокислые бактерии в нем во время сушки полностью погибли, а гнилостные споровые микробы сохранились.

Молочные консервы, так же как и натуральное молоко, безусловно не должны содержать патогенных микробов. Кроме того, молочные консервы не должны иметь признаков порчи, вызванной процессами жизнедеятельности микроорганизмами (биологический бомбаж банок, прогорклость содержимого, неприятный запах, комковатость, коричневые пятна на поверхности продукта).

Таблица 31 – Бактериологические показатели на молоко и молочные продукты по нормативам ГОСТа

Продукты	Сорт и вид продукта	ГОСТ	Микробное число	Коли-титр	Вес или объем пробы для санитарно-бактериологического исследования
Молоко пастеризов. в бутылках и пакетах	сорт А		не более 75 000	3,0	1 бутылка или пакет
Молоко пастеризов. в бутылках и пакетах	сорт А		не более 150 000	0,3	1 бутылка или пакет
Молоко пастеризов. в бутылках и пакетах	сорт А		не более 500 000	0,3	1 бутылка или пакет
Молоко пастеризов. во флягах и цистернах	сорт А		не более 400 000	-	250 мл
Сливки пастеризов.	сорт А		не более 100 000	3,0	1 бутылка
Сливки пастеризов.	все сорта		не более 300 000	0,3	1 бутылка
Мороженое	все сорта		не более 250 000	не ниже 0,3	1-2 единиц. или 100 г
Напитки молочные	все сорта		не более 250 000	0,3	250 мл

прозлад.					
Сливочный напиток	все сорта		не более 200 000	0,3	250 мл
Масло коровье	все сорта		бактер. показ. отсутст.	не ниже 0,3	50 мл
Кумыс	все сорта		бактер. показ. отсутст.	не ниже 0,3	250 мл
Кефир	все сорта		бактер. показ. отсутст.	не ниже 0,3	1 бутылка
Простокваша и ацидофильные продукты	все виды		бактер. показ. отсутст.	не ниже 0,3	1 бутылка или стакан, 50 г, 50-100 г, 100 г или 1 изделие
Сметана	все виды		бактер. показ. отсутст.		200 г
Сыр сычужный твердый	все сорта		бактер. показ. отсутст.		200 г
Творог и творожные изделия	все сорта		бактер. показ. отсутст.		200 г
Сухие молочные продукты					
Молоко коровье цельное сухое	высший сорт		не более 50 000	не допускается	200 г
Молоко коровье цельное сухое	первый сорт		не более 100 000	не допускается	200 г
Молоко коровье обезжиренное сухое	первый сорт		не более 50 000	не допускается	200 г
Сливки сухие с сахаром и без сахара	высший сорт		не более 50 000	не допускается	200 г
Сливки сухие с сахаром и без сахара	первый сорт		не более 100 000	не допускается	200 г
Молоко сухое для детей грудного возраста			не более 25 000	не допускается	200 г
Молоко сухое полужирное для детского питания			не более 30 000	не допускается	200 г
Молочные консервы					
Молоко сгущенное стерил. в банках			микроорганиз. должны отсут.	0,3	1 банка
Молоко цельное сгущен. с сахаром			не более 50 000	не ниже 0,3	1 банка
Молоко не жирное сгущен. с сахаром			бактер. показ. отсутст.	не ниже 0,3	1 банка
Сливки сгущен. с сахаром			не более 35 000	не ниже 0,3	1 банка
Какао со					

сгущен. молоком и с сахаром			не более 35 000	не ниже 0,3	1 банка
Кофе натураль. со сгущен. молоком			не более 35 000	не ниже 0,3	1 банка
Детские молочные смеси					
Пастеризов. и варенные молочнокислые			не более 5 000	более 11,1	1 порция

6.3 Отбор проб

При исследовании молока и молочных продуктов руководствовались ГОСТом «Молоко и молочнокислые продукты. Методы микробиологического исследования»

Пробы молока и молочных продуктов, а также молочных консервов для бактериологического исследования отбираются в следующих случаях:

- 1) при сомнении в доброкачественности продуктов;
- 2) по требованию санитарного надзора в порядке контроля за соблюдением санитарно-эпидемиологического режима в процессе обработки, хранения и реализации продукта;
- 3) на предприятиях молочной промышленности в порядке текущего производственного контроля.

При отборе проб поступают следующим образом.

Жидкие продукты (молоко, сливки) тщательно перемешивают стерильным черпаком (или ложкой) и отбирают в стерильную посуду, закрываемую стерильной ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком. При взятии пробы отмечается температура продукта.

Пробы творога, масла, мороженого, сухих молочных продуктов забираются из разных мест тары с помощью стерильного шупа (или другого инструмента). Вводят шуп в продукт на расстоянии 3-5 см от одного края к противоположной стороне, опускают его на глубину 30-50 см, берут по длине шупа из нескольких мест отобранной пробы 20 г и помещают в стерильную банку с пробкой. Фасованные изделия отбирают в количестве одной единицы.

Пробы сыров и брынзы отбираются стерильным шупом в нескольких местах куска после предварительного прижигания его поверхности при помощи раскаленного ножа или шпателя в каждом месте введения шупа.

Пробы сгущенного молока, расфасованного в небольшие банки, берутся целыми единицами, а из расфасованного в трехлитровые банки и в бочки – берется стерильной трубкой или стерильным черпаком около 200 г продукта.

Сухое молоко, сухие сливки и сухие сливки с сахаром отбирают из разных мест барабана (ящика) с помощью стерильной ложки в количестве около 200 г. Проба всыпается в стерильную сухую колбу и заворачивается в стерильную пергаментную бумагу.

Пробы необходимо опломбировать и отослать в лабораторию немедленно.

Отобранные для анализа образцы при транспортировке следует хранить в смеси льда с водой; замороженные продукты хранить до анализа при температуре не выше минус 2°C. Микробиологическое исследование в лаборатории необходимо производить не позднее 4 часа с момента отбора проб. Если к исследованию приступить в указанный срок невозможно, допускается продление срока до 24 часов, но с отметкой в протоколе анализа о причинах задержки. Запрещается добавление к пробе продукта каких-либо химических консервантов.

6.4 Методика санитарно-бактериологического исследования молока и молочных продуктов

Подготовка проб к бактериологическому исследованию. Из продуктов жидкой консистенции готовят десятикратные разведения, начиная 1:10, на стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде. Масло и мороженое предварительно расплавляют на водяной бане при температуре 40-45°C. Разведение этих продуктов осуществляют подогретой до 45°C стерилизованной водопроводной водой. Пробы сыра, творога тщательно растирают в стерильной ступке и постепенно добавляют необходимое количество подогретой до 45°C стерильной водопроводной воды до получения первоначального разведения 1:10. Для полного эмульсирования исходные суспензии этих продуктов встряхивают в течение 5-10 минут.

Определение микробного числа. Исследование производится аналогично анализу питьевой воды. Разведение жидких продуктов или эмульсий плотных продуктов готовят так, чтобы достигать концентраций, соответствующих вероятной обсемененности продукта микробами. Рекомендуется засеивать следующие разведения:

- 1) молоко от отдельных коров – 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} ;
- 2) сборное молоко молочно-товарной фермы – 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ;
- 3) сборное молоко молокозаводов – 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ;
- 4) молоко и сливки пастеризованные, мороженое – 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ;
- 5) детские молочные смеси 1, 0, 10^{-1} , 10^{-2} .

Каждое разведение засеивается на две чашки по 1 мл в каждую, причем засеиваемый объем распределяется каплями по всей площади чашки. При анализе мясо-пептонным агаром равномерно смешивают засеянный материал со средой путем вращения чашки.

Подсчет колоний производится после 48 часов пребывания посевов в термостате при 37°C. В каждой чашке подсчитывают количество выросших колоний и умножают на степень разведения продукта. Микробное число представляет собой среднее арифметическое результатов подсчета количества колоний на всех чашках. Для жидких продуктов микробное число

дается на объемную единицу (1 мл), а для плотных продуктов на весовую единицу (1 г).

Определение микробного числа кисломолочных продуктов, содержащих обильную специфическую микрофлору, согласно ранее госту 9225-68 не производится.

Определение коли-титра. В отличие от санитарно-бактериологического анализа воды стандартным методом исследования молока и молочных продуктов на группу кишечной палочки служит только трехэтапный бродильный метод с использованием среды Кесслер в пробирках по 5 мл с поплавками. Эти среды содержат краску генциан-виолет, подавляющую развитие грамположительной молочнокислой микрофлоры, а также желчь, которая служит буфером, предохраняющим кишечную палочку от действия краски. Сбраживающей субстанцией в этих средах является лактоза.

Таким образом, в названных средах созданы условия для накопления бактерий группы кишечной палочки в присутствии её антагонистов, тогда как другие среды не обеспечивают таких условий, и для обнаружения кишечной палочки в материале, содержащем молочнокислые бактерии, они не пригодны. Метод мембранных фильтров для определения коли-титра молока и молочных продуктов менее специфичен и официального признания пока не получил, хотя и был предложен к использованию некоторыми авторами.

При исследовании молока и различных молочных продуктов на коли-титр производить следующие посевы:

1) молоко от отдельных коров и сборное молоко молочно-товарной фермы: в 2 пробирки с 5 мл среды Кесслер, засевают по 1 мл следующих разведений молока – 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , всего 6 пробирок на каждую пробу;

2) сборное молоко молокозаводов: в 2 пробирки среды Кесслер вносят по 1 мл следующих разведений молока – 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} , всего 8 пробирок на пробу;

3) творог, масло, сыры: по 2 пробирки следующих разведений – 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , всего 12 пробирок среды Кесслер на пробу;

4) молоко и сливки пастеризованные, кисломолочные продукты (простокваша, кефир, ацидофилин, сметана и другие): по 1 мл в 3 пробирки с 10 мл среды Кесслер и в 3 пробирки той же среды по 1 мл разведения 10^{-1} продукта; всего 6 пробирок;

5) мороженое, молочные напитки: в 3 пробирки со средой Кесслер по 1 мл из разведения 10^{-1} (т.е. 0,1 мл исследуемого продукта).

Засеянные пробирки со средой Кесслер инкубируют при 43°C в течение 24 часов. Из забродивших пробирок (помутнение среды и газообразование) производят посевы на секторы чашек со средой Эндо с расчетом получить изолированные колонии. После суточного выращивания посевов при температуре 37°C выросшие колонии подвергаются исследованию. Проводится полная идентификация культур: морфологии, окраска по Граму, вторичная бродильная проба при 43°C , отношение к лимонной кислоте или

её солям (цитратная проба). Учету подлежат все выявленные при идентификации разновидности кишечной палочки, кроме *Vact. aerogenes*.

При вычислении и формировании результатов анализа необходимо руководствоваться таблицей 32. Норма содержания кишечной палочки в молоке и молочных продуктах разработаны не для всех видов продуктов.

6.5 Методика исследования молочных консервов

Обработка и вскрытие банок после предварительной их проверки на герметичность и бомбаж производится в общем по правилам, указанным далее разделе о баночных консервах (глава 7).

Для баночных молочных консервов при лабораторном исследовании на бомбаж применяется лишь более продолжительная термостатная выдержка (8 дней при 37°C).

Кроме того, при вскрытии банок со сгущенным молоком (сливками, кофе, какао) с сахаром ввиду весьма густой консистенции продукта приходится пользоваться не пробойником, а стерильным консервным ножом, вскрывая им банку и тотчас накрывая стерильной крышкой от чашки Петри. Банки же со стерилизованным молоком перфорируются стерильным пробойником, как и при анализе других баночных консервов [43, 44].

Таблица 32 – Регламентация результатов установления коли-титра молока и молочных продуктов

Молочные продукты	Число засеянных пробирок	Результаты бродильной пробы	Заключение
Пастеризованное молоко и сливки, мороженое, ацидофильное молоко, простокваша, кефир, молочные консервы	6 пробирок (из них 3 по 1 мл и 3 по 0,1 мл)	Газообразование не обнаружено ни в одной пробирке	Коли-титр более 3 мл
		В одной из пробирок с 1 мл продукта обнаружено брожение	Коли-титр 3 мл
		Брожение обнаружено более чем в одной пробирке с 1 мл продукта или хотя бы в одной из пробирок с 0,1 мл	Коли-титр 0,3 мл
		Брожение обнаружено во всех пробирках с посевами обоих разведений, либо оно обнаружено в 3 пробирках одного (любого) разведения и в 2 пробирках другого разведения	Коли-титр менее 0,3 мл
		Признаков брожения не обнаружено ни в одной из пробирок	Продукт практически не загрязнен кишечной палочкой
		Признаки брожения	Коли-титр равен

Прочие молочные продукты	8-10 и более пробирок (в зависимости от вида продукта) со стандартными разведениями от 0,1 мл или 1 г до 0,001 или 0,000001 мл или 1 г	обнаружены во всех пробирках	наименьшему объему или весу продукта, засеянного в пробирку с наибольшим разведением
		Признаки брожения обнаружены только в одной из пробирок	Коли-титр равен общему объему или весу продукта во всех засеянных пробирках
		Признаки брожения обнаружены не во всех пробирках при малых разведениях (1:100 и менее)	Коли-титр равен общему объему или весу продукта, засеянного во все пробирки и деленному на кол-во пробирок с признаками брожения
		Признаки брожения обнаружены не во всех пробирках при больших разведениях (1:100)	Коли-титр равен кол-ву продукта в забродившей пробирке с наибольшим разведением

Молочные консервы испытываются бактериологически:

1) сгущенное молоко с сахаром, сгущенные сливки с сахаром, кофе и какао со сгущенным молоком с сахаром – на общую микробную обсемененность и на обнаружение бактерий группы кишечной палочки;

2) сухое молоко и сухие сливки, только на общую микробную обсемененность, но при необходимости также на обнаружение кишечной палочки и патогенных микробов (при неблагоприятных условиях хранения);

3 сгущенное стерилизованное молоко – на стерильность.

Подготовка проб к бактериологическому исследованию. Сгущенное молоко с сахаром баночное (а также сливки, кофе и какао со сгущенным молоком с сахаром) и сгущенное молоко с сахаром разливное перемешивается стерильной ложкой или шпателем и берется в количестве 10 г в стерильную колбу, в которую наливают затем 90 мл стерильной воды, подогретой до 37°C. Растворение производится при взбалтывании. Таким образом, получается исходное разведение 1:100.

Для приготовления такого же исходного разведения из сухого молока или сухого сливок (с сахаром или без сахара) отобранная проба тщательно перемешивается. Затем из неё с соблюдением стерильности делается навеска в 1 г, которая всыпается в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды, нагретой до 37-40°C. Разведенный продукт взбалтывают и подогревают на

водяной бане при этой же температуре 10 минут, чтобы достигнуть наибольшей полноты растворения.

Из исходных разведений 1:10 готовится ряд последующих: 1:100, 1:1000 и 1:10 000.

Определение микробного числа. Засеваются исходное разведение и все последующие по 1 мл. рекомендуется засеять следующие разведения:

1) молоко сгущенное с сахаром, сухое молоко и сухие сливки: 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} ;

2) какао и кофе со сгущенным молоком, сухое молоко для детского питания: 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} .

Способ посева, условия выращивания и выражение результатов подсчета колоний те же, что и для натурального молока.

Сгущенное стерилизованное молоко исследуется на стерильность. С этой помощью производят посев пипетками (проверенными на стерильность) по 1 мл исследуемого продукта в 3 пробирки с обезжиренным молоком. После инкубации при 37°C в течение 3 суток убеждаются в отсутствии роста во всех пробирках.

Определение коли-титра. Производится посев в бродильные пробирки со средой Кесслер, разлитой по 5 мл. Засеваются все указанные выше разведения (от 1:10 до 1:10 000) в объеме 1 мл в три пробирки каждое.

Кроме того, в бродильные пробирки с той же средой, разлитой по 10 мл, засеивается цельный консервированный продукт:

1) Сгущенное молоко (с сахаром или без сахара), а также кофе и какао со сгущенным молоком – в количестве 1 мл;

2) сухое молоко или сухие сливки, в количестве 1 г.

Режим и сроки выращивания посевов при первичной бродильной пробе, ход дальнейшего исследования и учет результатов те же, что и при определении коли-титра натурального молока.

Надо учитывать, что посев высококонцентрированного продукта (сгущенное молоко или сухое) существенно изменяет состав питательной среды. Поэтому может получиться парадоксальный на первый взгляд, результат: наличие признаков брожения в больших разведениях и отсутствие газообразования в малых.

В таких случаях следует из всех пробирок как с забродившими питательными средами, так и незабродившими сделать пересев петлей в бродильные пробирки со средой Кесслер и регистрировать результат по вторичному посеву.

7. Санитарно-бактериологическое исследование консервов

7.1 Микробиология консервов

Консервы (от лат. conserve - сохраняю) – пищевые продукты, приготовленные из предварительно обработанного животного или растительного сырья, укупоренные в жестяную или стеклянную тару и

подвергнутые стерилизации в целях предохранения их от порчи при длительном хранении.

Использование высокой температуры является одним из наиболее распространенных способов консервирования пищевых продуктов. Стерилизации обычно подвергают консервы мясные, мясо-растительные, сало-бобовые, рыбные, консервы для диетического питания, соки овощные и др. Такие консервы при их правильной стерилизации и герметичности тары могут сохраняться годами.

Существуют и другие способы консервирования (пастеризация, замораживание, сушка, соление, маринование, квашение, копчение, путем применения сахара, антибиотиков, химически антисептиков и ряд других), которые направлены либо на уничтожение микроорганизмов, либо на временное прекращение их жизнедеятельности. Продукты, консервированные без применения термической стерилизации, принято называть презервами (от фран. *preserver* - предохранять). Консервирование их производится путем заливки маринадами или пряным посолом (например кильки, анчоусы, маринованные овощи и т.п.). Презервы – продукты не стерильные. Они могут храниться лишь короткое время и только при пониженной температуре (не ниже 0 и не выше 5°C).

Производство консервов и их качество регламентируется официальными технологическими инструкциями и стандартами. Консервы должны вырабатываться только из вполне доброкачественного сырья и в условиях строгого соблюдения санитарного режима производственного процесса. Сырые продукты тщательно сортируются, очищаются и моются в машинах с проточной водой. Подготовленный полуфабрикат укладывают в чистые банки и при необходимости заливают рассолом, соусом или сиропом. Перед герметизацией из банок удаляется воздух. Этот прием, называемый эксгаустированием, имеет целью улучшить условия стерилизации, снизить давление внутри банки, удалить кислород, тем самым предотвратить окисление металла и воспрепятствовать развитию аэробных микроорганизмов.

Стерилизацию консервов производят в автоклавах под давлением. Уровень температуры и длительность её воздействия устанавливают в зависимости от размеров тары, вида продукта, его кислотности, жирности, консистенции и других факторов. Важное значение имеет уровень микробной обсемененности консервируемого продукта, который перед стерилизацией не должен быть выше допустимого предела. Например, для тушеного мяса не более 100 000 бактерий 1 мл продукта, мясо-растительных, сало-бобовых консервов – 20 000, паштета мясного и печеночного, а также рыбных консервов – натуральных в масле, в томатном соусе – 10 000.

Консервы в стеклянных банках стерилизуют при меньшей температуре, но более длительное время по сравнению с консервами в жестяной таре. В кислой среде стерилизация проходит быстрее. Жиры, белки, сахара и ряд других веществ в какой-то мере защищают микробы от действия высокой температуры, поэтому их стерилизуют более продолжительное время.

Разумеется, чем выше температура, тем полнее будет стерилизующий эффект, однако при этом возникает опасность денатурирования продукта, снижения вкусовых качеств и ухудшения его внешнего вида. Обычно стерилизацию продолжают в течение 40-90 минут при температурах от 108 до 120°C.

Во избежание излишнего воздействия высокой температуры и разваривания продукта консервы после стерилизации быстро охлаждают в тех же автоклавах или специальных ваннах.

Следует отметить, что термическая обработка консервов не всегда приводит к полному уничтожению микроорганизмов, и в части банок могут сохраняться небольшое количество так называемой остаточной микрофлоры.

В таких нестерильных консервах обнаруживаются главным образом спорообразующие формы микробов. Среди них чаще всего встречаются как аэробные микроорганизмы – *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, так и анаэробные – *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificus* и др. Значительную долю остаточной микрофлоры консервов составляют термофильные микробы. Из них *Bac. asterosporus*, *Bac. polymixa*, *Bac. mesentericus rubeus* в процессе своей жизнедеятельности образуют газообразные продукты и вызывают порчу консервов со вздутием банок. Другие виды (*Bac. aerothermophilus*, *Bac. stearothermophilus*, *Bac. thermoliquefaciens*, *Bac. nondiastaticus* и пр.) не дают газообразования и вызывают так называемую плоскокислую порчу.

Высокая температура в значительной степени ослабляет остаточную микрофлору, однако последняя может проявить жизнедеятельность через некоторое время, особенно при неправильном хранении консервов. Поэтому в доброкачественных правильно стерилизованных консервах должны отсутствовать следующие микроорганизмы: *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Salmonella* и *Shigella*. *Staphylococcus*, все виды *Enterobacteraceae*, все виды родов *Achromobacter*, *Flavobacter* и *Pseudomonas*, грибы, наличие которых является показателем недостаточной стерилизации.

Эффективным способом контроля доброкачественности консервов является термостатная выдержка. В заводских условиях все мясные, мясорастительные консервы выдерживаются в термостатах до 10 суток при 37°C. Овощные рыбные, натуральные и все остальные виды рыбных консервов, за исключением рыбных консервов в масле, подвергаются термостатной выдержке в количестве 5% от каждой автоклавоварки.

Рыбные консервы в масле (шпроты, треска, корюшка и др.) не подлежат термостатной выдержке. Последняя может способствовать активации стафилококков, которые вследствие плохой теплопроводности масла иногда сохраняются при термической обработке. Развитие стафилококков не сопровождается газообразованием, поэтому банки, в содержимом которых стафилококк размножился, выглядели бы нормально, т.е. не вздутыми.

Не подвергаются термостатной выдержке фруктовые компоты, пюре и соки, томатные и соевые соусы, цельноконсервированные томаты, огурцы и другие консервы, имеющие кислую реакцию, так как кислая среда препятствует токсинообразованию микровозбудителей пищевых отравлений

(палочка ботулизма, стафилококк). Термостатному контролю не подлежат презервы, т.е. продукты заведомо нестерильные, как например кильки, маринованные грибы, овощи и фрукты, сгущенное молоко с сахаром, варенье, джемы, повидло и другие.

Термостатная выдержка применяется не только на заводах, но и во всех случаях микробиологического исследования консервов. В банках с сохранившимися жизнеспособными микроорганизмами за это время происходит их размножение и порча консервов, определяемая наружным осмотром. Появляется так называемый бомбаж – вздутие банки.

Следует различать бомбаж биологического, химического и физического происхождения.

Биологический бомбаж вызывается газами, образующимися в результате размножения микроорганизмов. Под влиянием их жизнедеятельности происходит разложение белков, жиров и углеводов с образованием газов (H_2S , NH_3 , CO_2), которые давят на стенки и доньшки банки и вызывают её вздутие. Биологический бомбаж чаще всего вызывается спороносными анаэробами (*Cl. sporogenes*, *Cl. putrificus*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*) и некоторыми термофильными бактериями. Иногда в этом процессе принимают участие факультативные анаэробы *E. coli*, *Proteus vulgaris* и др. Бомбаж фруктовых и молочных консервов нередко бывает обусловлен дрожжами и *Bact. lactis aerogenes*. Биологический бомбаж с санитарно-эпидемиологической точки зрения наиболее опасен. Консервы с биологическим бомбажем непригодны в пищу, подлежат браковке и уничтожению, независимо от того, каким видом микроорганизма вызван бомбаж.

Химический или водородный бомбаж возникает в результате сильной коррозии металла под влиянием кислого содержимого банки. При взаимодействии кислоты с металлом выделяется молекулярный водород. Давление последнего приводит к изменению внешней формы банок.

Для предотвращения химического бомбажа продукты с повышенной кислотностью укладывают в жестяные банки, покрытие с внутренней поверхности специальным кислотоупорным лаком. Консервы с химическим бомбажем практически безвредны, но они не должны выпускаться для реализации в торговую сеть, поскольку невозможно на складах достоверно дифференцировать этот вид бомбажа от бомбажа биологического происхождения.

Физический бомбаж либо является результатом переполнения банки консервированным продуктом, либо обусловлен подмораживанием консервов и расширением содержимого банок вследствие образования в них льда. Физический бомбаж бывает и при вполне доброкачественных консервах, однако реализация их требует осторожности. При подмораживании имеет место обычно массовый бомбаж, но выявить в таких партиях консервов отдельные банки, вздутие которых произошло под влиянием опасных микроорганизмов, невозможно. Доказано в ряде случаев, что среди подмороженных консервов встречались банки с биологическим

бомбажем, вызванным палочкой ботулизма. Поэтому консервы с физическим бомбажем вследствие замораживания должны реализоваться только после предварительной варки.

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

Таким образом, отсутствие бомбажа еще не свидетельствует о стерильности консервов, в то же время наличие отдельных бомбажных банок в партии не доказывает недоброкачества всей партии. Решить эти вопросы можно только на основании прямого бактериологического исследования консервов.

Обязательное лабораторное испытание консервов производится на заводе или на самой ферме при выпуске готовой продукции.

Лабораторный контроль консервов, выпущенных для реализации и хранения на складах, производится только в случае, когда внешний вид партии вызывает подозрение (повышенное количество бомбажных и деформированных банок, а также банок с нарушенной герметичностью или другими дефектами), либо к этому имеются прямые эпидемиологические показания (пищевые отравления данными консервами).

Все организации, занятые хранением и реализацией консервной продукции, при приемке, хранении и выпуске на доволствии консервов обязаны подвергать их сортировке, отбраковывать банки бомбажные, с подтеками, пробитые гвоздями и сильно деформированные (угрожающие герметичности).

На каждую выявленную партию непригодных в пищу консервов должен быть составлен акт с указанием причин браковки, количества забракованных банок, маркировки. Такие консервы должны храниться до утилизации или уничтожения в отдельных помещениях на особом месте [45, 46].

Лабораторный контроль за качеством консервов регламентирован «Инструкцией о порядке санитарно-технического контроля производства консервов», утвержденной Государственной санитарной инспекцией.

7.2 Правила отбора проб консервов

Отбор проб консервов на санитарно-бактериологический анализ производят в соответствии ранее с ГОСТом 8756-58.

Вначале проверяют состояние тары и отмечают её недостатки – неисправность, отсутствие пломб, наличие плесени, загрязненности, утечки, отсутствие или неясность маркировки. Затем устанавливают однородность партии (продукт одного вида и сорта, в таре одного типа и размера, одной даты выработки, изготовленный одним заводом). От каждой однородной партии консервов отбирают из разных штабелей или ящиков 10 единицу

расфасовки ёмкостью до 1 л и от 3 до 5 единиц ёмкости более 1 л. В случае обнаружения консервов в поврежденной ящичной таре количество отбираемых единиц расфасовки удваивается. В отобранных указанным способом консервах, представляющих так называемый средний образец, определяют путем осмотра количество банок мятых, негерметичных по внешним признакам и с другими дефектами.

Из среднего образца производят дальнейший отбор проб и составляют **среднюю пробу**, подлежащую анализу. Для средней пробы отбирают:

1) консервы, расфасованные в жестяную или стеклянную тару ёмкостью до 1 л, - 6 единиц (две – для физико-химического исследования, две для бактериологического анализа и две – для органолептической оценки);

2) консервы, расфасованные в тару ёмкостью до 3 л, - 3 единицы, ёмкостью свыше 3 л – 1 единицу (содержимое банки или баллона подвергается физико-химическим исследованиям после взятия пробы для бактериологического анализа).

В случае неудовлетворительных результатов исследования средней пробы образцы отбирают для анализа вторично в удвоенном количестве.

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

При отправке проб в лабораторию, находящуюся вне места осмотра, банки консервов завертывают в бумагу и опечатывают. Пробы сопровождают актом изъятия продукта и этикеткой, на которой указывают:

- 1) наименование организации (адресата);
- 2) наименование предприятия, выработавшего продукт;
- 3) наименование, сорт и дату выработки продукта;
- 4) размер партии, от которой отобрана проба;
- 5) дату отбора пробы;
- 6) должность и фамилии лиц, отбравших пробу;
- 7) показатели, которые должны быть определены в продукте;
- 8) номер стандарта или технических условий на данный продукт;
- 9) номер транспортного документа (накладной).

Отбирая пробы консервов в жесткой таре необходимо знать стандартные маркировочные знаки, существующие в консервной промышленности. Они выштампованы на крышках и донышках консервных банок. Ознакомление с оттисками позволяет определить характер консервов, дату их выпуска (число, месяц и год), номер предприятия, выпустившего данную партию и номер смены.

На крышке обозначены:

- 1) номер смены (одна цифра);
- 2) дата изготовления (две цифры, причем до 9-го числа включительно поставлен впереди 0);

3) месяц изготовления. Месяцы обозначаются буквами (в алфавитном порядке): А – январь, Б – февраль, В – март, Г – апрель, Д – май, Е – июнь, Ж – июль, И – август, К – сентябрь, Л – октябрь, М – ноябрь, Н – декабрь;

4) условный, так называемый ассортиментный номер, присвоенный данному виду консервов, который состоит из одной – трех цифр. Например, мясо тушеное (баранина) имеет ассортимент номер 02, шпроты – 137, кета в томатном соусе – 013 и т.д.

На доньшке имеется знак, состоящий из букв и цифр, обозначающих:

1) вид консервов. Он определяется по буквам (М – мясо, Р – рыба, К – фрукты и овощи);

2) номер, присвоенный заводу;

3) последнюю цифру года изготовления консервов.

Консервные заводы, не имеющие собственных жестяно-баночных цехов, обе маркировки (для крышки и для доньшка) штампуют только на крышке, но в два ряда.

7.3 Методика бактериального исследования баночных консервов (кроме молочных)

Методы бактериологического исследования консервированных пищевых продуктов изложены ранее в госте. Настоящий стандарт распространяется на следующие виды консервов: мясные, мясо-растительное, сало-бобовые, обеденные, рыбные (натуральные, в масле и в томатном соусе), овощные натуральные и закусочные, овощи-грибные, консервы для диетического и детского питания, соки овощные и устанавливает следующие методы бактериологического исследования:

1 выявление аэробных микроорганизмов;

2 выявление анаэробных микроорганизмов; определение присутствия ботулинических токсинов;

3 определение наличия возбудителей ботулизма;

4 выявление термофильных бактерий.

Перед бактериологическим исследованием консервов проверяют внешний вид тары. При этом отмечают и состояние этикетки: соответствие надписей на ней описанию в предварительном документе; наличие дефектов: видимое простым глазом нарушение герметичности, потеки и вздутие, хлопающие крышки и т.п. Для жестяных банок особо отмечают деформацию корпуса, доньшек, ржавые пятна и степень их распространения, дефекты продольного шва и швов доньшек и крышек. Выявленные дефекты, механическое загрязнение позволяют судить о предшествующих неблагоприятных условиях хранения. Описание внешнего состояния заносят в журнал, независимо от результата осмотра. Если консервы заморожены, то их оттаивают при комнатной температуре.

Затем проводят проверку герметичности. Жестяные банки предварительно помещают в нагретую до 70-80°C воду на 3 мин, после чего тщательно вытирают сухой тряпкой, протирают швы и фальцы смоченной

бензином ватой. Испытание на герметичность проводят в специальном аппарате Бомбаго, либо в другом вакуумном приборе типа анаэростана, либо погружением банок в нагретую до кипения воду, взятую примерно в четырех-кратном количестве по отношению к весу банок. Необходимо, чтобы после погружения банок температура воды была не ниже 85°C, а слой воды над ними 25-30 мм. Банки следует выдерживать в горячей воде 5-7 минут. Появление струйки пузырьков воздуха в каком-либо месте банки указывает не ее негерметичность. Отдельные пузырьки воздуха, появляющиеся вначале в разных местах швов, не являются показателем негерметичности, так как они могут выходить из фальца вполне герметичной банки.

Отобранные для бактериологического анализа герметичные банки тщательно промывают с мылом, затем ополаскивают чистой водой, швы протирают щеткой, насухо вытирают, снабжают наклейкой с указанием номера анализа, даты поступления в лабораторию и подвергают термостатированию для проверки на бомбаж.

Банки, предназначенные для выявления аэробных, анаэробных мезофильных бактерий выдерживают в течение пяти суток при 37°C. Для определения термофильных микроорганизмов инкубацию проводят в течение 2 суток при 55°C.

Вздутие консервной банки, не опадающее при нажиме или снова восстанавливающееся после нажима, дает основание признать банку бомбажной. Бомбажные банки подвергаются анализу только в исключительных случаях.

Бактериологический анализ консервов производится при строгом соблюдении максимальной асептики в специальном боксе. Стены, пол и все предметы оборудования бокса должны быть выкрашены масляной краской и доступны для протирания дезинфицирующим раствором. Для стерилизации воздуха в боксе рекомендуется применять ультрафиолетовые лампы. Последние следует включать за 2-3 часа перед посевом, а во время посева – выключать. При отсутствии оборудованного бокса допускается вскрытие банок в обычной лабораторной комнате после тщательной дезинфекции (во время анализа должны быть закрыты форточки и дверь во избежание движения воздуха). Микробиолог и его помощник работу проводят в масках, стерильными инструментами [47, 48].

Перед вскрытием банки тщательно протирают ватой, смоченной спиртом. Затем стерильным пинцетом берется заранее заготовленный ватный тампон, поджигается на пламени горелки и в зажженном виде помещается на крышку банки. Под горящую вату или сквозь пламя быстро подводят острие предварительно обожженного металлического пробойника, предназначенного для перфорации. С некоторым усилием прокалывают крышку и не отнимая пробойника осторожно вращают его, углубляют и расширяют отверстие до 1-1,5 см в диаметре. После этого пробойник извлекают и отверстие закрывают горячей ватой или половинкой стерильной чашки Петри размером чуть больше диаметра крышки банки.

Взятие содержимого для посева производят с помощью стеклянной трубки диаметром 7-9 мм, предварительно проверенной на стерильность промыванием в мясо-пептонном бульоне путем 2-3-кратного насасывания его из пробирки. Эта пробирка с бульоном выдерживается в термостате вместе с посевами консервов и служит контролем на стерильность трубок. Наличие роста микроорганизмов в контрольной пробирке ставит под сомнение все другие посева.

Посевы содержимого консервов для выявления аэробных микроорганизмов. В качестве питательной среды применяют мясо*-пептонный бульон (рН 7,0-7,2).

Из каждой банки вносят в 2 пробирки с бульоном около 1 г продукта. Посевы помещают в термостат при 37°C на 5 суток и ежедневно наблюдают за появлением роста микробов в среде. При помутнении бульона, образовании пленки, выделении пузырьков газа содержимое пробирок высевает на бульон и на чашки с кровяным агаром, а также исследуют под микроскопом в мазках, окрашенных по Граму, ставят каталазную реакцию. Результаты исследования тщательно протоколируются. Ход дальнейших исследований по идентификации выделенных микробов и их токсинов проводится по общепринятым тестам.

Посевы содержимого консервов для выявления анаэробных микроорганизмов. Для обнаружения анаэробов засевают 2 пробирки со средой Тароцци без масла, но с добавлением агара (0,15%). Перед посевом полужидкую среду Тароцци прогревают 25 мин в кипящей водяной бане и затем быстро охлаждают до 30-40°C. Посевы помещают в термостат на 5 суток и ежедневно наблюдают за появлением роста. Развитие анаэробных микроорганизмов сопровождается появлением мути и газообразования на 0,5-1,0 см ниже поверхности среды. В мазках обнаруживаются окрашенные по Граму палочки с субтерминальными или терминальными спорами в виде ракеток. Из среды Тароцци 1-2 мл культуры переносят в стерильную чашку Петри, заливают растопленным и остуженным до 45°C мясо-пептонным агаром с 1% глюкозы (рН 7,2) высота слоя 0,8 см. На застывшую поверхность агара накладывают стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не возникли пузырьки воздуха. Чашку в перевернутом виде помещают в термостат с температурой 37°C на 24-48 часов. Рост бактерий, отступающий от края стекла на 1-3 мм, свидетельствует о присутствии в посевах облигатных анаэробов.

Посевы консервов для выявления термофильных бактерий. Банки после выдерживания в термостате при 55°C в течение 48 часов обрабатываются и вскрываются, как указано выше. Затем в 4 стерильные пробирки отбирают по 5-6 мл, в 2 пробирки асептически добавляют стерильный раствор индикатора (0,04%-ный водный раствор бромкрезолпура) в количестве 0,1-0,2 мл. Пробирки встряхивают до получения равномерного окрашивания.

Если содержимое пробирок после добавления индикатора окрасилось в желтый цвет, а в мазках обнаружены бациллярные формы бактерий, это свидетельствует о наличии в консервах термофильных бактерий.

Если продукт не окрасился в желтый цвет, то из пробирок без добавления индикатора высевают 1-2 мл консервов непосредственно на чашки Петри с мясо-пептонным агаром с добавлением 1% глюкозы и 0,04% бромкрезолпурпура. Посевы выращивают при 55°C 48 часов. Рост кислотообразующих термофильных микробов сопровождается изменением окраски среды вокруг колоний от фиолетового до желтого цвета.

В соответствии с упомянутой выше инструкцией обнаружение в стерилизованных консервах непатогенных спорообразующих микробов при отсутствии явлений бомбажа и при нормальных органолептических свойствах не является препятствием к их хранению и употреблению в пищу. При обнаружении несорообразующих микробов (протей, кишечная палочка, стафилококки и т.д.) данная партия консервов подвергается дополнительному бактериологическому анализу. В случаях подтверждения анализа вопрос о возможности реализации консервов решается органами Государственного санитарного надзора.

8. Санитарно-бактериологическое исследование напитков

Производство безалкогольных и слабоалкогольных напитков представляет собой целую отрасль пищевой промышленности.

К безалкогольным напиткам относятся искусственные или натуральные газированные и минеральные воды, а также некоторые напитки, производстве которых используется процесс брожения. Поэтому напитки последней группы содержат небольшие концентрации алкоголя и к безалкогольным относятся условно. Например, в хлебном квасе – от 0,5 до 1,5% алкоголя, а в браге, бузе и мёде ещё больше. Последние могут быть отнесены к категории слабоалкогольных напитков, как и пиво, в котором концентрации алкоголя колеблется в пределах от 2,8 до 6-7%.

Искусственные газированные воды готовятся на растворах солей (сельтерская и содовая) или на искусственных сиропах с добавлением к последним органических кислот, сахара и различных искусственных ароматических эссенций (ситро и др.). натуральные газированные воды готовятся либо на натуральных фруктовых или ягодных соках, либо на натуральных же экстрактах из плодов и ягод (натуральный лимонад, клюквенный морс).

Все газированные воды, в том числе и натуральные, насыщаются углекислым газом искусственно в специальных сатураторах, что значительно повышает сохраняемость напитков. В напитках же, получаемых путем брожения, угольная кислота образуется в процессе их приготовления. Кислая реакция указанных напитков также способствует более длительному их сохранению, так как тормозит рост микрофлоры.

Следует отметить, что при концентрации алкоголя выше 7-8% большинство патогенных микроорганизмов погибают. В то же время в минеральной воде, пиве и других напитках при нарушении режима их укупорки и хранения возбудители кишечных и других инфекций, попавшие тем или иным путем, сохраняют свою жизнеспособность несколько дней, иногда недель и могут явиться причиной заражения.

Для некоторых напитков характерна своя сапрофитная микрофлора. Так, при приготовлении квасов сочетается два бродильных процесса: молочнокислое брожение, вызываемое бактериями, и спиртовое брожение, вызываемое дрожжами. Кроме дрожжей и молочнокислых бактерий, в составе микрофлоры безалкогольных и слабоалкогольных напитков могут присутствовать кокки, сарцины и небольшое количество грамположительных спорозонных палочек. В то же время некоторые сапрофитные микроорганизмы могут привести к порче напитков, поэтому их присутствие в последних недопустимо.

Например, сахарные напитки могут подвергаться ослизнению вследствие размножения особых бактерий из рода лейконостока – *Leiconostoc mesenterioides* (синоним - бетакокк). Эти микробы относятся к группе ароматобразующих бактерий и представляют собой грамположительные кокки удлинённой формы, которые складываются парами или короткими цепочками, хорошо развиваются в присутствии дрожжей, образуют слизистые капсулы, вырастают на агаре с сахаром в виде слизистых прозрачных колоний, на растворах тростникового (свекловичного) сахара разрастаются в виде студенистой массы, которая состоит из полисахарида декстрина.

Поражение пива дрожжами *Saccharomyces pasteurianus* или кокками *Pediococcus cervisiae*, реже палочками *Bact. lindneri* вызывает помутнение напитка с появлением неприятного вкуса и запаха. Иногда ослизнение пива вызывают и бактерии из вида *Pediococcus viscosus*. С целью предупреждения таких поражений пива дрожжи, идущие в производство, не должно содержать более 1% микробов-вредителей.

Появление в пиве и безалкогольных напитков или в сиропах мути, обусловленной развитием микроорганизмов, является показателем недоброкачества этих напитков. В связи с этим санитарным законодательством предусмотрены предельные сроки сохранения напитков без порчи (стойкость), т.е. способность сохранять без образования мути. Так, стойкость при 20°C для бархатного пива – 3 дня, для жигулевского – 7 дней, для рижского – 8, московского, украинского и мартовского – 8 дней, для ленинградского светлого – 10 дней и для ленинградского темного – 17 дней (по госту). Стойкость при 20°C для безалкогольных напитков, приготовленных на сахаре – 7 дней, а изготовленных на сахарине (для диабетиков) – 15 дней (по госту).

Гарантийный срок хранения при 20°C сиропов в бутылках и банках – 20 суток.

Таким образом, определение стойкости рекомендовано в качестве одного из методов оценки качества напитков. Однако действующими стандартами не установлены санитарно-бактериологические нормы для безалкогольных напитков, так как на них распространяются требования, предъявляемые к питьевой водопроводной воде для данной местности (по госту).

В практику лабораторного контроля за производством безалкогольных напитков в настоящее время введены ведомственные нормы [49, 50].

Таблица 33 – Нормы

Напитки	Микробное число не более	Коли-титр не менее
Негазированные безалкогольные	100	300
Газированные	200	100
Хлебный квас	-	100

Для пива, как и для безалкогольных напитков, государственными стандартами не установлено санитарно-бактериологических показателей.

Процесс производства пива имеет этап, на котором сусло выдерживается в открытых сосудах (так называемых «тарелках»), где возможно значительное обсеменение субпродукта кишечной палочкой. В то же время бактерии имеют возможность размножаться в сусле во время его брожения, поэтому в готовой продукции пивоваренных заводов кишечная палочка обнаруживается в титрах, несравненно более низких, чем коли-титр водопроводной воды, вплоть до 0,1 и 0,01 мл. Эти концентрации кишечной палочки не вызывают у человека какого-либо болезнетворного эффекта.

8.1 Методика бактериологического исследования

Взятие проб и подготовка их к исследованию. На отдельных этапах производственного процесса при изготовлении безалкогольных и слабоалкогольных напитков отбирают пробы с целью контроля за качеством по 400-500 мл из каждой ёмкости (чаны, бочки и т.п.) в стерильную посуду с помощью пипеток Мора, стерильных черпаков или из предварительно обожженных кранов.

При выборочной оценке качества готовой продукции, расфасованной в бутылки, для анализа берут по 1-2 бутылки из каждой партии или серии товара. До начала анализа пробы хранят при 2-4°C, но не более одних суток.

Как и при исследовании воды для безалкогольных напитков приняты следующие санитарно-бактериологические показатели: микробное число, коли-титр и коли-индекс, а также обнаружение патогенных микроорганизмов.

Подготовка напитков к бактериологическому исследованию включает замену стандартных пробок стерильными ватно-марлевыми, доведение напитка до нейтральной или слабощелочной реакции. С этой целью

проверяют начальную реакцию среды (она, как правило, кислая) с помощью фенолфталеина, а затем доводят до нужной величины путем добавления 10%-ного раствора едкого натрия или прокипяченного раствора соды.

Бактериоскопическое исследование. Для получения ориентировочного представления о микрофлоре напитка готовят мазки из осадка, полученного центрифугированием, ультрафильтрованием или самостоятельным осаждением, окрашивают по Граму и микроскопируют. Представляется перспективным использование с этой целью люминесцентного анализа.

Бактериологическое исследование. Определение микробного числа и коли-титра производится по методикам, предусмотренным для исследования питьевой воды. Однако при использовании методики бродильных проб посевы производят на среду Кесслер или Краевского.

При проведении анализа на лейконосток посевы производят в пробирки или в колбы (флаконы) с мясо-пептонным бульоном, содержащим 10% сахарозы, и в чашки Петри с мясо-пептонным агаром, содержащим такую же концентрацию указанного дисахарида. Посевы инкубируют при 20-21°C. Типичные слизистые колонии на агаре после первичного посева или в высеве с бульона исследуют путем приготовления мазков, окрашенных по Граму (типично по парное или цепочками расположение крупных грамположительных сферических клеток), или по Гинсу с конгорот (клетки лейконостока окружены массивной капсулой) и по поведению на средах «пестрого ряда» (типично разложение без газообразования глюкозы, маннита, сахарозы и арабинозы).

Более быстрое обнаружение ослизняющих напитки бактерий достигается по методу Преображенского: посев на дрожжевую воду с 10% сахарозы и мелом 1 мл исследуемого напитка с последующей инкубацией в течение 48 часов при 30°C. В положительных случаях в пробирках с питательной средой наблюдается образование слизи.

При необходимости количественного учета содержания лейконостока в напитке производят посевы последнего в количестве 1,0; 0,1 мл и последующих разведений на чашки с дрожжевым агаром с 5% сахарозы. Через 48 часов инкубации при 30°C производят подсчет характерных прозрачных, слизистых, каплевидных колоний лейконостока.

С целью обнаружения патогенных микроорганизмов в напитках последние фильтруются через мембранные ультрафильтры. Фильтры засевают как в жидкие, так и на плотные элективные питательные среды по принятым методикам.

Для определения стойкости безалкогольные, слабоалкогольные напитки и сиропы в оригинальной упаковке помещают в термостат при 20°C на требуемый срок с ежедневным учетом прозрачности напитка. В случаях пророста проводятся бактериоскопическое и бактериологическое исследования.

9. Бактериологическое исследование смывов с поверхностей инвентаря, оборудования пищевых объектов и рук персонала

В практике надзора за санитарным состоянием пищевых объектов и личной гигиеной работников общественного питания, торговой сетью и лечебных учреждений широко применяется бактериологический метод. В основе бактериологического метода исследования смывов лежит обнаружение на обследуемых объектах группы кишечной палочки как санитарно-показательных микроорганизмов.

По эпидемиологическим показаниям проводят также обследование с целью непосредственного поиска патогенной микрофлоры и источника инфицирования продукта, например, при расследовании причины вспышки пищевой токсикоинфекции или интоксикации. Однако во всех случаях бактериальной загрязненности инвентаря, оборудования и прочего представляют наибольший интерес показатели наличия кишечной палочки.

Присутствие кишечной палочки на предметах инвентаря и на руках работника может зависеть от свежего фекального загрязнения. Но чаще эти микроорганизмы заносятся с овощей, корнеплодов и с других продуктов, что подтверждается высоким процентом цитратассимилирующих разновидностей среди выделяемых при этом coli-штамов (тип citrovorum). Тем не менее обнаружение тех и других разновидностей бактерий дает возможность объективно оценить санитарный уровень контролируемых объектов.

Бактериологический контроль является одним из действенных методов для повышения санитарного уровня производства. Но положительное влияние контроля будет сказываться при правильной его организации. Обследование должно проводиться по заранее намеченному графику. При повторных обследованиях методика работы должна быть единой. Для того, чтобы получить сравнимые данные, необходимо брать пробы с одних и тех же предметов, в аналогичных условиях и в одни и те же часы. Можно сравнивать, но нельзя объединять данные смывов, полученных до и после работы. На основании анализа полученных результатов обследования должно быть выявлены основные причины и источники загрязнения продукции и намечены пути к их устранению.

Обследование объектов производится в соответствии с «Методикой санитарно-бактериологического контроля на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами».

9.1 Методика исследования

Для отбора проб пользуются стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками размером 5×5 см, завернутыми в бумажные пакеты. Стерильные тампоны на стеклянных или металлических палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками наполняют до 2 мл стерильной водопроводной водой так, чтобы тампон не касался воды. Перед

взятием смыва тампон увлажняют путем наклонения пробирки или опускания его на палочке.

Если смыв производят салфеткой, то её захватывают прокаленным пинцетом, смачивают в пробирке стерильной водой, делают смыв и помещают в ту же пробирку.

Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности в 120 см². Для ограничения поверхности смыва применяют трафареты размером 25 см², сделанные из проволоки или металлической пластинки. Чтобы взять материал с площади в 100 см², трафарет накладывают 4 раза в разных местах обследуемого предмета. Трафареты стерилизуют заранее в лаборатории или на месте отбора проб путем отбирания спиртов и обжигания на горелке.

При взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 см², нижнюю часть каждого рукава и 2 площадки с верхней передней части спецодежды. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25 см.

Смывы с мелкого инвентаря делают со всей поверхности предмета. У тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. У столовых приборов протирают нижнюю часть ручки. Смывы с мелких предметов производят одним тампоном с трех одноименных предметов – 3 тарелок, 3 ложек и т.д.

При взятии смывов с рук тщательно протирают ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцами, затем протирают межпальцевые и подногтевые пространства и ногти.

В процессе отбора пробы записывают номер образца по порядку; в каком техническом и санитарном состоянии находилось оборудование, с которого взят смыв (кратко); какая операция в нем выполнялась в момент отбора пробы и до взятия пробы.

При взятии смывов с рук записывают: номер по порядку, фамилию, имя, отчество сотрудника, его специальность (повар, рабочий т.д.); характер операции, выполняемых непосредственно перед взятием смыва.

Бактериологическое исследование смывов обычно ограничивается определением присутствия кишечной палочки без учета титра и общего количества бактерий.

Для определения наличия кишечной палочки посев смывов производят в пробирке со средой Кесслер с поплачками или без них. С этой целью тампон вместе с палочкой вынимают из пробирки и вводят в другую пробирку со средой Кесслер. Пробкой, в которую вмонтирована палочка тампона, закрывают пробирку с посевом. Можно также стерильно налить в пробирку с тампоном 5-10 мл среды Кесслер.

Если в смывах учитывается только наличие кишечной палочки, а не определяется её титр и общее количество бактерий, то взятие смывов и посев могут совмещаться. В этом случае в пробирку с тампоном наливают 5 мл среды Кесслер (или 10-20% желчного бульона). Смоченным в среде тампоном делают смыв и затем опускают его обратно в ту же пробирку.

Засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 43°C. Через 24 часа производят высеивание из всех засеянных пробирок на твердые дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина). Чашки с посевами

помещают на сутки в термостат при 37°C. Отсутствие роста на чашках указывает на отрицательный результат. Если имеются типичные для кишечной палочки колонии, из них готовят мазки и при обнаружении грамотрицательных палочек переходят к следующему этапу работы.

Из 2-3 колоний, в которых обнаружены грамотрицательные палочки, делают посев в пробирки с глюкозо-пептонной средой и помещают их в термостат при 43°C.

Газообразование в среде с глюкозой и типичные грамотрицательные палочки в мазке дают основание для окончательного положительного результата. На этом исследование смывов на обнаружение бактерий кишечной группы заканчивается.

При необходимости определения отдельных групп кишечной палочки материал на колонии засевают в 4 пробирки на среды Гисса с глюкозой, лактозой, среду Симмонса и среду Кларка. Посев на среде Кларка выдерживают 5 дней при температуре 37, после чего ставят реакцию Фогес-Проскауера. Отсутствие роста на среде Симмонса характерно для *E. coli* commune и обычно свидетельствует о непосредственном свежем фекальном загрязнении.

Следует отметить, что после надлежащей санитарной обработки инвентаря, посуды, оборудования и рук персонала кишечная палочка не должна обнаруживаться в смывах, взятых с поверхностей указанных объектов исследования.

Определение в смывах титра кишечной палочки следует производить не позже 4 часов с момента их отбора. Все образцы для посева должны храниться при температуре не выше 6°C.

Приготовление разведений и посев производят следующим образом. Ватный тампон снимают с палочки и опускают его обратно в ту же пробирку. В пробирку добавляют 8 мл стерильной воды (12 мл были добавлены перед взятием пробы). Получается разведение 1:10. Пробирку тщательно встряхивают в течение 3 минут, затем из неё готовят последующие десятикратные разведения путем переноса 1 мл в пробирки с 9 мл стерильной воды. Из каждого разведения по 1 мл засевают одной пипеткой в ряд пробирок со средой Кесслер, начиная с наибольшего разведения и кончая пробиркой с тампоном.

Тампон и весь остаток воды из первой пробирки высевают в колбочку с 50 мл среды Кесслер. Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре 43°C на 24 часа. Дальнейший ход исследования тот же, что и для определения кишечной палочки. Результаты анализа выражают в виде коли-титра.

Для определения общего числа бактерий обычно используют те же разведения. По 1 мл соответствующего разведения вносят в стерильные чашки Петри, затем наливают 15-20 мл мясо-пептонного агара, предварительно расплавленного и охлажденного до 45°C. Содержимое чашки перемешивают и оставляют на столе до застывания агара. Чашки помещают в термостат на 48 часов при температуре 37°C, после чего

подсчитывают количество выросших колоний. Результаты исследования заносят в журнал для учета смывов.

Кроме вышеприведенного трехэтапного метода, для выявления в смывах бактерий группы кишечной палочки предложены одноэтапные методы, позволяющие значительно сократить сроки исследования и упростить работу.

Одноэтапные методы основаны на применении жидких или полужидких питательных сред, содержащих тот или иной индикатор (розовая кислота, бромтимоловый синий и пр.).

Смыв производят тампонами на палочках, укрепленных в ватных пробках пробирок, в которых разлито по 5-6 мл питательной среды. Перед посевом тампон смачивают в среде, затем делают смывы с поверхности объекта и тампон погружают в ту же среду. Посевы помещают в термостат при 42-43°C по 18-20 часов. Рост бактерий группы кишечной палочки сопровождается образованием пузырьков газа и изменением цвета среды из вишнево-фиолетового в ярко-желтый, или синего в желтый, в зависимости от свойств индикатора.

Исследование микрофлоры поверхностей производится и так называемым контактным методом, который дает возможность более точно оценить обсемененность различных объектов кишечной палочки и другими микроорганизмами.

Метод Сомова заключается в исследовании поверхностей с помощью металлического в виде усеченного конуса кольца, которое устанавливают на поверхность, объектов и заливают расплавленным и остуженным МПА до 40-42°C. Толщина агара должна быть не менее 0,7-1 см. Агар застывает в течение 5 минут, после чего форму отделяют от поверхности, переворачивают и ударом пальца по боковой наружной стороне встряхивают находящуюся в ней пластинку агара в стерильную чашку Петри. Чашку ставят в термостат при 37°C на 24 часа и затем подсчитывают выросшие колонии. Этот метод может быть применен лишь для обследования строго горизонтальных и относительно равных поверхностей.

Метод Верхолова. Из фильтровальной бумаги вырезают кружки диаметром 8 см, смачивают их в растопленном и остуженном до 60-65°C МПА и быстро переносят на исследуемую поверхность. Через 2-3 минуты агаровые отпечатки снимают стерильным пинцетом с исследуемой поверхности и перекладывают на агар в чашки Петри отпечатком вверх. Чашки помещают в термостат на 18-24 часа при 37°C, затем подсчитывают количество выросших колоний на единицу поверхности.

Вместо фильтровальной бумаги в качестве основы были предложены мембранные фильтры (модификация Л.И. Адельсон, 1964). Последние, благодаря единому размеру и качеству, более удобны в работе. С помощью бумажных и мембранных фильтров могут быть исследованы закругленные и вертикальные поверхности.

Метод Лаврентьева. Разработанный автором для определения видов микробов, находящихся на раневых и ожоговых поверхностях, этот метод

оказался применим и в санитарной бактериологии. Принцип его состоит в получении посева отпечатка с подлежащей исследованию поверхности непосредственно на плотную дифференциальную среду (Эндо, кровяной агар, среда Г.Н. Чистовича и др.). С этой целью на дно бактериологической чашки малых размеров (диаметром 5-6 см) закладывают по одному марлевому кружочку, на краю которого оставляют при выкраивании «стебелек», выступающий за пределы наружного края чашки. После стерилизации чашек вместе с марлевыми кружочками в них заливают расплавленную питательную среду. Застывшую пластинку агара без нарушения целостности и стерильности вынимают из чашки за марлевый «стебелек», прикладывают к поверхности объекта для получения отпечатка. После этого среда вновь укладывается в чашку, а конец «стебелька» сжигается на пламени горелки. Чашки с посевом инкубируют в термостате при 37°C 24 часа. Измерив диаметр чашки, вычисляют, с какой площади получено то или иное число характерных колоний.

Вместо чашек малого размера изготавливаются агаровые пластинки в обычных стандартных чашках. Методом агаровым отпечатком при разных условиях получены более точные данные о степени обсемененности микробами поверхностей, чем при использовании метода смыва [51, 52].

10. Пищевые токсикоинфекции

Среди пищевых отравлений, вызываемых вредными химическими веществами, растительными и животными ядами, особое значение приобретают пищевые отравления микробной природы, возникающие при попадании живых патогенных микроорганизмов или их токсинов в пищевые продукты.

Пищевые токсикоинфекции – заболевания связанные с употреблением пищевых продуктов, обсемененных патогенными или условно патогенными микроорганизмами, которые при гибели и распаде в организме выделяют эндотоксин.

Пищевые отравления микробной природы чаще встречаются при употреблении в пищу инфицированных мясных продуктов и блюд (фарши, студни, паштеты, пирожки, котлеты, порционные блюда, ветчина, солонина, колбасы, мясные салаты), а также рыбных и яичных блюд и продуктов. Реже эти заболевания возникают при употреблении растительных продуктов (овощные блюда, фрукты).

Для этих заболеваний характерны внезапное начало, массовость, бурное развитие, кратковременное течение и отсутствие «эпидемического» хвоста. В клинике преобладают явления токсикоза и выраженного гастроэнтерита.

При подозрении на пищевое отравление микробной этиологии лабораторному исследованию подлежат как материалы от больного, так и пищевые продукты, послужившие причиной заболевания. Целью бактериологического анализа является обнаружение микробов-возбудителей.

Наиболее частыми возбудителями пищевых токсикоинфекций являются бактерии рода салмонелл, главным образом *S. typhi murium* (Breslau), *S. enteritidis* (Gartneri), *S. cholerae suis* (Suipestifer). Реже встречаются салмонеллы Гейдельберг (*S. heidelberg*), Ньюпорт (*S. newport*) и другие, всего около 20 видов и типов.

Несколько меньшую роль в этиологии пищевых токсикоинфекции играют условно патогенные бактерии кишечного семейства: кишечная палочка, паракришечные бактерии, протей вульгарный, палочка Моргана.

Часто описаны вспышки этих заболеваний, вызванных и возбудителем дизентерии (*Sh. sonnei*).

10.1 Общая характеристика возбудителей пищевых токсикоинфекций

Салмонеллы. Все они представляют собой полиморфные подвижные палочки (перитрихи) с закругленными концами, не образуют спор и капсул, не окрашиваются по Граму. Являются факультативными анаэробами. Хорошо растут на обычных питательных средах.

Салмонеллы не разжижают желатина, не образуют индола, большинство видов выделяют сероводород, сбраживают глюкозу, манит и мальтозу с образованием кислоты и газа, лактозу и сахарозу не изменяют, щелочат лакмусовое молоко. Для улавливания биохимических различий отдельных видов салмонелл в пестрый ряд вводят арабинозу, дульцит, рамнозу (таблица 34).

Окончательную идентификацию выделенных культур производят с помощью серологического метода, основанного на различии их антигенной структуры и на использовании специфических моноклональных агглютинирующих сывороток.

У бактерий этой группы установлены два антигена. Один из них – жгутиковый (H-антиген) имеет белковую природу, термолабильный. Другой – соматический (O-антиген) представляет собой термостабильный стойкий комплекс из полисахаридов и липоидов, располагающийся поверхностно в теле микробной клетки.

В дальнейшем было показано (Эндрюс), что жгутиковый H-антиген неоднороден и состоит из двух фаз: специфической или –й, агглютинирующей специфической видовой сывороткой, и не специфической или 2-й, агглютинирующей как видовой, так и групповой сыворотками.

O-антигены могут состоять из одного или нескольких компонентов, обозначаемых римскими цифрами. Они обуславливают групповую специфичность. H-антиген в специфической (1-й) фазе обуславливает видовую специфичность. H-антиген в не специфической (2-й).

Таблица 34 – Культурально-биохимические свойства и антигенная структура салмонелл – наиболее частых возбудителей пищевых токсикоинфекций

Группа	Салмонеллы	Морфология	Биохимические свойства													Антигены					
			Валообразование													Соматические - O	Жгутиковые - H				
			лактоза	глюкоза	маннит	мальтоза	сахароза	арабиноза	дульцит	рамноза	индол	сероводород	лактозное молоко	Патогенность для мышей	Специфическая – I-я фаза		Неспецифическая -фаза				
В	<i>S. paratyphi B</i>	грампалочки	+	-															(I), IV, V, XII	a	1, 2
В	<i>S. typhi murium (Breslau)</i>		-	-	кг	кг	кг	-	-	кг	кг	кг							(I), IV, V, XII	i	1, 2
С	<i>S. cholerae suis (suipestifer)</i>		+	-	кг	кг	кг	-	-	-	-	-	-	±					VI, VII	c	1, 5
Д	<i>S. enteritidis (Gartneri)</i>		-	-	кг	кг	кг	-	-	-	-	-	-	+					(I), IX, XII	q, m	-

Условные обозначения: кг – киелота и газ; + иоложителная реакция; - отрицателная реакция; +- реакция отрицателная или илабоиоложителная. Цифры в икобках и оказывают, что антиген может отиутитовати.

Фазе является общим для многих типов салмонелл. Антигены первой фазы обозначают буквами латинского алфавита, второй – арабскими цифрами.

Окончательную идентификацию вида выделенного микроба производят по совокупности всех признаков: морфологии, тинкториальных свойств, подвижности, культуральных, биохимических, серологических свойств и патогенности для животных.

Кишечная палочка и паракишечные бактерии. По морфологическим и тикториальным признакам сходны с салмонеллами. Подробная характеристика культуральных, биохимических и других свойств дана в пособии к практическим занятиям по курсу медицинской микробиологии.

Вульгарный протей. Представляет собой палочку, не отличимую по морфологическим и тинкториальным свойствам от бактерий кишечного семейства. Н-формы подвижны и образуют на поверхности агара характерный ползучий рост, неподвижные О-формы вырастают в виде изолированных колоний, напоминающих колонии бактерий рода салмонелл. Культивируется на обычных питательных средах.

Протей ферментирует глюкозу с образованием кислоты и газа и не ферментирует лактозу и маннит. Некоторые штаммы разлагают мальтозу и сахарозу. Культуры протeya обладают протеолитическими свойствами разжижают желатин, образуют индол и сероводород, дают положительную реакцию на уреазу (таблица 35).

Палочка Моргана. Грамотрицательная подвижная палочка. Спор и капсул не образует. Расчет на обычных питательных средах. На среде Эндо и Плоскирева образует бесцветные колонии, напоминающие колонии бактерий рода салмонелл. Ферментирует глюкозу с образованием кислоты, а чаще кислоты и газа. Остальные углеводы пестрого ряда не расщепляет. Продуцирует индол и сероводород, разлагает мочевины, щелочит молоко. Желатин не разжижает. По серологическим свойствам бактерии Моргана подразделяют на А- и В-серотипы.

Для идентификации выделенных культур изучают культуральные, биохимические и серологические свойства.

Таблица 35 – Биохимические свойства условно патогенных микробов кишечной группы и дизентерийных бактерий Зонне

Микроорганизмы	Морфология	Биохимические свойства									
		подвижность	глюкоза	лактоза	маннит	мальтоза	сахароза	индол	сероводород	лактозное молоко	разложение мочевины
<i>E. coli</i>	Грамотрицательные палочки	±	кГ	кГ	кГ	кГ	±	±	±	покраснение сверт.	-
<i>E. paracoli</i>		±	кГ	-	кГ	кГ	±	±	±	покраснение сверт.	-
<i>Bact. Proteus vulgaris</i>		+	кГ	-	-	кГ	кГ	+	+	посинение	+
<i>Bact. Morgan</i>		+	кГ	-	-	-	-	+	+	посинение (поздно)	+
<i>Sh. Sonne</i>		-	к	К (медленно)	+	+	+	-	-	покраснение	-

Бактерии Зонне. Характеристика основных свойств представлен в пособии к практическим занятиям по курсу медицинской микробиологии [53, 54].

10.2 Отбор и пересылка проб

При подозрении на пищевые токсикоинфекции бактериологическому исследованию подлежат:

- материалы от больного (рвотная масса, промывные воды, испражнения, моча, кровь, слизь) и секционный материал трупа (содержимое желудка, тонких кишок, паренхиматозные органы);

- остатки подозреваемой готовой пищи и исходные продукты (полуфабрикаты);

- смывы и соскобы с кухонного и столового инвентаря и оборудования, применяемых для обработки и хранения пищи (котлы, разделочные доски и столы, ножи, кастрюли и т.п.).

Пробы для исследования отбирают в стерильную посуду, закрытую ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками. При отсутствии стерильной посуды материал собирают в стеклянную тару, предварительно прокипяченную в течение 20-30 минут. Для отбора проб используют стерильные ложки, шпатели и тампоны. Плотные продукты собирают в полиэтиленовые мешочки или завертывают в пергаментную бумагу.

Рвотные массы и промывные воды направляют на исследование в количестве 100-150 мл, фекальные массы – в количестве 30-50 г.

Кровь берут из вены в количестве 8-10 мл в пробирку.

Слизь из зева и носа также забирают тампоном в пробирку.

При взятии секционного материала (50 г) кусочек вырезают после прижигания поверхности органа раскаленным шпателем. Содержание желудка или тонких кишок берут пастеровской пипеткой также после прижигания поверхности органа.

Пищу и продукты отбирают в следующем количестве и порядке.

Мясо отбирают из разных мест туши в количестве 500 г, по возможности с трубчатой костью и лимфатическими узлами.

Пробы солонины и соленых продуктов забирают сверху, на середине и со дна бочки.

Птицу и мелкую рыбу берут целиком, а от крупной рыбы отрезают куски из головной, средней и хвостовой частей.

Пробы из жидких (полужидких) продукт и первых блюд направляют в объеме 200-250 мл. Вторые блюда берут в количестве 1-2 порций. Остатки пищи на тарелках собирают марлевыми салфетками или ватными тампонами в колбы или пробирки.

Смывы с поверхностей инвентаря и оборудования также производят ватным тампоном или марлевой салфеткой, смоченными стерильным физиологическим раствором. Если поверхность жирная, используют сухой тампон. Соскобы берут прокаленным на огне ножом и помещают в стерильную чашку Петри с 2-3 мл стерильного физиологического раствора.

Посуду с пробами снабжают этикетками, упаковывают и немедленно пересылают в лабораторию в опечатанном виде с нарочным. Материал при пересылке следует предохранять от действия высокой температуры.

В сопроводительном документе указываются:

- при обследовании заболевших: фамилия, имя, отчество и возраст больного; место работы, воинская часть и адрес; предполагаемый диагноз и краткое описание клиники заболевания; дата и час взятия материала; цель

исследования; место и время (дата и час) выемки пробы; фамилия лица, направляющего пробу [55, 56].

10.3 Подготовка проб к исследованию

Предварительная подготовка проб к исследованию заключается в переводе их в жидкую фазу.

Плотные пищевые продукты и материалы забирают стерильно с поверхности и из глубины в виде навески (5-10 г), погружают в этиловый спирт и обжигают на пламени горелки, после чего растирают в ступке со стерильным песком при постепенном добавлении стерильного физиологического раствора до получения 10% эмульсии.

Так же обрабатывают кусочки органов и содержимое желудка и кишок, но с равным объемом физиологического раствора.

Масло, мороженное, крем, сметану и т.п. предварительно расплавляют при температуре 40-45°C.

Жидкие продукты и выделения засевают непосредственно.

Фекальные и рвотные массы густой консистенции эмульгируют в десятикратном количестве физиологического раствора, тщательно перемешивают и отстаивают. Для посева берут верхний слой жидкости.

Все продукты с кислой реакцией среды нейтрализуют с помощью 10%-ного раствора соды. Пробы подлежат исследованию даже при наличии признаков порчи.

10.4 Методика бактериологического исследования на бактерии группы салмонелл

Первый этап исследования. несколько капель взвеси исследуемого материала наносят петлей или пастеровской пипеткой на поверхность плотной дифференциально-диагностической среды (бактоагар Ж, Плоскирева, Эндо, Левина, Вильсон-Блера) и растирают стеклянным шпателем последовательно не менее чем на двух-трех чашек. Для среды Плоскирева посевную дозу увеличивают в 3-4 раза.

Если поверхность среды после посева влажная, то чашки слегка приоткрывают и подсушивают в термостате.

Одновременно 0,5-1,0 мл исследуемой жидкости вносят в пробирку с жидкой средой обогащения (Мюллера, Кацфмана, Килиана). При исследовании мяса и мясных продуктов, в которых более вероятно наличие протей, лучше использовать среду Килиана, содержащую бриллиантгрюн, содержащий рост протей молоку и молочные продукты предпочтительнее засеивать в среду Мюллера или Кауфмана.

Кровь от большого засевают на мясо-пептонный бульон с 20-30% желчи из расчета 1 мл крови на 10 мл среды. При невозможности раннего посева крови засевают свернувшиеся сгустки её, а сыворотку используют для серодиагностики возбудителей пищевых токсикоинфекции.

Смывы с кухонного и столового инвентаря засевают на плотные питательные среды тем же тампоном, которым забирали материал, после чего тампон погружают в жидкую среду обогащения.

Все посевы ставят в термостат при 37°C.

Второй этап исследования. Через 18-20 часов инкубирования производят высев из сред обогащения на чашки с плотной питательной средой для получения изолированных колоний. Для этого материал из каждой пробирки лучше засевают последовательно на две чашки.

Первые посевы на чашках изучают невооруженным глазом. Подозрительные колонии (круглые, прозрачные, бесцветные или голубоватые) на средах Эндо, Левина, бактоагаре Ж обводят карандашом по дну чашки. Из части колонии готовят мазок для изучения морфологии микроорганизмов, окрашенных по Граму. Остальную часть колонии используют для постановки ориентировочной реакции агглютинации на стекле со специфическими (ОН) сыворотками к наиболее частым возбудителям пищевых токсикоинфекций *S. Breslan* (группы В), *S. gatneri* (группы Д), *S. suipestifer* (группы С).

Агглютинирующие сыворотки разводят 1:25 или 1:50. На обезжиренное предметное стекло наносят по капле соответствующей сыворотки и для контроля каплю физиологического раствора. Во всех каплях эмульгируют изучаемую колонию. При положительной реакции появляются хлопья. Сыворотка при этом просветляется.

Из всех подозрительных колоний делают пересев на среду Ресселя с лактозой и глюкозой или на короткий пестрый ряд – в пробирки со скошенным агаром и средами Гиса с лактозой, глюкозой и маннитом. Чем больше отбирают колоний, тем больше шансов обнаружить патогенные микробы.

Из посевов крови делают высев на чашку с плотной дифференциально-диагностической средой. Через сутки инкубирования в термостате выбирают подозрительные колонии, которые также пересевают на среду Ресселя или на короткий пестрый ряд.

Все посевы помещают в термостат при 37°C до следующего дня.

Если на чашках с первичными посевами и с высевами из сред обогащения подозрительных колоний нет – исследование на этом заканчивают и выдают отрицательный ответ.

Третий этап исследования. Просматривают посевы на среде Ресселя (коротком пестром ряду). Выделенная культура на скошенном агаре должна быть однородной в проходящем свете и лишена пигмента.

Для определения морфологических свойств и чистоты культуры микроскопируют мазки, окрашенные по Граму. Если в мазке обнаруживается смешанная культура, её снова рассеивают на чашку с плотной питательной средой для выделения в чистом виде.

При наличии в мазке однородных грамотрицательных палочек производят посев на развернутый пестрый ряд для изучения биохимических свойств культуры, которые учитывают через сутки инкубации посевов в

термостате. Изучается подвижность. Для дифференциации различных представителей салмонелл по способности ферментировать углеводы дополнительно вводят в пестрый ряд арабинозу, дульцит и рамнозу.

Окончательную идентификацию выделенной культуры осуществляют путем постановки агглютинации на стекле с типичными монорецепторами O и H салмонеллезными сыворотками.

На предметное стекло наносят по капле агглютинирующих сывороток различных типов салмонелл и для контроля каплю физиологического раствора. Монорецепторные сыворотки применяют неразведенными. В каждой капле эмульгируют испытуемую культуру. Хлопья и просветление сыворотки наблюдают только в опыте, где имеются гомологичные антиген и антитело. При положительном результате реакции агглютинации с монорецепторными сыворотками и наличии других типичных признаков (морфология, окраска по Граму, подвижность, характерные культурно-биохимические свойства) выдают окончательный положительный ответ с указанием вида возбудителя.

Если лаборатории не имеет монорецепторных сывороток, то ставят развернутую реакцию агглютинации до титра той сыворотки, которая дала положительную ориентировочную реакцию агглютинации на стекле.

Иногда наблюдается групповая реакция агглютинации с двумя или несколькими сыворотками до одинакового разведения или до их титра. В этом случае необходимо исследовать серологические свойства выделенной культуры методом адсорбции агглютининов по Каstellани.

Патогенность полученных культур определяют на белых мышках. Для этого культуру смывают физиологическим раствором, увлажняют смывом кусочки булки и скармливают их натошак двум-трем белым мышам приблизительно одинакового веса. Салмонеллы паратифа В не вызывают гибели мышей. При заражении бактериями Бреслау, Гертнера и суипестифер мыши заболевают и гибнут через 5-6 дней. Из крови и внутренних органов животных выделяют и идентифицируют чистую культуру.

10.5 Методика бактериологического исследования на условно патогенные бактерии кишечного семейства

Исследование на кишечную палочку. Схема бактериологического исследования на кишечную палочку и её разновидности приведена в пособии к практическим занятиям по курсу медицинской микробиологии.

Выделенную из пищевых продуктов и материалов от больного культуру кишечной палочки идентифицируют по совокупности культурально-биохимических свойств.

Все представители группы не разжижают желатин, не разлагают мочевины, ферментируют с образованием кислоты и газа лактозу, глюкозу, манит и непостоянно сахарозу. Большинство их продуцирует индол.

Патогенные штаммы кишечной палочки вызывают гемолиз бараньих эритроцитов и гибель белых мышей при заражении через рот. Выделенная

культура должна давать положительную реакцию агглютинации с сывороткой переболевшего. Наиболее часто встречающиеся патогенные серотипы кишечной палочки (0-124 и некоторые другие) обнаруживают с помощью специальных агглютинирующих сывороток.

Исследование на протей. Маленький кусочек или 1-2 капли исследуемого материала засевают в конденсационную воду свежескошенного агара по методу Щукевича (не касаясь поверхности агара). Одновременно делают посев в среду обогащения (Мюллера, Кауфмана, Калиана). Посевы выдерживают в термостате при 37°C 24 и 48 часов (двукратный просмотр).

Характерный ползучий рост протей из конденсационной воды вверх по поверхности агара наблюдают в виде нежной пленки. При отсутствии такого роста производят высев по методу Щукевича из сред обогащения.

Для получения чистой культуры делают пересев из верхней части пробирки в другую пробирку со скошенным агаром. Культуры протей удается выделить также с дифференциальных питательных сред (Эндо, Левина, бактогар Ж).

Выделенные культуры идентифицируют по морфологии, подвижности, биохимическим свойствам, в том числе способности продуцировать сероводород и индол, расщеплять мочевины (таблица 35).

Для суждения о степени обсемененности продукта протеем посевы по Щукевичу делают в объеме 0,1 мл из различных разведений (до 10^5 , 10^6) исследуемого материала.

Полученная культура должна агглютинироваться сывороткой переболевшего.

Исследование на бактерии Моргана. Исследование проводят по обычной методике, применяемой для выделения и идентификации возбудителей группы салмонелл.

Культуру изучают по морфологически (грамотрицательные подвижные палочки), биохимическим (ферментируют глюкозу до кислоты и газа, выделяет сероводород, образует индол, разлагает мочевины) свойствам и способности агглютинироваться поливалентной и типовыми сыворотками.

Исследование на дизентерийные бактерии Зонне. Проводят по схеме бактериологического исследования на возбудителей дизентерийной группы, изложенной в пособии к практическим занятиям по курсу медицинской микробиологии.

Выделенную культуру идентифицируют по культурально-биохимическим и серологическим свойствам. В биохимическом отношении бактерии Зонне резко отличаются от салмонелл отсутствием подвижности и ферментацией углеводов без газообразования.

10.6 Серологическая диагностика пищевых токсикоинфекций

Наряду с бактериологическим применяют серологический метод диагностики пищевых токсикоинфекций.

Для этой цели часть крови, взятой у заболевших для посева, используют для получения сыворотки, которую испытывают в развернутой реакции агглютинации с имеющимися в лаборатории типичными культурами салмонелл Бреслау, Гертнера, суипестифер или с их диагностикумами.

Через 7-12 дней у больных и переболевших кровь берут повторно и с полученными сыворотками вновь ставят реакцию агглютинации с теми же лабораторными культурами. Если реакция агглютинации наблюдается в разведении сыворотки не ниже, чем 1:100, а также при нарастании титра агглютининов к тому или другому возбудителю, выдают положительный ответ.

Полученные при бактериологическом исследовании культуры также испытывают в реакции агглютинации с сыворотками больных и переболевших. Положительные результаты такого серологического исследования служат подтверждением этиологической роли выделенного микроба в возникновении данной вспышки.

11. Пищевые интоксикации микробной этиологии

Среди пищевых отравлений значительное место занимает интоксикации, обусловленные ядовитыми веществами микроорганизмов. Это чаще всего остро протекающие заболевания, которые возникают в результате употребления продуктов, содержащих истинные растворимые экзотоксины микробов. Присутствие жизнеспособных возбудителей в пище не является обязательным условием такого заболевания. Отравление наступает и тогда, когда в ней содержатся одни микробные токсины. К числу таких заболеваний следует отнести ботулизм, стафилококковую пищевую интоксикацию и отравление токсином-клубридий перфрингенс, а также некоторые микотоксикозы [57].

11.1 Ботулизм

Пищевые отравления токсином *C. Botulinum* носят название ботулизм (от лат. *Botulus* – колбаса). Заболевание ботулизмом было известно сравнительно давно. Многие считают, что описание болезни, сделанное Зенгбушем в России в 1818 году, и классические отчеты Юстинуса Кернера, немецкого поэта и врача, о вспышках отравления в Вюртембурге в 1920 году относятся несомненно к явлениям ботулизма. Яд ботулизма был обнаружен русским исследователем В.К. Анрепом в 1885 году при рыбном отравлении.

В 1895 году бельгиец Ван Эрменгем выделил возбудителя ботулизма и изучил образование им токсина на мясных средах.

В настоящее время консервы промышленного изготовления редко бывают причиной ботулизма.

Ботулизм представляет собой типичную интоксикацию микробной природы. В настоящее время известны 6 типов клубридий ботулизма: А, В, С, D, E, F, продуцирующий одноименный токсины. В нашей Республике

пока зарегистрированы (учитывая широкий зарубежный экспорт и импорт продуктовых товаров) отравление людей только токсинами типа А, В и Е. В то же время описано заболевание норок, вызванное клостридиями ботулинус типа С, последние были обнаружены в почве. Опасность для людей представляют микробы типов А, В, Е и F, а возбудители типов С и вызывают отравления у животных. Однако описаны единичные вспышки заболеваний человека, вызванные токсинами типов С и D.

11.2 Биологические особенности возбудителя ботулизма

Возбудители ботулизма – это сравнительно крупные палочки (4-8 мк) с закругленными концами, образующие субтерминальные споры, отчего микробы приобретают характерную форму теннисных ракеток. Они окрашиваются по Грамму, подвижны, имеют несколько перетрихально расположенных жгутиков. Микробы ботулизма – строгие анаэробы. Для культивирования их необходимо удаление кислорода химическим, физическим или биологическим путем. Подвижность ослабевает в присутствии кислорода. Оптимальная температура роста от 28 до 35°C. В столбике агара микробы образуют колонии в форме пушистых шаров с плотным центром или в виде чечевицы. На поверхности сахарно-кровяного агара развиваются колонии средней величины с ровными или изрезанными краями, округленные зоной гемолиза.

Клостридии ботулизма биохимически активны. Разлагают с образованием кислоты и газа ряд углеводов: глюкозу, левулезу, фруктозу, мальтозу, салицин, декстрин, адонит, инозит и не разлагают галактозу, сахарозу, дульцит, манит, арабинозу, рамнозу. Однако свойства эти не постоянны и не используются по этому для дифференцировки и идентификации. Клостридии типов А и В обладают сильными протеолитическими свойствами и способны растворять кусочки печени или мясного фарша в среде Китт-Тароцци. Культура при этом издает довольно характерный запах прогорклого масла. Значительно слабее протеолитические свойства выражены у клостридий С, D, Е, и F. все типы клостридий морфологически и культурально не различимы, но дифференцируются серологически по антигенной структуре вырабатываемых ими токсинов. Каждый тип образует свой особый, свойственный только ему токсин.

Распространение возбудителя в природе и устойчивость к физическим и химическим факторам. Возбудители ботулизма довольно широко распространены в окружающей среде. Местом их постоянного обитания является почва. Их можно обнаружить в воде неглубоких прудов или озер. Описаны даже случаи размножения клостридий в мелких, теплых водоемах и образовании ими токсинов, которые вызывали массовую гибель водоплавающих птиц. С водой и почвой клостридии попадают на овощи, фрукты, пищевые продукты, а с ними в кишечник человека и животных, где находят благоприятные условия для размножения. Вегетативные формы микробов не отличаются особой устойчивостью, но в неблагоприятных

условиях они легко образуют споры, которые обладают особенно высокой сопротивляемостью к химическому и физическому воздействию. Они устойчивы к действию низких температур и не сразу погибают даже при -190°C . При температуре -16°C переживают в течение года, хотя часть их при этом разрушается с выделением токсина.

В связи с этим продукты, содержащие большое количество спор, могут стать более ядовитыми после замораживания. Споры также весьма резистентны к высоким температурам и выдерживают кипячение в течение нескольких часов. Чтобы разрушить их при автоклавировании необходимо давление в 2 атмосферы и экспозиции не менее 30 минут.

Споровые формы значительно устойчивее вегетативных форм к действию дезинфицирующих веществ. Так, 40%-ный формалин в двойном разведении убивает их только через 24 часа, 5%-ный фенол - через сутки, в этиловом спирте они сохраняют жизнеспособность до 2 месяцев. Раствор 10%-ной соляной кислоты при комнатной температуре убивает их только через час.

Токсины *Cl. Botulinum*. Каждый из указанных выше типов клостридий вырабатывает соответствующий токсин. Различают токсины ботулизма типов: А, В, С, D, Е, F. Они являются экотоксинами, строго специфичны в антигенном отношении и нейтрализуются только антитоксической сывороткой соответствующего типа. Токсин ботулизма считается самым ядовитым из всех известных ядов биологического происхождения. Он патогенен почти для всех видов животных. Человек очень чувствителен к этому яду. Наблюдались случаи тяжелых отравлений тогда, когда пострадавший только пробовал пищу, содержащую токсин, даже не проглотившая её. Токсин представляет собой белок, состоящий не менее чем из 19 аминокислот. Он относительно термостабилен. Прогревание при 80°C разрушает его не ранее чем через час; кипячение – через 10-15 минут; в воде менее стоек; сравнительно быстро разрушается под действием хлора, марганца и щелочей.

Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин) не разрушают токсины типов А, В, С, D, F и усиливают активность токсина Е во много раз. Токсины образуются в растительных и мясных продуктах там, где создаются условия анаэробно-гнилостного брожения (в банках консервов, в толще мяса и рыбы). Весьма характерным является гнездовое распределение токсина в пище. Поэтому наблюдались случаи отравления только одного лица из всех, употреблявших в пищу продуктов из одной консервной банки. Из лабораторных животных наиболее чувствительны белые мыши, морские свинки. При парентеральном введении токсина у них уже через 30 мин наступают явления интоксикации: адинамия, вялый паралич задних конечностей, расслабление мышц брюшного пресса, которое придает животному характерную форму «осиной талии». У человека наблюдается более или менее короткий инкубационный период от 2-4 до 24-36 часов. Описаны случаи длительной инкубации, когда от момента предполагаемого отравления до развития заболевания проходило 10-15 дней.

11.3 Лабораторная диагностика ботулизма

Материал для исследования. во всех случаях подозрительных на отравление ботулизмом исследуют:

1 Материалы, взятые от больного (промывные воды желудка, рвотные массы, кровь, испражнения);

2 Продукты, которые употреблялись в пищу заболевшими, остатками пищи;

3 В случае гибели пораженных исследуется секционный материал, кусочки печени, селезенки, кровь из сердца, содержимое желудка и кишечника.

Правила и нормы взятия материала. Материалы для исследования берут в стерильную стеклянную посуду и закрывают плотно пригнанными стеклянными, резиновыми, корковыми или закручивающимися пробками. Твердые объекты можно пересылать в лабораторию завернутыми в несколько слоев вощеной или пергаментной бумаги, целлофана. При отсутствии стерильной посуды пробы берут в любые банки, прокипяченные в течение 15 минут. Все материалы опечатывают, нумеруют, на банки наклеивают этикетки.

Взятые пробы должны быть направлены в лабораторию в кратчайший срок. До отправки они должны сохраняться на холоду. Остатки пищи доставляются в той же посуде, в которой были обнаружены.

Материалы от больного собираются в следующих количествах: промывные воды желудка, рвотные массы в объеме 50-100 мл, испражнения – 50-60 г; кровь 8-10 мл в стерильную пробирку, можно с добавлением 4%-го раствора лимоннокислого натрия в соответствии 1 часть на 3 части крови. Продукты: мясо 500 г из разных мест туши, рыба крупная из 2-3 мест у головы, спинки и анального отверстия. Мелкая рыба и птица отсылается целиком. Жидкие и полужидкие объекты по 200 г. Секционный материал: кусочки печени, селезенки, отрезки желудка и тонкого кишечника с содержимым берут в отдельные банки по 50-60 г.

Подготовка материалов к исследованию. При поступлении пробы в лабораторию отмечают и регистрируют характер упаковки, количество материала. Исследование начинают немедленно. Описывают запах, внешний вид, консистенцию. Бактериологическое исследование производится независимо от признаков порчи. Для посева плотных пищевых продуктов (мясо, колбаса, рыба и т.д.) стерильно вырезают кусочки весом в 25-30 г с поверхности и из глубины и растирают в стерильной ступке со стерильным песком и стерильным физиологическим раствором. Закрытые консервные банки вскрывают и исследуют согласно требованиям ГОСТа. Жидкие фекальные массы оставляют на 30 минут для отстаивания, густые размешивают в физиологическом растворе 1:10, исследуют верхний слой. Секционный материал – отрезок желудка, кишечника с содержимым, кусочки органов, растирают в ступке со стерильным песком и с добавлением

равного количества физиологического раствора. Взвесь отстаивается 1 час при комнатной температуре.

Бактериологическое исследование. При подозрении на ботулизм производится полный бактериологический анализ всех материалов с целью выделения и идентификация клостридий ботулизма по классической схеме, как это описано в разделе «Патогенные анаэробы». Однако особенно важным этапом диагностики является непосредственное обнаружение токсина ботулизма в исследуемом материале. Определение токсина ботулизма производится двумя методами: 1) с помощью биологической пробы (реакция нейтрализации) на белых мышах; 2) путем реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), которая не исключает биологической пробы. Методика её излагается в разделе «Индикация патогенных бактерий в объектах внешней среды».

Биологическая проба (реакция нейтрализации) на белых мышах. Суспензию, приготовленную из исследуемого материала, фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют. Фильтрат или центрифугат вводят белым мышам весом 16-18 г внутрибрюшинно в количестве 0,8 мл или в хвостовую вену в таком же объеме. При этом двум мышам вводится только испытуемый материал, а двум другим смесь материала с антитоксическими сыворотками. Для этого специально выпускаются сухие моновалентные типоспецифические диагностические сыворотки с титром не менее 1 000 АЕ в 1 мл. Смешивают в равном объеме сыворотки типов А, В, С, Е. Смесь этих сывороток по 0,2 мл добавляют к 0,8 мл исследуемого материала, выдерживают 30 минут при комнатной температуре и вводят белым мышам. Общий объем жидкости, водимой обеим парам мышей, должен быть одинаковым.

Наблюдение за животными продолжается 4 дня. Если в материале содержится токсин, то погибают две мыши, которые не получили сыворотки. При гибели всех 4 мышей, то есть тех, которым вводился материал с сывороткой и без сыворотки, необходимо повторить пробу с экстрактами, разведенными в 5-10, а иногда даже в 100 раз.

В случае болезни или гибели животных в течение срока наблюдения ставится реакция нейтрализации с моновалентными сыворотками. Для этого требуется 5 пар белых мышей, каждой паре вводится материал, смешанный с моновалентной сывороткой одного из типов.

Пятой паре вводится только исследуемый материал. Смеси, готовятся следующим образом: в пять пробирок наливают по 2,4 мл испытуемого материала (фильтрат или центрифугат). Затем в пробирки добавляют по 0,6 мл типоспецифических сывороток, в первую – типа А, во вторую – типа В и т.д. В пробирку № 5 добавляют 0,6 мл физиологического раствора. Смесь выдерживают при комнатной температуре 30 минут и вводят по 1 мл из каждой пробирки двум мышам. Для каждой сыворотке используется отдельный шприц. При этом выживает только та пара мышей, которая получила сыворотку, соответствующую типу токсина, содержавшегося в материале.

Картина болезни и гибели мышей от ботулизма довольно характерна. Появляется учащенное дыхание, расслабление всех мышц, западение мышц брюшной полости стенки (осиная талия) параличи и судороги перед смертью.

11.4 Специфическая терапия и профилактика

Специфическая терапия и профилактика ботулизма осуществляется с помощью антитоксических противоботулиновых сывороток. Для этой цели выпускаются поливалентные противоботулиновые сыворотки, содержащие антитела против токсинов А, В и Е, а также моновалентные против отдельных типов токсинов. Сыворотки вводятся, как правило внутримышечно в дозе 25 000-50 000 АЕ в сутки. В тяжелых случаях допускаются внутривенное введение их в тех же дозах.

По специальным показаниям для профилактических целей может быть применена активная иммунизация людей с помощью ботулиновых анатоксинов.

11.5 Стафилококковые интоксикации

Пищевые отравления, вызываемые стафилококками, возникают при употреблении в пищу продуктов, содержащих энтеротоксин этих микробов. Природа стафилококкового энтеротоксина окончательно не выявлена. Большинство исследователей полагают, что это токсическое вещество несколько отличается от экзотоксинов, обычно вырабатываемых стафилококками. Однако принято считать, что энтеротоксин образуется только патогенными разновидностями стафилококков. Вопрос о том, как часто среди них встречаются штаммы, способные образовывать энтеротоксин, не разрешен. Некоторые авторы находили эту способность у 75% коагулазоположительных штаммов. В то же время не удается обнаружить заметных биологических различий между представителями стафилококков, образующими и не образующими энтеротоксин.

Энтеротоксин стафилококков является термостабильным веществом. Он не разрушается при нагревании до 100°C в течение часа. При хранении в холодильнике (4°C) он не теряет полностью токсические свойства в течение 2 месяцев. В высушенном состоянии токсин может храниться без утраты токсичности до 8 месяцев. Он также длительно сохраняет свою активность при замораживании. Энтеротоксин устойчив к действию кислот и щелочей и не теряет активности в диапазоне рН от 4,5 до 8,2. Спирт, формалин, хлор в обычных концентрациях не разрушают энтеротоксин.

Алиментарные отравления стафилококковой природы чаще всего связаны с употреблением в пищу молочных продуктов (48,5% случаев) и консервов в масле (31,8%). Нарушение правил приготовления и хранения таких продуктов, как сметана, сливки, мороженое, сливочный крем, торты и пирожные, сырковая масса, ливерная колбаса, изделия из варенного мяса и

других может приводить к массовому обсеменению их патогенными стафилококками и служит причиной пищевой интоксикации.

Патогенные стафилококки попадают в пищевые продукты воздушно-капельным путем из зева носителей или контактным способом с рук людей, имеющих гнойничковые заболевания кожи. Давно известно, что заражение молока стафилококками наблюдается и тогда, когда оно получено от коров, больных гнойным воспалением вымени (маститом). Хранение обсемененных продуктов в тепле, при комнатной температуре приводит к бурному размножению стафилококков и выработке ими токсинов. Следует подчеркнуть, что при этом внешний вид, запах, цвет и вкусовые качества пищевых продуктов не изменяется. Клинически признаки стафилококкового отравления достаточно характерны. После короткого инкубационного периода от 1 до 6 часов развивается острое заболевание, сопровождающееся тошнотой, рвотой, болями в животе, поносом. Нередко наблюдаются явления сердечной слабости, резкое ослабление пульса, синюшность кожных покровов и слизистых, судороги, коллаптоидное состояние.

Следует отметить, что смертельные исходы при стафилококковой интоксикации встречаются редко.

11.6 Лабораторная диагностика пищевой стафилококковой интоксикации

Материал для исследования. Исследованию подлежат остатки пищи, рвотные массы, промывные воды и испражнения больных, смывы и соскобы со столов, посуды, столового инвентаря. Персонал, связанный с приготовлением пищи, обследуют на присутствие стафилококков в носу, зеве, на коже рук, в гное при наличии пиодермий.

Ход исследования. Две-три капли жидкого материала или суспензии плотных материалов засевают на поверхность молочно-солевого агара Петрович, желточно-солевого агара Чистовича и мясо-пептонного кровяного агара. Одновременно производят посев на жидкие среды накопления: мясо-пептонный бульон с 6,5% NaCl и мясо-пептонный бульон с 1% глюкозы.

В дальнейшем производятся выделение и идентификация чистой культуры, как это описано в пособии к практическим занятиям по микробиологии.

Обнаружение стафилококкового энтеротоксина. 1) Биологическая проба на котятках. Исследуемый жидкий продукт или суспензию (экстракт твердых продуктов 1:1 на стерильной дистиллированной воде) или 5-суточную молочную культуру исследуемого штамма стафилококков в количестве 20-25 мл вводят котяткам per os при помощи пипетки. Рвота и понос или только рвота, наступившие в сроки от 30 минут до 4 часов, свидетельствуют о наличии энтеротоксина. В опыте должны быть использованы 2-3 животных.

2) Биологическая проба на кошках. Исследуемый материал разводят стерильным физиологическим раствором 1:1, центрифугируют 1-1,5 часа.

Прозрачный центрифугат прогревают в кипящей водяной бане 30 минут, после чего вводят кошке в бедренную вену или вену уха в количестве 0,5-1 мл на 1 кг веса животного. Синдром интоксикации (рвота и понос или только рвота) появляется в период от 30 минут до 3 дней.

Установление энтеротоксичности стафилококковых культур. Для выявления способности испытуемого штамма вырабатывать энтеротоксин производится посев культуры на чашки Петри с питательной средой следующего состава: 0,75-1% агара на бульоне Мартена, Хоттингера или телячьем бульоне с 0,25% глюкозы, рН 7,2. Вносят в чашку две-три капли суточной бульонной культуры стафилококка и растирают по поверхности агара шпателем. Чашки выдерживают 2-3 суток в эксикаторе с 20% CO₂ при 37°C. После инкубации на поверхность питательной среды в чашку вливают 10 мл физиологического раствора. Агар измельчают шпателем и выдерживают 2 часа при комнатной температуре. Экстракт отсасывают пипеткой, фильтруют или центрифугируют, затем после прогревания испытывают в опыте на животных.

Для получения необходимой концентрации угольной кислоты на каждый титр объема эксикатора берется 1,0 двууглекислой соды, которую насыпают в чашку Петри на дно эксикатора.

Загрузив его чашками с посевом, приоткрывают крышку и пипеткой наливают на соду 210%-ную соляную или серную кислоту из расчета 8-9 мл на 1 г соды.

Ввиду широкого распространения в природе стафилококков, среди которых встречаются как патогенные, так и непатогенные штаммы, для подтверждения их этиологической роли в пищевом отравлении необходимо учитывать комплекс следующих признаков: 1) клиническую картину интоксикации; 2) степень обсемененности продуктов стафилококками при первоначальном исследовании; 3) характеристику и патогенные свойства выделенных штаммов, включая морфологию, пигмент, гемолитические свойства, образование летициназы и плазмоагулазы, токсинообразование (гемолитический титр токсина); 4) продукцию энтеротоксина; 5) результаты биологической пробы; 6) характер пищевых продуктов, вызванных отравление.

11.7 Пищевые отравления, вызванные *Cl. perfringens*

В последние годы появились данные о вспышках пищевых отравлений, вызванных *Cl. perfringens*. Такие вспышки носят спорадический или эпидемический характер. Обычно отравление вызывают недоброкачественные консервы (мясные, птичьи, рыбные, фруктовые и овощные), мясные и рыбные супы, соусы, колбасы, сало, молоко и т.п. Заболевание имеет инкубационный период от 6 до 24 часов. Начинается остро с появлением болей в животе и диареей. Стул до 20 раз в сутки. Через 24-48 часов все симптомы обычно исчезают, но иногда развиваются явления некротического энтерита. Принято считать, что наиболее тяжелые случаи

отравления обусловлены штаммами клостридий тип А, в то время как клостридии других типов вызывают острые кратковременные заболевания.

Биологические особенности *Cl. perfringens*. Различают 6 типов *Cl. perfringens* А, В, С, D, Е, F, которые отличаются по антигенным свойствам вырабатываемых ими токсинов. Микроскопически все типы клостридий выглядят одинаково и представляют собой крупные грамположительные палочки, способные образовывать капсулу. Они неподвижны и не имеют жгутиков. Образуют центральные или субтерминальные споры. Растут хорошо на плотных и жидких питательных средах. Из жидких сред наиболее пригодны гидролизаты мяса или казеина рН=7,4. Они также хорошо культивируются на мясном бульоне с ватой, мясным фаршем или кусочками печени. Из плотных сред наиболее подходящей является сахарно-кровяной агар.

Распространение возбудителя в природе и устойчивость к физическим и химическим факторам. В естественных условиях *Cl. perfringens* встречаются повсюду, особенно тип А: в почве, пыли, испражнениях людей и животных, в воде рек, озер, в иле, на различных предметах. Другие типы обнаруживаются реже. Вегетативные формы этих микробов обычно быстро погибают при действии кислорода воздуха, солнечного света, высокой температуры, кислот, щелочей, спиртов, дезинфицирующих жидкостей и некоторых антибиотиков. Споры *Cl. perfringens* обычно погибают при кипячении в течение 15-30 минут. Однако отдельные штаммы типа А, и особенно типа F, образуют термоустойчивые споры, переносящие кипячение от 1 до 6 часов.

11.8 Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых *Cl. perfringens*

Во всех случаях острых пищевых отравлений необходимо производить исследования на присутствие *Cl. perfringens* и их токсинов. Анализ производят с целью непосредственного обнаружения токсинов *Cl. perfringens* в испражнениях больного, в содержимом тонкого кишечника и перитонеальной жидкости трупов. В то же время материал исследуется на присутствие в нем самого возбудителя. Для исследования служат продукты, вызвавшие пищевое отравление, а также материалы от больного: рвотные массы, промывные воды желудка, кровь, испражнения. Из всех полученных материалов, кроме крови, готовят экстракты так же, как при исследовании на ботулизм.

С экстрактами ставят реакцию нейтрализации на белых мышах, так же как и при исследовании на ботулиновый токсин. В опыт берут сыворотку антиперфрингенс типа А. когда такое прямое определение токсина не удается, большое диагностическое значение имеет обнаружение любого сильнотоксигенного штамма типов А, В, С, D, Е и F.

Выделение чистой культуры этих микробов производится по правилам, описанным в пособии к практическим занятиям по курсу медицинской микробиологии.

Культуры, в которых находят типичные для *Cl. perfringens* палочки, проверяют на токсигенность в реакции нейтрализации на белых мышах.

12. Микотоксикозы

Микотоксикозы – это незаразные заболевания, возникающие чаще всего у животных и реже у людей при попадании с пищей или через дыхательные пути веществ, вырабатываемых токсическими грибами. При этом сами грибы не развиваются в организме животных и человека, а причиной отравления служат ядовитые продукты их метаболизма.

В зависимости от ряда факторов, в особенности от количества ядовитых продуктов, поступивших в организм, могут развиваться острые, подострые или хронические формы микотоксикозов. Встречается две разновидности токсических грибов: грибы-паразиты, развивающиеся на жизнеспособных, вегетирующих растениях, грибы-сапрофиты, обсеменяющие растительные продукты и корма. Заболевания, вызываемые токсическими грибами у человека, до некоторой степени условно можно разделить на две группы, в зависимости от способа проникновения в организм ядовитых веществ.

1 Алиментарные токсикозы, при которых токсические субстанции проникают в организм только через пищеварительный тракт. Эти заболевания характеризуются явлениями общего токсикоза и поражениями центральной нервной системы. Местные процессы в виде некроза или гангрены носят вторичный характер. К этой группе относятся клавицепстоксикозы (эрготизм).

2 Алиментарно-респираторные токсикозы, когда токсические вещества поступают в организм через пищеварительный тракт и респираторным путем. Заболевания характеризуются явлениями общей интоксикации с клиническими симптомами поражения различных органов и систем. В результате непосредственного воздействия яда на месте попадания токсических грибов развивается некроз кожи или слизистых, ринит, конъюнктивит, бронхит, пневмония. К этой группе относятся стахиботриотоксикоз, дендродохиотоксикоз, фузариотоксикозы.

12.1 Клавицепстоксикозы (*Claviceptoxicosis*) эрготизм

Заболевания возникают при попадании в пищу злаков, пораженных грибами *Claviceps* (класс *Ascomycetes*, сумчатые грибы).

Наиболее известным у человека является эрготизм (от фран. *ergot* - рожки), заболевание, вызываемое грибом *Claviceps purpurea*. Оно возникает при употреблении в пищу зерна и муки, содержащих примесь так называемой спорыньи. Спорынья или маточные рожки (*Secale cornutum*) представляют собой склероций гриба *Claviceps purpurea*. Это удлиненные в

виде рожка трехгранные образования величиной от нескольких миллиметров до 5 см, представляющие собой половую стадию размножения гриба. Поражается ими чаще всего рожь. В рожках спорыньи содержатся ядовитые алкалоиды: эрготоксин, эрготомин и др. токсическое начало спорыньи весьма стойко. Оно сохраняет свою ядовитость годами. По госту примесь спорыньи в муке не должна превышать 0,05%.

Острое отравление спорыньей характеризуется резко выраженными гастроэнтеритом и поражением ЦНС (судороги, парестезии). Заболевание хроническое, имеет две формы нервную и гангренозную. Спорынья встречается во всех странах мира.

12.2 Стахиботриотоксикоз (Stachybotryotoxicosis)

Болезнь вызываемое грибом *Stachybotrys alternans*, последний относится к классу несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*). Распространен почти повсеместно. Обитает в почве. Развивается на субстратах богатых клетчаткой – соломе, сене, зерне, где образуется черный, легко снимающийся налет. Токсические вещества в субстратах появляются параллельно с процессом спорообразования и накопления пигмента, приблизительно на 3-4-е сутки. Болеют люди, соприкасающиеся с кормами (соломой, половой), пораженными грибами. Первичные симптомы – головная боль, слабость, температура, иногда носовое кровотечение. Позднее развивается катаральное воспаление слизистых оболочек носа, зева, рта, бронхов, конъюнктивы, появляются сыпи, переходящие в дерматиты.

12.3 Дендродохиотоксикоз (Dendrodochiotoxicosis)

Заболевание, возникающее при работе с кормами (сено, солома, мякина и др), пораженными грибом *Dendrodochium toxicum*. Гриб-сапрофит относится к классу несовершенных грибов, растет на кормах, богатых клетчаткой. Поражает солому, полу, сено. Из клинических признаков характерными являются диффузное воспаление кожи лица и катаральный конъюнктивит.

12.4 Фузариотоксикозы (Fusariotoxicosis)

Фузариотоксикозы – отравления, возникающие в результате употребления в пищу злаков, пораженных грибами рода Фузариум (*Fusarium*). Описываются следующие формы заболевания, вызываемые разновидностями этих грибов.

1 Алиментарно-токсическая алейкия (АТА) или септическая ангина. Наблюдалась в 1942-1945 гг. при употреблении в пищу злаков пшеницы, проса и др., перезимовавших под снегом. Возбудителем заболевания является гриб *Fusarium sporotrichioides*, способный развиваться при низких температурах (до 0°C).

2 Отравление «пьяным хлебом». Впервые отмечено в конце XIX века на Дальнем Востоке. В тридцатых годах прошлого столетия оно стало известным в Западной Европе и США. Хлеб из зерна, пораженного грибом *Fusarium graminearum*, вызывал отравление с поражением ЦНС. В числе симптомов отмечались головная боль, головокружение, нарушение походки, иногда эйфория, напоминающая опьянение (отсюда возникло выражение «пьяный хлеб»).

3 Уровская болезнь (болезнь Кашина-Бека). Под этим названием описано в 1865 г. эпидемическое заболевание с поражением костно-суставного аппарата преимущественно у детей. Как выяснилось позднее, причиной болезни служит употребление в пищу продуктов, приготовленных из злаков (пшеницы, ржи и др.), пораженных токсическим грибом *Fusarium sporotrichiella*. Яд гриба устойчив к высокой температуре и сохраняется при выпечке хлеба. Профилактика заболевания заключается в соблюдении тщательного контроля за зерном.

FOR AUTHOR USE ONLY

ПРИЛОЖЕНИЕ

Рецептура некоторых питательных сред, употребляемых в санитарной микробиологии

Жидкие среды для бродильных проб на кишечную палочку

Глюкозопептонная среда (по бывшему госту 5216-63)

Разведенная (одинарной концентрации). Растворяют в 1 л воды 10 г пептона и 5 г хлористого натрия, нагревают до кипения, отфильтровывают, добавляют 5 г глюкозы, устанавливают рН в пределах 7,4-7,8, разливают по 10 мл в пробирки с поплавками и стерилизуют дробно (текучим паром).

Концентрированная (десятикратной концентрации). Те же ингредиенты берутся в десятикратном количестве на 1 л, ход приготовления тот же, рН устанавливается такой же, но разливка среды производится в меньших объемах: в пробирки с поплавками по 1 мл и в колбы или склянки (емкостью 250-500 мл) – по 10 мл.

Среда Булижа. К обычному мясо-пептонному бульону прибавляют 0,25% маннита, после его растворения устанавливают рН=6,8-7,0 и кипятят 10-15 минут, затем добавляют водный насыщенный раствор нейтральрот до ясной вишневой окраски, после чего фильтруют и разливают в колбы (по 50 мл среды одинарной концентрации и по 100 мл среды двойной концентрации) и в пробирки с поплавками (по 5 мл среды одинарной концентрации). Стерилизуют при 120° 15 минут.

При отсутствии маннита его можно заменить в среде Булижа глюкозой в той же концентрации, но тогда стерилизацию следует производить дробно (три дня подряд по 20 минут ежедневно).

Можно также при массовых исследованиях пользоваться для посева 10 мл исследуемой жидкости. Вместо колб с 50 мл среды одинарной концентрации пробирками с 5 мл среды тройной концентрации, приготавливаемой соответственно той же прописки.

Среда Кесслер. В 1 л воды добавляют 10 г пептона и 50 мл бычьей желчи. Кипятят, помешивая 20-30 минут. Фильтруют через вату, растворяют 2,5 г лактозы и доводят до 1 л. Устанавливают рН=7,4-7,6 и добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора генциан-виолета на 1 л среды. Разливают в пробирки с поплавками по 5 мл и стерилизуют при 120° 15 минут.

В некоторых случаях, например, при посеве разведений почвенной суспензии пользуются разведенной средой Кесслер, где также устанавливается рН=7,4-7,6.

Среда Краевской. Чистую свежую желчь фильтруют через ватный фильтр. Стерилизуют при 120° 10 минут и ещё раз фильтруют через ватный фильтр. К фильтрату добавляют 1% лактозы и 1% пептона. Смесь нагревают в текущем пару 10 минут, а затем прибавляют 4 мл 1%-ного раствора

генциан-виолета на 1 л среды. Среду разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 120° в течение 15 минут.

Плотные дифференциальные среды для группы кишечной палочки

Среда Эндо (по госту 5216-63). Накануне готовят 10%-ный раствор основного фуксина в 95%-ном этиловом спирте. Раствор перед употреблением профильтровывают. Непосредственно перед приготовлением среды:

А. в отдельную стерильную пробирку наливают 0,5 мл отфильтрованного 10%-ного спиртового раствора основного фуксина, к которому добавляют 10%-ный раствор сернокислого безводного (или кристаллического) натрия для получения ярко-розового окрашивания;

Б. 0,5 г лактозы растворяют в 2-3 мл стерильной воды и прогревают на водяной бане при 100° в течение 5 минут.

К 100 мл предварительно расплавленного 2%-ного МПА (рН=7,4-7,6) добавляют в указанном порядке раствор лактозы (пункт Б) и все количество раствора основного фуксина, смешанного с сульфитом натрия, как указано в пункте А.

Среда перемешивается вращением флакона и разливается в чашки Петри. Готовый фуксин-сульфитный агар Эндо в чашках должен иметь после охлаждения кремовую окраску. Его следует готовить по мере надобности (на текущий день или на 1-2 дня вперед). Остаток неиспользованной готовой среды можно сохранять в течение указанного срока в колбочке (флаконе) в прохладном темном месте.

Модификация среды Эндо для ускоренного (12-часового) анализа по Барсову (с добавлением ростовых флаконов). Это модификация применяется в двух вариантах, в зависимости от способа приготовления исходного питательного агара:

Первый рецепт: мясного лизата – 30 г, пептона сухого – 10 г, агар-агара – 30 г, воды – 1 л.

Второй рецепт: дрожжевого автолизата – 50 г, мясного лизата – 10 г, пептона сухого – 10 г, агар-агара – 30 г, воды – 1 л.

В обоих случаях перед стерилизацией устанавливается рН=7,2.

Приготовление модифицированной среды Эндо. К 100 мл питательного агара, приготовленного по одному из двух вышеуказанных рецептов, добавляют лактозы 1,5 г, соды углекислой 0,4 г, сульфита натрия (безводного) 0,4 г, насыщенного спиртового раствора основного фуксина 0,8 мл в следующем порядке: навески лактозы и соды смешивают и растворяют в 4-5 мл стерильной воды при кипячении, затем эту смесь охлаждают и в нее добавляют навеску сульфита в сухом виде, туда же пипеткой приливают раствор фуксина. Пробирку, в которой производилось это смешивание, споласкивают 2-3 раза расплавленным агаром, чтобы снять полностью сульфит, остающийся частично на снегах пробирки.

Затем в среду, приготовленную по первому варианту, обязательно добавляют 1-2 мл настоя ростков ячменя. Если же среда готовилась по второму рецепту (с дрожжевым автолизатом), то добавление настоя ростков ячменя не является обязательным.

Используемый здесь насыщенный раствор фуксина рекомендуется готовить за 1-2 часа до приготовления дифференциальной среды, для чего в пробирку всыпают 0,1 г сухого основного фуксина и добавляют спирта этилового 95-96° 1 мл, закрывают пробирку корковой пробкой и ставят на 1-2 часа в термостат для насыщения при 37°С.

Приготовление настоя из ростков ячменя. К 100 мл стерильной воды добавляют 5 г сухих ростков ячменя и прогревают в колбе на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Настой пригоден только в течение двух суток.

Среда с лактозой и ТТХ. К 100 мл мясо-пептонного бульона прибавляют 0,5 г лактозы и после ее растворения устанавливают рН=6,2-6,4. Среду разливают в пробирки по 9 мл и в колбы по 50 мл и стерилизуют при 112° в течение 20 минут. После охлаждения среду помещают в термостат на сутки для проверки на стерильность. Перед посевом в каждую пробирку с лактозным бульоном прибавляют по 0,3 мл 2%-ного водного раствора ТТХ, а в каждую колбу – по 1,5 мл. Раствор ТТХ следует хранить в темной склянке; срок годности раствора 2 месяца.

Приготовление дрожжевого гидролизата. Пекарские дрожжи разводят водой в соотношении: 1 кг дрожжей на 3-5 л воды, подогревают до 55-58°. Тщательным перемешиванием получают равномерную взвесь дрожжей, которую сливают в стеклянные бутылки и ставят в термостат при температуре 50-55° на 18-24 часа для аутолиза. По окончании этого процесса бутылки с автолизатом стерилизуют в автоклаве 15 минут при 120°. После стерилизации дрожжевой автолизат хранится впрок при комнатной температуре. Через сутки он отстоится: на дне выпадает осадок нерастворившихся дрожжевых клеток, а сверху будет прозрачный слой, который и употребляется для вышеуказанной среды. К прозрачному слою дрожжевого автолизата перед приготовлением среды прибавляют 0,5% хлористого натрия в 0,1% двухзамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4).

Упомянутый в рецептуре мясной лизат выпускается готовым продуктом в любом мясокомбинате.

Розоловый двусахарный дифференциальный агар (среда Киченко). К расплавленному МПА добавляют 5% желчи, 1% лактозы и 0,1% глюкозы. Хорошо смешивают, затем фильтруют через вату и устанавливают рН=7,2-7,5. Прибавляют 0,2 мл 5%-ного спиртового раствора розоловой кислоты на 100 мл среды (раствор розоловой кислоты должен быть свежим). Среду разливают в небольшие пробирки до одной трети их высоты и стерилизуют в автоклаве при 120° 20 минут или дробно текучим паром. Агар скашивают так, чтобы оставался достаточно высокий столбик среды. Готовая среда имеет розовый цвет. Существует вариант этой же среды, в котором, кроме

розовой кислоты, содержится ещё 2 мл 1%-ного спиртового раствора бромтимолблау. В этих случаях среда имеет коричневый цвет.

Элективные плотные среды для стафилоккока

Среда Чистовича. Желток одного свежего куриного яйца, извлеченный с соблюдением правил асептики, взбалтывают в 200 мл стерильного физиологического раствора хлористого натрия. Полученную эмульсию желтка хранят в холодильнике неопределенно долгое время. Заготавливают обычный мясо-пептонный агар, но с 10%-ной концентрацией хлористого натрия. По мере надобности этот агар расплавляют и, остудив его до 45°, добавляют в него эмульсию желтка в количестве 10, 15 или 20% к объему среды. Быстро смешав ингредиенты, среду разливают в чашки Петри. При посеве на эту среду рост всех микробов, кроме стафилоккока, резко затормаживается. Вокруг колоний патогенных стафилококков образуется зона помутнения, которая в первые сутки бывает выражена ещё слабо, а через 48 часов хорошо.

Среда Гамовой-Каюковой. К мясо-пептонному агару (рН=7,2-7,4) добавляют 6-7% хлористого натрия. Стерилизуют при 120° 15 минут. По мере надобности этот агар расплавляют и, остудив его до 45°, добавляют к нему ex ferre свежую человеческую кровь или баряни эритроциты, как при приготовлении обычного кровяного агара.

После тщательного перемешивания среду разливают в теплые чашки для застывания.

Среды для выращивания грибов

Сусло-агар. Неохмеленное сусло, полученное с пивоваренного завода (плотность 16-18° по Баллингу) разбавляют в 2 раза водопроводной водой, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 112° 30 минут.

На стерилизованном сусле готовят 2%-ный агар, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 112° 30 минут. Для выращивания плесеней устанавливают при приготовлении этой среды рН-6,5.

Глюкозный агар Сабуро (среды стерилизуют при 1 атм. в течение 15 минут): глюкоза – 4 г, пептон – 1 г, агар-агар – 1,8 г, вода – 100 мл.

Среда Георга: агар Сабуро (с глюкозой), циклогексимид или актидион – 0,05 мг/мл, левомицетин – 0,05 мг/мл.

Глюкозный бульон Сабуро: глюкоза – 40 г, пептон – 10 г, вода – 1000 мл.

Агар Литмана с бычьей желчью: пептон – 10 г, глюкоза – 10 г, бычья желчь сухая – 15 г, кристаллвмолет – 0,01 г, вода – 1000 мл, агар-агар – 20 г.

Тесты

1. Перечислите 5 основных групп микроорганизмов:

1. *бактерии
2. *актиномицеты
3. *микроскопические грибы
4. *простейшие
5. *микоплазмы
6. бациллы
7. серобактерии
8. псевдомонады
9. фузобактерии
10. коринобактерии

2. Перечислите 3 вида патогенных микроорганизмов относящихся к клостридиям:

1. *возбудитель столбняка
2. *возбудитель ботулизма
3. *возбудитель газовой гангрены
4. возбудитель дифтерии
5. возбудитель дизентерии
6. возбудитель паратифа

3. Приведите 5 микроорганизмов, которые обнаруживаются в зубном налете:

1. *лептотрихи
2. *грибы
3. *различные кокки
4. *вибрионы
5. *спирохеты
6. дифтероиды
7. бактериоиды
8. микобактерий
9. фузобактерий
10. клебсиеллы

4. Назовите 3 физических фактора внешней среды неблагоприятно действующих на микроорганизмы:

1. *высокая температура
2. *излучение
3. *ультразвук
4. давление
5. механический фактор
6. кипячение

5. Укажите 5 свойств характеризующих экзотоксины:

1. *являются белками
2. *резко выраженная токсичность
3. *избирательное действие
4. *вызывают образование специфических антител
5. *термолабильны
6. состоят из глиуцидо-липидо-протеиновых комплексов
7. менее токсичны
8. избирательное действие выражено слабо
9. термические
10. не вызывает образование специфических антител

6. Какими 4 характерными свойствами обладают эндотоксины:

1. *состоят из глиуцидо-липидо-протеиновых комплексов
2. *менее токсичны
3. *избирательное действие выражено слабо
4. *термоустойчивы
5. являются белками
6. резко выражена токсичность
7. избирательное действие
8. термический

7. Назовите 4 морфологических свойств E.coli:

1. *палочковидные
2. *беспорядочно расположенные
3. *грамотрицательные
4. *подвижные
5. шарообразная
6. грамположительные
7. неподвижные
8. располагаются цепочкой

8. Укажите 3 характерные особенности колоний кишечной палочки на среде Эндо:

1. *гладкие
2. *средние размеры
3. *темно-красного цвета
4. шероховатые
5. бледно синего цвета
6. мелкие размеры

9. Назовите 3 фактора патогенности кишечной палочки:

1. *реснички (фимбрии)
2. *эндотоксин
3. *экзотоксин (энтеротоксин)

4. токсин
5. гемолизин
6. гистотоксин

10. Назовите 3 типа кишечной патологии у детей в зависимости от серотипа кишечной палочки:

1. *колиэнтериты
2. *дизентериеподобные заболевания
3. *холероподобные заболевания
4. нефрит
5. гепатит
6. сепсис

11. Укажите 4 подрода входящие в род салмонелл:

1. *S kauffmani
2. *S salamae
3. *S arizonae
4. *S houtenau
5. S туберкулёзис
6. S Григорьева-Шига
7. S ауреус
8. S пневмония

12. Назовите 5 основных видов салмонелл вызывающих токсикоинфекцию:

1. *S. enteritidis
2. *S. Cholerae-suis
3. *S. typhimurium
4. *S. hedelberg
5. *S. anatum
6. S tuberculosis
7. S pneumonia
8. S rostoc
9. S moscow
10. S london

13. Какие 3 антигена различают у салмонелл:

1. *О-соматический
2. *Н-жгутиковыи
3. *Vi-вирулентный
4. К-капсульный
5. О-протективный
6. М- биохимический

14. Перечислите 5 видов возбудителей анаэробной инфекции:

1. *Clostridium perfringens
2. *Cl novyi
3. *Cl histol-ticum
4. *Cl septicum
5. *Cl sordelli
6. V cholerae
7. F tularensis
8. Br abortus
9. B pertusis
10. Bac anthraxis

15. Перечислите 3 симптома отравления при ботулизме:

1. *параличи глазных мышц, птоз, расширение зрачков
2. *затруднение глотания
3. *афония, глухота
4. отит
5. цистит
6. нефрит

16. Назовите 3 меры профилактики при ботулизме:

1. *правильная технология обработки продуктов
2. *правильное хранение мясных продуктов и рыбы
3. *изъятие из продажи бомбажных консервированных банок
4. введения вакцины СТИ
5. назначение антибиотиков
6. правильное хранение молочных продуктов

17. Назовите 3 основные среды на которых выращивают стафилококки:

1. *МПА
2. *молочно-солевой агар
3. *кровяной агар
4. Ру
5. щелочной агар
6. эндо

18. Назовите 3 вида стафилококков:

1. *Стаф.ауреус
2. *Стаф.эпидермидис
3. *Стаф.сапрофитикус
4. Стаф.пневмония
5. Стаф.туберкулёзис
6. Стаф.поратуберкулёзис

19. Какие 3 пигмента вырабатывают стафилококки:

1. *золотисто-желтый
2. *желтый
3. *белый
4. коричневый
5. черный
6. красный

20. Назовите 3 основные свойства, которые отличают патогенные кокки от непатогенных:

1. *гемолитические
2. *расщеплять аргинин
3. *плазмокоагулирующие
4. фибринолитические
5. образование пигмента
6. расщеплять глюкозу

21. Назовите основные 4 ферментативные свойства стафилококков:

1. *разжижать желатин в виде воронки
2. *свертывать молоко
3. *восстанавливать нитраты в нитриты
4. *ферментировать ряд углеводов до кислоты
5. не расщеплять глюкозу
6. не расщеплять лактозу
7. не разжижают желатин
8. не ферментировать углеводы до кислоты

22. Назовите 3 фактора патогенности стафилококков:

1. *экзотоксин
2. *эндотоксин
3. *ферменты агрессии
4. наличие капсулы
5. фибринолитические свойства
6. летальный токсин

23. Назовите 4 вида токсина стафилококков:

1. *гемолизин
2. *лейкоцидин
3. *дермонекротоксин
4. *энтеротоксин
5. плазмокоагулаза
6. лецитиназа
7. нейроминидаза
8. капсульный полимераз

24. Стафилококки вырабатывают 5 основных фермента агрессии:

1. *плазмакоагулаза
2. *гиалуронидаза
3. *фибринолизин
4. *лецитиназа
5. *дезоксирибонуклеаза
6. гемолизин
7. лейкоцидин
8. энтеротоксин
9. дермонекротоксин
10. гемаагглютинин

25. Назовите 4 типа антигена стафилококков:

1. *полисахарид А
2. *полисахарид В
3. *полисахарид С
4. *белковый
5. М-белок
6. Н- липидный
7. С-реактивный белок
8. Н-антиген

FOR AUTHOR USE ONLY

Список использованной литературы

- 1 **Беляев С.А.** Микробиология / С.А. Беляев. - Москва: Лань, 2016. – 496 с.
- 2 **Белясова Н.А.** Микробиология / Н.А. Белясова. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 443 с.
- 3 **Блинов Л.Н.** Санитарная микробиология / Л.Н. Блинов. - Москва: Лань, 2016. – 240 с.
- 4 **Блинов Л.Н.** Микробиология и иммунология / Л.Н. Блинов. – Москва: Лань, 2013. – 240 с.
- 5 **Борзова Л.Д.** Ветеринарная микробиология и иммунология / Л.Д. Борзова. – Москва: Лань, 2016. – 368 с.
- 6 **Борисов Л.Б.** Медицинская микробиология и микология / Л.Б. Борисов. – Москва: МИА, 2015. – 736 с.
- 7 **Бородин А.Н.** Ветеринария, микробиология и микология / А.Н. Бородин. – Москва: Лань, 2014. – 624 с.
- 8 **Брюханов А.Л.** Молекулярная микробиология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. – Москва: МГУ, 2012. – 480 с.
- 9 **Волина Е.Г.** Частная микробиология / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова. – Москва: РУДН, 2016. – 222 с.
- 10 **Ганина В.И.** Техническая микробиология продуктов животного происхождения / В.И. Ганина, Н.С. Королева, С.А. Фильчакова. – Москва: ДеЛи принт, 2014. – 352 с.
- 11 **Госманов Р.Г.** Микробиология и иммунология / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галлиуллин. – Москва: Лань, 2013. – 240 с.
- 12 **Госманов Р.Г.** Микробиология / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галлиуллин. – Москва: Лань, 2013. – 296 с.
- 13 **Госманов Р.Г.** Санитарная микробиология пищевых продуктов / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев. – Москва: Лань, 2015. – 560 с.
- 14 **Дейша-Сионицкая М.А.** Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / М.А. Дейша-Сионицкая. – Москва: Лань, 2016. – 588 с.
- 15 **Джей Д.М.** Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Д. Лесснер. - Москва: БИНОМ. ЛЗ, 2012. – 886 с.
- 16 **Долганова Н.В.** Микробиология рыбы и рыбных продуктов / Н.В. Долганова, Е.В. Першина, З.К. Хасанова. – Москва: Лань, 2012. – 2588 с.
- 17 **Донецкая Э.Г.** Клиническая микробиология / Э.Г. Донецкая. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 480 с.
- 18 **Емцев В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев. – Люберцы: Юрайт, 2016. – 445 с.
- 19 **Ивчатов А.Л., Малов В.И.** Химия воды и микробиология / А.Л. Ивчатов, В.И. Малов. – Москва: НИЦ ИНФРА-М, 2013. – 218 с.
- 20 **Ивчатов А.Л.** Микробиология / А.Л. Ивчатов. - Москва: АСВ, 2013. – 120 с.

- 21 **Ившина И.Б.** Большой практикум. Микробиология / И.Б. Ившина. – Москва: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
- 22 **Каракулов А.В.** Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи / А.В. Каракулов, С.А. Быков, А.С. Быков. - Москва: БИНОМ, 2012. – 328 с.
- 23 **Кисленко В.Н.** Ветеринарная микробиология и иммунология / В.Н. Кисленко. – Москва: Лань, 2012. – 368 с.
- 24 **Колычев Н.М.** Ветеринарная микробиология и микология / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. – Москва: Лань, 2014. – 624 с.
- 25 **Коротяев А.И.** Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – Москва: СпецЛит, 2012. - 760 с.
- 26 **Кочемасова З.Н.** Микробиология / З.Н. Кочемасова, С.А. Ефремова, Ю.С. Набоков. – Москва: Альянс, 2014. – 352 с.
- 27 **Красникова Л.В.** Микробиология / Л.В. Красникова. – Москва: Троицкий мост, 2012. – 296 с.
- 28 **Левинсон У.** Медицинская микробиология и иммунология / У. Левинсон. - Москва: Бином, 2015. – 181 с.
- 29 **Мальцев В.Н.** Медицинская микробиология и иммунология / В.Н. Мальцев, Е.П. Пашков. – Москва: Наука, 2014. – 512 с.
- 30 **Мартинчик А.Н.** Микробиология, физиология питания, санитария / А.Н. Мартинчик, А.А. Королев, Ю.В. Несвижский. – Москва: ИЦ Академия, 2012. – 352 с.
- 31 **Нагорный В.С.** Микробиология рыбы и рыбных продуктов / В.С. Нагорный. – Москва: Лань, 2016. – 288 с.
- 32 **Нетрусов А.И.** Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – Москва: ИЦ Академия, 2012. – 384 с.
- 33 **Никитина Е.В.** Микробиология / Е.В. Никитина. - Гомель: ГИОРД, 2012. – 368 с.
- 34 **Павлович С.А.** Микробиология с вирусологией и иммунологией / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2018. – 799 с.
- 35 **Подколзина В.А.** ВПС: Медицинская микробиология / В.А. Подколзина, А.А. Седов. – Москва: Приор, 2017. – 222 с.
- 36 **Прист Ф.** Микробиология пива / Ф. Прист, И. Кемпбелл. - Москва: Профессия, 2015. – 368 с.
- 37 **Просеков А.Ю.** Общая биология и микробиология / А.Ю. Просеков. – Москва: Проспект Науки, 2012. – 320 с.
- 38 **Рубина Е.А.** Микробиология, физиология питания, санитария / Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – Москва: Форум, НИЦ ИНФРА-М, 2013. – 240 с.
- 39 **Скокан Л.Е.** Микробиология основных видов сырья и полуфабрикатов в производстве кондитерских изделий / Л.Е. Скокан, Г.Г. Жарикова. - Москва: ДеЛи принт, 2016. – 148 с.
- 40 **Черкес Ф.К.** Микробиология / Ф.К. Черкес, Л.Б. Богоявлинская. – Москва: Альянс, 2014. – 512 с.
- 41 **Асонов Н.Р.** Микробиология / Н.Р. Асонов. - Москва: Колос С, 2017. – 352 с.

- 42 **Емцев В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – Москва: Дрофа, 2014. – 448 с.
- 43 **Колычев Н.М.** Ветеринарная микробиология / Н.М. Колычев. – Москва: Колос, 2014. – 432 с.
- 44 **Колычев Н.М.** Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. – Москва: Колос, 2016. – 432 с.
- 45 **Сидоренко О.Д.** Микробиология / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Л.И. Войнова. – Москва: Инфа М, 2015. – 287 с.
- 46 **Степаненко П.П.** Микробиология молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко. – Москва: Колос, 2009. – 415 с.
- 47 **Ерденова Н.А.** Изучение влияния красного фосфора на процессы самоочищения воды / Н.А. Ерденова, К.Ж. Аширбекова, А.Т. Кенжебаева, З.Р. Садирова, Ш.Т. Базарбаева, У.А. Алшериева, Г.К. Аширбеков, А.Д. Тянь / Материалы III съезда врачей и провизоров РК / под общ. ред. Н.А. Ерденовой. – Астана: 2017. – II том. – С. 73-74.
- 48 **Лукашев А.А.** Исследование действий некоторых химических веществ на процессы самоочищения водоемов / А.А. Лукашев, Г.К. Аширбеков, А.Д. Тянь, А.Т. Кенжебаева, Н.А. Умбеталиева, Б.А. Мусаева, С.Ш. Нурмагамбетова, Ш.Т. Базарбаева, Л.С. Шарасулова / Республиканская научно-практическая конференция «Экология промышленного региона и здоровье населения», посвященная 70-летию академика НАН РК Кулқыбаева Г.А. / под общ. ред. А.А. Лукашева. – Караганда: 2018. – С. 82-84.
- 49 **Молдалиев Ы.С.** Влияние некоторых химических веществ на процессы самоочищения водоемов / Ы.С. Молдалиев, Г.К. Аширбеков, К.Ж. Аширбекова, Н.А. Умбеталиева, Б.А. Мусаева // Хабаршысы. – Вестник МКТУ им. А. Ясави. – 2012. - № 6 (72). – С. 208-211.
- 50 **Молдалиев Ы.С.** Изменение органолептических свойств воды при добавлении некоторых химических веществ / Ы.С. Молдалиев, Г.К. Аширбеков, К.Ж. Аширбекова, Н.А. Умбеталиева, Б.А. Мусаева // Хабаршысы. – Вестник МКТУ им. А. Ясави. – 2012. - № 6 (72). – С. 225-228.
- 51 **Лукашев А.А.** Исследование органолептических свойств воды при добавлении химических веществ / А.А. Лукашев, Г.К. Аширбеков, А.Д. Тянь, Н.А. Умбеталиева, Б.А. Мусаева, С.Ш. Нурмагамбетова, Ш.Т. Базарбаева, Л.С. Шарасулова / Международная научно-практическая конференция «Здоровье и питание», посвященной 80-летию со дня рождения академика Шарманова Т.Ш. / под общ. ред. А.А. Лукашева. – Алматы: 22 октября 2017. – С. 109-110.
- 52 **Аширбеков Г.К.** Важность процессов самоочищения водоемов при метафосфорной кислоте / Г.К. Аширбеков, Р.Б. Жумабекова, Д.М. Ахтаманов, И.М. Рузаева // Вестник КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова. - № 4. – 2020. - С. 372-374.
- 53 **Badiane N.N.Y.** Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semiarid tropical regions / N.N.Y. Badiane, J.L. Chotte, E. Pate // Applied Soil Ecology. - 2012. - Vol. 18. - № 3. – P. 687.

54 **Казеев К.Ш.** Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков. - Ростов-на-Дону, Дума, 2013. – 67 с.

55 **Галиулин Р.В.** Ферментативная индикация загрязнения почв тяжелыми металлами / Р.В. Галиулин, Р.А. Галиулина // Агрохимия. - 2016. - № 11. – С. 45-62.

56 **Громова В.В.** Оценка ферментативной активности городских почв на примере г. Обнинска / В.В. Громова, Н.Н. Павлова / Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: материалы конференций / под общ. ред. В.В. Громовой. - Киров, 2017. – С. 89.

57 **Федорец Н.Г.** Методика исследования почв урбанизированных территорий / Н.Г. Федорец, М.В. Медведева // Петрозаводск. - 2019. – С. 45-48.

FOR AUTHOR USE ONLY

Содержание

Перечень сокращения, условных обозначений, символов, единиц и терминов	
1. Санитарно-бактериологическое исследование воды	7
1.1 Санитарно-показательные микроорганизмы	
1.2 Методика санитарно-бактериологического исследования воды	
1.3 Определение микробного числа воды	
1.4 Определение количества бактерий – показателей фекального загрязнения (группы кишечной палочки)	
1.5 Определение коли-титра воды двухфазным бродильным методом	
1.6 Определение коли-индекса воды методом мембранных фильтров	
2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха	22
2.1 Микрофлора воздуха	
2.2 Методы бактериологического исследования воздуха	
2.3 Седиментационные методы	
2.4 Аспирационные методы	
2.5 Фильтрационные методы	
3. Санитарно-бактериологическое исследование почвы	30
3.1 Микрофлора почвы	
3.2 Методика постановки опытов по определению ПДК химического вещества в почве по общесанитарному показателю вредности	
3.3 Предварительные исследования по общесанитарному показателю вредности	
3.4 Основные экспериментальные исследования по общесанитарному показателю вредности	
3.5 Экспериментальные исследования общесанитарного показателя	
Результат исследования 1	
Результат исследования 2	
Результат исследования 3	
3.6 Подготовка единого модельного почвенного эталона	
3.7 Определение допустимой концентрации нитрозодиметиламин и тетраметилтетразен по их влиянию на биологическую активность почвы	
Результат исследования 4	
3.8 Протеазная активность загрязненных НДМА и ТМТ почв	
3.9 Определение влияния кероина на биологическую активность почвы	
Результат исследования 5	
3.10 Подсчет численности микроорганизмов в почвах, обработанных различными концентрациями керосина	
3.11 Определение ферментативной активности почвенных образцов, загрязненных керосином	
3.12 Определение допустимой концентрации неимметричного диметилгидразина по их влиянию на биологическую активность почвы	

3.13 Эпидемиология почвы и её микрофлора	
3.14 Оценка санитарно-бактериологического состояния почвы	
3.15 Методы бактериологического исследования почвы	
4. Санитарно-бактериологическое исследование мяча и мясных продуктов	72
4.1 Правила отбора проб	
4.2 Подготовка проб к исследованию	
4.3 Бактериологическое исследование	
4.4 Оценка качества продукта по результатам исследования	
5. Санитарно-бактериологическое исследование рыбы и рыбных продуктов	82
6. Санитарно-бактериологическое исследование молока и молочных продуктов	85
6.1 Микрофлора молока и молочных продуктов	
6.2 Молочные консервы	
6.3 Отбор проб	
6.4 Методика санитарно-бактериологического исследования молока и молочных продуктов	
6.5 Методика исследования молочных консервов	
7. Санитарно-бактериологическое исследование консервов	98
7.1 Микробиология консервов	
7.2 Правила отбора проб консервов	
7.3 Методика бактериального исследования баночных консервов (кроме молочных)	
8. Санитарно-бактериологическое исследование напитков	104
8.1 Методика бактериологического исследования	
9. Бактериологическое исследование смывов с поверхностей инвентаря, оборудования пищевых объектов и рук персонала	107
9.1 Методика исследования	
10. Пищевые токсикоинфекции	111
10.1 Общая характеристика возбудителей пищевых токсикоинфекций	
10.2 Отбор и пересылка проб	
10.3 Подготовка проб к исследованию	
10.4 Методика бактериологического исследования на бактерии группы салмонелл	
10.5 Методика бактериологического исследования на условно патогенные бактерии кишечного семейства	
10.6 Серологическая диагностика пищевых токсикоинфекций	
11. Пищевые интоксикации микробной этиологии	115
11.1 Ботулизм	
11.2 Биологические особенности возбудителя ботулизма	
11.3 Лабораторная диагностика ботулизма	
11.4 Специфическая терапия и профилактика	
11.5 Стафилококковые интоксикации	
11.6 Лабораторная диагностика пищевой стафилококковой	

интоксикации	
11.7 Пищевые отравления, вызванные <i>Cl. perfringens</i>	
11.8 Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых <i>Cl. perfringens</i>	
12. Микотоксикозы	134
12.1 Клавицепстоксикозы (<i>Clavicepstockicosis</i>) эрготизм	
12.2 Стахиботриотоксикоз (<i>Stachybotryotoxicosis</i>)	
12.3 Дендродохиотоксикоз (<i>Dendrodochiotoxicosis</i>)	
12.4 Фузариотоксикозы (<i>Fusariotoxicosis</i>)	
ПРИЛОЖЕНИЕ	
Тесты	
Список использованной литературы	147

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**More
Books!**



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.morebooks.shop

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.morebooks.shop

KS OmniScriptum Publishing
Brivibas gatve 197
LV-1039 Riga, Latvia
Telefax: +371 686 20455

info@omniscryptum.com
www.omniscryptum.com

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY