

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра «Микробиология и биохимия»

**Методические указания
к лабораторным работам**

По дисциплине: *Микробиология, санитария и гигиена питания*

Мурманск
2020

Составитель – Ускова Инга Владимировна, к.б.н., доцент кафедры «Микробиология и биохимия»

Методические указания к лабораторным работам рассмотрены и одобрены на заседании кафедры микробиологии и биохимии «____»_____2020 г., протокол № _____.

Рецензент – Литвинова Марина Юрьевна, доцент кафедры «Микробиология и биохимия», к.б.н.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
2. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН
3. СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
4. СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ТЕМ ДИСЦИПЛИНЫ

I. ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Лабораторные работы по дисциплине «Микробиология, санитария и гигиена питания» выполняются в соответствии с учебными планами, предусматривающими изучение данной дисциплины.

Целью лабораторных работ является систематизация и углубление знаний и способностей обучающихся применять полученные знания на практике, в ходе эксперимента, а также выработки умений и навыков самостоятельного экспериментирования. Включают подготовку необходимых для опыта (эксперимента) приборов, оборудования, реактивов, составления схемы-плана опыта, его проведение и описание.

Приступая к выполнению лабораторных работ, необходимо ознакомиться с соответствующими разделами программы дисциплины и методическими указаниями, изучить рекомендуемую литературу.

Отчет о лабораторной работе должен быть выполнен и представлен в срок, указанный в технологической карте дисциплины.

Таблица 1. – Перечень лабораторных работ

№ п/р	Наименование лабораторных работ	Кол-во часов	
		очная	заочная
1	2	3	
1	Правила работы и поведения в лаборатории микробиологии.		0,5
2	Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней.		0,5
3	Изучение устройства микроскопа и овладение техникой микроскопирования. Приготовление препаратов различных культур микроорганизмов в живом и окрашенном виде. Микроскопирование бактерий, плесневых грибов, дрожжей. Изучение тинкториальных свойств микроорганизмов.		0,5
4	Методы и средства стерилизации.		0,5
5	Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.		0,5
6	Классификация питательных сред, требования к ним.		0,5
7	Физиология микроорганизмов: культуральные свойства бактерий, выделение чистых культур микроорганизмов		0,5
8	Методы изучения биохимических свойств микроорганизмов		0,5
9	Основы процессов брожения смешанного типа, спиртового, молочнокислого (химизм, характеристика возбудителей, значение в биотехнологии).		1
10	Санитарно-бактериологический анализ проб воды, воздуха, смыва с рук.		0,5
11	Методы определения и выявления. (Схема посева санитарно-показательных групп микроорганизмов) ГОСТы. Отбор проб и подготовка анализов. НТД.	5	0,5
12	Микробиологический анализ соленой продукции, холодного и горячего копчения. Определение обсемененности продуктов мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными сапрофитными бактериями методом предельных разведений.	5	-
13	Микробиологический анализ пресервов. Выделение условно-патогенной и патогенной микрофлоры р. р. <i>Proteus</i> , <i>Escherichiae</i> . <i>Staphilococcus</i> , <i>Salmonella</i> , идентификация этих бактерий.	5	1

14	Микробиологический анализ вспомогательных материалов (томат продуктов, овощного сырья, пряностей, муки, сахара, соли и др.)	6	-
15	Микробиологический анализ кулинарных продуктов.	6	-
16	Микробиологический анализ консервов. Выделение массовых форм бактерии, обсеменяющих сырье, в чистую культуру, определение их таксономической принадлежности. Тестирование.	6	1
ИТОГО		30	8

Основная литература

1. Куранова, Н. Г. Микробиология : учебное пособие : [16+] / Н. Г. Куранова, Г. А. Купатадзе. – Москва : Прометей, 2020. – Часть 3. Мир прокариот. – 119 с. : схем. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=612078> (дата обращения: 12.01.2022). – ISBN 978-5-00172-049-2. – Текст : электронный.
2. Мурадова, Е. О. Микробиология: полный курс к экзамену : учебное пособие : [16+] / Е. О. Мурадова ; Научная книга. – 2-е изд. – Саратов : Научная книга, 2020. – 335 с. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=578516> (дата обращения: 12.01.2022). – ISBN 978-5-9758-1924-6. – Текст : электронный.
3. Нилова, Л. П. Товароведение и экспертиза пищевых продуктов функционального назначения [Электронный ресурс] : учебное пособие / Л. П. Нилова, Т. В. Пилипенко, А. А. Вытовтов. — Электрон. текстовые данные. — СПб. : Троицкий мост, 2018. — 199 с. — 978-5-4377-0116-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/75697.html>
4. Серегин, И. Г. Ветеринарно-санитарная экспертиза пищевых продуктов на продовольственных рынках [Электронный ресурс] : учебное пособие / И. Г. Серегин, М. Ф. Боровков, В. Е. Никитченко. — Электрон. текстовые данные. — СПб. : Квадро, 2018. — 468 с. — 978-5-906371-61-7. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/79871.html>
5. Галынкин, В. А. Микробиологические основы ХАССП при производстве пищевых продуктов [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. А. Галынкин. — Электрон. текстовые данные. — СПб. : Проспект Науки, 2017. — 288 с. — 978-5-903090-08-2. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/79982.html>

Дополнительная литература

6. Куранова, Н. Г. Микробиология : учебное пособие / Н. Г. Куранова, Г. А. Купатадзе ; Московский педагогический государственный университет. – Москва : Прометей, 2013. – Часть 1. Прокариотическая клетка. – 108 с. : ил., табл., схем. – Режим доступа: по подписке. – URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=240544> (дата обращения: 12.01.2022). – ISBN 978-5-7042-2459-4. – Текст : электронный.
7. Ваншин, В. В. Хранение зерна и пищевых продуктов. Часть 1. Характеристика зерновой массы, микрофлоры зерна и вредителей хлебных запасов [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. В. Ваншин. — Электрон. текстовые данные. — Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. — 203 с. — 978-5-7410-1622-0. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/69969.html>
8. Черняева, Л. А. Основы микробиологического контроля производства пищевых продуктов. Лабораторный практикум [Электронный ресурс] : учебное пособие / Л. А. Черняева, О. С. Корнеева, Т. В. Свиридова. — Электрон. текстовые данные. — Воронеж : Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2013. — 136 с. — 978-5-00032-020-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/47436.html>
9. Ускова, И.В. Микробиология технологических и вспомогательных материалов [Электронный ресурс]: Учебное пособие по дисциплине «Микробиология сырья и продуктов животного происхождения», для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения" очной формы обучения/ И.В. Ускова. – Электрон. текстовые дан. (1 файл : 1,2 Мб). – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2015. – Доступ из локальной

сети Мурман. гос. техн. ун-та. http://elib.mstu.edu.ru/2015/U_15_26.pdf – Загл. с экрана. – Имеется печ. аналог 2015 г. – Библиогр.: с. 88-93.

10. Перетрухина (Ускова), И.В. Микробиология рыбы и рыбных продуктов [Электронный ресурс] : методические указания для выполнения лабораторных работ по дисциплине для студентов очной, вечерней и заочной формы обучения специальностей 260302 «Технология рыбы и рыбных продуктов», 020201 «Биология», 020803 «Биоэкология», 020209 «Микробиология»/ И.В. Перетрухина. – Электрон. текстовые дан. (1 файл : 506 Кб). – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2008. – Доступ из локальной сети Мурман. гос. техн. ун-та. http://elib.mstu.edu.ru/2008/M_08_118.pdf – Загл. с экрана.

11. Перетрухина (Ускова), И.В. Бактериология [Электронный ресурс] : Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Бактериология» для студентов направления 020200.62 «Биология» профиль «Микробиология» и специальности 020209.65 «Микробиология»/ И.В. Перетрухина. – Электрон. текстовые дан. (1 файл : 1,6 Мб). – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2012. – Доступ из локальной сети Мурман. гос. техн. ун-та. http://elib.mstu.edu.ru/2012/M_12_212.pdf – Загл. с экрана.

12. Перетрухина (Ускова), И.В. Микробиология [Электронный ресурс]: методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения"/ И.В. Перетрухина. – Электрон. текстовые дан. (1 файл : 1,4 Мб). – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2013. – Доступ из локальной сети Мурман. гос. техн. ун-та. http://elib.mstu.edu.ru/2013/U_13_40.pdf – Загл. с экрана

Лабораторная работа № 1. Правила работы и поведения в лаборатории микробиологии.

Работники лаборатории постоянно должны помнить, что они имеют дело с микроорганизмами, которые не всегда безвредны для окружающей среды и здоровья человека. При работе необходимо соблюдать следующие правила.

Запрещается:

1. Входить в лабораторию в головных уборах и верхней одежде.
2. Вносить в лабораторию посторонние предметы.
3. Курить и принимать пищу.
4. Выходить за пределы лаборатории в халате.
5. Лишнее передвижение, способствующее контаминации исследуемого материала посторонней микрофлорой.

Следует:

1. Работать в лаборатории в наглухо застегнутом халате.
2. Пользоваться только своим рабочим местом и прикрепленным к нему оборудованием.
3. По окончании работы тщательно продезинфицировать и вымыть с мылом руки.
4. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором.
5. Все использованные материалы сжигать или обезвреживать стерилизацией в автоклаве. Эта работа выполняется сотрудником лаборатории.
6. Стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микробов (разбились пробирки, упала капля инокулята), продезинфицировать рабочим раствором.
7. По окончании работы поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры бактерий и остатки исследуемого материала сдать лаборанту, а рабочее место привести в порядок.

Лабораторная работа № 2. Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней.

Требования к устройству микробиологических лабораторий для работы с ПБА III – IV групп патогенности (СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней):

Общие требования к организации лабораторий:

Типовые проекты, а также проекты реконструкции и перепланировки зданий и помещений лаборатории подлежат обязательному согласованию с органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора;

Производственные лаборатории, должны располагаться в отдельно стоящих зданиях, не связанных с производственными помещениями, или изолированном блоке здания, имеющем отдельный вход. Не допускается их размещение в подвальных и цокольных этажах зданий;

Диагностические лаборатории, должны иметь 2 входа: один - для сотрудников, другой - для доставки материала на исследование. Допускается получение материала через передаточное окно;

В лабораториях научно-исследовательских учреждений, а также в производственных лабораториях, проводящих экспериментальные исследования, допускается наличие одного входа;

Требования к планировке, внутренней отделке и организации работы в микробиологической лаборатории

1. Работа с ПБА может проводиться только в лабораториях, имеющих разрешение, выданное в установленном порядке.

2. В составе микробиологической лаборатории обязательным должно быть наличие следующих основных и вспомогательных помещений: • Для приема и регистрации проб, • Для проведения исследований,

- Боксированные помещения,
- Моечная,
- Автоклавная для обеззараживания отработанного материала ("грязная автоклавная"),
- Автоклавная для стерилизации посуды и питательных сред ("чистая автоклавная"),
- Средоварочная с боксом для разлива питательных сред,
- Гардеробы для домашней и рабочей одежды персонала,
- Комната отдыха и приема пищи, • Комната для работы с документацией и литературой,
- Кладовые для хранения питательных сред, химических реактивов, лабораторной посуды, контейнеров, уборочного инвентаря и др.

- Туалет.

3. Лаборатории и боксы должны быть обеспечены устройствами приточно-вытяжной вентиляции.

4. Движение «заразного» и «чистого» материалов должно быть разделено во времени.

5. Внутренняя отделка помещений лаборатории: поверхность пола, стен и потолка должна быть гладкой, без щелей, легко обрабатываемой, устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих средств, полы не должны быть скользкими. Окна и двери должны быть герметичными.

6. В помещении моечной пол должен быть покрыт керамической плиткой; покрытие пола в помещениях автоклавных должно быть выполнено из электроизолирующего материала.

7. Покрытие потолка и стен выше 1,5 или 2 м от пола допускается силикатными красками; для отделки потолка может применяться покрытие масляными или вододисперсионными красками. Не допускается в помещениях лабораторий применение подвесных потолков.

8. Лаборатория должна быть оснащена необходимым оборудованием и техникой: термостаты, автоклавы, сушижаровые шкафы, центрифуги, холодильники, измерительные приборы. Все оборудование и техника должны быть подписаны, аттестованы и проходить периодическую поверку для подтверждения их соответствия необходимым требованиям, иметь паспорта и инструкции по применению.

9. Лаборатория должна быть оснащена необходимой мебелью: шкафы, стеллажи, столы, оргтехника и др.

10. Лабораторное оборудование и мебель должны быть прочными, изготовленными из устойчивых к действию дезинфектантов материалов;

11. Помещения лабораторий должны быть непроницаемы для грызунов и насекомых;

12. Лаборатория должна быть обеспечена средствами пожаротушения.

13. Для создания асептических условий при проведении микробиологических исследований и других работ, а также предотвращения микробиологического загрязнения внешней среды в составе лаборатории предусматривается устройство боксированных помещений (боксов).

Боксированное помещение (бокс) - специальным образом устроенное помещение, состоящее из собственно бокса и предбокса, предназначенное для создания асептических условий при проведении исследований, а также для предотвращения микробного загрязнения внешней среды.

- Стены, пол и потолок помещений бокса должны быть облицованы материалом, устойчивым к действию дезинфицирующих средств.

- Не должно быть недоступных для влажной дезинфекции поверхностей, исключено движение воздуха, создаваемое сквозняками, должны отсутствовать инженерные коммуникации.

- Допускается устройство в предбоксе раковины для мытья рук с подводкой горячей и холодной воды.

- Боксы должны быть оборудованы бактерицидными облучателями. Эксплуатация бактерицидных облучателей должна осуществляться в рамках, указанных в паспорте и инструкции по их эксплуатации. Бактерицидное облучение проводится после влажной уборки; вход в помещение разрешается через 30 минут после отключения облучателя.

- Не разрешается устанавливать в помещении бокса лабораторное оборудование, кроме рабочего стола, бактерицидной лампы, необходимых инструментов для посева;

в предбоксы допускается размещение термостатов для выращивания соответствующих данному боксу посевов;

"Чистая" зона - помещение или группа помещений лаборатории, где не проводятся манипуляции с ПБА. "Заразная" зона - помещение или группа помещений лаборатории, где проводятся манипуляции с патогенными биологическими агентами и их хранение.

- Столы, на которых проводят работу с ПБА III-IV групп патогенности, должны быть покрыты пластиком или другим материалом, устойчивым к действию дезинфицирующих средств и фламбированию горящим спиртовым факелом, не должны иметь швов и трещин;

- Ежедневная уборка помещений лаборатории должна проводиться влажным способом с использованием водно-мыльных растворов в «чистой» и с применением дезинфицирующих растворов и моющих средств в «заразной» зоне.

- В помещениях боксов должна проводиться еженедельная генеральная уборка с применением дезинфицирующих средств путем протирания поверхности мебели, приборов, аппаратов, а также стен (на высоту до 2 метров). После влажной уборки помещения облучают бактерицидными лампами в течение 30-60 минут

Требования к режиму работы в микробиологической лаборатории:

- Работу с ПБА III-IV групп патогенности выполняют специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие соответствующую подготовку;

- Персонал допускается к работе с ПБА только после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности; последующие инструктажи проводятся не реже 2 раз в год;

- Доставка в лабораторию материала для исследования осуществляется в специальных контейнерах, биксах или сумках-холодильниках; доставляемые емкости с жидким материалом должны быть закрыты резиновыми или пластмассовыми пробками, исключающими выливание содержимого во время транспортирования;

- Во время работы двери боксов и предбоксов должны быть закрыты; выход из бокса во время проведения работы запрещается;

- Все инструменты, имевшие контакт с ПБА III-IV групп патогенности, фламбируются в пламени горелки или сбрасываются в емкости с дезинфицирующим раствором или специальные емкости для последующего обеззараживания;

- Работы по обеззараживанию автоклавированием ПБА III-IV групп патогенности, стерилизации питательных сред и лабораторной посуды, производящиеся в одном помещении (автоклавной), должны быть разделены во времени;

- По окончании работы все объекты, содержащие ПБА, должны быть убраны в хранилища (холодильники, термостаты, шкафы); в обязательном порядке производится дезинфекция рабочих поверхностей столов; • Остатки ПБА III-IV групп патогенности, использованная посуда собираются в закрывающиеся емкости и передаются в автоклавную для уничтожения автоклавированием или путем погружения в дезинфицирующие растворы;

- По окончании рабочей смены следует обработать и вымыть руки, снять специальную одежду и снова вымыть руки; по окончании отдельных этапов исследования персонал обязан обработать руки 70-ти процентным раствором спирта и вымыть руки с мылом. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде;

- Прием посетителей, хранение пищевых продуктов, прием пищи разрешается только в специально отведенных местах в "чистой" зоне лаборатории

Требования к порядку использования средств индивидуальной защиты (СИЗ):

- Сотрудники лабораторий должны быть обеспечены медицинскими халатами, комбинезонами, шапочками, сменной обувью и другими СИЗ в зависимости от характера выполняемых работ и в соответствии с действующими нормами;

- Рабочая одежда и обувь должны быть индивидуальными, соответствовать размерам работающих и храниться отдельно от личной одежды;

- При проведении исследований в боксированных помещениях производится смена медицинского халата в предбоксе

- Смена рабочей одежды должна проводиться по мере загрязнения, но не реже 1 раза в неделю;

- Перед сдачей в стирку защитная одежда должна быть обеззаражена

Режим обеззараживания различных объектов, зараженных или подозрительных на заражение микроорганизмами III-IV групп патогенности

Способ обеззараживания	Объект, подлежащий обеззараживанию	Обеззараживающий агент
Паровой стерилизатор (автоклав)	1. Посуда лабораторная (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри, гребенки для сушки культур, шприцы и другое). 2. Бактериологические посе­вы. 3. Жидкие отходы, смывные воды. 4. Резиновые пробки, шланги, груши для пипетирования зараженного материала. 5. Перчатки резиновые. 6. Защитная одежда персонала (халаты, косынки, ватно-марлевые маски, шапочки.	Водяной насыщенный пар под давлением
Сухожаровой шкаф	1. Посуда лабораторная (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри, гребенки для сушки культур, шприцы). 2. Пинцеты, скальпели, ножницы.	Горячий воздух
Кипячение	1. Резиновые пробки, шланги, груши для пипетирования зараженного материала 2. Пинцеты, скальпели, ножницы, предметные и покровные стекла	Вода, раствор детергента, 2 % раствор пищевой соды
Прокаливание в пламени горелки	1. Петли для пересева микроорганизмов	Пламя горелки
Фламбирование горящим факелом	1. Лабораторные столы 2. Внутренние поверхности термостатов 3. Внутренние поверхности холодильников 4. Пинцеты, скальпели, ножницы	Спирт этиловый технический
Протирание раствором	1. Микроскопы 2. Незащищенные участки кожи, руки	Спирт этиловый, дезинфицирующие средства
Орошение или протирание дезинфицирующим раствором	1. Поверхности в помещениях (пол, стены, двери, подоконники), мебель, оборудование, шкафы, и др. мебель, помещения вивария 2. Лабораторные столы	Дезинфицирующие средства, разрешенные к применению
Замачивание в дезинфицирующем растворе	1. Уборочный материал (ветошь, мочалки и др) 2. Защитная одежда персонала (халаты, косынки, ватно-марлевые маски, шапочки).	Дезинфицирующие средства
Сжигание	1. Трупы лабораторных животных, подстилочный материал, остатки кормов, выделения животных 2. Мусор	Пламя

Ликвидация последствий аварий

Авария - нештатная ситуация, при которой создается реальная или потенциальная возможность выделения ПБА в воздух производственной зоны, окружающую среду или заражения персонала. • При авариях работу с ПБА немедленно прекращают, ставят в известность руководителя лаборатории или лицо, его замещающее;

- Все открытые части тела обрабатывают дезинфицирующим раствором или 70-ти процентным спиртом;

при попадании инфекционного материала на слизистые оболочки их немедленно обрабатывают:

- глаза - 1-процентным раствором борной кислоты, несколькими каплями 1-процентного раствора азотнокислого серебра или струей воды;

- в нос закапывают, а рот и горло прополаскивают 0,05-процентным раствором борной кислоты;

• При аварии, связанной с ранением или другим повреждением кожных покровов, перчатки (если работа проводилась в них) обрабатываются дезраствором, снимаются, из ранки выдавливается кровь, руки обрабатываются 70-процентным спиртом, затем моются водой с мылом, ранка смазывается раствором йода;

Проводится обеззараживание места аварии; защитная одежда замачивается в дезинфицирующем растворе; все сотрудники, находившиеся в зоне аварии, должны принять душ;

Требования к помещениям

Общее размещение лаборатории и ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям в зависимости от ее профиля в соответствии с ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований. Лаборатория, в случае работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности, должна иметь разрешение в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

1. Классификация помещений

Помещения лаборатории подразделяют на следующие зоны:

- 1) рабочая зона для выполнения следующих операций:
 - приема, хранения, подготовки и обработки проб,
 - приготовления и стерилизации питательных сред и оборудования,
 - проведения исследования путем взвешивания, приготовления разведений, посева, пересева, термостатирования, сохранения штаммов и других лабораторных работ,
 - обеззараживания и очистки оборудования, ликвидации отходов исследований;
- 2) дополнительные зоны, включающие следующие помещения:
 - входы, коридоры, лестницы, лифты,
 - административные помещения - секретарская и офисная комнаты, комната для работы с документами и другие,
 - раздевалки и туалеты,
 - архивы,
 - склады;
- 3) при работе с патогенными для человека микроорганизмами помещения рабочей и дополнительных зон должны быть разделены также на «заразную» и «чистую» в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

2. Требования к расположению помещений

Окружающие условия, в которых проводят микробиологические исследования, не должны влиять на их достоверность.

Помещения следует располагать таким образом, чтобы избежать опасности перезаражения. Для достижения этой цели необходимо организовать поточность прохождения чистых и загрязненных материалов и обеспечить непересечение потоков.

Следует обеспечить защиту от экстремальных условий, таких как повышенная температура, запыленность, влажность, пар, шум, вибрация, воздействие прямых солнечных лучей и т.д.

Площадь рабочей зоны должна быть достаточно большой для поддержания в ней чистоты и порядка. Во всех аналитических помещениях для каждого аналитика рекомендуется рабочее место площадью примерно 20 м².

Во время проведения испытаний в рабочую зону следует допускать только персонал, участвующий в проведении исследований.

Должны быть предусмотрены отдельные комнаты и/или отдельные зоны и/или специально огороженные участки для следующих операций:

- прием и хранение проб;
 - подготовка проб, особенно в случае необработанного сырья (например порошкообразных продуктов, содержащих большое количество микроорганизмов);
 - работа с патогенами (например *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*);
 - приготовление и стерилизация питательных сред и оборудования;
 - мойка стеклянной посуды и другого оборудования, а также обеззараживание оборудования и контаминированных питательных сред;
 - проверка на стерильность пищевых продуктов.
- Может быть также предусмотрено выделение следующих зон:
- для приготовления питательных сред и помещения для стерилизации питательных сред и оборудования;
 - для обеззараживания и моечной.

Термостаты, холодильники, морозильные камеры могут быть размещены в отдельных, специально подготовленных комнатах.

3. Требования к оборудованию помещений

1. Чтобы уменьшить опасность загрязнения пылью и, следовательно, микроорганизмами, помещения для проведения испытаний должны быть устроены следующим образом:

- стены, потолок и пол должны быть гладкими, легко очищаемыми, устойчивыми к действию детергентов и дезинфицирующих веществ, используемых в лаборатории, полы не должны быть скользкими;
- помещения не должны пересекать водопроводные трубы, если они герметично не изолированы;
- окна с наружной стороны должны быть оборудованы системой защиты от прямого солнечного излучения (за исключением особых случаев);
- во избежание сквозняков во время проведения испытаний окна и двери должны закрываться герметично. Их конструкция должна препятствовать скоплению пыли и облегчать очистку.

2. Температура и качество окружающего воздуха (содержание микроорганизмов, влажность, запыленность и другое) должны соответствовать требованиям, предъявляемым к проведению испытаний. Для этого рекомендуется притяжная вентиляционная система, снабженная фильтрами. Допускается установка кондиционеров в рабочих помещениях и боксах в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

Если для испытаний требуется очень чистая атмосфера, то помещение должно быть оборудовано ламинарным шкафом с очисткой воздуха и/или безопасным боксом. Это оборудование должно быть снабжено соответствующими инструкциями.

3. Верхняя поверхность лабораторного инвентаря и мебели должна быть изготовлена из гладкого непроницаемого материала, легко очищаемого и дезинфицируемого. Для предупреждения накопления пыли шкафы должны достигать потолка.

Конструкция лабораторной мебели не должна затруднять уборку помещения (например передвижная мебель). Документация, используемая при работе с пробами, питательными средами, реактивами и т. д., должна храниться в закрытых шкафах.

Примечание - редко используемые документы и книги желательно размещать вне рабочей зоны.

4. В помещениях должно быть хорошее освещение, без мешающих световых бликов. Следует избегать попадания прямого солнечного света на рабочее место 14 чувствительное оборудование, в частности, термостаты.

4. Требования по уходу и контролю

Полы, стены, полки, лабораторный инвентарь и мебель следует содержать в чистоте и ремонтировать, чтобы избежать образования трещин, которые могут способствовать скоплению грязи и тем самым являться источником заражения.

Для поддержания в помещениях условий, пригодных для выполнения исследований, проводят регулярную уборку и дезинфекцию. Дезинфекцию различных объектов при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности проводят в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

Постоянно проводят проверку исправности вентиляционных установок и их фильтров, в случае необходимости фильтры заменяют.

Регулярно контролируют микробиологическое состояние поверхностей стен, рабочих мест и воздуха в помещениях рабочей зоны.

Загрязнение поверхностей может быть определено наложением на них контактных пластин, содержащих подходящие нейтрализующие соединения. Качество воздуха может быть установлено путем экспонирования в течение 15 мин открытых чашек Петри, содержащих неселективную агаровую питательную среду (например МПА - мясопептонный агар).

Примечание - при определении загрязнения поверхностей и воздуха могут быть использованы и другие методы.

Аппаратура и оборудование

Вся аппаратура и оборудование должны содержаться в чистоте и в рабочем состоянии. Операции по обслуживанию и ремонту должны контролироваться. Приборы, оборудование и средства измерений должны быть аттестованы и подвергнуты метрологическому контролю в установленные сроки, иметь технический паспорт и другую документацию в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

1. Микробиологические боксы

Бокс (боксовые помещения или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности) - защищенное от пыли рабочее место, оборудованное установкой для горизонтального или вертикального ламинарного потока воздуха. В микробиологии используют безопасные боксы с улавливанием микроорганизмов фильтрами. При работе с патогенными микроорганизмами устройство боксов и их эксплуатация должны проводиться в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. По степени очистки от пыли боксы условно делят на классы в соответствии с максимально допустимым количеством частиц размером более 0,5 мкм/м³. Для боксов, применяющихся в пищевой микробиологии, количество частиц не должно превышать 4000 в кубическом метре.

Боксы могут быть двух типов:

а) бокс биологической безопасности с очисткой воздуха, который предназначен для защиты продукта от внешнего заражения и сведения к минимуму заражения, связанного с оператором;

б) боксированное помещение, предназначенное для предохранения продукта от внешнего заражения, а также защиты оператора и окружающей среды.

При всех работах с патогенами следует использовать, как минимум, боксированные помещения.

Требования к обслуживанию и контролю

Эффективность работы боксов биологической безопасности должна проверяться квалифицированным персоналом при вводе в эксплуатацию и далее не реже одного инспектирования в год. Если боксы оснащены фильтрами притяжной вентиляции, последние должны систематически заменяться.

После работы боксы убирают и дезинфицируют. Периодический контроль на всевозможные микробные загрязнения рабочих поверхностей и стен бокса проводят с помощью обычного оборудования. Например, путем экспонирования в течение 30 мин в каждом боксе нескольких открытых чашек Петри, содержащих неселективную агаровую питательную среду (например МПА). Могут быть использованы и другие методы.

Площади помещений бактериологической лаборатории (Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций СН 535-81. Утверждена приказом Госгражданстроя от 20 июля 1981 г. № 216) следует принимать по табл. 2.

Таблица 2

Помещения	Площадь, м ²
Бактериологическая лаборатория	
1. Кабинет заведующего лабораторией	12
Бактериологическое отделение	
2. Помещение врачей и лаборантов для исследования на кишечные инфекции	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
3. Помещение врачей для фаготипирования	12
4. Помещение для исследования на ф. 30	12
5. Помещение врачей для исследования по санитарной бактериологии	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
6. Помещение врачей для исследования капельных инфекций	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
7. Помещение лаборантов для исследования по санитарной бактериологии	То же
8. Помещение лаборантов для исследования капельных инфекций	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
9. Помещение для серологических исследований	14
10. Посевная	5 на 1 рабочее место, но не менее 15
11. Боксы с предбоксами: по санитарной бактериологии группы капельных инфекций для исследования на стерильность	12 12 12
12. Помещение энтомологии	12
13. Помещение гематологии	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
14. Помещение для гельминтологических исследований	9 на 1 рабочее место, но не менее 18
15. Помещение для экспресс диагностики	12
16. Моечная (без моечной машины) При применении моечной машины	18 36
17. Препараторская	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
18. Стерилизационная	15 на 2 стерилизационных шкафа, на каждый дополнительный шкаф - 5
19. Термальные комнаты: а) для исследования на кишечные инфекции с температурным режимом 37°С б) для исследования по санитарной бактериологии с температурным режимом 37°С в) с температурным режимом 43°С	В зависимости от размера оборудования, но не менее 6 То же „
20. Холодильная камера	1,5 на 1 врача-бактериолога, но не менее 8
21. Автоклавная на 2 автоклава	15, на каждый дополнительный автоклав - 5
22. Средоварочная	18
23. Бокс с предбоксом для розлива сред	6 на 1 рабочее место
24. Помещение для холодильников	12

25. Кладовые: стерильной лабораторной посуды нестерильной лабораторной посуды, реактивов, тележек, контейнеров	12 12+2 на 1 тележку
26. Помещение для розлива сред	4 на 1 рабочее место
27. Помещение для контроля и расфасовки сред с термальной комнатой	12+6
28. Помещение для приема, регистрации, сортировки и выдачи результатов анализов	6 на 1 рабочее место, но не менее 12
29. Санитарный пропускник персонала отделения: а) гардероб для домашней одежды б) душевая на 1 сетку в) гардероб для специальной одежды г) уборная	0,4 на шкаф, но не менее 6 По п. 3.9 настоящих норм 0,4 на шкаф, но не менее 6 По п. 3.9 настоящих норм
30. Комната персонала	8
31. Помещения для забора проб: а) ожидальная б) регистратура и выдача результатов анализов в) помещение (с унитазом и умывальником) для взятия проб г) помещение (с кушеткой и умывальником) для взятия проб д) душевая на 1 сетку	12 8 3 12 По п. 3.9 настоящих норм
Вирусологическое отделение	
32. Кабинет заведующего отделением	12
33. Помещения для идентификации респираторных вирусов: а) рабочая комната врача и лаборанта б) бокс для заражения эмбрионов в) бокс для исследования г) предбокс, общий для боксов	12 12 6 9 3
34. Помещения для идентификации энтеральных вирусов: а) рабочая комната врача и лаборанта для серологических исследований б) бокс с предбоксом для заражения культуры тканей в) бокс с предбоксом для обработки материалов	12 12+5 12+5
35. Помещения для приготовления культуры тканей: а) рабочая комната врача и лаборанта б) бокс с предбоксом	12 9+3
36. Помещения для идентификации арбовирусов: а) рабочая комната врача и лаборанта б) бокс с предбоксом	12 9+3
37. Комната для экспресс-диагностики	12
38. Комната для серологических исследований	12
39. Бокс с предбоксом (для применения МФА в культуре и обработке материалов)	9+3
40. Термальная комната	В зависимости от размеров оборудования, но не менее 6
41. Помещение для низкотемпературных холодильников	12
42. Холодильная камера со шлюзом	5+3
43. Помещение холодильной установки	В зависимости от размера оборудования
44. Автоклавная на 2 автоклава	15
45. Моечная	12
46. Препараторская-стерилизационная	12
47. Кладовая посуды, реактивов, материалов	6
48. Комната для регистрации, приема, сортировки и выдачи результатов анализов	8

49. Комната для персонала	8
50. Санитарный пропускник для персонала:	0,4 на шкаф, но не менее 6
а) гардероб для домашней одежды	
б) кабина для переодевания	2
в) душевая на 1 сетку	По п. 3.9 настоящих норм
г) гардероб для специальной одежды	0,4 на шкаф, но не менее 6
51. Уборная на 1 унитаз	По п. 3.9 настоящих норм

Примечание. В бактериологических лабораториях СЭС сельских районов следует объединять в одно помещение: препараторскую и стерилизационную (площадью 18 м²), боксы по санитарной бактериологии и боксы капельных инфекций (площадью 6 м²), для серологических исследований и помещения [для исследований капельных инфекции (площадью 12 м²).

Кроме того, в бактериологических лабораториях СЭС сельских районов I категории объединяются помещения энтомологии и гематологии (площадью 16 м²), кладовые нестерильной лабораторной посуды, тележек, контейнеров и реактивов (площадью 8 м²).

Лабораторная работа № 3 Изучение устройства микроскопа и овладение техникой микроскопирования. Приготовление препаратов различных культур микроорганизмов в живом и окрашенном виде. Микроскопирование бактерий, плесневых грибов, дрожжей. Изучение тинкториальных свойств микроорганизмов.

Устройство и правила работы с биологическим микроскопом.

Устройство микроскопа, строение микроскопа

В микроскопе различают механическую и оптическую части. Механическая часть представлена штативом (состоящим из основания и тубусодержателя) и укрепленным на нем тубусом с револьвером для крепления и смены объективов. К механической части относятся также: предметный столик для препарата, приспособления для крепления конденсора и светофильтров, встроенные в штатив механизмы для грубого (макромеханизм, макровинт) и тонкого (микромеханизм, микровинт) перемещения предметного столика или тубусодержателя.

Оптическая часть представлена объективами, окулярами и осветительной системой, которая в свою очередь состоит из расположенных под предметным столиком конденсора Аббе и встроенного осветителя с низковольтной лампой накаливания и трансформатором. Объективы ввинчиваются в револьвер, а соответствующий окуляр, через который наблюдают изображение, устанавливается с противоположной стороны тубуса.



Рисунок 1. Устройство микроскопа

К механической части относится штатив, состоящий из основания и тубусодержателя. Основание служит опорой микроскопа и несет всю конструкцию штатива. В основании микроскопа находится также гнездо для зеркала или встроенный осветитель.

Тубусодержатель служит для крепления тубуса микроскопа - встроенные в штатив механизмы для грубого (макромеханизм, макровинт) и тонкого (микромеханизм, микровинт) вертикального перемещения предметного столика или тубусодержателя

- кронштейн для крепления предметного столика;
- предметный столик, служащий для размещения препаратов и горизонтального перемещения;

- узел для крепления и вертикального светофильтров.

В большинстве современных микроскопов фокусировка осуществляется путем вертикального перемещения предметного столика с помощью макро- и микромеханизма при неподвижном тубусодержателе. Это позволяет установить на тубусодержатель различные насадки (микрофото и т.п.). В некоторых конструкциях микроскопов, предназначенных для работы с микроманипулятором, фокусировка осуществляется вертикальным перемещением тубусодержателя при неподвижном предметном столике.

Тубус микроскопа - узел, служащий для установки объективов и окуляров на определенном расстоянии друг от друга. Он представляет собой трубку, в верхней части которой находится окуляр или окуляры, а в нижней - устройство для крепления и смены объективов. Обычно это револьвер с несколькими гнездами для быстрой смены объективов различного увеличения. В каждом гнезде револьвера объектив

закреплен таким образом, что он всегда остается центрированным по отношению к оптической оси микроскопа. В настоящее время конструкция тубуса существенно отличается от прежних микроскопов тем, что части тубуса несущие окуляры и револьвер с объективами, конструктивно не связаны. Роль средней части тубуса может выполнять штатив. Механическая длина тубуса биологических микроскопов обычно составляет 160мм. В тубусе между объективом и окуляром могут располагаться призмы, изменяющие направление хода лучей и промежуточные линзы, изменяющие окулярное увеличение и оптическую длину тубуса.



Рис. 2. Револьверный держатель объективов

другой приемник изображения.

Помимо тубусодержателя с тубусом к механической части микроскопа относятся:

- кронштейн для крепления предметного столика;
- предметный столик, служащий для размещения препаратов и горизонтального перемещения в двух перпендикулярных направлениях относительно оси микроскопа. Конструкция некоторых столиков позволяет вращать препарат. Вертикальное перемещение предметного столика осуществляется макро- и микромеханизмом.
- приспособления для крепления и вертикального перемещения конденсора и его центрировки, а также для помещения светофильтров.

Существуют различные взаимозаменяемые конструкции участка тубуса, несущего окуляры (прямой и наклонный) и различающиеся по количеству окуляров (окулярные насадки):

- **монокулярные** - с одним окуляром, для наблюдения одним глазом;
- **бинокулярные** - с двумя окулярами, для одновременного наблюдения двумя глазами, которые могут различаться по конструкции в зависимости от модели микроскопа;
- **тринокулярные** - с двумя окулярами и проекционным выходом, позволяющие одновременно с визуальным наблюдением двумя глазами, проецировать изображение препарата соответствующей оптикой на монитор компьютера или



Рис. 3. Центрируемый предметный столик

Устройство микроскопа и правила работы с ним

Микроскоп - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает раздельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают полезное и бесполезное увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Бесполезное - это увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения.

В учебных лабораториях обычно используют световые микроскопы, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены световые биологические микроскопы: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР, МБИ и МБС. Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз.

Стереомикроскоп (МБС) (рис. 2) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

В микроскопе выделяют две системы: оптическую и механическую (рис. 1). К оптической системе относят объективы, окуляры и осветительную систему (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

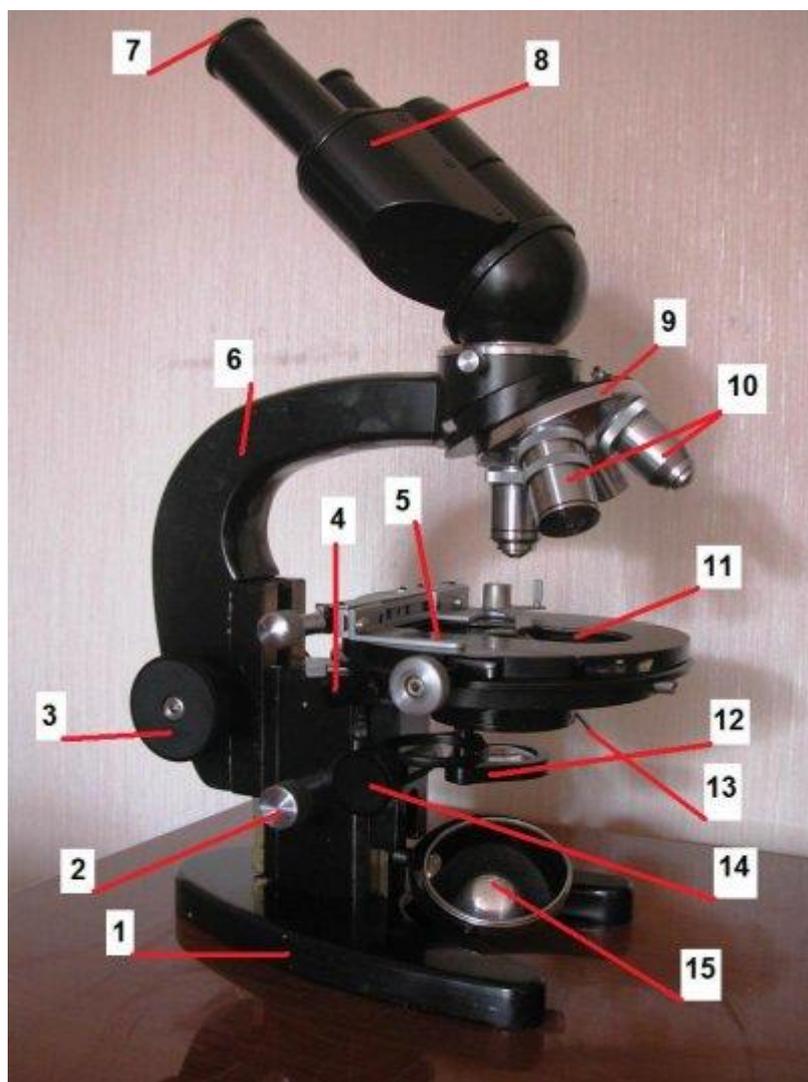


Рис. 1. Устройство микроскопа МБР-1

1 - основание (штатив); 2 - микрометрический винт; 3 - макрометрический винт; 4 - винты, перемещающие столик; 5 - предметный столик; 6 - тубусодержатель; 7 - окуляр; 8 - тубус; 9 - револьвер; 10 - объективы; 11 - отверстие предметного столика; 12 - конденсор; 13 - диафрагма конденсора ; 14 - винт конденсора; 15 - зеркало.

МИКРОСКОП МБС-9 (СТЕРЕОСКОПИЧЕСКИЙ)

Микроскоп МБС-9 (рис. 2) используется для изучения более крупных объектов.

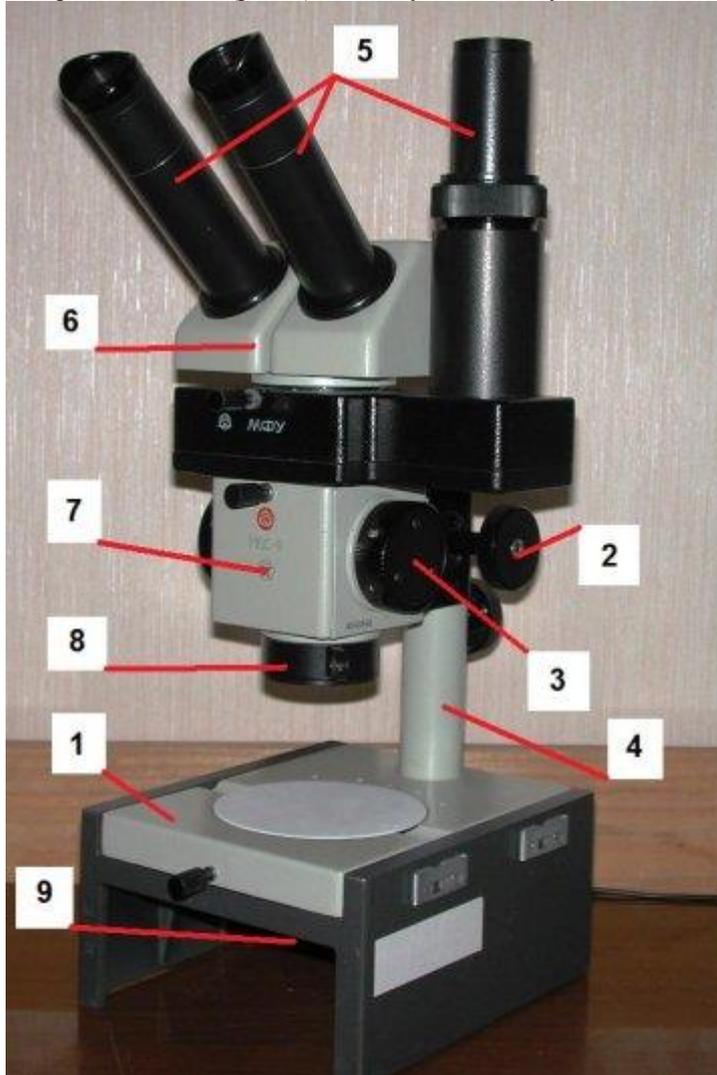


Рис. 2. Микроскоп МБС-9.

1 - предметный столик; 2 - винт для наводки на фокус; 3 - устройство для переключения степени увеличения; 4 - штатив; 5 - окуляр; 6 - бинокулярная насадка; 7 - оптическая головка; 8 - объектив; 9 - зеркало.

Объектив - определяет полезное увеличение объекта. Объектив состоит из нескольких линз. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами.

В учебных целях используют обычно объективы $\times 8$ и $\times 40$.

Окуляр состоит из 2-3 линз. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$.

Окуляры не выявляют новых деталей строения и в этом отношении их увеличение бесполезно.

Для определения общего увеличения микроскопа следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра. В случае использования бинокулярной или тринокулярной насадки, в данное уравнение нужно добавить собственное увеличение насадки. Для бинокулярной насадки АУ-12 ЛОМО, увеличение которой составляет 1,5X. В таких насадках как АУ-26 или МФН-11 увеличение можно менять, собственное сменное увеличение насадки АУ-26 -- 1,1x; 1,6x и 2,5x

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Правила работы с микроскопом

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

1. Работать с микроскопом следует сидя;
2. Микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало;
3. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать;
4. Открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение;
5. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения;
6. Опустить объектив 8 х в рабочее положение, т. е. на расстояние 1 см от предметного стекла;
7. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения;
8. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм ;
9. Смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив. Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины;
10. Передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа;
11. Если изображение не появилось, то надо повторить все операции пунктов 6, 7, 8, 9;
12. Для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер, так чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометрического винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометрического механизма имеются две риски, а на микрометрическом винте - точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометрический винт может перестать действовать;
13. По окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

Техника изучения морфологии микроорганизмов

Морфология бактерий зависит от условий выращивания на питательных средах, температуры и других факторов. Наиболее типична морфология бактерий в молодых культурах. По форме бактерии делятся на шаровидные (сферические), палочковидные и извитые.

Морфологическая классификация бактерий

Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	
Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное			

К морфологическим свойствам относятся не только форма, но и размер клеток, наличие спор и капсул, подвижность и характер окраски бактерий по Граму. Для изучения морфологии бактерий в лабораториях готовят препараты.

Приготовление препаратов. Препараты (мазки) готовят из бактериальных культур. Бактериальная чистая культура - это потомство одной микробной клетки, т. е. расплодка одного вида микроба (без примеси других), выросшая на питательной среде.

При приготовлении препаратов из культуры бактерий, выросших на питательных средах, необходимо соблюдать правила стерильности. Пробирку с культурой берут в левую руку, помещают между большим и указательным пальцами и держат в наклонном положении. Бактериологическую петлю (металлическая или платиновая проволока на стержне) берут правой рукой и прокалывают на пламени горелки или спиртовки. Мизинцем правой руки вынимают ватно-марлевую пробку из пробирки и держат ее, не касаясь окружающих предметов около пламени горелки. Края пробирки слегка обжигают на пламени, вносят стерильную петлю в пробирку, охлаждают ее, не прикасаясь к внутренним стенкам. Затем набирают небольшое количество культуры, вынимают петлю из пробирки, которую закрывают пробкой, пронося предварительно через пламя горелки. Пробирку ставят в штатив и приступают к приготовлению мазка.

Для приготовления препарата из бульонной культуры на чистое, обезжиренное предметное стекло стерильной петлей наносят каплю взвеси и равномерно распределяют ее по поверхности стекла в форме мазка размером 1,5-2,5 см.

Если препарат готовят из культуры, выращенной на плотной питательной среде, то вначале на стекло наносят каплю стерильной воды, а затем в эту каплю вносят небольшое количество культуры и тщательно растирают.

После нанесения культуры на стекло бактериологическую петлю прокалывают над пламенем горелки, а препарат высушивают на воздухе, затем фиксируют на пламени, проводя 3-4 раза тыльной стороной стекла (мазком вверх) через пламя горелки. При фиксации микроорганизмы погибают и прикрепляются к стеклу. Мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Окраска препарата. Фиксированный препарат окрашивают, так как при рассмотрении под микроскопом неокрашенных мазков микробные клетки не видны. Для окрашивания бактерий в лабораториях применяют рабочие (водные) растворы анилиновых красителей (метиленовой сини, фуксина основного, сафранина, малахитовой зелени и др.). Краски разливают в специальные склянки с пипетками.

Бактерии окрашивают простым и сложным методами.

Простой метод окраски проводят следующим образом: на фиксированный мазок наносят 2-3 капли водного раствора одного красителя (например, фуксина или метиленового синего) и окрашивают в течение

2-3 мин. Затем краску смывают, препарат тщательно промывают водой и просушивают между листками фильтровальной бумаги и рассматривают под микроскопом. Для приготовления и окраски препаратов используют установку для промывания препаратов (рис. 2). На подставку помещают бутылку, промывают препараты на мостике, расположенном на сливной чашке.

При сложном методе окраску проводят двумя или более красителями. Сложные методы окраски бактерий основаны на физико-химических свойствах микробной клетки. Их применяют для детального изучения строения бактерий и их различия. Наиболее распространенным сложным методом окраски микробов является метод Грама, предложенный в 1884 г. Для окраски по Граму на фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, наносят 2-3 капли генцианвиолета на 1-2 мин,

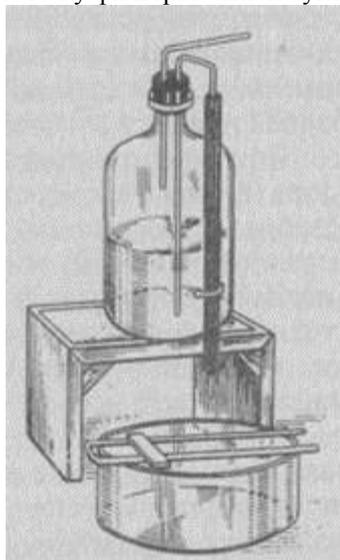


Рис. 6. Установка для промывания препаратов (на сливной чашке лежит мостик с предметным стеклом)

Рис.2

Снимают пинцетом бумажку, сливают остаток краски и наливают 2-3 капли раствора Люголя на 1-2 мин. Затем раствор сливают и на мазок наносят несколько капель этилового спирта-ректификата на 30-40 с. После этого мазок промывают водой и окрашивают фуксином (2-3 капли раствора на 1-2 мин). Препарат тщательно промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой и рассматривают под микроскопом с иммерсионным объективом.

Одни бактерии по методу Грама окрашиваются в фиолетовый цвет (грамположительные), другие - в розовый цвет (грамотрицательные). Различие окраски бактерий обусловлено неодинаковым химическим составом клеточной стенки. У грамположительных бактерий больше муреина (до 95 %), чем у грамотрицательных (всего 5-10 %).

1) клеточных стенках грамположительных бактерий муреин связан в основном с полисахаридами, среди которых большое место занимают тейхоевые кислоты. Такой химический состав клеточной стенки прочно удерживает фиолетовый краситель и не обесцвечивается спиртом.

В клеточных стенках грамотрицательных бактерий муреин связан в основном с липидами. Тейхоевые кислоты отсутствуют. Микробная клетка таких бактерий не обладает способностью прочно удерживать фиолетовую окраску. При обработке спиртом обесцвечивается, и дополнительная окраска фуксином придает клетке розовый цвет.

Окраска спор. Для окраски спор в лабораториях часто пользуются методом Меллера, Шеффера-Фултона и др.

Метод Меллера заключается в следующем. На фиксированный над пламенем мазок наносят несколько капель 5 %-ного раствора хромовой кислоты на 3-5 мин. Затем промывают водой, высушивают. На мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и наносят 3-4 капли карболового фуксина Пилля, окрашивают с подогреванием (до появления паров) в течение 3-5 мин. Краску смывают и мазок обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты в течение 30-40 с. Мазок вновь промывают водой и окрашивают раствором метиленового синего в течение 1-2 мин. После промывания водой и высушивания фильтровальной бумагой мазок рассматривают под микроскопом. Споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные части клетки - в синий.

Метод Шеффера-Фултона заключается в следующем. Фиксированный мазок окрашивают 5 %-ным раствором малахитовой зелени с подогревом до появления паров в течение 1-2 мин. Затем препарат промывают водой и дополнительно окрашивают 0,5 %-ным водным раствором сафранина в течение 1 мин. Остаток краски смывают водой и мазок просушивают фильтровальной бумагой. При микроскопии в поле зрения микроскопа споры выглядят зелеными, вегетативные формы - красными.

Окраска капсул. В лабораториях часто проводят исследования для выявления капсул. Капсула плохо воспринимает окраску и при простых методах окраски не выявляется. Капсула хорошо окрашивается

по методу Романовского-Гимза, Муромцева и др. Метод Романовского-Гимза заключается в следующем. Фиксированный мазок окрашивают краской фабричного изготовления, в которую входят азур и эозин. Краску разводят водой 1:10 и препарат окрашивают в течение 20-30 мин. Затем мазок промывают, просушивают фильтровальной бумагой. Капсула окрашивается в розовый цвет, тело микробной клетки - в синий.

По Методу Муромцева фиксированный препарат окрашивают готовой краской Муромцева 20-30 с, промывают водой и высушивают. Капсулы окрашиваются в бледно-розовый цвет, микробная клетка - в темно-синий.

Плесневые грибы. Для изучения морфологии плесневых грибов готовят препараты методом раздавленной капли, а для определения подвижности микробов - методами раздавленной капли и висячей капли. Затем препараты рассматривают под микроскопом с объективом 8 и 40 при слегка опущенном конденсоре.

Метод Раздавленной капли основан на следующем. На середину чистого, обезжиренного предметного стекла наносят бактериологической петлей каплю культуры микроорганизмов, выращенную в жидкой питательной среде, осторожно накрывают покровным стеклом. Капля тонким слоем заполняет пространство между покровным и предметным стеклом.

Для приготовления препарата из культуры микробов, выращенных на плотной питательной среде, вначале на предметное стекло наносят каплю стерильной воды, а затем в нее вносят небольшое количество изучаемых микроорганизмов и накрывают покровным стеклом.

Метод Висячей капли заключается в следующем. Культуру микроорганизмов наносят бактериологической петлей на покровное стекло, а к нему прикладывают предметное стекло с углублением (лункой). Края лунки предварительно смазывают вазелином, чтобы прикрепить покровное стекло. Для рассматривания под микроскопом препарат помещают на предметный столик покровным стеклом вверх, т. е. к объективу. Капля свободно висит в лунке и долго не высыхает, что позволяет длительное время наблюдать за подвижностью микробных клеток.

При изучении морфологии плесневых грибов на предметное стекло необходимо нанести каплю воды и из культуры двумя препаровальными иглами (иглы, закрепленные в деревянные палочки) внести небольшой кусочек мицелия гриба. Его осторожно расщепляют на стекле, не разрушая гифов, спорангиеносцев, конидиеносцев, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом.

Мукор (головчатая плесень) - Одноклеточный плесневый гриб. Спорангиеносцы расположены одиночно, реже кустиками. Мицелий пушистый, в верхней части образует множество черных головок. Споры серые, округлой или овальной формы, при микроскопировании просвечиваются.

Пенициллиум - Плесневый гриб, конидиеносцы имеют перегородки, разветвленные в виде кисточек, на концах ветвей расположены стеригмы, а на них округлые, гладкие споры в виде цепочек (конидии). Мицелий низкий, вырастает в питательную среду. Колонии плесени окрашены в зеленый цвет.

Аспергиллюс - Плесневый гриб, конидиеносец одноклеточный без перегородок. Стеригмы располагаются на булабовидном утолщении конидиеносца. От стеригм отходят по радиусам споры (конидии) округлой формы черного цвета.

Молочная плесень - Мицелий белого цвета с перегородками. Конечные нити мицелия распадаются, образуя споры круглой, овальной и прямоугольной форм (оидии).

Гроздевидная плесень - Конидиеносец многоклеточный. От него отходят круглые оливково-зеленые овальной формы конидии, располагающиеся в гроздевидные скопления. Колонии плесени окрашены в черный цвет.

Шоколадная плесень - Конидии шоколадно-коричневого цвета, образуют длинные в виде бус цепочки.

Лабораторная работа № 4. Методы и средства стерилизации.

Методы и средства стерилизации.

Стерилизация представлена физическим, химическим, механическим и биологическим методами и различными способами.

Целесообразность применения того или иного метода стерилизации и его способов зависит от особенности материала, подлежащего стерилизации, его физических и химических свойств. Продолжительность стерилизации зависит от стерилизуемого объекта, стерилизующего агента и его дозы, температуры и влажности окружающей среды.

Физический метод стерилизации

К способам физического метода стерилизации относятся высушивание, сжигание и прокалывание, кипячение, пастеризация и тиндализация, горячий воздух (сухой жар), ультразвук, ультрафиолетовое и радиоактивное излучение, ток высокой частоты, солнечный свет.

Наиболее распространенным способом стерилизации предметов, допускающих применение высокой температуры, является стерилизация огнем, горячим воздухом и насыщенным водяным паром под давлением.

Огонь используют для сжигания инфицированных предметов, не представляющих какой-либо ценности (ненужные бумаги, старые обои, тряпки, мусор), для обеззараживания мокроты больных

туберкулезом, трупов людей и животных, погибших от особо опасных инфекций, а также для обжигания и прокаливания разных предметов.

Обжигание и прокаливание широко применяется в микробиологической практике для обеззараживания инструментов, лабораторной и аптечной посуды.

Прокаливание в пламени горелки или фламбирование – способ стерилизации, при котором происходит полное обеспложивание объекта, так как погибают и вегетативные клетки, цисты и споры микроорганизмов. Обычно прокаливанием стерилизуют петли, шпатели, пипетки, предметные и покровные стекла, мелкие инструменты и другие зараженные предметы, если их нельзя кипятить. Не рекомендуется стерилизовать прокаливанием ножницы и скальпели, так как под воздействием огня режущая поверхность становится тупой.

Одним из наиболее простых и распространенных способов физического метода стерилизации, применяемых в медицинской практике, является стерилизация горячим воздухом (сухим жаром). Сухожаровая стерилизация осуществляется в сушильных шкафах (печах Пастера). Сухой горячий воздух оказывает бактерицидное, вирусоцидное, спороцидное действие и используется в основном для стерилизации изделий из стекла (лабораторная посуда- чашки Петри, колбы, пипетки, пробирки и др.), а также изделий из металла, которые могут быть простерилизованы паром под давлением. Кроме того, сухой жар используется для стерилизации предметов из фарфора и термостойких веществ (тальк, белая глина), а также минеральных и растительных масел, жиров, вазелина, ланолина, воска. Наиболее эффективным режимом для этого способа стерилизации, обеспечивающего гибель вегетативных форм и спор, является температура 160 – 180 градусов в течение 15 минут.

Одним из популярных видов стерилизаторов являются гласперленовые установки, которые просты в использовании и эффективны в действии, используются для стерилизации металлических инструментов.

Гласперленовый стерилизатор - что это такое?

Это стерилизатор, представляющий из себя установку с емкостью, в которую погружаются инструменты, требующие обеззараживания. В эту же емкость засыпаются специальные шарики, которые собственно и обеспечивают требуемый эффект. Работают эти аппараты от сети, что позволяет им нагреваться, уничтожая все возможные бактерии и микроорганизмы, которые могли остаться на инструментах в ходе работы.

Принцип работы гласперленового прибора

Специфика работы этого оборудования заключается в нагреве специальных гласперленовых шариков (кварцевые или стеклянные шарики диаметром 1, 2, или 2,5 мм), которые засыпаются в емкость прибора. В результате воздействия высоких температур шарики нагреваются и сохраняют в себе тепло, производя стерилизацию. Таким образом, погруженные приборы в емкость с горячими шариками, температура которых превышает 100 градусов, полностью обеззараживаются, после чего их снова можно применять в работе.

Нельзя стерилизовать сухим жаром питательные среды, изотонический раствор, предметы из резины и синтетических материалов, так как жидкости вскипают и выливаются, а резина и синтетические материалы плавятся.

Стерилизация насыщенным паром под давлением – это наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации перевязочного материала, воды, некоторых лекарственных средств, питательных сред, мягкого инвентаря, инструментов, а также для обеззараживания отработанного зараженного материала.

В хирургической практике перевязочный материал, халаты хирургов, белье для оперируемого обеззараживают при помощи пара в автоклавах. Стерилизация паром под давлением осуществляется в специальных аппаратах – автоклавах.

При автоклавировании происходит полное уничтожение всех микроорганизмов и спор. Метод стерилизации паром под давлением основан на нагревании материала насыщенным водяным паром под давлением выше атмосферного. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивают особую эффективность данного способа. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Споры микробов под действием насыщенного водяного пара погибают в течение 10 минут, а вегетативные формы – от 1 до 4 минут.

Высокая бактерицидная сила насыщенного пара обусловлена тем, что под воздействием водяного пара под давлением белки микробной клетки набухают и свертываются, в результате чего микробные клетки гибнут.

Бактерицидное действие насыщенного водяного пара усиливается при избыточном давлении.

Стерилизацию в автоклаве проводят при разных режимах.

Так, простые питательные среды (мясо – пептонный агар и мясо – пептонный бульон) стерилизуют 20 минут при 120 градусах (1 атм.). Но при этом режиме нельзя стерилизовать среды, содержащие белки, углеводы и другие легко изменяющиеся от нагревания вещества. Среда с углеводами стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. 10 – 15 минут или дробно текучим паром.

С помощью высокой температуры можно уничтожить самые стойкие формы патогенных микроорганизмов (включая и спорообразующие) не только на поверхности обеззараживаемых объектов, но и глубине их. В этом и заключается большое преимущество высокой температуры, как надежного средства

стерилизации. Однако, некоторые предметы портятся под действием высокой температуры и в этих случаях приходится прибегать к другим способам и средствам обеззараживания.

Полное обеспложивание материалов и предметов, не допускающих применения стерилизации высокой температурой, достигается путем повторно проводимой стерилизации водяным паром в аппарате Коха при температуре не выше 100 градусов. Этот способ носит название дробной стерилизации. Он сводится к тому, что остающиеся неубитыми споровые формы микробов, через сутки в термостате при 37 градусах прорастают в вегетативные клетки, гибель которых наступает при последующей стерилизации данного объекта текучим паром. Обработку текучим паром проводят три раза по 30 – 40 минут. Однократный прогрев материала при температуре ниже 100 градусов известен под названием пастеризации. Пастеризация предложена Пастером и предназначена в основном для уничтожения в основном бесспорных микроорганизмов. Пастеризацию проводят при 60 – 70 градусах от 15 до 30 минут, при 80 градусах от 10 до 15 минут.

В микробиологической практике пастеризацию посевного материала часто пользуют для выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов и для выявления способности микроорганизмов к образованию спор.

Для жидкостей, теряющих вкусовые и другие ценные качества при воздействии высокой температуры (молоко, ягодные и фруктовые соки, пиво, питательные среды, содержащие углеводы или мочевины и др.) стерилизацию текучим паром проводят при 50 – 60 градусах в течение 15 – 30 минут или при 70 – 80 градусах в течение 5 – 10 минут. При этом погибают микробы средней резистентности, а более стойкие и споры сохраняются.

Дробная 5 – 6 кратная стерилизация при 60 градусах в течение 1 часа носит название тиндализации.

Многие изделия медицинского назначения, изготовленные из полимерных материалов, не выдерживают стерилизации паровым способом по общепринятым режимам. Для многих изделий из – за особенностей, содержащихся в них жидкостей (консервант, лекарственные и другие средства) невозможно стерилизовать общепринятыми способами и методами. Для таких изделий разрабатываются индивидуальные режимы стерилизации, обеспечивающие надежное обеспложивание объектов.

Так, стерилизация ротора для разделения крови на фракции проводится водяным паром при температуре 120 градусов в течение 45 минут. Стерильность контейнеров для консервантов достигается при 110 градусах в течение 60 минут.

Кипячение – способ стерилизации, применяемый для обеспложивания шприцев многоразового пользования, хирургических инструментов, резиновых трубок, стеклянной и металлической посуды.

Стерилизацию кипячением проводят в стерилизаторах. Спорные формы в кипящей воде погибают через 20 – 30 минут. Кипячение в течение 45 минут широко используют для обеззараживания выделений и других заразных материалов, белья, посуды, игрушек, предметов ухода за больными.

Горячую воду (60 – 100 градусов) с мощными средствами используют при стирке и уборке для механического удаления загрязнений и микроорганизмов.

Большинство вегетативных клеток погибают при 70 градусах через 30 минут.

Стерилизация фильтрованием применяется в тех случаях, когда субстраты не выдерживают нагревания, в частности, для сред, содержащих белки, для сывороток, некоторых антибиотиков, витаминов, летучих веществ. Этот прием довольно широко применяется для стерилизации культуральной жидкости, когда необходимо освободить ее от клеток микроорганизмов, но сохранить все содержащиеся в ней продукты обмена в неизменном виде. Способ заключается в фильтровании жидкостей через специальные фильтры, имеющие мелкопористые перегородки и поэтому задерживающие клетки микроорганизмов.

Наиболее широко используются два типа фильтров: мембранные фильтры и фильтры Зейтца.

Мембранные фильтры готовят из коллодия, ацетата, целлюлозы и других материалов.

Фильтры Зейтца изготовлены из смеси асбеста с целлюлозой.

Кроме того, для стерилизации применяются фильтры, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка, из инфузорной земли и из других материалов («свечи» Шамберлана, Беркфельда).

Полтора десятка лет назад научились изготавливать материал, получивший название "трековые мембраны", который с точки зрения фильтровальной науки является идеальным при очистке жидкостей и газов от механических микропримесей (пыли, взвеси, бактерий и т. п.). Эти исследования велись под руководством академика Г. Н. Флерова, активно работавшего над внедрением ядерно-физических методов в различные области науки и техники.

Как изготавливаются трековые мембраны? Пленка из лавсана (или любого другого полимера) обрабатывается потоком высокоэнергетических ионов криптона, ускоряемых на нашем дубненском циклотроне. Энергия ионов задается такой, чтобы в материале не возникло ядерное излучение, но чтобы ионы пробивали пленку насквозь. Каждый ион оставляет в лавсане след из поврежденного им материала, называемый треком (отсюда и название "трековые").

Если затем пленку окунуть на некоторое время в раствор щелочи, то на месте каждого трека образуется сквозное отверстие (пора) цилиндрической формы. Диаметры всех пор оказываются совершенно одинаковыми, а в зависимости от времени травления в щелочи диаметр можно менять в диапазоне от 0,05 до 3 микрон (для сравнения: толщина человеческого волоса - 50 микрон). Поскольку поток ионов составляет

сотни миллиардов в секунду, вы можете наделать таких пор в пленке до миллиарда на 1 см². На основе этих процессов в нашей лаборатории было создано опытное производство трековых мембран.

Мембранные и асбестовые фильтры рассчитаны на одноразовое использование.

При ультрафиолетовом облучении бактерицидный эффект обеспечивают лучи длиной 200 – 450 нм, источником которых являются бактерицидные лампы.

При помощи бактерицидных ламп производят стерилизацию ультрафиолетовыми лучами воздуха в лечебно – профилактических учреждениях, боксах микробиологических лабораторий, на предприятиях пищевой промышленности, в боксах по производству вакцин и сывороток, в операционных, манипуляционных, детских учреждениях и др.

Ультрафиолетовые лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызывать гибель не только вегетативных клеток, но и их спор.

Солнечный свет вызывает гибель микроорганизмов в результате действия ультрафиолетового облучения и высушивания. Высушивание при помощи солнечного света губительно действует на многие виды микроорганизмов, но действие его поверхностное и поэтому в стерилизационной практике солнечный свет играет вспомогательную роль.

В последнее время при лечении ран и ожогов используют в виде гелей покрытия из синтетических и природных полимеров. Для местного лечения ран и ожогов широко применяют полимерные антисептические пленки. В состав их входят такие антимикробные средства широкого спектра действия, как катапол, диоксидин, синий йод, а также сорбит, содержащий глутаровый альдегид. Для стерилизации этих пленок применяется ионизирующее излучение в дозе 20,0 кГр. При промышленном выпуске полимерных антисептических пленок и сорбента стерильность их при таком режиме стерилизации обеспечивается полностью.

Радиоактивное излучение убивает все виды микроорганизмов как в вегетативной, так и в споровой форме. Оно широко применяется для стерилизации на предприятиях, выпускающих стерильную продукцию и стерильные изделия медицинского назначения одноразового пользования, для дезинфекции сточных вод и сырья животного происхождения.

Механический метод стерилизации

Механические способы стерилизации позволяют удалить микробы с поверхности предметов. К ним относятся обмывание, вытряхивание, подметание, влажное протирание, проветривание, вентиляция, обработка пылесосом, стирка.

Химический метод стерилизации

В медицинской практике в настоящее время все более широкое применение находят пластмассы. Они используются в стоматологии, в челюстно – лицевой хирургии, в травматологии, ортопедии, хирургии. Большинство пластмасс не выдерживают тепловых способов стерилизации паром под давлением и сухим жаром (сухим нагретым воздухом). Применяемые для стерилизации таких объектов растворы спирта, диоксида, тройного раствора не обеспечивают стерильности обрабатываемых изделий. Поэтому для стерилизации изделий из пластмасс используют газовый и радиационный методы, а также растворы химических препаратов.

Внедрение в практику лечебных учреждений большого числа изделий из термолабильных материалов способствует внедрению радиационного, газового способов обеззараживания и стерилизации растворами дезинфицирующих средств.

При химической стерилизации используют газы и средства из различных химических групп (перекисные, фенольные, галоидосодержащие, альдегиды, щелочи и кислоты, поверхностно – активные вещества и др.). Для использования в быту выпускаются моющие, чистящие, отбеливающие и другие препараты, оказывающие антимикробное действие за счет введения в их состав различных химических веществ. Эти препараты используются для очистки и обеззараживания санитарно – технического оборудования, посуды, белья и пр.

Пар формальдегида (пароформ) может применяться в лечебных учреждениях для стерилизации металлических изделий медицинского назначения (скальпели, иглы, пинцеты, зонды, зажимы, крючки, кусачки и др.). Перед стерилизацией парами формальдегида изделия необходимо подвергнуть предстерилизационной очистке и тщательно просушить.

При стерилизации каким – либо химическим способом регламент обработки того или иного объекта зависит от особенностей обеззараживаемого объекта, резистентности микробов, особенностей свойств химического препарата, температуры окружающей среды, влажности и других факторов. Так, стерильность металлических инструментов достигается за пять часов выдерживания в герметичной камере с пароформом при температуре не ниже 20 градусов и относительной влажности 95 – 98%, при температуре 15 градусов полная стерильность этих объектов достигается только через 16 часов.

Спороцидная активность глутарового альдегида зависит от температуры. Оптимум его действия наступает при температуре 15 – 25 градусов. При повышении температуры активность спороцидного действия этого препарата снижается.

Стерилизацию химическим методом применяют несколько ограничено. Чаще всего этот метод используют для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов (вакцин и сывороток). К питательным средам чаще всего добавляют такие вещества, как

хлороформ, толуол, эфир. При необходимости освободить среду от этих консервантов ее нагревают на водяной бане при 56 градусах и консерванты испаряются.

Для консервации вакцин или сывороток используют мертиолат, борную кислоту, формалин.

Биологический метод стерилизации

Биологическая стерилизация основывается на применении антибиотиков. Этот метод широко используется при культивировании вирусов.

Преимущества:

1. Использование щадящих температурных режимов стерилизации для термолабильных изделий.

2. Возможность проводить стерилизацию децентрализованно.

Недостатки:

1. Необходимость отмыва стерильной водой от стериллянтов.

2. Короткий срок хранения стерильных изделий

Паровой метод стерилизации:

Паровым стерилизатором называют стерилизатор, в котором стерилизующим агентом является насыщенный пар под давлением. Стерилизуют: стекло, металл, хлопок, резину, полимерные изделия.

Упаковки и сроки сохранения стерильности:

Бикс с фильтром- 20 суток

Бикс без фильтра — 3 суток

Двухслойная бязевая укладка — 3 суток

Крафт-пакеты — 20 суток

Бумага двухслойная крепированная — 20 суток

Воздушный метод стерилизации:

Воздушным стерилизатором называют стерилизатор, в котором стерилизующим агентом является горячий воздух. Стерилизуют: стекло, металл, силиконовую резину.

Упаковки и сроки сохранения стерильности:

Крафт-пакеты — 20 суток

Бумага двухслойная крепированная — 20 суток

Ламинат – бумага – более 6 месяцев

В открытом виде в лотках – сразу же после стерилизации

Химическая стерилизация:

Химическим стерилизатором называют стерилизатор, в котором стерилизующим агентом является газ (смесь ОБ, окись этилена, формальдегид). Стерилизуют: стекло, металл, хлопок, резину, полимерные изделия.

Пакеты из полиэтиленовой пленк — 5 лет

Крафт-пакеты — 20 суток

Комбинированные (ламинат + бумага) прозрачные пакеты, закрытые термосшивателем — от 6 месяцев и более

Двухслойная крепированная бумага — 20 суток

Стерилизация растворами химических средств – при помощи растворов химических веществ.

Контроль качества стерилизации

1. Краткосрочный (оперативный) метод контроля стерилизации:

- Химический метод – использование химических индикаторов стерильности или химических тестов (для паровой, воздушной и газовой стерилизации)

- Физический метод – использование: термометров, максимальных термометров, индикаторных устройств на панели, мановакууметров, секундомеров, часов, таймеров на панели аппарата (для паровой, воздушной и химической стерилизации).

Химические индикаторы стерильности для паровой стерилизации: мочевина, бензойная кислота, сера, ИС (индикатор стерилизации) – Винар (название фирмы) (120, 132 гр.)

Химические индикаторы стерильности для воздушной стерилизации: винная кислота, гидрохинон, тиомочевина, ИС - Винар (160, 180 гр.)

2. Долгосрочный метод контроля стерилизации — использование бактериологического метода (бактериальных тестов со споровой культурой)

Самоконтроль работы стерилизаторов проводит персонал ЛПУ физическим и химическим методом при каждой загрузке стерилизатора.

Для регистрации контроля качества стерилизации ведется журнал - форма 257/у.

Причины неудовлетворительных результатов контроля стерилизации в паровых и воздушных стерилизаторах: неисправность стерилизатора, неполное удаление воздуха из камеры парового стерилизатора перед стерилизацией (образование паровоздушной смеси вместо насыщенного пара), избыточная, неравномерная или неправильная загрузка камеры стерилизатора, нарушение режима стерилизатора, использование несоответствующего упаковочного материала.

Контроль паровой стерилизации изделий медицинского назначения химическими индикаторами (статья) Н.С.Васильев, В.С.Андреев, О.Д.Лямкина НПФ "ВИНАР", Москва

В системе мероприятий по профилактике внутрибольничных инфекций ведущую роль играет стерилизация изделий медицинского назначения (ИМН). Качество и эффективность стерилизации зависят от многих факторов, один из них - контроль стерилизации.

В соответствии с инструктивно-методическими документами Минздрава РФ, для получения объективной оценки качества стерилизации ее контроль должен проводиться комплексно:

- физическими методами - с помощью контрольно-измерительной аппаратуры (термометры, манометры, таймеры);
- химическими методами - с помощью химических индикаторов;
- бактериологическими методами.

Физические и химические методы являются экспресс-методами, так как позволяют оперативно контролировать соблюдение критических параметров стерилизации. Только комплексное использование всех методов контроля дает возможность избежать ошибок при проведении стерилизации и гарантирует от использования некачественно простерилизованных изделий.

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 13683-2000 «Требования к валидации и текущему контролю», при паровой стерилизации необходим периодический и текущий контроль.

P.S. Валидация в технике или в системе менеджмента качества — процесс приведения доказательств того, что требования конкретного пользователя продукта, услуги или системы удовлетворены.

Валидация – это придание законной силы, утверждение, легализация, ратификация (общегражданское право).

Валидация (validation)

- придание законной силы, утверждение, легализация, ратификация (общегражданское право);

- процесс, позволяющий определить, насколько точно с позиций потенциального пользователя продукция удовлетворяет заданные требования.

- процедура, дающая высокую степень уверенности в том, что конкретный процесс, метод или система будет последовательно приводить к результатам, отвечающим заранее установленным критериям приемлемости.

Валидация технологических процессов проводится с использованием образцов не менее трех серий реального продукта с целью доказательства и предоставления документального свидетельства, что процесс (в пределах установленных параметров) обладает повторяемостью и приводит к ожидаемым результатам при производстве полупродукта или готового продукта требуемого качества;

Валидация аналитических методов состоит в определении: точности, воспроизводимости, чувствительности, устойчивости (межлабораторная воспроизводимость), линейности и других метрологических характеристик (GMP - Надлежащая производственная практика, является обязательным требованием при производстве лекарственных средств).

Применительно к системам менеджмента качества согласно стандартам ISO серии 9000:

Валидация - подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены (ISO 9000:2005).

Валидация - подтверждение путем экспертизы и представления объективного доказательства того, что особые требования, предназначенные для конкретного применения, соблюдены.

Примечания:

1. При проектировании и разработке утверждение означает проведение экспертизы продукции с целью определения соответствия нуждам потребителя.

2. Утверждение обычно осуществляется на конечной продукции в определенных условиях эксплуатации. Оно может быть необходимо на более ранних стадиях.

3. Термин «утверждено» используется для обозначения соответствующего статуса.

4. Могут осуществляться многократные утверждения, если предполагается различное использование.

Проведем анализ требований стандарта ISO 9001:

ISO 9001, п. 7.3.6: Валидация проекта и разработки должна осуществляться в соответствии с запланированными мероприятиями, чтобы удостовериться, что полученная в результате продукция соответствует требованиям к установленному или предполагаемому использованию.

ISO 9001, п. 7.5.2: Валидация процессов производства и обслуживания. Организация должна подтверждать все процессы производства и обслуживания, результаты которых нельзя проверить посредством последовательного мониторинга или измерения. К ним относятся все процессы, недостатки которых становятся очевидными только после начала использования продукции или после предоставления услуги. Валидация должна продемонстрировать способность этих процессов достигать запланированных результатов.

ISO 9000, примечание 3 п. 3.4.1: Процесс, в котором подтверждение соответствия конечной продукции затруднено или экономически нецелесообразно, часто относят к "специальному процессу".

Общепринятые требования к специальным производственным процессам, обеспечивающие их валидацию:

1. аттестация производственного процесса (технология, методика, рабочие инструкции...)
2. аттестация производственного оборудования (калибровка сварочных машин или роботов, краскопульты и систем подачи краски...)
3. аттестация материалов (электроды, газ, флюсы, краска, растворители, грунты...)
4. аттестация персонала (квалификационные требования к сварщикам или операторам сварочных роботов, наладчикам, сервисным компаниям...) с соответствующим документальным подтверждением.

Спец. процесс (СП) должен быть в управляемых условиях.

Управляемые условия включают:

- наличие информации, описывающей характеристики продукции и СП;
- наличие нормативной, конструкторской и технологической документации;
- использование пригодного оборудования;
- наличие и использование средств контроля и измерений;
- проведение контроля, измерений и испытаний;
- осуществление деятельности по выполнению СП;
- наличие квалифицированного и аттестованного персонала осуществляющего СП;
- повторную валидацию;

• наличие записей, содержащих достигнутые результаты или свидетельства осуществленной деятельности при выполнении СП.

Чем отличается валидация от верификации?

Стандарт ИСО 9000 определяет эти термины следующим образом:
"Верификация - подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что установленные требования были выполнены".

"Валидация - подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены".

Казалось бы, определения чуть ли не совпадают и уж если не полностью, то в значительной части. И, тем не менее, верификация и валидация - принципиально разные действия.

Перевод с английского этих терминов дает определенную пищу для понимания разницы: **verification - проверка, validation - придание законной силы.**

Таким образом, можно констатировать следующее:

верификация - проводится практически всегда, выполняется методом проверки (сличения) характеристик продукции с заданными требованиями, результатом является вывод о соответствии (или несоответствии) продукции; **валидация** - проводится при необходимости, выполняется методом анализа заданных условий применения и оценки соответствия характеристик продукции этим требованиям, результатом является вывод о возможности применения продукции для конкретных условий.

Стандарт ИСО 9001 в двух местах обращается к этим терминам. Проверим, соответствует ли данное мной толкование содержанию разделов 7.3.5, 7.3.6 и 7.5.2.

Если фармацевтический завод выпускает лекарства, то он будет проверять лишь их соответствие требованиям (т.е. верификацией), а проблемами применения конкретных лекарств конкретными пациентами заниматься будет врач (валидация).

В случае использования паровых стерилизаторов периодический контроль проводится 1 раз в неделю, контролируется удаление воздуха из камеры стерилизатора. Такой контроль в гравитационных стерилизаторах (ГК-100-3, ГП-400, ГП-560, ГП-700 и др.) осуществляют с помощью Тест-ИХ (Инструкция №11-7/18-09, утвержденная Минздравом РФ 18.12.03), в форвакуумных стерилизаторах (ГК-100-4, ГК-100-5) - с помощью Боуи-Дик-теста. Текущий контроль осуществляется в каждом цикле стерилизации и включает в себя 3 вида контроля.

1. Контроль потоков медицинских изделий - во избежание случайного смешения стерилизованных изделий с нестерилизованными. На каждую упаковку и/или стерилизационную коробку после закладки изделий наклеивают индикаторы процесса, относящиеся к классу 1 по классификации ГОСТ Р ИСО 11140-1. Минздравом РФ для этих целей разрешены индикаторы ИСПС-01, ИСПС-02 (НПФ «Винар»), используемые при всех режимах в паровых стерилизаторах всех типов.

2. Контроль условий стерилизации внутри упаковок и изделий - осуществляется с применением «внутренних» индикаторов. По ним персонал клинических отделений перед непосредственным использованием медицинских изделий контролирует их стерильность. Это - косвенный метод. Прямым методом является бактериологический контроль, который осуществляется путем посева смывов с простерилизованных изделий не реже 1 раза в месяц. Однако только косвенный метод с использованием «внутренних» химических индикаторов обеспечивает 100% достоверность данных стерильности каждого изделия.

Для закладки внутрь упаковок и изделий необходимо пользоваться индикаторами, специально разрешенными для этих целей, имеющими санитарно-гигиеническое заключение и зарегистрированными как индикаторы для «внутреннего» контроля. Ни в коем случае не допускается использование в гравитационных стерилизаторах одного и того же индикатора для наклеивания снаружи и закладки внутрь упаковок и изделий. Применение разных индикаторов для контроля условий внутри и снаружи изделий связано с медленным прогревом стерилизуемых изделий в гравитационных стерилизаторах.

В гравитационных стерилизаторах длительность прогрева трудно-стерилизуемых изделий в режиме «120+2 °С, 45 мин может достигать 25 мин, т.е. после достижения заданной температуры в камере стерилизатора (снаружи изделия) необходимо еще 25 мин для прогрева изделия. Поэтому длительность достижения конечного состояния «внутреннего» индикатора при температуре 120°С должно быть на 25 мин меньше, чем «наружного»: для «наружного» - 45 мин, для «внутреннего» - 20 мин.

В форвакуумных паровых стерилизаторах (ГОСТ Р 51935-2002) самые трудностерилизуемые изделия должны прогреваться в течение 30 с и соответственно для таких паровых стерилизаторов можно использовать один и тот же индикатор для «наружного» и «внутреннего» контроля.

«Внутренние» индикаторы вкладывают в наиболее труднодоступные для пара места - в трикотажные и текстильные изделия, перчатки, в «пустоты» (в чашки Петри), внутрь упаковок. Закладку индикаторов производят в процессе упаковки либо в клинических, либо в стерилизационных отделениях. При использовании одноразовых упаковочных материалов «внутренние» индикаторы закладывают в каждую упаковку. В стерилизационные коробки (биксы) с пористыми изделиями и с изделиями с полостями при видовой и целенаправленной укладке закладывают не менее 3 индикаторов и 4 индикатора - при секторной укладке (по 1 в каждый сектор); в биксы с непористыми массивными изделиями достаточно заложить 1 индикатор.

В качестве «внутренних» индикаторов для гравитационных стерилизаторов Минздравом РФ разрешены только индикаторы Стеритест-П-120/45-02 и Стеритест-П-132/20-02 (НПФ «Винар»), аналогов которым нет ни в России, ни за рубежом, для форвакуумных - индикаторы Интест-П-121/20, Интест-П-126/10, Интест-П-134/5 (НПФ «Винар»).

3. Контроль условий в камере парового стерилизатора, вне стерилизуемых изделий и упаковок - «наружный» контроль. Используются индикаторы с контрольными значениями достижения конечного состояния, соответствующими минимально допустимым условиям. Например, для режима 132 (2°С, 20+3 мин минимально допустимые условия: 130°С в течение 20 мин. Результаты контроля становятся известны сразу после завершения цикла стерилизации в стерилизационном отделении. Персонал, эксплуатирующий паровые стерилизаторы, проводит «наружный» контроль, закладывая химические индикаторы в камеру стерилизатора снаружи упаковок в контрольные точки. Контрольные точки должны быть расположены в холодных зонах камеры, определяемых по результатам валидации (тестирования) стерилизатора. При отсутствии валидации для повышения надежности контроля индикаторы закладывают во все контрольные точки в соответствии с методическими указаниями МУ 15/6-5 (от 28.02.91). В качестве «наружных» индикаторов для гравитационных паровых стерилизаторов Минздравом РФ разрешены к использованию индикаторы класса 4 (ГОСТ Р ИСО 11140-1) ИС-120, ИС-132, МедИС-120/45, МедИС-126/30, МедИС-132/20, Стериконт-П-120/45, Стериконт-П-132/20 (НПФ «Винар»), для форвакуумных паровых стерилизаторов - Интест-П-121/20, Интест-П-126/10, Интест-П-134/5 (НПФ «Винар»).

Таким образом, для получения объективной информации о качестве стерилизации необходимо использовать комплекс физических, биологических и химических методов. Химический метод состоит из периодического и текущего контроля стерилизации. Периодическим контролем для паровых стерилизаторов является контроль удаления воздуха, проводимый 1 раз в неделю в гравитационных стерилизаторах с помощью Тест-ИХ, в форвакуумных стерилизаторах - с помощью Боуи-Дик-теста.

Текущий контроль состоит из контроля потоков стерилизованных и нестерилизованных изделий (индикаторы ИСПС-01, ИСПС-02), «внутреннего» контроля (для гравитационных стерилизаторов - индикаторы Стеритест- П-120/45, Стеритест-П-132/20, для форвакуумных - Интест-П-121/20, Интест-П-126/10, Интест-П-134/5) и «наружного» контроля (для гравитационных стерилизаторов - индикаторы ИС-120, ИС-132, МедИС-120/45, МедИС-126/30, МедИС-132/20, Стериконт-П-120/45, Стериконт-П-132/20, для форвакуумных - Интест-П-121/20, Интест-П-126/10, Интест-П-134/5).

Самостоятельная работа № 1. Методы и режим стерилизации различных материалов

Цель: изучить методы стерилизации различных материалов.

Разработать и занести в тетрадь таблицу «Методы и режим стерилизации различных материалов».

Дано: таблица.

МЕТОДЫ И РЕЖИМ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Метод стерилизации	Аппаратура	Температура	Время (мин)	Материал
Кипячение				
Прокаливание				
Автоклавирование				
Сухим жаром				

Пастеризация				
Тиндализация				
Фильтрация				
Лиофильная сушка				
Лучистая энергия				
Ионизирующая радиация				

Вывод:

Самостоятельная работа № 2. Контроль эффективности стерилизации

Цель: оценить качество работы автоклава. Объяснить механизм стерилизации.

Дано: методические рекомендации, опыт № 1.

Для контроля работы автоклава и режима стерилизации используют следующие методы:

1. физические – контактные температуры, установленные на автоклаве;
2. химические – различные химические вещества, имеющие определенную температуру плавления (бензойная кислота - 121⁰С, антипирин – 113⁰С, резорцин – 110⁰С);
3. бактериологические тесты.

В пробирки с питательной средой засевают фильтровальную бумагу, зараженную спороносной культурой. 1-я пробирка («О») автоклавируется при оптимальном режиме, 2-я пробирка («К») не автоклавируется. Обе пробирки помещают в термостаты при 37⁰С. Результаты регистрируются через 18-24 час

Результат:



«К»



«О»

Вывод:

Ответ к сам. работе № 1

МЕТОДЫ И РЕЖИМ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Метод стерилизации	Аппаратура	Температура	Время (мин.)	Материал
Кипячение	стерилизатор	100 ⁰ С	20-30	Инструменты, шприцы, иглы, шелк
Прокаливание	газовая горелка, спиртовка	до покраснения металла	-	Бактериальная петля, препаровальная игла
Автоклавирувание	Автоклав	120 ⁰ С (давление – одна дополнительная атмосфера)	20-30	МПА, МПБ, пептонная вода, физиологический раствор и др.

Текучим паром	аппарат Коха	80 – 100 ⁰ С	30-60 ежедневно 3 дня	Среды с углеводами
Сухим жаром	печь Пастера	160 – 170 ⁰ С	90	Стеклопосуда, тампоны и др.
Пастеризация	аппарат Коха, водяная баня	65 – 70 ⁰ С 70 – 80 ⁰ С	60 5-10	Молоко
Тиндализация	аппарат Коха, водяная баня	56 – 58 ⁰ С 70 – 80 ⁰ С	по 1 часу 5 дней по 1 часу 3 дня	Сыворотки Витамины
Фильтрование	Фильтры: Зейца, Бекерфельда, Шамберлана, нитроцеллюлозные мембраны	-	-	Сыворотки. Лекарственные препараты.

Лабораторная работа № 6.

Действие физических и химических факторов на микроорганизмы

Цель занятия:

изучить действие на микробы физических и химических факторов; понятия «асептика» и «антисептика»; методы стерилизации и аппаратуру.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Действие на микроорганизмы высоких и низких температур, давления. Понятие «стерилизация».
2. Понятия «асептика» и «антисептика»
3. Методы стерилизации, аппаратура.
4. Действие на микроорганизмы факторов высушивания. Лиофильное высушивание.
5. Действие света, ультразвука, лучистой энергии, ионизирующей радиации.
6. Действие химических факторов на микробы. Дезинфицирующие и антисептические вещества.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

- готовить посуду к стерилизации в сухожаровом шкафу и автоклаве;
- оценить результаты контроля стерильности работы автоклава и сухожарового шкафа;
- оценить результаты определения чувствительности микробов к антимикробным веществам (дезинфектанты, антисептики).

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ИМЕТЬ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ

об индексе токсичности при применении антисептиков; о **режиме асептики при изготовлении лекарств**; о химических консервантах крови, биопрепаратов, **живых вакцин**.

Показатель токсичности антисептического средства, вычисляемый как отношение минимальной концентрации препарата, вызывающей гибель тест-микроба в течение 10 мин., к максимальной концентрации того же препарата, не подавляющей рост культуры тканей куриного эмбриона.

Консервирующие растворы для крови:

Для увеличения продолжительности сроков хранения крови вне организма используют специальные растворы – *гемоконсерванты*. В качестве обязательного компонента во все консервирующие растворы входят особые химические вещества – *стабилизаторы*. Широкое распространение в практической деятельности получили такие стабилизаторы как лимонная кислота и цитрат натрия. Они связывают ионы кальция, что способствует подавлению одного из этапов процесса гемостаза – образования тромбина.

Важным свойством *цитрата натрия* является то, что через 20–30 мин после трансфузии крови, стабилизированной с его помощью, он почти полностью (не менее 90%) выводится из организма.

Необходимо помнить о том, что при острой кровопотере или других состояниях (гипотермия) в результате введения стабилизированной цитратом натрия крови может возникнуть дефицит ионов кальция, поэтому после гемотрансфузии объемом в 500 мл надо внутривенно ввести 10 мл 10% раствора хлорида или глюконата кальция. Этого бывает вполне достаточно для восполнения возникающего дефицита кальция.

К другой разновидности стабилизаторов относится *гепарин*. Он препятствует свертыванию крови, непосредственно связывая и инактивируя тромбин. Существенным недостатком гепарина при использовании его в качестве стабилизатора является то, что он не позволяет длительно сохранять консервированную с его помощью кровь, потому что по мере увеличения срока хранения происходит

инактивация гепарина. В результате этого уже через сутки образуются мелкие, а через двое суток и крупные сгустки крови.

Биологические консерванты

В основу закваски (биологического консерванта) входит одна или несколько живых культур молочнокислых бактерий, которые продуцируют молочную кислоту, подавляющую нежелательную анаэробную микрофлору.

С целью предупреждения развития аэробной микрофлоры производители заквасок используют гетероферментативные молочнокислые бактерии, прежде всего *Lactobacillus buchneri*, а также пропионовокислые бактерии. Как первые, так и вторые способны синтезировать и накапливать в массе корма пропионовую кислоту и некоторые другие вещества, угнетающе действующие на дрожжи и плесени.

Кроме того, ряд заквасок содержит ферменты, способные расщеплять клетчатку растительных клеток до простых сахаров. Это позволяет успешно заквашивать трудноусвояемые корма или работать в сложных погодных условиях. Причина популярности биологических консервантов кроется в их меньшей стоимости по сравнению с химическими продуктами. Кроме того, они обладают более высокой технологичностью: абсолютно не коррозионны, не токсичны, почти не вызывают раздражения кожи и слизистых, не имеют резкого запаха.

Биологические консерванты производятся в двух формах - жидкой и сухой (лиофильно высушенные). Сухие консерванты имеют ряд преимуществ: срок хранения составляет год и более (у жидких - до 3 месяцев); расход леофильно высушенных консервантов меньше, при этом жидкие более требовательны к условиям хранения.

В числе поставщиков биологических силосных заквасок на российский рынок упомянем компании «БИОТРОФ», «Биомин», «Капитал-ПРОК», AGRAVIS Raiffeisen AG, «Лаллеманд», «НИИ Пробиотиков», «Сиббиофарм», «НТЦ «БИО», «Vilofoss», «Фидимпорт».

Химические консерванты

Химические консерванты можно разделить на следующие виды: 1) минеральные (неорганические) кислоты - серная, соляная, фосфорная и их смеси; 2) органические (антибактериальные) кислоты - муравьиная, уксусная, пропионовая, бензойная и их смеси; 3) антибактериальные соли - нитрит натрия, бензоат натрия, пиросульфат натрия, бисульфат натрия и т.д.; 4) газообразные консерванты - диоксид серы, аммиак, диоксид углерода, азот и т.д.

Отметим, что неорганические кислоты резко повышают кислотность силоса, ведут к различным заболеваниям животных и снижению их продуктивности, в связи с чем мало используются.

На сегодняшний день наибольшую популярность на российском рынке среди продуктов этой категории завоевали химические консерванты на основе органических кислот. Механизм их действия заключается в резком понижении рН среды и ингибировании жизнедеятельности патогенной микрофлоры. Такие консерванты обладают более высокой эффективностью, надежностью и более длительным сроком хранения по сравнению с биологическими заквасками, характеризуются сильным бактерицидным и фунгицидным действием и не имеют негативных побочных эффектов. Эти кислоты (летучие жирные кислоты - ЛЖК) естественны для жвачных животных, так как являются продуктами их метаболизма. Преимущество химического консервирования перед другими способами заготовки кормов состоит еще и в том, что оно обладает универсальностью, то есть позволяет сохранять любые виды кормовых культур, злаковых и бобовых. Наиболее эффективным считается применение консервантов, состоящих из нескольких компонентов (муравьиной, пропионовой кислот и их солей и т.д.). Подобные смеси активно воздействуют на разные группы возбудителей, такие как бактерии, дрожжи, грибы, что позволяет получать силос высокого качества.

Влияние физических факторов на микроорганизмы

Температура является наиболее значимым фактором, оказывающим влияние на жизнедеятельность микробов. Температура, необходимая для роста и размножения бактерий одного и того же вида варьирует в широких пределах. Различают температурный оптимум, минимум и максимум.

Температурный оптимум соответствует физиологической норме данного вида микробов, при которой размножение происходит быстро и интенсивно. Для большинства **патогенных и условно-патогенных микробов** температурный оптимум соответствует **37⁰С**.

Температурный минимум соответствует температуре, при которой данный вид микроба **не проявляет жизнедеятельность**.

Температурный максимум – температура, при которой рост и размножение прекращается, **все процессы метаболизма снижаются** и может наступить гибель.

В зависимости от температуры, оптимальной для жизнедеятельности, различают 3 группы микроорганизмов:

- 1) *психрофильные*, холодолюбивые, размножающиеся при температуре ниже 20⁰С (иерсинии, психрофильные варианты клебсиелл, псевдомонады, вызывающие заболевания человека. Размножаясь в пищевых продуктах, они более вирулентны при низких температурах);
- 2) *термофильные*, оптимум развития которых лежит в пределах 55⁰С (в организме теплокровных не размножаются и медицинского значения не имеют);

3) *мезофильные*, активно размножаются при температуре 20-40⁰С, оптимум температуры развития для них 37⁰С (патогенные для человека бактерии).

Микроорганизмы хорошо выдерживают низкие температуры. На этом основано длительное сохранение бактерий в замороженном состоянии. Однако ниже температурного минимума проявляется повреждающее действие низких температур, обусловленное разрывом клеточной мембраны кристаллами льда и приостановкой метаболических процессов.

Низкая температура приостанавливает гнилостные и бродильные процессы. Это лежит в основе консервации субстратов (в частности, пищевых продуктов) холодом.

Губительное действие высокой температуры (выше температурного максимума для каждой группы) используется при стерилизации. **Стерилизация** – обеспложивание – это процесс умерщвления на изделиях или в изделиях или удаление из объекта микроорганизмов всех видов, находящихся на всех стадиях развития, включая споры (термические и химические методы и средства). Для гибели вегетативных форм бактерий достаточно действия температуры 60⁰С в течение 20-30 мин; споры погибают при 170⁰С или при температуре 120⁰С пара под давлением (в автоклаве).

Асептика – комплекс мероприятий, направленных против возможности попадания микроорганизмов в рану, ткани, органы, полости тела больного при хирургических операциях, перевязках, инструментальных исследованиях, а также на предотвращение микробного и другого загрязнения при получении стерильной продукции на всех этапах технологического процесса.

Антисептика – комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс на поврежденных или интактных участках кожи или слизистых оболочек.

Дезинфекция – обеззараживание объектов окружающей среды: уничтожение патогенных для человека и животных микроорганизмов с помощью химических веществ, обладающих антимикробным действием.

Рост и размножение микробов происходит при наличии воды, необходимой для пассивной и активного транспорта питательных веществ в цитоплазму клетки. Снижение влажности (высушивание) приводит к переходу клетки в стадию покоя, а затем к гибели. Наименее устойчивыми к высушиванию являются патогенные микроорганизмы – менингококки, гонококки, трепонемы, бактерии коклюша, ортомиксо-, парамиксо- и герпес-вирусы. Микобактерии туберкулеза, вирус натуральной оспы, сальмонеллы, актиномицеты, грибы устойчивы к высушиванию. Особой устойчивостью к высушиванию обладают споры бактерий. Устойчивость к высушиванию повышается, если микробы предварительно замораживают. Для сохранения жизнеспособности и стабильности свойств микроорганизмов в производственных целях используется метод **лиофильной сушки** - высушивание из замороженного состояния под глубоким вакуумом.

В процессе лиофилизации производят: 1) предварительное замораживание материала при t-40⁰- -45⁰С в спиртовых ваннах в течение 30-40 мин; 2) осуществляют сушку из замороженного состояния в вакууме в сублимационных аппаратах в течение 24-28 часов.

Процесс высушивания имеет 2 фазы: сублимация льда при tниже 0⁰С и десорбцию - удаление части свободной и связанной воды при t выше 0⁰С.

Лиофилизацию используют для получения сухих препаратов, когда не происходит денатурации белков и не изменяется структура материала (антисыворотки, вакцины, сухая бактериальная масса). В лабораторных условиях лиофилизированные культуры микробов сохраняются в течение 10-20 лет, причем культура остается чистой и не подвергается мутациям.

Прокаливание производят в пламени спиртовки или газовой горелки. Этим способом стерилизуют бактериологические петли, препаровальные иглы, пинцеты и некоторые другие инструменты.

Кипячение применяют для стерилизации шприцев, мелкого хирургического инструментария, предметных, покровных стекол и т.д. Стерилизацию проводят в стерилизаторах, в которые наливают воду и доводят ее до кипения. Для устранения жесткости и повышения температуры кипения к воде добавляют 1-2% бикарбонат натрия. Инструменты обычно кипятят в течение 30 мин. Данный метод не обеспечивает полной стерилизации, так как споры бактерий при этом не погибают.

Пастеризация - стерилизация при 65-70⁰С в течение 1 часа для уничтожения бесспорных микроорганизмов (молоко освобождается от бруцелл, микобактерий туберкулеза, шигелл, сальмонелл, стафилококков) Хранят на холоде

Тиндализация - дробная стерилизация материалов при 56-58⁰С в течение 1 часа 5-6 дней подряд. Применяется для стерилизации легко разрушающихся при высокой температуре веществ (сыворотка крови, витамины и др.).

Действие **лучистой энергии** на микроорганизмы. Солнечный свет, особенно его ультрафиолетовый и инфракрасный спектры, губительно действуют на вегетативные формы микробов в течение нескольких минут.

Инфракрасное излучение используется для стерилизации объектов, которая достигается за счет теплового воздействия температурой 300⁰С в течение 30 мин. Инфракрасные лучи оказывают воздействие на свободнорадикальные процессы, в результате чего нарушаются химические связи в молекулах микробной клетки.

Для дезинфекции воздуха помещений лечебно-профилактических учреждений и аптек широко используются ртутно-кварцевые и ртутно-увиолевые лампы, являющиеся источником ультрафиолетовых лучей. При действии УФЛ с длиной волны 254 нм в дозе 1,5-5 мкВт т/с на 1 см² при 30-ти минутной экспозиции погибают все вегетативные формы бактерий. Повреждающее действие УФ излучения вызвано повреждением ДНК микробных клеток, приводящим к мутациям и гибели.

Ионизирующая радиация обладает мощным проникающим и повреждающим действием на клеточный геном микробов. Для стерилизации инструментов одноразового использования (игл, шприцев) используют гамма-излучение, источником которого являются радиоактивные изотопы ⁶⁰Со и ¹³⁷Ссв дозе 1,5-2 МН.рад. Этим методом стерилизуют также системы переливания крови и шовный материал. Действие ультразвука в определенных частотах на микроорганизмы вызывает деполимеризацию оргanelл клетки, денатурацию входящих в их состав молекул в результате локального нагревания или повышения давления. Стерилизация объектов ультразвуком осуществляется на промышленных предприятиях, так как источником УЗ являются мощные генераторы. Стерилизации подвергаются жидкие среды, в которых убиваются не только вегетативные формы, но и споры.

Стерилизация фильтрованием - освобождение от микробов материала, который не может быть подвергнут нагреванию (сыворотка крови, ряд лекарств). Используются фильтры с очень мелкими порами, не пропускающими микробы: из фарфора (фильтр Шамберлена), каолина, асбестовых пластинок (фильтр Зейтца). Фильтрация происходит под повышенным давлением, жидкость нагнетается через поры фильтра в приемник или создается разрежение воздуха в приемнике и жидкость всасывается в него через фильтр. К фильтрующему прибору присоединяется нагнетающий или разрежающий насос. Прибор стерилизуют в автоклаве.

Влияние химических факторов на микроорганизмы

Химические средства неспецифического действия, применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов, обозначают термином «**дезинфектанты**», а вещества, используемые для обработки живых тканей – «**антисептики**».

Антисептики – антимикробные средства широкого спектра действия, оказывающие губительное или статическое влияние на микроорганизмы и обладающие высокой активностью. Антисептики должны сохранять активность в присутствии продуктов тканевого распада; не должно быть местного раздражающего фактора и угнетающего влияния на процессы заживления раны.

Антисептики подразделяются по механизму действия и по химической структуре:

1. Галогеносодержащие соединения (препараты йода и хлора). Взаимодействуют с микробными белками, что сопровождается их инактивацией и денатурацией;
2. Алкоголи или спирты (этанол, изопропанол и др.) осаждают белки и вымывают липиды из клеточной стенки;
3. Окислители (перекись водорода, калия перманганат) окисляют метаболиты и ферменты микроорганизмов, либо денатурируют белки;
4. Кислоты, щелочи и соли (борная, салициловая кислоты, раствор аммиака) диссоциируют при проникновении через клеточную оболочку и вызывают денатурацию белков цитоплазмы;
5. Соединения фенола (карболовая кислота, трикрезол) денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки;
6. Альдегиды (формальдегид, лизоформ, цимизоль и т.д.) - за счет присоединения к аминокетогруппам белка происходит денатурация белка;
7. Красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый) - обладают избирательностью, так как реагируют с определенными кислотными или основными группами веществ бактерий;
8. Производные нитрофурана (фурацилин) тормозят клеточное дыхание микроорганизмов, действуя на дегидрогеназы;
9. Дeterгенты (циригель, дегмицид) вызывают изменение проницаемости цитоплазматической мембраны.

Самостоятельная работа № 3. Определение чувствительности микроорганизмов к антисептикам

Цель: оценить чувствительность микробных клеток к антисептикам. Объяснить механизм действия антисептика в каждом конкретном случае. Зарисовать. Сделать вывод.

Дано: опыт № 2 (посев кишечной палочки с внесенными антисептиками - йод, метиленовый синий, карболовая кислота, хлорамин);

Результат:



Вывод:

Лабораторная работа № 7.

Классификация питательных сред, требования к ним.

Питательной средой в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения бактерий или других микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Питательные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения. Большое значение имеет наличие в питательной среде ростовых факторов, которые катализируют метаболические процессы микробной клетки (витамины группы В, никотиновая кислота и др.).

Искусственные среды готовят по определенным рецептам из различных настоев или отваров животного или растительного происхождения с добавлением неорганических солей, углеводов и азотистых веществ.

В бактериологической практике чаще всего используют сухие питательные среды, которые получают на основе достижений современной биотехнологии. Для их приготовления используют экономически рентабельное непищевое сырье: утратившие срок годности кровезаменители (гидролизин - кислотный гидролизат крови животных, аминокептид - ферментативный гидролизат крови; продукты биотехнологии (кормовые дрожжи, кормовой лизин, виноградная мука, белколизин). Сухие питательные среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и имеют относительно стандартный состав.

По консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими, плотными. Плотные среды готовят путем добавления к жидкой среде 1,5 - 2% агара, полужидкие - 0,3 - 0,7 % агара. Агар представляет собой продукт переработки особого вида морских водорослей, он плавится при температуре 80 -86 °С, затвердевает при температуре около 40 °С и в застывшем состоянии придает среде плотность. В некоторых случаях для получения плотных питательных сред используют желатин (10 - 15%). Ряд естественных питательных сред (свернутая сыворотка крови, свернутый яичный белок) сами по себе являются плотными.

По целевому назначению среды подразделяют на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

К основным относятся среды, применяемые для выращивания многих бактерий. Это триптические гидролизаты мясных, рыбных продуктов, крови животных или казеина, из которых готовят жидкую среду - питательный бульон и плотную - питательный агар. Такие среды служат основой для приготовления сложных питательных сред - сахарных, кровяных и др., удовлетворяющих пищевые потребности патогенных бактерий.

Элективные питательные среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида (или определенной группы) из материалов, содержащих разнообразную постороннюю микрофлору. При создании элективных питательных сред исходят из биологических особенностей, которые отличают данные микроорганизмы от большинства других. Например, избирательный рост стафилококков наблюдается при повышенной концентрации хлорида натрия, холерного вибриона - в щелочной среде и т. д.

Дифференциально-диагностические питательные среды применяются для разграничения отдельных видов (или групп) микроорганизмов. Принцип построения этих сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности вследствие неодинакового набора ферментов.

Особую группу составляют синтетические и полусинтетические питательные среды. В состав синтетических сред входят химически чистые вещества: аминокислоты, минеральные соли, углеводы, витамины. В полусинтетические среды дополнительно включают пептон, дрожжевой экстракт и другие питательные вещества. Эти среды чаще всего применяют в научно-исследовательской работе и в микробиологической промышленности при получении антибиотиков, вакцин и других препаратов.

В последние годы в целях экономии питательных сред и ускоренной идентификации некоторых микроорганизмов (энтеробактерии, стафилококки, стрептококки и др.) применяются так называемые микротест-системы (МТС). Они представляют собой полистироловые пластины с лунками, в которых содержатся стерильные дифференциально-диагностические среды. Стерилизацию МТС проводят УФ-облучением. Микротест-системы особенно удобны при массовых бактериологических исследованиях в практических лабораториях.

Требования, предъявляемые к питательным средам

Любая питательная среда должна отвечать следующим требованиям:

- быть **питательными**, то есть содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят *факторы роста* - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.

- иметь **оптимальную** концентрацию водородных ионов - рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства **патогенных бактерий** оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2 - 7,4). Исключение составляют холерный вибрион - его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5 - 9,0) и возбудитель туберкулёза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2 - 6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать *буферностью*, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.

- быть **изотоничными** для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида.

- быть **стерильными**, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды.

- плотные среды должны быть **влажными** и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию.

- обладать определённым **окислительно-восстановительным** потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Например, анаэробы размножаются при RH_2 , не выше 5, а аэробы - при RH_2 не ниже 10.

- быть по возможности **унифицированным**, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов.

Желательно, чтобы среды были *прозрачными* - удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Техника разлива питательных сред

Микроорганизмы в лабораторных условиях культивируют на различных питательных средах, которые разливают в стерильные пробирки, чашки Петри, колбы, матрацы и др. Разлив среды производят стерильно около пламени: сосуд берут в правую руку, держа пробку между мизинцем и ладонью левой руки, вращательным движением вынимают из сосуда, края которого обжигают в пламени спиртовки. При разливе в чашки Петри свободными пальцами левой руки приоткрывают крышку чашки в сторону пламени, выливают в нее 15-20 мл среды, слегка покачивая чашку.

Плотные питательные среды в колбах или пробирках плавят на водяной бане, сняв с сосуда бумажный колпачок. Затем среду охлаждают до 60° С.

При разливе агаризованных сред в пробирки для получения скошенного столбика сосуд берут в правую руку, а стерильную пробирку – в левую. Мизинцем левой руки вынимают пробку из сосуда, а мизинцем правой руки – из пробирки. В обеих руках пробки удерживают между ладонью и мизинцем, а свободными пальцами держат сосуд и пробирку в зоне стерильности. В пробирку среду наливают на 1/3. Для получения столбика пробирку оставляют в вертикальном положении, а для получения скошенной поверхности пробирку оставляют в наклонном положении.

Жидкие среды разливают в пробирки или колбы с помощью стеклянных пипеток: в левую руку берут завернутую в стерильную бумагу пипетку, правой рукой вращением разрывают бумагу, снимают ту половину, которая находится на конце, закрытом ватой. Правой рукой держат пипетку за открытый край, левой снимают оставшуюся обертку и проводят пипетку через пламя спиртовки. В левую руку берут сосуд с питательной средой, возле пламени мизинцем правой руки открывают пробку. Края сосуда обжигают в пламени, вводят пипетку в сосуд и отбирают нужное количество среды.

Техника посева и пересева культур микроорганизмов (инокуляция)

Посев – внесение инокулята (части исследуемого материала) в стерильную питательную среду, *пересев* – перенос части выращенной на питательной среде культуры микроорганизма на другую, свежую стерильную среду.

Посев (пересев) микроорганизмов проводят при соблюдении правил стерильности, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами и не загрязнять окружающую среду исследуемыми культурами микроорганизмов.

Пересев микроорганизмов, выращенных на твёрдой среде в пробирках, в другие пробирки с плотной средой. Посевы петлей на скошенную агаризованную среду производят: зигзагообразным штрихом, начиная со дна косяка где есть конденсационная вода, скользя петлёй по поверхности плотной среды от одного края пробирки к другому; прямой чертой, для чего проводят петлёй прямую линию снизу вверх посередине поверхности питательной среды; сплошным посевом, распределяя материал круговыми движениями по всей поверхности среды. При посеве и пересеве необходимо соблюдать следующие приёмы:

1. В левую руку берут две пробирки – одну со стерильной средой, другую – с культурой и держат в наклонном положении. В правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки.

2. Вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянным пальцами правой руки и обжигают края пробирок. Следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов.

3. Петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев со скошенной питательной среды, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности ПС или внутренней стенки пробирки, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы с плотной среды на кольцо петли.

4. Вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задеть стенок пробирки. При посеве на скошенные питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь кольцом петли поверхности плотной среды, проводят от дна вверх штрих.

5. Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают.

6. Петлю вновь прокалывают в пламени горелки и ставят в штатив или стакан вверх кольцом петли.

7. На пробирке делают надпись: название культуры и дату посева.

Пересев культур микроорганизмов в жидкую среду. Пересев в жидкую среду можно производить петлей или пипеткой. Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватные пробки. Петлей или пипеткой отбирают материал из пробирки с выросшей культурой и переносят в пробирку со стерильной средой. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой стерильной среды, все время, смывая его средой. Засеянные пробирки закрывают, подписывают, датируют и ставят на инкубирование.

Пересев на плотные среды в чашки Петри. Пересев в чашки Петри проводится глубинным и поверхностным способами.

Поверхностный способ посева: плотную стерильную питательную среду расплавляют на кипящей водяной бане и, соблюдая правила стерильности, разливают ровным слоем толщиной 3-5 мм в стерильные чашки Петри. Оставляют до полного застывания среды. На поверхность среды вносят инокулят и стеклянным шпателем равномерно распределяют его по поверхности (посев газоном) или петлей в виде параллельных или зигзагообразных штрихов.

Глубинный способ посева: на дно стерильной чашки Петри вносят петлей или пипеткой определённый объём посевного материала. Обжигают края пробирки или колбы в пламени горелки и заливают расплавленной охлаждённой агаризованной питательной средой, соблюдая правила асептики. Распределяют равномерно посевной материал в питательной среде, для чего круговыми движениями перемещают чашку Петри по поверхности стола. Оставляют до полного застывания.

Посев уколом на плотные среды. Такой посев производят в пробирки с нескошенной агаризованной питательной средой. При посеве пробирки держат вверх дном.

Лабораторная работа № 7 Физиология микроорганизмов: культуральные свойства бактерий, выделение чистых культур микроорганизмов

Культуральные свойства бактерий

К культуральным (или макроморфологическим) свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. На поверхности плотных питательных сред, в зависимости от посева, микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки (клон клеток).

У большинства микроорганизмов колонии двух типов:

гладкие – S, образующиеся если микробные клетки после деления располагаются, соприкасаясь своими поверхностями (при пересевах на жидкие среды такие микроорганизмы вызывают равномерное помутнение среды),

и *шероховатые* с неровными краями – R, образующиеся если клетки после деления сохраняют цитоплазматические мостики и образуют цепочки, накладывающиеся друг на друга (при пересевах на жидкие среды такие микроорганизмы дают зернистый осадок). Существуют и переходные формы колоний (переход S в R-форму происходит при микробной диссоциации под действием антибиотиков).

В зависимости от того, где растёт микроорганизм (на поверхности плотной питательной среды или в толще ее), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются разнообразием: они видоспецифичны и их изучение используется для определения видовой принадлежности исследуемой культуры.

При описании колоний учитывают следующие признаки:

1) форму колонии - округлая, амёбовидная, ризоидная, неправильная и т. д.;

- 2) размер (диаметр) колонии - очень мелкие (точечные) (0,1-0,5 мм), мелкие (0,5-3 мм), средних размеров (3-5 мм) и крупные (более 5 мм в диаметре);
- 3) поверхность колонии - гладкая, шероховатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- 4) профиль колонии - плоский, выпуклый, конусовидный, кратерообразный и т. д.;
- 5) прозрачность - тусклая, матовая, блестящая, прозрачная, мучнистая;
- 6) цвет колонии (пигмент) - бесцветная или пигментированная (белая, желтая, золотистая, красная, черная), особо отмечают выделение пигмента в среду с ее окрашиванием;
- 7) край колонии - ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д.;
- 8) структуру колонии - однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая; край и структуру колонии определяют с помощью лупы или на малом увеличении микроскопа, поместив чашку Петри с посевам на столик микроскопа крышкой вниз;
- 9) консистенцию колонии; определяют прикасаясь к поверхности петлей: колония может быть плотной, мягкой, врастающей в агар, слизистой (тянется за петлей), хрупкой (легко ломается при соприкосновении с петлей).

Глубинные колонии чаще всего похожи на более или менее сплюснутые чечевички (форма овалов с заостренными концами), иногда комочки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют газ.

Донные колонии имеют обычно вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну. Особенности колонии могут изменяться с возрастом, они зависят от состава среды и температуры культивирования.

Рост микроорганизмов на *жидких* питательных средах учитывают, используя четырех-семисуточные культуры, выращенные в стационарных условиях. В жидких питательных средах при росте микроорганизмов наблюдается помутнение среды, образование пленки или осадка.

При росте на *полужидких* (0,5 - 0,7 % агара) питательных средах подвижные микробы вызывают выраженное помутнение, неподвижные формы растут только по ходу посева уколом в среду.

Нередко рост микробов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Характерный запах культур некоторых видов бактерий связан с образованием различных эфиров (укусноэтилового, укусноамилового и др.), индола, меркаптана, сероводорода, скатола, аммиака, масляной кислоты.

Способность образовывать пигменты присуща многим видам микроорганизмов. Химическая природа пигментов разнообразна: каротиноиды, антоцианы, меланины. Если пигмент нерастворим в воде, окрашивается только культуральный налет; если же он растворим, окрашивается и питательная среда. Считается, что пигменты защищают бактерии от губительного действия солнечных лучей, поэтому в воздухе так много пигментированных бактерий, кроме того, пигменты участвуют в обмене веществ этих микроорганизмов. В природе существуют так называемые флуоресцирующие бактерии, культуры которых светятся в темноте зеленовато-голубоватым или желтоватым светом. Такие бактерии встречаются главным образом в речной или морской воде. К светящимся бактериям - фотобактериям - относятся аэробные бактерии (вibriоны, кокки, палочки).

Выделение чистых культур микроорганизмов

Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий - обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной практике, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и в целом при любой работе с микроорганизмами. Исследуемый материал (вода, почва, воздух, пищевые продукты или другие объекты) обычно содержит ассоциации микробов. Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, т. е. производится его идентификация.

Для выделения чистых культур микроорганизмов используют методы, которые можно разделить на несколько групп:

1. Метод Пастера - последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации одной клетки в объеме (имеет историческое значение).
2. Метод Коха («пластинчатые разводки») - последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48 - 50°C), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и в дальнейшем при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний в глубине агара получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды.
3. Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара. Подвижные микробы (протей) способны

подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу, на месте посева. Пересевая верхние края культуры, можно получить чистую культуру.

4. Метод Дригальского - широко применяется в бактериологической практике, при этом исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном. Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1 - 7 суток выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

5. Метод Вейнберга. Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев производят по методу Дригальского, но после этого чашки сразу помещают в анаэростат. Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведение исследуемого материала проводят в расплавленной и охлажденной до 45-50°C агаризированной питательной среде. Делают 6 - 10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды. Иногда питательную среду после посева и перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри или капиллярные пипетки Пастера, концы которых запаивают. При удачном разведении в пробирках, трубках Бурри, пипетках Пастера вырастают изолированные колонии анаэробов. Чтобы изолированные колонии хорошо были видны, используют осветленные питательные среды. Для извлечения изолированных колоний анаэробов пробирку слегка нагревают, вращая ее над пламенем, при этом агар, прилегающий к стенкам, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика выскальзывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным пинцетом и извлекают колонии петлей. Извлеченные колонии помещают в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Агаризированную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

6. Метод Хангейта. Когда хотят получить изолированные колонии бактерий с особенно высокой чувствительностью к кислороду (строгие аэробы) используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Для этого расплавленную агаризированную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку; среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом.

7. Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. На предметном столике микроскопа устанавливают влажную камеру, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закрепляют микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирку со стерильной жидкой средой для получения клона клеток.

Лабораторная работа № 8

Методы изучения биохимических свойств микроорганизмов

В жизнедеятельности микробов ферменты играют большую роль. Они являются обязательными участниками разнообразных биохимических реакций, лежащих в основе функций питания, дыхания, размножения. По характеру связи с цитоплазматическими структурами и по месту проявления своего действия ферменты делятся на внутри- и внеклеточные. Каждый вид микроорганизмов продуцирует постоянный для него набор ферментов, одни из которых расщепляют в разной степени белки и углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Стабильность ферментативных систем бактерий позволяет использовать биохимические свойства бактерий в сочетании с их морфологическими, культуральными и другими постоянными признаками для определения видов и типов бактерий.

Для обнаружения ферментов исследуемую культуру микробов засевают на специальные дифференциально-диагностические питательные среды.

Сахаролитические свойства микроорганизмов

Свойство расщеплять углеводы и высокоатомные спирты, которые принято объединять в одну группу, именуемую сахарами, присуще многим патогенным микробам. Под действием сахаролитических

ферментов бактерий сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются газообразные вещества: CO_2 и H_2 .

Характерно, что различные виды и даже разновидности микробов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Так, например, одни бактерии, ферментируя лактозу, остаются нейтральными в отношении глюкозы, другие, наоборот, сбраживают глюкозу, а третьи, наиболее активные, вызывают расщепление и глюкозы, и лактозы.

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса, называемые также «пестрым» рядом. «Пестрый» ряд Гисса содержит обычно 5 пробирок: с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой и сахарозой. При некоторых исследованиях для более углубленного изучения биохимических свойств выделенного микроба ряд Гисса дополняют дульцитом, сорбитом, ксилозой, арабинозой и некоторыми другими сахарами. Другими словами, есть «большой» и «малый» «пестрый ряд».

Название «пестрый» ряд обусловлено тем, что под действием ферментов микроба одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и, соответственно, цвет питательной среды.

Среды Гисса бывают жидкими и полужидкими (с добавлением 0,2 - 0,5% агар-агара). В пробирки с жидкими средами Гисса для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, опускают «поплавок» - трубочку диаметром 0,5 - 0,7 см, запаянную с одного конца. «Поплавок» помещают запаянным концом вверх; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в «поплавке», вследствие чего у запаянного конца его собирается воздушный пузырек.

В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности.

Таким образом, при изучении сахаролитических ферментов, выделяемых микробами, учитывают не только явления расщепления тех или иных сахаров по кислотообразованию, но и глубину ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов.

Пробирки с набором сред Гисса ставят в штатив в один ряд. На каждой пробирке надписывают название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, указывают номер или вид исследуемой микробной культуры. Культуру берут на кончик петли в очень небольшом количестве и засевают по общепринятой методике.

Протеолитические свойства микроорганизмов

Некоторые виды микроорганизмов продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты - протеазы, катализирующие расщепление белков. В результате расщепления молекулы белка образуются высокомолекулярные промежуточные продукты распада - пептоны, альбумозы и полипептиды. Под действием других протеолитических ферментов пептоны в свою очередь расщепляются на полипептиды (соединения двух или нескольких аминокислот) и отдельные аминокислоты.

Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру микроба засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок. Чаще всего для этой цели применяют желатин, реже - свернутую лошадиную сыворотку, коагулированный яичный белок, молоко или кусочки вареного мяса.

Протеолитическая активность одного и того же микроба при определении ее на разных питательных средах будет проявляться неодинаково, что обусловлено специфичностью ферментов. Поэтому для разных видов микробов рекомендуют питательные среды различного состава.

Определение протеолитической активности микробов

а) На желатине. Мясо-пептонный желатин разливают в пробирки столбиком по 5 - 6 мл. Посев производят уколом, погружая петлю с исследуемой культурой в глубь питательной среды до дна пробирки. Микробы, способные расти при низкой температуре, оставляют стоять в комнате при 20 - 22°C. Остальные посевы инкубируют в термостате при 37°C. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят одну или две пробирки с незасеянным желатином для контроля. При температуре 37°C желатин плавится, поэтому после инкубации пробирки, вынутые из термостата, опускают в холодную воду или ставят в холодильник. После застудневания желатина в контрольных пробирках приступают к просмотру роста и учету изменений в питательной среде опытных пробирок. Там, где под действием фермента желатиназы произошло расщепление белков желатина, отмечается разжижение питательной среды. Пробирки, в которых после суточного инкубирования среда остается без изменения, оставляют в термостате. Наблюдение за изменением среды ведется в течение 20 суток. В протоколе исследования обязательно отмечают день появления признаков разжижения среды, степень и характер ее разжижения.

б) На молочном агаре Эйкмана. Молочный агар Эйкмана, разлитый и остуженный в чашках Петри, засевают исследуемой культурой микробов. Посев делают петлей или шпателем так, чтобы получить изолированные колонии. Через 24 - 48 ч инкубации в термостате культуры, продуцирующие протеолитический фермент, обуславливают пептонизацию молочного белка - казеина, в результате чего вокруг таких колоний образуются прозрачные зоны, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды.

в) На свернутой кровяной сыворотке. Культуру исследуемых аэробных микробов засевают на чашки, анаэробных - уколом в столбик свернутой лошадиной сыворотки, инкубируют в термостате при 37°C. Штаммы, продуцирующие протеолитические ферменты, разжижая питательную среду, образуют углубления вокруг колоний или на поверхности столбика среды.

г) В бульоне с куриным яичным белком. В пробирку с мясо-пептонным бульоном или бульоном Хоттингера, содержащим кусочек свернутого куриного белка, вносят одну петлю исследуемой культуры микроба. Посевы просматривают ежедневно в течение 5 дней. Протеолитически активные культуры микробов расщепляют коагулированный яичный белок; кусочки белка, содержащиеся в среде, заметно уменьшаются в размере, превращаясь в крошкообразную массу, или полностью растворяются.

Аналогичным образом проявляются протеолитические свойства микробов в средах с кусочком вареного мяса.

Некоторые виды патогенных микробов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: индола, сероводорода, мочевины и аммиака.

При определении видов и дифференциации разновидностей патогенных микробов наибольшее значение имеет выявление двух первых продуктов: индола и сероводорода.

Определение индола в культуре микроорганизмов

Индол образуется при расщеплении сложной гетероциклической аминокислоты - триптофана. Для выявления индолообразования петлю исследуемой культуры засевают в среду Строгова или другие среды, рекомендуемые для обнаружения индола. Тотчас после посева в пробирку вносят полоску индикаторной бумаги, пропитанную раствором щавелевой кислоты, так, чтобы индикаторная бумага не касалась питательной среды. Для этого верхнюю треть бумажной полоски прижимают пробкой к стенке пробирки. Посевы инкубируют 24 - 48 ч при температуре 37°C. Образование индола определяют по окрашиванию нижнего конца индикаторной бумаги в бледно-розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете.

Определение сероводорода

Сероводород является конечным продуктом расщепления аминокислот: цистина, цистеина и метионина, содержащих серу. Петлю исследуемой культуры микробов засевают в пробирку с мясо-пептонным бульоном или бульоном Хоттингера. Тотчас после посева в пробирку вносят пропитанную ацетатом свинца полоску индикаторной бумаги на определение сероводорода. В положительных случаях образующийся в культуре сероводород вступает в соединение с бесцветным ацетатом свинца и превращается в сульфид свинца, который придает индикаторной бумаге черно-бурое окрашивание.

Окончательный учет результатов на образование индола и сероводорода проводят на 7 - 10 й день после посева, так как процесс ферментативного расщепления белка и образования конечных продуктов распада происходит иногда в течение длительного времени.

Окислительно-восстановительные свойства микроорганизмов

В культуре микробов могут быть обнаружены окислительно-восстановительные ферменты, связанные главным образом с дыхательной функцией микроорганизма.

Как известно, процесс окисления субстрата может происходить посредством присоединения к нему кислорода с участием ферментов оксидаз или в результате отщепления от него водорода с участием ферментов дегидрогеназ. Для этого типа реакции характерно то, что окисление какого-либо одного вещества всегда сопровождается восстановлением (редукцией) другого органического вещества. Первое вещество, от которого отщепляется водород, называют донатором, а то вещество, к которому он присоединяется, - акцептором.

Акцептором водорода чаще всего является кислород воздуха, однако им могут быть также многие органические соединения, способные легко окисляться и восстанавливаться.

С целью выявления ферментов дегидрогеназ и определения их активности в практике микробиологических исследований предложен метод, основанный на введении в питательную среду органической краски, выполняющей роль акцептора водорода. В результате присоединения водорода краситель восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение, называемое лейкобазой. При обильном доступе кислорода оно может вновь окислиться и приобрести прежний цвет.

В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовую настойку, малахитовый зеленый, индигокармин, нейтральный красный и др.

Для выявления редуцирующих свойств микроорганизмов указанные красители добавляют к обычным питательным средам: мясо-пептонному бульону, мясо-пептонному агару, молоку.

Один и тот же вид микроба ведет себя неодинаково по отношению к краскам разного состава. Это свойство микроба использовано в микробиологической практике в качестве дифференциального признака. Бактерии брюшного тифа редуцируют метиленовый синий, но не редуцируют лакмуса и не изменяют нейтрального красного в противоположность кишечной палочке, которая остается нейтральной в отношении метиленового синего, но восстанавливает лакмус и нейтральный красный.

Определение редуцирующей способности

1. В 5 мл среды - молока с метиленовым синим - засевают петлю исследуемой культуры с плотной питательной среды или 0,1 мл 18-часовой бульонной культуры и после 24 ч инкубации учитывают

результаты роста. При положительной реакции на редукцию метиленового синего среда из голубой становится кремового цвета, а при слабоположительной - приобретает зеленоватое окрашивание.

2. Пробирки с лакмусовым молоком, средой Минкевича засевают так же, как молоко с метиленовым синим, суточной культурой с плотной или жидкой питательной среды. Посевы инкубируют в термостате в течение 10 дней, ежедневно наблюдая за изменением цвета среды. Редукция лакмуса проявляется полным обесцвечиванием молока, имеющего розовато-сиреневый цвет до посева. В протоколе исследования редукцию лакмуса обозначают буквой Р.

Среда Минкевича позволяет также выявлять кислото- или щелочеобразование, выражающееся соответственно в покраснении или посинении молочной среды. Образование кислоты обозначается буквой К, щелочи - буквой Щ.

Определение фермента каталазы

Некоторые виды микроорганизмов, принадлежащие к группе аэробов, в процессе дыхания образуют перекись водорода, являющуюся клеточным ядом. Количество перекиси водорода в культуре никогда не достигает высоких концентраций, так как по мере образования перекись расщепляется на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы. На поверхность микробной культуры, выращенной на плотной питательной среде в чашке Петри, наносят 1 - 2 мл 1% раствора перекиси водорода так, чтобы она покрывала поверхность культуры тонким слоем. Появление пузырьков газа в слое нанесенной жидкости свидетельствует об образовании кислорода в результате расщепления перекиси водорода под действием каталазы. Подобный результат в протоколе опыта отмечается знаком + как положительный результат реакции на каталазу.

Согласно международной биохимической классификации ферментов, в зависимости от катализируемой реакции выделяют 6 основных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Отдельные представители каждого класса ферментов имеют систематическое название, традиционное (тривиальное) название, а также четырехуровневый числовой код, который отражает класс, подкласс, под-подкласс и серийный номер фермента в под-подклассе. Кроме систематического названия ферменты микроорганизмов имеют традиционные названия, получаемые в зависимости от субстратной специфичности. Традиционно ферменты микроорганизмов классифицируются на сахаролитические, протеолитические, липолитические, окислительно-восстановительные ферменты, а также ферменты-токсины, которые определяют с помощью специальных сред или тестов (табл. 10).

Таблица 10

Определение биохимических свойств микроорганизмов

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
САХАРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ		
Амилаза	Крахмальный агар (агар с 0,2% крахмала) и раствор Люголя.	При нанесении раствора йода на среду с 18 - 24 часовой культурой микроорганизмов, вокруг колоний с амилазной активностью образуется светлый неокрашенный ореол, в то время как остальная среда приобретает сине-фиолетовый цвет из-за присутствия в ней крахмала.
Карбогидразы	Дифференциально-диагностические среды для энтеробактерий (Эндо, Левина, колонии, Плоскирева и др.); содержат энтеробактерии – лактозу, анилиновые красители.	Лактозопозитивные энтеробактерии (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i>), образуют ярко окрашенные колонии, лактозонегативные энтеробактерии (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>) – бледно-розовые или бесцветные колонии.
Полиуглеводные (Клиглера, Олькеницкого и др.). Среда Клиглера имеет малиново-красный цвет и содержит: 0,1% глюкозы, 1% лактозы, соли Fe ²⁺ , феноловый красный (индикатор рН).	При разложении глюкозы желтеет столбик среды, при разложении лактозы желтеет скошенная часть среды, при разложении углеводов с образованием CO ₂ в среде также появляются газовые пузырьки или разрыв столбика; при образовании H ₂ S наблюдается почернение по ходу укола.	
Жидкие или полужидкие моноуглеводные среды	При разложении углеводов Гисса; образуются кислые продукты,	

содержат один из углеводов, снижающие рН среды, в индикатор рН (табл. 5); рН результате чего индикатор рН среды устанавливают $7,2 \pm 0,2$. изменяет цвет. Газообразование Для выявления газообразования на жидких средах приводит к в жидкие среды вносят накоплению газа в поплавке, в поплавок. полужидких – появлению разрывов или газовых пузырьков в среде.		
Продукция карбинола	ацетил-метил-	Выявляют с помощью реакции Фогес-Проскауэра, используют 10% КОН или 20% КОН. После добавления к культуре равного объёма 10% или 20% КОН и инкубации 4-24 часа при 37°C в случае образования ацетилметилкарбинола среда окрашивается в розовый цвет с жёлтым оттенком; в случае образования ацетона и 2,3-бутиленгликоля окраска не изменяется.
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ		
Протеазы и пептидазы	5% обезжиренное молоко.	Происходит свёртывание с образованием сгустков казеина и пептонизация с лизис казеина, при которой молоко становится прозрачным. Обе реакции могут происходить последовательно или одновременно.
Свёрнутая сыворотка.	Происходит разжижение.	
Столбик желатина.	Происходит разжижение (желатину разжижают <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus anthracis</i>).	
Молочный агар в чашках Петри имеет мутно-белый цвет.	Появляются зоны просветления вокруг колоний на фоне мутно-белой среды.	
Деаминазы аминокислот	Среда с одной из аминокислот и индикатором рН; рН среды $7,2 \pm 0,2$. Образуется аммиак, приводящий к защелачиванию среды и изменению цвета индикатора.	
Декарбоксилазы	Среда с одной из основных аминокислот (аргинином, лизином, орнитином, гистидином, тирозином, глутамином) и индикатором рН. При наличии декарбоксилазной активности среда подщелачивается за счёт образования диаминов, вызывая изменение цвета индикатора.	
Триптофаназа	Мясо-пептонный бульон или среда с аминокислотой триптофаном, а также индикаторная бумажка, смоченная щавелевой кислотой и закреплённая под пробкой над питательной средой. Образуется индол, который приводит к покраснению бумажки, смоченной щавелевой кислотой.	
Десульфуразы (цистиназы)	Среды с цистеином, метионином и качественным реактивом на H_2S – солями железа, свинца, образующим сульфид железа черного висмута. Образуется H_2S , который взаимодействует с Fe^{2+} (Pb^{2+} , Vl^{2+}) с образованием сульфида железа черного цвета, что вызывает почернение среды.	
Уреаза	Среда с мочевиной и индикатором рН - феноловым красным, рН среды $6,8 \pm 0,2$. Образуется аммиак и окраска среды из красно-оранжевой переходит в малиново-лиловую за счёт сдвига рН в щелочную сторону.	
ЛИПОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ		
Липаза	Желточный агар или твином-80.	Липазы гидролизуют жиры на глицерин и свободные жирные кислоты. Вокруг колоний в проходящем свете на

		поверхности среды видна радужная пленка (похожа на бензиновую пленку на поверхности воды).
Лецитиназа	Желточный агар (к 300 мл стерильного МПА, фосфохолин и диглицерид, и расплавленного и охлажденного колоний до 45-50°C, добавляют источник лецитина - желток куриного яйца).	расщепляет лецитин на МПА, фосфохолин и диглицерид, и вокруг колоний появляются опалесцирующие зоны, или «венчики помутнения»; лецитиназа есть у <i>Staphylococcus aureus</i> , кластридий, фузобактерий.
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ (ОВФ)		
Оксидаза	Фильтровальная смоченная свежеприготовленным раствором тетраметилпарафенилен-диамина (реактив на оксидазу).	При нанесении бакпетлей культуры на поверхность фильтровальной бумаги в течение 1 мин появляется пурпурно-фиолетовое окрашивание; используют для дифференциации <i>Pseudomonas spp.</i> (оксидазопозитивные) и энтеробактерий (оксидазонегативные).
Каталаза	3% раствор H ₂ O ₂ ; присутствие каталазы определяют у микроорганизмов, выращенных на любой питательной среде, кроме кровяных сред.	При нанесении на колонию перекиси водорода, либо при внесении культуры в каплю перекиси на предметном стекле появляются пузырьки газа; используют для дифференциации <i>Streptococcus spp.</i> (каталазопозитивные) и <i>Staphylococcus spp.</i> (каталазонегативные).
Дегидразы	Сахарный полужидкий агар (донор водорода) с 1% метиленовым синим (акцептор водорода).	Дегидразы способны восстанавливать некоторые органические красители, поэтому метиленовый синий обесцвечивается. Используют для определения бактериальной обсеменённости молока: подкрасив молоко метиленовой синькой, определяют время его обесцвечивания. Чем оно меньше, тем более обсеменено молоко. Качественное молоко долго остаётся синим.
Пероксидаза	Используют бензидиновый тест: на предметное стекло наносят 4-6 капель суточной бактериальной культуры добавляют по 1-3 капли 2% раствора метилпарааминофенол сульфата и 3% раствора H ₂ O ₂ .	В течение 5 – 10 мин бесцветная среда приобретает розовую или вишнево-красную окраску. Положительная реакция характерна для <i>Staphylococcus spp.</i> , отрицательная - <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Escherichia spp.</i>
ФЕРМЕНТЫ-ТОКСИНЫ		
Гемолизины	5-10% кровяной агар.	α-гемолизины приводят к неполному гемолизу с образованием вокруг колоний зоны неполного просветления среды, которая в течение 2-5 суток приобретает зеленовато-бурый оттенок. β-гемолизины вызывают полный гемолиз с образованием прозрачной зоны вокруг колоний. γ-гемолизины не дают видимого глазом гемолиза.
О-стрептолизин	В пробирки с двукратными разведениями стрептококков добавляют равный объем 5% эритроцитов	В положительных случаях происходит гемолиз (лаковая кровь), в отрицательных случаях образуется осадок из эритроцитов. Определяют титр

	кролика, инкубируют при 37 ⁰ С 1 О-стрептолизина - наибольшее час; параллельно ставят разведение микробной культуры при контроль из взвеси эритроцитов котором наблюдается гемолиз. в питательном бульоне.	
Плазмокоагулаза	Стерильная цитратная плазма крови, разлитая по 0,4 мл в пробирки.	После внесения суточной агаровой культуры и инкубации посевов 2-5 часов при 37 ⁰ С происходит свёртывание плазмы и утрата ею текучести.
Гиалуронидаза	Побирка с гиалуронозой кислотой и уксусная кислота; при добавлении к гиалуронозой кислоте уксусной кислоты образуется сгусток муцина.	Если тест-культура образует гиалуронидазу, то после 15 мин инкубации культуры бактерий при 37 ⁰ С в пробирке с гиалуронозой кислотой и добавления 2-3 капель уксусной кислоты образуется сгусток муцина.
Нуклеазы	МПА с ДНК, среда опалесцирует (полупрозрачна).	Через 18-24 часа культивирования на среде после нанесения на ее поверхность 0,1% H ₂ SO ₄ из-за деполимеризации ДНК и РНК вокруг колоний образуется прозрачный ореол - «венчик просветления».
Фибринолизин	Сгустки фибрина.	Растворение сгустков фибрина.
Цитотоксины	Культура эпителиальных клеток или др. и токсин, выделенный путем фильтрования культуральной жидкости с использованием бактериальных фильтров.	При культивировании культуры клеток с безмикробным фильтратом токсина культура клеток утрачивает типичную тканевую морфологию: округляется, ядра пикнотизируются.
Летучие жирные кислоты	Газо-жидкостная хроматография кислото-эфирного экстракта ЛЖК из биологического материала или культуральной жидкости, содержащей анаэробы.	На хроматограмме появляются пики в зависимости от массы и полярности вещества: чем легче вещество, тем раньше появляется пик на хроматограмме, поэтому ЛЖК выходят в следующей последовательности: уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, капроновая (рис. 25). Изомасляная, изовалериановая, изокапроновая кислоты выходят раньше соответствующей кислоты.

Лабораторная работа № 9 Основы процессов брожения смешанного типа, спиртового, молочнокислого (химизм, характеристика возбудителей, значение в биотехнологии).

1. Теоретические основы процесса брожения смешанного типа (химизм, характеристика возбудителей, значение в биотехнологии).

Броже́ние — биохимический процесс, основанный на окислительно-восстановительных превращениях органических соединений в анаэробных условиях. В ходе брожения происходит образование АТФ за счёт субстратного фосфорилирования. При брожении субстрат окисляется не полностью, поэтому брожение энергетически малоэффективно в сравнении с дыханием, в ходе которого АТФ образуется не за счёт субстратного фосфорилирования, а за счёт окислительного фосфорилирования.

Брожение осуществляют многие микроорганизмы, так называемые **бродильщики**, как прокариотические, так и эукариотические, например, дрожжи рода *Saccharomyces* проводят спиртовое брожение

Смешанный тип брожения – **Муравьинокислое брожение** - биохимический процесс, тип субстратного фосфорилирования, в ходе которого пируват окисляется до формиата и других продуктов. Ферментом выступает пируват-формиат-лиаза. Такое

брожение осуществляют бактерии группы кишечной палочки семейства *Enterobacteriaceae*. На одну молекулу глюкозы в ходе энергетического обмена приходится 2 молекулы АТФ.

Пути молочнокислого брожения

В зависимости от микроорганизмов различают разные продукты.

1. Бактерии вида *Escherichia coli* образуют большое количество различных соединений, среди которых преобладают органические кислоты: уксусная, муравьиная, янтарная и молочная.
2. Бактерии вида *Enterobacter aerogenes* также образуют целый ряд кислот, однако преимущественно ацетоин и 2,3-бутандиол.

Механизм смешанного брожения

В процессе расщепления пирувата может образоваться

- муравьиная кислота, которая расщепляется на CO_2 и H_2
- молочная кислота
- янтарная кислота - путем присоединения к пирувату углекислого газа и образования оксалоацетата, затем в ходе гидрирования образуется яблочная кислота, и, дегидратируясь, она превращается в фумаровую кислоту, которая в ходе гидрирования образует янтарную.
- Ацетил-КоА, который образует либо уксусную кислоту, либо этанол в ходе восстановления.
- Ацетоин образуется путем конденсации двух молекул пирувата, включающим двукратное декарбоксилирование. При восстановлении ацетоина образуется 2,3-бутандиол.

2. Теоретические основы процесса спиртового брожения (химизм, характеристика возбудителей, значение в биотехнологии).

Спиртовое брожение — вид брожения, при котором углеводы, преимущественно глюкоза, преобразуются в молекулы этанола и углекислого газа. В подавляющем большинстве случаев спиртовое брожение осуществляют дрожжи. Известны модификации спиртового брожения, при котором вместо этанола или наряду с ним под действием определённых химических веществ дрожжи начинают производить глицерин. Спиртовое брожение имеет огромное промышленное значение, издавна используется человеком для получения разнообразных алкогольных напитков и в хлебопечении.

Микроорганизмы

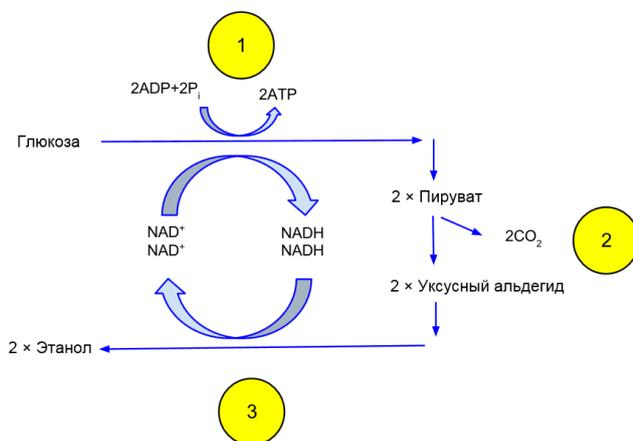
Спиртовое брожение в 90 % случаев осуществляют дрожжи родов *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*. Также к спиртовому брожению способны дрожжи рода *Kloeckera*, вызывающие спонтанное брожение виноградного сока, а также представители родов *Torula* и *Eudomyces*. Несмотря на то, что этанол, образуемый при спиртовом брожении, влияет на клеточные мембраны, дрожжи выдерживают до 9-12 % этанола по объёму, а дрожжи расы *sake*, используемые при приготовлении рисовой водки сакэ, выдерживают до 18 % этанола. Кроме того, дрожжи не могут долго существовать в анаэробных условиях, поскольку одна из стадий биосинтеза фосфолипидов в их клетках требует присутствия кислорода, поэтому в анаэробных условиях дрожжевая клетка способна поделиться не более шести раз.

В присутствии кислорода дрожжи переключаются со спиртового брожения на существенно более выгодное энергетически аэробное дыхание, при котором они образуют в 20 раз больше биомассы. Этот переход получил название *эффект Пастера*.

Спиртовое брожение обнаружено лишь у единичных прокариот из-за редкой встречаемости у них фермента пируватдекарбоксилазы, необходимого для этого вида брожения. Строго анаэробная грамположительная бактерия *Sarcina ventriculi* способна к спиртовому брожению, подобно дрожжам. Бактерия *Zymomonas mobilis*, хотя и имеет пируватдекарбоксилазу, спиртовое брожение не проводит, а сбрасывает сахара по пути

Энтнера - Дудорова. Эта бактерия используется для сбраживания сока агавы в ходе приготовления текилы. Ещё одна бактерия, имеющая пируватдекарбоксилазу, - *Erwinia amylovora* - способна к спиртовому брожению, наряду с другими типами брожения. Некоторые клостридии и энтеробактерии, а также гетероферментативная молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides* проводят брожения, в которых этанол является одним из продуктов.

Механизм



Общая схема спиртового брожения

Как отмечалось выше, почти всегда спиртовое брожение осуществляют дрожжи. Они сбраживают моно- и дисахариды с образованием этанола и углекислого газа. Окислительный этап спиртового брожения идёт по пути гликолиза с образованием из одной молекулы глюкозы двух молекул пирувата, двух молекул АТФ и двух молекул NADH + H⁺. На восстановительном этапе фермент пируватдекарбоксилаза, коферментом которого служит тиаминпирофосфат, в отсутствие кислорода превращает пируват в ацетальдегид с высвобождением молекулы углекислого газа. Далее фермент алкогольдегидрогеназа, используя два NADH + H⁺, образовавшихся в окислительном этапе, восстанавливает две молекулы ацетальдегида до этанола.

Общее уравнение реакции спиртового брожения:

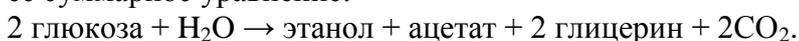


Модификации

Карл Нейберг показал, что при добавлении к бродящим дрожжам особых химических веществ состав продуктов брожения меняется. Например, если добавить бисульфит натрия NaHSO₃, то он будет связывать ацетальдегид, и основным продуктом брожения станет не этанол, а глицерин. Связанный с бисульфитом ацетальдегид не может служить акцептором водорода, и эту роль принимает на себя дигидроксиацетонфосфат, который восстанавливается, дефосфорилируется и превращается в глицерин. Общее уравнение брожения становится следующим: глюкоза + бисульфит натрия → глицерин + ацетальдегидсульфит + CO₂. Эта модификация используется в биотехнологии для получения глицерина и известна как II форма брожения по Нейбергу (нормальное спиртовое брожение Нейберг считал I формой брожения).

Добавление к бродящим дрожжам NaHCO₃ или Na₂HPO₄ изменяет pH среды, из-за чего ацетальдегид в реакции дисмутации превращается в этанол и ацетат, а дигидроксиацетонфосфат акцептирует водород, образуя глицерин. Эта модификация известна как III форма брожения по Нейбергу,

её суммарное уравнение:



4. Раскройте теоретические основы процесса молочнокислого брожения (химизм, характеристика возбудителей, значение в биотехнологии).

Молочнокислое брожение — вид брожения, конечным продуктом при котором выступает молочная кислота. Существует два основных вида молочнокислого брожения: гомоферментативное, при котором молочная кислота составляет до 90 % продукта, и гетероферментативное, при котором на её долю приходится лишь половина. Молочнокислое брожение активно используется человеком для приготовления кисломолочных продуктов и других продуктов питания.

Микроорганизмы

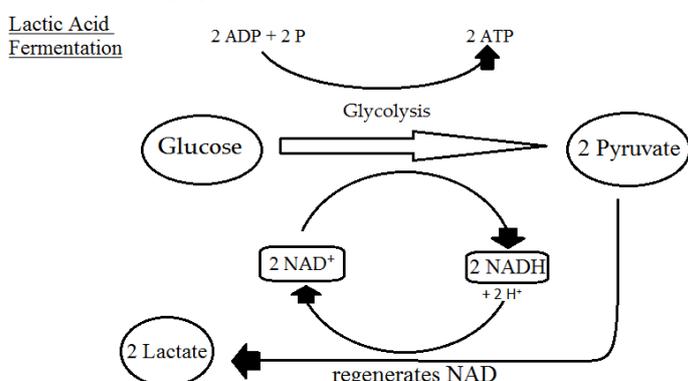
Молочнокислое брожение осуществляют филогенетически неродственные организмы: представители порядков *Lactobacillales*, *Bacillales*, а также семейства *Vifidobacteriaceae*. Эти бактерии живут исключительно за счёт брожения. Морфологически они неоднородны, однако все являются грамположительными, неподвижны и не образуют спор (за исключением представителей семейства *Sporolactobacillaceae*). Молочнокислые бактерии аэротолерантны, не содержат каталазы и гемопротеинов (цитохромов), растут только на богатых средах с добавлением большого количества витаминов.

Механизм

Как правило, молочнокислые бактерии сбраживают сахара. В зависимости от конечных продуктов молочнокислое брожение подразделяют на гомоферментативное и гетероферментативное.

Некоторые молочнокислые бактерии, наряду с сахарами, могут сбраживать органические кислоты. Так, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei* осуществляют так называемое яблочно-молочнокислое брожение, при котором яблочная кислота превращается в молочную под действием фермента малатдегидрогеназы. *Streptococcus diacetylactis* и *Pediococcus ceravisiae* используют лимонную кислоту, которая в небольшом количестве содержится в молоке, которая с помощью цитратлиазы расщепляется на ацетат и оксалоацетат. Оксалоацетат далее декарбоксилируется до пирувата, который и восстанавливается до лактата.

Гомоферментативное брожение



Общая схема гомоферментативного молочнокислого брожения

При *гомоферментативном молочнокислом брожении* сахара сбраживаются через гликолиз, и около 90 % конечного продукта приходится на лактат (остальные 10 % составляют ацетат, ацетоин и этанол). Субстратом для гомоферментативного молочнокислого брожения служат лактоза, другие моно- и дисахариды, а также органические кислоты.

Общее уравнение гомоферментативного брожения:



Гомоферментативное брожение осуществляют представители родов *Streptococcus*, *Pediococcus*, многих видов рода *Lactobacillus*, которые обитают в желудочно-кишечном тракте и молочных железах млекопитающих, а также на поверхности растений.

Гетероферментативное брожение

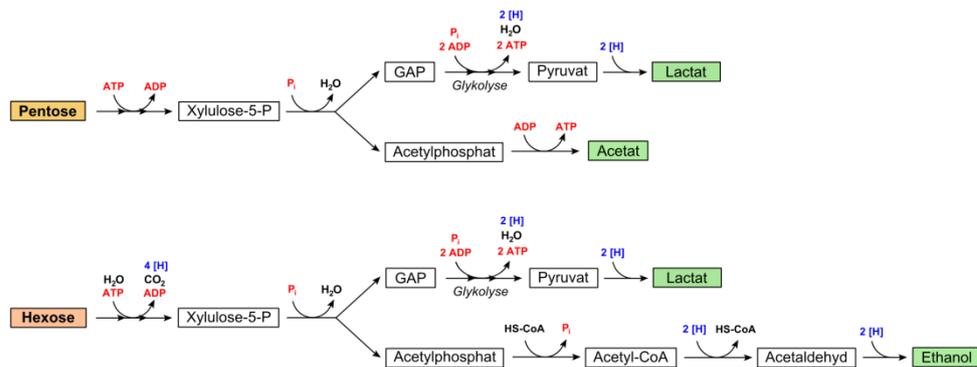


Схема гетероферментативного молочнокислого брожения

При *гетероферментативном молочнокислом брожении* сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь, и на долю молочной кислоты приходится лишь около половины конечного продукта. Помимо лактата, при гетероферментативном брожении образуются ацетат, этанол и углекислый газ. Основным субстратом для гетероферментативного молочнокислого брожения является мальтоза. Ацетил-КоА может преобразовываться в двух направлениях: либо окисляться до ацетата, давая ещё одну молекулу АТФ, либо восстанавливаться до этанола за счёт $\text{NADH} + \text{H}^+$. У гетероферментативных бактерий нет ключевых ферментов гликолиза - альдолазы и триозофосфатизомеразы - из-за чего бактерии не могут окислять сахара с помощью гликолиза. У некоторых лактобактерий гидролиз мальтозы сопровождается ее фосфорилированием с образованием глюкозо-6-фосфата и галактозы. При этом энергетический выход брожения повышается.

К гетероферментативным молочнокислым бактериям относятся некоторые виды рода *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. brevis* и другие), а также представители рода *Leuconostoc*.

Некоторые гомоферментативные бактерии, оказываясь в среде, содержащей пентозы, начинают вырабатывать каталазу и могут переходить на гетероферментативное брожение. Так, *Lactobacillus plantarum*, обитающая на растительных остатках, использует гликолиз для окисления гексоз, а пентозы окисляет по пентозофосфатному пути с образованием лактата и ацетата.

Ряд гетероферментативных бактерий очень чувствителен к окружающим условиям. Так, *Leuconostoc mesenteroides*, которая в качестве одного из продуктов образует этанол, при соприкосновении с кислородом производит значительное количество полисахаридов и из-за этого ослизняется.

Физиологическое значение

Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Bifidobacterium* преобладают в микробиоте желудочно-кишечного тракта грудных детей, и продукты осуществляемого ими брожения подавляют рост гнилостной микрофлоры. В настоящее время при дисбактериозе, вызванном, например, приёмом антибиотиков, назначают пробиотики, содержащие молочнокислые бактерии. Кроме того, бактерии рода *Lactobacillus*, обитающие во влагалище, за счёт образования молочной кислоты предотвращают размножение патогенной микрофлоры.

У животных

В условиях недостатка кислорода, когда аэробное окисление пирувата становится невозможным, в тканях животных пируват начинает превращаться в лактат под действием фермента лактатдегидрогеназы с затратой молекулы $\text{NADH} + \text{H}^+$, то есть он подвергается молочнокислому брожению. Так как при гликолизе из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы пирувата и две молекулы $\text{NADH} + \text{H}^+$, которые потом тратятся на превращение двух молекул пирувата в две молекулы лактата, суммарного образования или расходования $\text{NADH} + \text{H}^+$ в этой реакции не происходит. Превращение пирувата в

лактат происходит при активной работе мышц или эритроцитах. Из-за образования лактата при активной физической работе pH в крови и мышцах снижается, что ограничивает длительность периода напряжённой физической активности. Образованный лактат может быть использован повторно: при восстановлении сил после интенсивной физической нагрузки по кровотоку он доставляется в печень, где снова превращается в глюкозу.

Использование человеком

Молочнокислое брожение используется в приготовлении различных продуктов на основе молока (простокваши, сметаны, кефира. Для приготовления сметаны используются мезофильные бактерии *Streptococcus lactis* и *Streptococcus cremoris*, йогуртов - термофильные *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ацидофилина - *Lactobacillus acidophilus*, творога, мягких сыров и сливочного масла - *Lactobacillus casei*, которая вызывает сворачивание белка казеина. Для производства кефира используется симбиотический комплекс из лактобактерий, стрептококков и дрожжей («кефирный гриб»). Спонтанное образование простокваши вызывает *Lactobacillus delbrueckii*, постоянно присутствующая в молоке. Кисломолочные продукты представляют собой накопительные культуры соответствующих бактерий.

Поскольку молочная кислота является естественным консервантом, молочнокислое брожение используется при квашении овощей, засолке огурцов, в заквасках для ржаных сортов хлеба и добавках для сырокопчёных колбас, а также для получения чистого лактата. С помощью молочнокислого брожения осуществляют силосование, в том числе заготовку кормовой свёклы.

Маслянокислое брожение углеводов

Возбудители маслянокислого брожения были открыты Луи Пастером в 1861 году. Для изучения маслянокислого брожения ставят опыт на среде с картофелем.

Ход работы:

1. Сырой неочищенный картофель нарезать мелкими кубиками, заполнить ими 1/3 высокой пробирки, добавить немного мела (для нейтрализации образующейся масляной кислоты), залить водопроводной водой до пробки.

2. Пастеризовать пробирки на водяной бане при 80 °C в течении 10 мин.

3. Культивировать в термостате при 28-30 °C в течении 7 дней.

4. После окончания культивирования сделать вывод об интенсивности брожения (отметить выделение пузырьков CO₂ и N₂ на поверхности). 75 Культуральную жидкость использовать для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

5. Микроскопирование. Из середины пробирки пипеткой взять каплю культуральной жидкости и приготовить прижизненный препарат «раздавленная капля»: - нанести каплю культуральной жидкости на предметное стекло, - к накопительной культуре добавить каплю раствора Люголя, - накрыть покровным стеклом и микроскопировать. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает темно-синее окрашивание.

6. Сделать качественную реакцию на масляную кислоту. Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции). К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавить 0,5 мл 96 % этилового спирта и 1-2 мл крепкой серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса). Реакция протекает по уравнению: $Ca(CH_3CH_2CH_2COO)_2 + 2C_2H_5CH_2OH = 2C_2H_5CH_2CH_2COOCH_2CH_3 + Ca(OH)_2$

7. Зарисовать бактерии. Записать возбудителей брожения (латынь).

Сделать вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите возбудителей маслянокислого брожения?
2. Назовите виды маслянокислого брожения?
3. Где распространены маслянокислые бактерии?
4. Как относятся маслянокислые бактерии к кислороду?
5. Какие источники углерода могут использовать маслянокислые бактерии?
6. Какие источники азота могут использовать маслянокислые бактерии?
7. Почему маслянокислые бактерии относятся к облигатным анаэробам?
8. Какое запасное вещество накапливают маслянокислые бактерии в почвах?
9. Как создать элективные условия для маслянокислого брожения?

10. Какие конечные продукты образуются при маслянокислом брожении?
 11. Почему маслянокислые бактерии устойчивы к высоким температурам и другим условиям внешней среды?

Спиртовое брожение

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду следующего состава, объемные проценты: сахара - 15,0; пептон - 0,5, K_2HPO_4 - 0,3; MgSO_4 - 0,1.

2. Налить 100 мл среды в колбу Эрленмейера и внести туда 0,5 г прессованных дрожжей. Закрывать ватной пробкой.

3. Колбу взвесить на технических весах с точностью до 0,01г и поставить в термостат при 25-30°C на 7 дней.

К условиям, способствующим развитию дрожжей, но препятствующим развитию других микроорганизмов и делающим питательную среду селективной для дрожжей можно отнести следующие:

- 1) высокую концентрацию сахара;
- 2) слегка кислую среду за счет K_2HPO_4 ;
- 3) анаэробные условия;
- 4) накопление в процессе опыта значительного количества спирта.

Результаты опыта:

4. Определить количество выделившегося CO_2 по разнице в весе колбочки до и после опыта.

5. Исходя из уравнения спиртового брожения и учитывая массу выделившегося CO_2 , рассчитать количество выделившегося спирта



Массу сброженного сахара можно определить по сумме образовавшегося спирта и углекислого газа.

6. Определить интенсивность брожения. Интенсивность брожения это количество сброженного сахара в % от исходного за определенный промежуток времени.

7. Микроскопирование дрожжей. Бактериальной петлей взять каплю культуральной жидкости и приготовить прижизненный препарат «раздавленная капля» (см. занятие 2).

8. Зарисовать.

9. Отгон этилового спирта. Культуральную жидкость перенести в плоскодонную колбу на 800 мл соединенную с холодильником и нагреть на плитке до кипения. Спирт, улетучиваясь с водой и охлаждаясь в холодильнике стекает в приемную колбу.

10. Качественная реакция на этиловый спирт. К 1-2 мл отгона прилить 1-2 мл крепкой серной кислоты и по каплям 1 % раствор двуххромовокислого калия до получения зелено-синей окраски.

11. Сделать выводы о протекании процесса брожения.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите возбудителей спиртового брожения?
2. Назовите селективные условия для спиртового брожения? 3. Дайте определение интенсивности спиртового брожения.
4. При каком pH протекает спиртовое брожение?
5. Какое брожение будут вести дрожжи, если реакцию среды сделать щелочной?
6. Какие конечные продукты образуются при спиртовом брожении?
7. Что произойдет с дрожжами, если аэрировать среду, в которой их выращивают?
8. Какие конечные продукты образуют дрожжи в аэробных условиях?
9. Чем характеризуются верховые дрожжи и где их применяют?
10. Чем характеризуются низовые дрожжи и где их применяют?
11. К каким микроорганизмам - аэробам, анаэробам или факультативным анаэробам относят дрожжи?
12. Какие соединения входят в состав сивушных масел?

Домашнее задание: заполнить таблицу 2 «Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе».

Таблица 5.1 – Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе

Виды брожений и окислений	Молочнокислое	Спиртовое	Уксуснокислое	Маслянокислое	Окисление:	
					- клетчатки	- пектиновых веществ
Возбудители процессов брожения и окисления						
Динамика процессов брожения и окисления						
Условия, благоприятствующие течению процесса						
Значение процессов в природе, в сельском						

хозяйстве продукты продукты	исходные конечные						
-----------------------------------	----------------------	--	--	--	--	--	--

Лабораторная работа № 10 «Санитарно-бактериологический анализ проб воды, воздуха, смыва с рук.»

Тема: Осуществление микробиологического контроля пищевого производства. Изучение результатов санитарно-бактериологического анализа проб воды, воздуха, смывов с рук.

Цель: овладеть методом количественного учета микрофлоры в воздухе методом оседания Коха. Оценить микробиологическую обсемененность смывов с рук. Выявить соответствие воды СанПиНам для питьевой воды.

Приборы и посуда: термостат, чашки Петри, ватные тампоны или салфетки, пипетка.

Материалы и реактивы: мясо-пептонный агар, изотонический раствор хлорида натрия.

Теоретическая часть

Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль выполняет задачу возможно быстрого обнаружения и выявления путей проникновения микроорганизмов - вредителей в производство, очагов и степени размножения их на отдельных этапах технологического процесса; предотвращение развития посторонней микрофлоры путем использования различных профилактических мероприятий; активное уничтожение ее путем дезинфекции с целью получения высококачественной готовой продукции. Микробиологический контроль осуществляется на всех этапах технологического процесса, начиная с сырья и кончая готовым продуктом, на основании государственных стандартов (ГОСТ), технических условий (ТУ), инструкций, правил, методических указаний и другой нормативной документации, разработанной для каждой отрасли пищевой промышленности. Микробиологический контроль будет действенным и будет способствовать улучшению работы предприятия, если он сочетается с санитарно-гигиеническим контролем, назначение которого - обнаружение патогенных микроорганизмов. Они обнаруживаются по содержанию кишечной палочки. Санитарно-гигиенический контроль включает проверку чистоты воды, воздуха производственных помещений, пищевых продуктов, санитарного состояния технологического оборудования, инвентаря, тары, гигиенического состояния обслуживающего персонала (чистоты рук, одежды и т. п.). Он осуществляется как микробиологической лабораторией предприятия, так и санитарно-эпидемиологическими станциями по методикам, утвержденным Министерством здравоохранения. Бактериальное загрязнение определяют путем изучения микрофлоры смывов, сделанных с рук и поверхностей исследуемых объектов.

Смывы с оборудования и инвентаря производят перед началом работы либо после санитарной обработки в санитарные дни.

Смывы с рук следует производить перед началом работы, после пользования туалетом. Взятие смывов с рук персонала, спецодежды, инвентаря и оборудования производят с помощью стерильных ватных тампонов на стеклянных (лучше металлических) палочках или марлевых салфеточек размером 5 x 5 см, завернутых в бумажные пакеты. Непосредственно перед взятием смыва увлажняют тампон или салфетку стерильной 0,1 %-ной пептонной водой или физиологическим раствором, предварительно разлитым по 2 мл в стерильные пробирки. Салфетки при этом захватывают прокаленным пинцетом. После взятия смыва тампон или салфетку помещают в ту же пробирку, из которой проводили увлажнение. При контроле жирных поверхностей пользуются сухими тампонами или салфетками.

Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности в 100 см² в разных местах исследуемого предмета. Для ограничения поверхности используют шаблон (трафарет) площадью 25 см². При взятии смывов с рук протирают тампоном ладони обеих

рук, проводя не менее 5 раз по одной ладони и пальцам, затем протирают участки между пальцами, ногти и под ногтями. При взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 см²: нижнюю часть каждого рукава и две площадки с верхней и передней части спецовки. Смывы исследуют на обнаружение бактерий группы кишечной палочки и определение наличия коагулазоположительных стафилококков.

Порядок выполнения работы

1. Учет микрофлоры со смывов с рук. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 мл смыва. Наличие бактерий группы кишечной палочки в смывах с рук и одежды не допускается. Количество колоний, выросших на чашке, умножают на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета или рук. Обсемененность рук не должна превышать 200 микробных клеток на кисть руки. Таким образом, для расчета умножают число колоний на 10 и делят на 2 (смыв с обеих рук). Материалом для посева при исследовании смывов является смывная жидкость, используемая для увлажнения тампона или марлевой салфетки.

1. Определение общего числа микробов. К 2 мл изотонического раствора хлорида натрия, используемого для увлажнения тампона, прибавить еще 8 мл. Тампон тщательно отмыть, встряхивая. Полученное исходное разведение 1:10 внести в чашки Петри по 1 мл, залить расплавленным, и остуженным до 45 °С мясо-пептонным агаром. Чашки Петри поместить в термостат, где поддерживается температура 37°С, на 48 ч. По истечении времени подсчитать количество выросших колоний.

2. Выявление коагулазоположительных стафилококков. Для этого производят посев непосредственно тампоном на чашки с молочно-солевым агаром. Если смывы делают марлевыми салфетками, то посев на плотные питательные среды удобнее осуществлять нанесением на поверхность среды в количестве 0,1 мл смывной жидкости, которую затем тщательно растирают шпателем по всей поверхности агара. В качестве среды накопления для стафилококков применяют питательный бульон с 6,5 % хлорида натрия, разлитый по 5 мл в пробирки, куда помещают оставшуюся смывную жидкость.

3. Выявление наличия бактерий кишечной группы. Для этого посев произвести в среду накопления, для чего тампон, которым производили ранее посев на молочно-солевой агар (или марлевую салфетку), погрузить в среду Кесслера, разлитую в пробирки по 5-10 мл.

Дальнейший ход исследования на обнаружение стафилококков и бактерий группы кишечных палочек производят, как указано в п. 1.

Бактерии группы кишечной палочки и коагулазоположительных стафилококков должны отсутствовать в смывах с контролируемых объектов.

2. Учет микрофлоры воздуха оседания Коха. Контроль воздуха производственных помещений.

1. СанПиН 2.1.2.2645-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям проживания в жилых зданиях и помещениях».
2. СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».
3. Методические указания МУ 4.2.734-99 «Микробиологический мониторинг производственной среды».
4. Руководство 2.2.755-99 «Методика контроля содержания микроорганизмов в воздухе рабочей зоны».
(СанПиН 2.1.3.1375-03)

Актуальность изучения данной темы

Бактериальное загрязнение воздуха жилых, больничных и производственных помещений существенно влияет на заболеваемость людей инфекционными заболеваниями. Поэтому знания и умения, полученные на практическом занятии по теме: «Гигиеническая оценка микробного загрязнения воздуха помещений», помогут студентам

при решении вопроса профилактики внутрибольничных инфекций и снижении биологического фактора воздействия на производстве и в быту.

Цель занятия: изучение методов определения и оценки бактериальной загрязненности воздушной среды помещений.

После освоения темы **студент должен знать:**

– методику проведения отбора проб воздуха, их анализа, определение степени бактериального загрязнения воздуха аптечных помещений;

– расчет необходимой мощности и количества бактерицидных облучателей при обеззараживании воздуха и поверхностей помещений аптек;

уметь:

– оценить результаты исследований воздуха на соответствие гигиеническим нормативам;

– оценить условия труда персонала аптек при воздействии биологических факторов по данным санитарно-гигиенического обследования и лабораторных исследований;

– использовать основные нормативные документы и информационные источники справочного характера для организации контроля за уровнем микробного загрязнения в воздухе помещений и разработки профилактических мероприятий по предупреждению и снижению уровня загрязнения воздуха помещений.

При подготовке к занятию студенты должны проработать следующие вопросы теории:

1. Эпидемиологическое значение воздушной среды. Источники микробного загрязнения воздуха помещения.

2. Характеристика бактериального состава атмосферного воздуха и воздуха помещений. Факторы, способствующие снижению микробного загрязнения воздуха помещений.

3. Значение бактериального загрязнения воздуха при изготовлении лекарственных препаратов.

4. Методы исследования и оценки степени бактериального загрязнения воздуха закрытых помещений.

1. ОЦЕНКА САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОЗДУХА ПОМЕЩЕНИЙ

Атмосферный воздух непригоден для размножения микроорганизмов, так как в нем недостаточно влаги и питательных веществ, а солнечная радиация и высушивание оказывают бактерицидное действие.

Бактерии попадают в воздух в основном из почвы, с поверхности растений и животных, от человека воздушно-капельным путем, с отходами некоторых производств.

В атмосферном воздухе преобладают *споры грибов, актиномицетов, бацилл, пигментообразующие виды аспорогенных бактерий.*

В воздухе плохо проветриваемых и перенаселенных помещений содержится большое количество микроорганизмов. В основном, это микрофлора дыхательных путей и кожи человека.

Санитарно-микробиологическое состояние воздуха помещений оценивают по следующим показателям:

1) **Микробное число** – количество микроорганизмов, обнаруженных в 1 м³ воздуха.

2) Наличие **санитарно-показательных бактерий** – представителей микрофлоры дыхательных путей (*гемолитические стрептококки, золотистый стафилококк*).

Биологическими компонентами пыли помещений являются микрофлора (бактерии, вирусы и грибы) верхних дыхательных путей, кожи, микроскопические клещи, споры плесневых грибов. Санитарно-показательными микроорганизмами в воздухе закрытых помещений являются стафилококки, зеленящие стрептококки, а показателями прямой эпидемической опасности – гемолитические стрептококки. Несмотря на сравнительно короткий срок пребывания в воздухе, микробы создают эпидемическую опасность. Источниками микробного загрязнения воздуха в стационарах всех типов являются медицинский персонал и больные, страдающие стертыми (бессимптомными) формами инфекционных болезней, а также носители полирезистентных к антибиотикам штаммов патогенных и условно патогенных микроорганизмов.

При производстве лекарственных препаратов на основе биологического синтеза работающие могут подвергаться воздействию аэрозоля живых клеток микробов-продуцентов, продуктов метаболизма микроорганизмов и пылевидных конечных продуктов, часто содержащих более 50% белка (например, на заводах, изготавливающих белково-витаминные концентраты). На этапах собственно получения и выделения антибиотиков, а также на заключительных этапах (сушка, фасовка, упаковка) работающие могут подвергаться воздействию пыли антибиотиков. Контроль за содержанием в воздухе вредных веществ биологической природы (антибиотики, ферменты, витамины и др.) проводят аналогичным способом: как это принято для химических веществ в соответствии с требованиями Методических указаний «Микробиологический мониторинг производственной среды» (МУ 4.2.734-99) и Приложения 10 Руководства 2.2.755-99 «Методика контроля содержания микроорганизмов в воздухе рабочей зоны».

В помещениях аптек бактериальное загрязнение воздуха, происходящее за счет выделений посетителей и работников аптек, имеет большое значение, так как является причиной возможного инфицирования персонала возбудителями различных инфекционных заболеваний, а также опасности попадания микроорганизмов в лекарственные средства. Попавшая в лекарственные препараты микрофлора приводит к изменению их физико-химических свойств, снижению терапевтической активности, уменьшению сроков хранения, может явиться причиной развития заболеваний и осложнений у больного. Наиболее интенсивное бактериальное загрязнение воздуха отмечается в торговом зале, моечной и вспомогательных помещениях.

Нормативов содержания микроорганизмов в воздухе жилых помещений нет. Нормативы бактериальной чистоты производственных помещений (больниц, аптек) разработаны в зависимости от их функционального назначения с учетом интенсивности бактериальной обсемененности и риска возникновения внутрибольничных инфекций. В соответствии с нормативными документами (СанПиН 2.1.3.1375-03) бактериальную чистоту воздуха оценивают дифференцированно по общему количеству микроорганизмов в 1 м³ воздуха, а в помещениях классов А, Б, и В необходимо контролировать наличие колоний *Staphylococcus aureus*, которые не должны определяться в 1 м³ воздуха, и плесневых и дрожжевых грибов, которые не должны определяться в 1 дм³ воздуха.

2. САНАЦИЯ ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ

Наибольшее практическое значение имеет санация воздуха закрытых помещений с большим скоплением людей.

Одним из эффективных методов обеззараживания воздуха является использование бактерицидного действия ультрафиолетовых лучей с длиной волны 254-257 нм. Очистка и дезинфекция (санация) воздушной среды закрытых помещений производится с помощью специальных очистителей и бактерицидных ламп. Используют воздухоочистители передвижные рециркуляционные (ВОПР-0,9, ВОПР-1,5).

В целях санации аптечных и лечебных помещений в настоящее время применяются бактерицидные увиолевые лампы БУВ-15, БУВ-30, представляющие собой газоразрядные

ртутные лампы низкого давления. Лампы сделаны в виде трубок разной длины из увиолевого стекла и наполнены газовой смесью, состоящей из паров ртути и аргона. В концы трубок впаяны вольфрамовые электроды. При пропускании тока через трубку возникает газовый разряд, в результате которого происходит свечение. Увиолевое стекло лампы пропускает УФ-лучи, убивающие микробы, обеспечивая при этом высокий обеззараживающий эффект.

Возможно два способа применения бактерицидных ламп БУВ:

1. В присутствии людей.
2. Без людей.

Более удобным и эффективным является облучение воздуха в присутствии людей. При этом лампы располагают на высоте 2,5 м в местах наиболее мощного конвекционного потока воздуха (над отопительными приборами, дверьми и т.д.). Необходимое число ламп БУВ зависит от объема помещения и мощности ламп. При расчете количества ламп исходят из того, что на каждый метр кубический воздуха должно приходиться 0,75-1 Вт мощности, потребляемой лампой из сети. Время облучения воздуха не должно превышать 8 ч в сутки. Лучше проводить облучение 3-4 раза в день с перерывами для проветривания помещения.

В аптеках применяются потолочные бактерицидные облучатели (ПБО) и настенные бактерицидные облучатели (НБО). ПБО имеют две экранированные лампы БУВ-15 и две открытые лампы БУВ-30. При использовании ПБО, особенно при включении неэкранированных бактерицидных ламп, обеззараживающий эффект наступает за счет действия прямого потока лучей. НБО имеет две бактерицидные лампы: одна, экранированная лампа, облучает верхнюю зону и другая – неэкранированная – нижнюю зону. *Надежный бактерицидный эффект* достигается при работе бактерицидных облучателей *в течение двух часов при мощности ламп 3 Вт на 1 м³.*

При длительной работе бактерицидных ламп в воздухе помещений могут накапливаться озон и окись азота в количестве, превышающих ПДК этих веществ, поэтому использование ультрафиолетового облучения требует соблюдения правил техники безопасности. В присутствии работающих рекомендуется применять экранированные бактерицидные лампы мощностью 1 Вт на 1 м³, а в отсутствие людей используются бактерицидные лампы открытого типа (НЭ) мощностью 3 Вт на 1 м³. ПБО и НБО являются стационарными бактерицидными установками. В настоящее время в лечебно-профилактических учреждениях и аптеках применяются передвижные бактерицидные облучатели, что дает возможность более эффективно производить обеззараживание воздуха.

При санации воздуха *в отсутствие людей* (операционные, перевязочные и т.д.) лампы размещают равномерно или с преобладанием над рабочими поверхностями. При этом на кубометр воздуха необходима потребляемая мощность не менее 1,5 Вт, а минимальное время облучения составляет 15-20 минут.

Кроме ламп БУВ применяют также лампы **ПРК**.

Нормативы:

1. *При людях*: высота – 1,7 м, мощность – 2-3 Вт/кубометр, облучение – несколько раз в день по 30 минут с интервалами для проветривания.
2. *Без людей*: мощность – 5-10 Вт/кубометр, время облучения – максимально возможное.

В некоторой степени снижают микробную загрязненность воздуха помещений правильно организованная вентиляция, регулярные проветривания.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА

Для определения микробного числа воздуха в помещениях применяют следующие методы:

- 1) *Седиментационный метод* основан на принципе осаждения (седиментации). Две чашки Петри с питательным агаром оставляют открытыми в течение 60 минут, после чего инкубируют при 37⁰ С 1 сутки. Результаты оценивают по суммарному числу колоний, выросших в обеих чашках:
менее 250 колоний – воздух чистый,
250-500 – загрязненный в средней степени,
500 – загрязненный.
- 2) *Аспирационный метод* – аспирация определенного объема воздуха с высеванием содержащихся в нем бактерий на поверхность питательной среды с применением щелевого прибора Кротова (рис. 1) или с помощью микробиологического импактора воздуха «Флора-100».

Прибор Кротова представляет собой цилиндр со съемной крышкой, в котором находится электромотор с центробежным вентилятором. Принцип работы прибора основан на инерционном осаждении частиц аэрозоля на поверхность питательной среды. Исследуемый воздух всасывается со скоростью 20-25 л/мин через клиновидную щель в крышке прибора, ударяется о поверхность плотной питательной среды, и микробы задерживаются на ее влажной поверхности. Для равномерного посева микробов чашка Петри с питательной средой помещается на подставку, вращающуюся со скоростью 1 оборот в 1 с. Скорость аспирации воздуха регулируется по микроманометру (реометру) прибора. Общий объем пробы при значительном загрязнении воздуха должен составлять 40-50 л, при незначительном – более 100 л. Продолжительность аспирации 2-5 мин. После инкубирования отобранных проб при температуре 37⁰С в течение 1-2 суток в зависимости от выделяемых микроорганизмов производится подсчет выросших колоний. Учитывая объем взятой пробы воздуха, вычисляется количество микробов в 1 м³ воздуха.

Расчет производят по формуле:

$$X = a / V \cdot 1000,$$

где a – количество выросших колоний;
 V – объем пропущенного воздуха, дм³ (л);
1000 – искомый объем, дм³ (л).

Импактор «Флора-100», современная модель прибора для улавливания бактерий из воздуха, работает в автоматическом режиме и превосходит прибор Кротова по техническим характеристикам.



Рис. 1. Прибор Кротова для бактериологического исследования воздуха

Определение количества микроорганизмов в воздухе служит одним из гигиенических критериев его чистоты. О степени бактериального загрязнения воздуха судят по общему количеству бактерий, содержащихся в 1 м³ воздуха. Кроме того, оценку воздуха можно дать по содержанию санитарно-показательных микроорганизмов (разных видов стрептококков и стафилококков) – обычных обитателей слизистых оболочек дыхательных путей человека. Содержание микроорганизмов в воздухе различно в разные сезоны года. В холодный период воздух имеет меньшее микробное загрязнение, а летом воздух больше загрязняется микробами, поступающими в него в большом количестве вместе с частичками почвенной пыли. В качестве ориентировочных показателей оценки бактериального загрязнения воздуха в жилых помещениях используются предложенные А.И. Шафиром следующие величины (табл.).

Таблица

Оценка чистоты воздуха по бактериологическим показателям воздуха аптечных помещений в разные периоды года

Оценка чистоты воздуха	Содержание микроорганизмов в 1 м ³ воздуха			
	Летний период (апрель-сентябрь)		Зимний период (октябрь-март)	
	Всего микроорганизмов	Гемолитического стрептококка	Всего микроорганизмов	Гемолитического стрептококка
Чистый	<3500	<24	<5000	<52
Умеренно загрязненный	3500-5000	24-52	5000-7000	52-124
Загрязненный	>5000	>52	>7000	>124

Нормы микробного числа (Приложение 2):

- Операционные до начала работы – не более 500;
- Операционные во время работы – не более 1000;
- Родильные комнаты – не более 1000;
- Палаты для недоношенных детей – не более 750.

Воздух является важным фактором распространения патогенных микроорганизмов. Через воздух передаются возбудители многих заболеваний, таких как *грипп*, *ОРЗ*, *ангина*, *дифтерия*, *туберкулез*, *коклюш*, *чума* и др. (Приложение 1).

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА «ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА»

Задания студенту

1. Произвести бактериологический посев воздуха с помощью прибора Кротова.
2. Произвести подсчет колоний в чашке Петри, посев воздуха на питательную среду которой был сделан с помощью аппарата Кротова сутки назад со скоростью 20 л/мин в течение 5 мин. и которая находилась в термостате при температуре 37 °С в течение суток.
3. Определить уровень бактериального загрязнения в помещении.
4. Дать гигиеническую оценку эффективности работы бактерицидных ламп по условиям ситуационной задачи.

Методика работы

Определение микробного загрязнения воздуха

Получив одну из чашек Петри с выросшими микробными колониями, ознакомиться с содержащимися в задаче сведениями о времени, месте и условиях отбора пробы воздуха (скорость и время аспирации).

Для подсчета числа колоний надо разделить поверхность чашки на 4 равных стора, нанеся линии раздела на стекло крышки. Подсчитать общее число колоний на поверхности чашки и умножить на 4. Подсчет можно осуществлять простым глазом или через лупу. Число выросших колоний можно принять примерно равным количеству микробных тел в посеянном на чашку Петри объеме воздуха. Затем, учитывая условия отбора пробы, рассчитать общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха помещения.

Оценку степени микробного загрязнения воздуха произвести в соответствии с градациями, приведенными в табл. 1.

Расчет необходимой мощности и количества УФ-облучателей в помещении

Необходимая мощность (N) бактерицидных ламп определяется по формуле:

$$N = E V,$$

где: E – нормируемая величина удельной мощности ламп:

3 Вт/м³ – для ламп открытого типа,

1 Вт/м³ – для ламп экранированного типа,

V – объем помещения, м³.

Необходимое количество бактерицидных ламп (K) определяется по формуле:

$$K=N/(\text{мощность бактерицидной лампы}).$$

По условиям ситуационной задачи:

1. Определение уровня бактериального загрязнения воздуха помещения.

Общее количество микроорганизмов, выросших при посеве заданного объема воздуха на чашке Петри

Количество гемолитического стрептококка в заданном объеме воздуха ...

Расчет общего количества микроорганизмов в 1 м³ воздуха ...

Расчет количества гемолитического стрептококка в 1 м³ воздуха ...

Гигиеническая оценка степени микробного загрязнения воздуха на основе сопоставлении числа микробных тел в 1 м³ воздуха с соответствующими гигиеническими нормативами (табл.).

2. Расчет необходимой мощности и количества УФ-облучателей в помещении:

Необходимая мощность бактерицидных ламп =

Необходимое количество бактерицидных ламп =.

Заключение (образец).

1. Общее число колоний в 1 м³ воздуха в помещении составляет ... что в зимний (летний) период позволяет считать воздух этого помещения сравнительно чистым (загрязненным, требуется санация воздуха).

2. Для уменьшения уровня микробного загрязнения воздуха в помещении необходимо установить ... УФ-облучателей открытого (неэкранированного) или закрытого (экранированного) типа для достижения требуемой мощности.

3. Дать гигиенические рекомендации по организации санитарно-эпидемического режима помещения.

3. Учет микрофлоры воды.

Безопасность питьевой воды по эпидемиологическим показателям (по СанПиНу 2.1.4.1074-01) составляет не более 50 колоний на 1 мл воды.

Произвести подсчет колоний, выросших на питательной среде.

Оценить соответствие воды нормам СанПиНа для питьевой воды.

4. Сравнить показатели.

5. Написать отчет о проделанной работе.

Контрольные вопросы

1. Какую задачу выполняет микробиологический и санитарно-гигиенический контроль ?

2. Когда осуществляется микробиологический контроль и на каком основании?

3. Объясните, что включает в себя санитарно-гигиенический контроль?

4. Опишите каким путем определяют бактериальное загрязнение.

5. Что делают при взятии смывов с рук?

6. Укажите наличие каких микроорганизмов может отрицательно влиять на микробиологический контроль производственных помещений.

7. Расскажите для чего служит дезинфекция.

Ожидаемый результат:

• отчет о проделанной работе по санитарно-бактериологическому анализу воды

• ответы на контрольные вопросы.

Лабораторная работа № 11 «Методы определения и выявления. (Схема посева санитарно-показательных групп микроорганизмов) ГОСТы. Отбор проб и подготовка анализов. НТД.»;

Лабораторная работа № 12 «Микробиологический анализ соленой продукции, холодного и горячего копчения. Определение обсемененности продуктов мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными сапрофитными бактериями методом предельных разведений.»

Цель бактериологического исследования - установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного и на объектах окружающей среды.

Задачи бактериологических исследований.

1. Обнаружение патогенных бактерий в исследуемом материале.

2. Идентификация. Определение видовой принадлежности патогенных бактерий, их морфологических, биохимических, токсигенных и антигенных свойств.

Методы. Разработано много методических приёмов выделения и идентификации подавляющего большинства возбудителей инфекций человека. Эффективность выделения возбудителя в значительной степени обусловлена правильной техникой отбора образцов клинического материала, своевременностью их доставки в лабораторию и их правильным хранением.

Основные правила взятия материала для проведения бактериологических исследований.

1. Своевременное изъятие (до назначения антимикробной терапии).

2. Объём материала. Получение материала в объёме, достаточном для всего комплекса исследований. Из очага поражения материал забирают без травматизации прилежащих тканей.

3. Кровь. Образцы крови следует немедленно вносить в питательную среду.

4. Тампоны с мазками помещают в транспортную среду или сохраняют во влажной атмосфере, т.к. при высыхании погибает большинство бактерий (не рекомендуется использовать натуральную вату, т.к. остатки жирных кислот в хлопковых волокнах способны угнетать рост некоторых прихотливых микроорганизмов).

5. Замораживание материала. Некоторые материалы (моча, фекалии, иногда гнойное отделяемое) можно сохранять в замороженном виде. СМЖ, кровь и другие тканевые жидкости замораживать нельзя.

6. Анаэробы. Идеальный способ получения материала, подозрительного на анаэробы - аспирация отделяемого шприцем.

7. Сроки исследования. Исследования следует начинать немедленно после поступления образца.

§ 1. Отбор проб и подготовка их к анализам

Отбор проб производят согласно ГОСТ 26668–85 "Пищевые и вкусовые продукты". Если на какой-то вид продукции нормы отбора проб отсутствуют, то объем и массу пробы определяют в соответствии с НТД на этот продукт, Инструкцией по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319–91 или ГОСТ Р 51446–99 "Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований".

В первую очередь отбирают пробы для микробиологических анализов, затем – для физико-химических и органолептических.

Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, установлено действующими ГОСТами, ОСТАми, ТУ и другими нормативными документами на соответствующие продукты. Если на исследуемый продукт отсутствуют стандарты или ТУ, вскрывают 5 % единиц упаковки от общего количества в партии, но не менее 5 единиц.

Перед отбором пробы готовой продукции необходимо осмотреть всю партию, вскрыть отдельные единицы упаковки, дать органолептическую оценку продукта (внешний вид, цвет, запах, консистенция, вкус) и только после этого отобрать пробу.

Пробы для микробиологических анализов отбирают стерильным инструментом (ножом, ложкой, шупом, пинцетом, пробоотборником) в стерильную посуду, закрытую двумя слоями бумаги и обвязанную бечевкой, или упаковывают в стерильную бумагу.

Пробы мелкой рыбы, нерыбных объектов морского промысла, ястыков, молоко и т. д. отбирают в количестве 3–10 штук из разных мест исследуемой партии в предварительно взвешенную стерильную колбу, взвешивают и по разности устанавливают массу отобранной пробы.

Крупную рыбу и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не более трех штук. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник (за исключением отбора проб для определения паразитических вибрионов), площадью около 4 см², толщиной 4–5 мм и помещают в колбу.

Отбор средней пробы икры-сырца в ходе технологического процесса производится из трех мест исследуемой партии общей массой около 100 г.

Разрезанные ястыки исследуют путем отбора 2–3 кусочков из разных мест общей массой 100 г.

Рыбу, объекты морского промысла после разделки и мойки отбирают и вырезают небольшими кусочками массой не более 100 г.

Пробы мороженой рыбы в целом виде или замороженных сырых полуфабрикатов, в том числе молоки и икру, отбирают из трех блоков (мест) по 2–3 кусочка (икру и молоки массой около 100 г). Для приготовления навески отобранные пробы дефростируют при температуре 2...5 °С. Навеску отбирают сразу после окончания дефростации, но не позднее чем через 18 ч после ее начала. Продукты однородной консистенции допускается размораживать при температуре 18...20 °С в течение 1 ч или в термостате при температуре 35 °С не более 15 мин.

Образцы мороженных фаршевых изделий (мороженный фарш) отбирают из трех брикетов (мест) по 2–3 кусочка из поверхностных слоев и внутренней части массой около 200 г в банку. Перед анализом пробы полностью размораживают при температуре 2...5 °С в той емкости, в которой они были доставлены в лабораторию.

Пробы рыбного фарша, приготовленного на производстве, отбирают из разных мест общей массой около 200 г.

Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят шупом из верхнего, среднего и нижнего слоев. Для анализа отбирают до 3 % единиц расфасовки, но не менее трех бочек. Общая масса среднего образца должна составлять около 100 г.

Для определения сальмонелл в икре дополнительно берется навеска около 100 г.

Если пробы предполагается исследовать за пределами лаборатории предприятия, составляется акт отбора проб установленной формы, в котором указываются наименование продукта, номер партии, номер образца и дата отбора.

Для скоропортящихся продуктов интервал времени между отбором образцов и анализом должен быть сокращен до минимума. Такие образцы можно хранить при температуре от 0 °С до 4 °С не более 6 ч. В случае отбора проб в ходе технологического процесса интервал времени между отбором проб и исследованием также должен быть максимально сокращен.

Подготовку проб, разведения продуктов готовят согласно ГОСТ 26669–85 "Пищевые и вкусовые продукты". Перед анализом из отобранной пробы готовят однородную массу путем измельчения, перемешивания, растирания. Способ измельчения зависит от вида продукта и его консистенции. Образцы измельчают ножницами или скальпелем, в электрических гомогенизаторах (микроизмельчителях) или ступках. Растирание продуктов твердой консистенции производят с помощью стерильного кварцевого песка.

Продукты, содержащие жиры, нагревают на водяной бане, в термостате или в сушильном шкафу до температуры 40...45 °С и перемешивают.

Навеску отбирают в количестве 1 г из усредненной подготовленной пробы и постепенно добавляют к ней 9 см³ жидкости для разведения, получая таким образом исходное разведение 10⁻¹ (рис. 1).

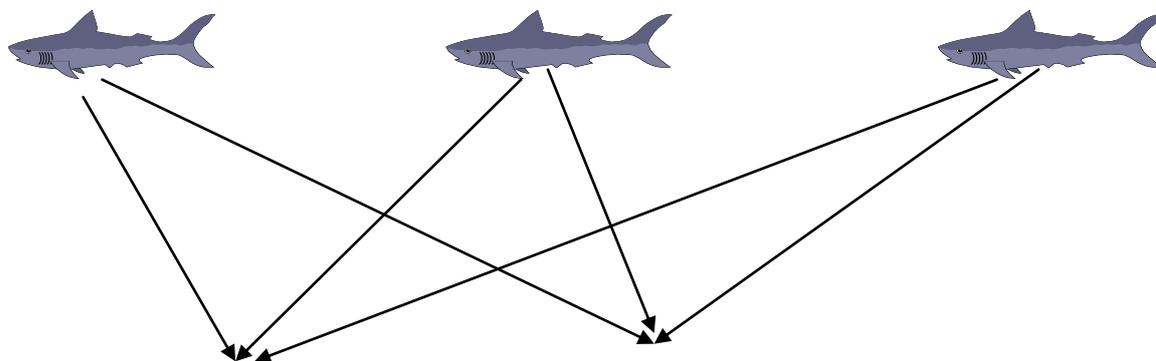


Рис. 1 Взвесь хорошо перемешивают или взбалтывают и оставляют при комнатной температуре на 3–5 мин. Затем исследуют надосадочную жидкость. При необходимости готовят последующие разведения, при этом каждый раз используют новую пипетку. Для пищевых продуктов жидкой или полужидкой консистенции 1 см³ исследуемого продукта вносят в 9 см³ стерильной жидкости для разведения, получая исходное разведение (10⁻¹).

Для исследования на сальмонеллы и паразитические вибрионы пробы сырья и продукции из гидробионтов отбирают с частью кишечника и жабр. Из усредненной пробы берут навеску в 25 г.

В основном продукты разводят в пептонно-солевом или физиологическом растворе (изотоническом растворе хлорида натрия).

Массу пробы можно определять и объемным методом. Для этого берут специально подготовленные стаканы, на стенки которых наносятся нарезки на уровне 100 см³. В стакан наливают 90 см³ стерильной жидкости для разведения. Среднюю пробу размельченного продукта вносят в стаканы в количестве, обеспечивающем подъем жидкости до уровня нанесенной нарезки по нижнему мениску, получая разведение 10⁻¹.

§ 2. Санитарно-микробиологический контроль сырья водного происхождения

Качество свежей, охлажденной и мороженой рыбы и морских беспозвоночных контролируют визуально при поступлении на рыбообработывающее предприятие и ежедневно.

Контроль сырья для выявления источника обсеменения проводят согласно СанПиН 2.3.2.1078–01 "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов".

Одним из наиболее распространенных санитарно-микробиологических показателей является общий уровень микробного обсеменения сырья.

В санитарной микробиологии используют бактериоскопический метод прямого микроскопического подсчета микроорганизмов и бактериологический метод количественного посева на питательные среды с последующей инкубацией. Последний метод применяется для группы микроорганизмов, имеющих обмен веществ одного типа.

На практике широко применяется учет группы бактерий, образующих колонии на питательном агаре при определенных температуре и времени инкубации в аэробных и факультативно-анаэробных условиях.

Контроль включает определение в сырье мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), наличия бактерий группы кишечной палочки (БГКП), золотистых стафилококков, сульфитредуцирующих клостридий, патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл и паразитических вибрионов (табл. 1).

Таблица 1

Группа продуктов	МАФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются				Примечания
		БГКП (коли-формы)	St. aureus	сульфитредуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Рыба свежая	5 · 10 ⁴	0,01	0,01	–	25	<i>V. parahaemolyticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы
Рыба охлажденная, морожена	1 · 10 ⁵	0,001	0,01	–	25	То же

Филе рыбное и фарш рыбный пищевой	$5 \cdot 10^4$	0,001	0,01	–	25	То же; сульфитредуцирующие клостридии в 0,01 г не допускаются в продукции, упакованной под вакуумом
Фарш особой кондиции	$5 \cdot 10^4$	0,01	0,1	–	25*	Сульфитредуцирующие клостридии в 0,1 г не допускаются в продукции, упакованной под вакуумом *Только сальмонеллы
Молоки и икра ястычная, мороженая	$5 \cdot 10^4$	0,001	0,01	–	25	<i>L. monocyto-genes</i> в 25 г не допускается; <i>V. parahaemoliticus</i> – не более 100 КОЕ/г, для морской рыбы
Группа продуктов	МАФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются				Примечания
		БГКП (количественные формы)	<i>St. aureus</i>	сульфитредуцирующие клостридии	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Нерыбные объекты промысла – ракообразные и другие беспозвоночные (головоногие и брюхоногие моллюски, иглокожие и др.): – живые – охлажденные, мороженые	$5 \cdot 10^4$	0,01	0,01	–	25	<i>V. parahaemoliticus</i> – не более 100 КОЕ/г для морской рыбы
	$1 \cdot 10^5$	0,001	0,01	–	25	
Нерыбные объекты промысла – двухстворчатые моллюски (мидии, устрицы, и др.): – живые – охлажденные, мороженые	$5 \cdot 10^3$	1,0	0,1	0,1	25	<i>E. coli</i> в 1 г не допускаются, <i>Enterococcus</i> – в 0,1 г не допускаются, <i>V. parahaemoliticus</i> – в 25 г не допускаются, для морской рыбы <i>V. parahaemoliticus</i> – не более 100 КОЕ/г для морской рыбы
	$5 \cdot 10^4$	0,1	0,1	–	25	
Водоросли и травы морские – сырец, в том числе замороженные	$5 \cdot 10^4$	0,1	–	–	25*	* Только сальмонеллы

Анализы по выявлению в рыбопродукции сальмонелл и паразитических вибрионов выполняются лабораториями санэпидслужбы на договорных началах, а также по требованию Госсанэпиднадзора и по эпидемиологическим показаниям. Паразитические вибрионы контролируются только по эпидпоказаниям и при экологическом неблагополучии района добычи гидробионтов.

Санитарно-микробиологический контроль двухстворчатых моллюсков проводится согласно Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю мидий в районах их выращивания, на рыбообрабатывающих предприятиях и по очистке мидий от бактериального загрязнения (1988)

и Методическим указаниями по санитарно-микробиологическому контролю дальневосточных двустворчатых моллюсков (мидий, устриц, морского гребешка), поставляемых в живом виде для общественного питания и в торговую сеть (1985).

Сырье должно соответствовать требованиям ОСТов, ТУ и технологических инструкций, в которых определены требования к качеству сырья, полуфабрикатов и готовых изделий. Кроме того, для предприятий общественного питания и торговой сети сроки, условия хранения и транспортировки регламентируются специальными санитарными правилами об условиях, сроках хранения и реализации особо скоропортящихся продуктов.

2.1. Определение качества сырья бактериоскопическим методом

Исследование микрофлоры поверхности сырья

К влажной поверхности исследуемого сырья прикладывают стерильное предметное стекло и прижимают на 1–3 мин. Затем стекло осторожной снимают, подсушивают, готовят фиксированный препарат и окрашивают по Граму. Готовый мазок просматривают, подсчитывают все микроорганизмы в десяти полях зрения (объектив $\times 90$ с иммерсией).

Исследование микрофлоры внутренних тканей сырья

В теле рыбы стерильным скальпелем делают надрез, осторожно вводят в него предметное стекло. С одной стороны стекло вытирают, мазок на другой стороне сушат, фиксируют, окрашивают по Граму. Препарат просматривают в десяти полях зрения (объектив $\times 90$ с иммерсией).

При взятии отпечатка из глубины мышц кожу посередине спины рыбы освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Стерильными ножницами и пинцетом с глубины 1,0–1,5 см вырезают кусочек мышечной ткани общей площадью 2 см². Этим кусочком делают несколько отпечатков: к предметному стеклу его прикладывают разными гранями на 2–3 мин. Препарат сушат, фиксируют, окрашивают по Граму, а затем каждый просматривают и просчитывают в десяти полях зрения. В тетрадах отмечают наличие микробов, окраску и форму:

- отсутствие микробных тел в препаратах;
- единичные микроорганизмы в препарате;
- единичные микроорганизмы в поле зрения;
- множество микроорганизмов в поле зрения.

Рыба считается доброкачественной, если в ней не содержится микроорганизмов или в поле зрения встречаются единичные грамположительные бактерии.

В недоброкачественной рыбе с резким неприятным запахом увеличивается общее число микроорганизмов и процентное содержание грамотрицательных бактерий, уменьшается удельный вес кокковых форм.

Результаты подсчета обрабатывают статистически, используя формулу

$$A = x + S_x,$$

где A – общая бактериальная обсемененность; x – среднее арифметическое десяти полей зрения; S_x – стандартная средняя ошибка.

2.2. Определение качества сырца бактериологическим способом

2.2.1. Определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) определяют по ГОСТ 10444.15–94 "Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных и факультативно-анаэробных микроорганизмов". Метод основан на подсчете выросших на питательных средах при термостатировании посевов при температуре 37 °С в течение 72 ч колоний, видимых при двукратном увеличении.

Порядок выполнения работы

Перед работой стол и руки протирают спиртом. Рыбопептонный агар (РПА) расплавляют и остужают до 50 °С. Подготовленную пробу тщательно перемешивают. Взвесь отстаивают в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для приготовления последующих разведений.

В пробирку с 9 см³ стерильного раствора для разведений переносят 1 см³ исходного разведения (10^{-1}), не прикасаясь к поверхности жидкости в этой пробирке, перемешивают полой стерильной пипеткой, 1 см³ содержимого пробирки переносят в следующую (10^{-2}) и т. д. В результате исследуемый продукт оказывается разведенным в 10, 100 и более раз. Степень разведения навески для посева на плотные среды выбирают так, чтобы общее количество колоний, выросших на чашке, колебалось в пределах от 30 до 300. В чашку Петри стерильной пипеткой вносят по 1 см³ разведенного продукта или смыва, заливают расплавленным и остуженным до 45 °С рыбопептонным агаром (15–20 см³), размешивают, вращая чашку по поверхности стола. На чашке указывают данные об анализе (номер пробы, разведение, дату посева). После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч (рис. 2).

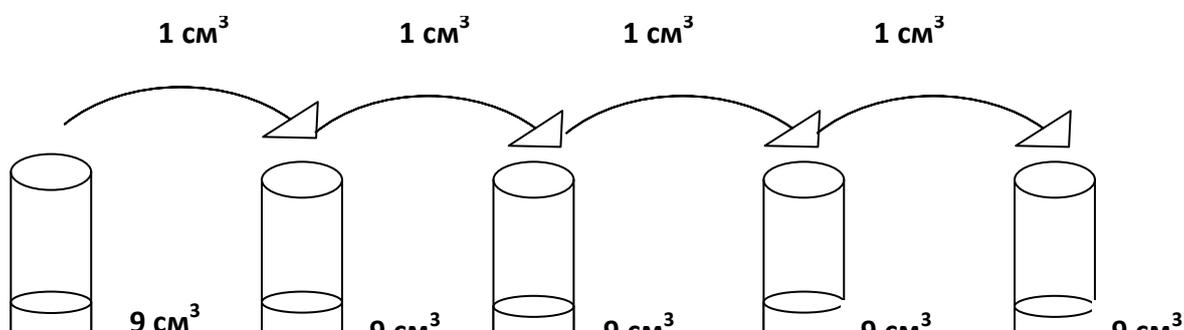


Рис. 2

Обработка результатов

Количество микроорганизмов в 1 г (1 см³, 1 см²) рассчитывают по формуле

$$K = AB/C,$$

где K – количество микроорганизмов в 1 г или 1 см³ или на 1 см², КОЕ;
 A – среднее арифметическое число колоний в чашке; B – разведение;
 C – масса (г), объем (см³), поверхность (см²).

Для определения среднего арифметического нельзя использовать данные о посевах, на которых количество выросших на чашках колоний менее 30. Если оказалось, что во всех разведениях на засеянных чашках выросло менее 30 колоний, в результатах анализа рекомендуется писать: "Количество микроорганизмов менее 1". Если на чашках более чем на половине их площади наблюдается рост спорообразующих микроорганизмов или за счет спорных микроорганизмов подсчет изолированных колоний невозможен, в результатах анализа следует писать: "Рост спорообразующих микроорганизмов". Результаты выражают в колониеобразующих единицах – КОЕ (г, см³, см²).

2.2.2. Определение бактерий группы кишечных палочек
(колиформных бактерий)

Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) имеют большое санитарно-гигиеническое значение. В этой группе определяют пять родов энтеробактерий: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Особое место в этой группе занимают бактерии, которые являются показателем свежего фекального загрязнения, типичный представитель – *E. coli*.

Определение бактерий группы кишечных палочек проводят согласно ГОСТ 30518–97 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)".

Бактерии группы кишечных палочек – анаэробные и факультативно-анаэробные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие оксидазной активностью, каталазоположительные, обычно цитратотрицательные, отрицательные по признакам образования H₂S, гидролиза мочевины и активности липазы.

Проведение исследований

Для определения БГКП 1 см³ исходного разведения продукта засевают в пробирки с 9 см³ среды Кесслера и инкубируют при температуре 37 °С; засеивается такое количество продукта, в котором ГОСТом нормируется отсутствие бактерий группы кишечных палочек. Через 24–48 ч из пробирок, в которых наблюдается интенсивный рост микроорганизмов, проявляющийся в помутнении среды, образовании газа, подкислении среды (т. е. изменение цвета среды), проводят посев на плотную дифференциально-диагностическую среду Эндо с молоком и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч (рис. 3).

При наличии на среде Эндо красных (с металлическим блеском или без него), розовых, бледно-розовых и бесцветных колоний, не обладающих протеолитической активностью, из изолированных колоний (не менее пяти колоний) готовят препараты, окрашивают их по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных без спор палочек делают заключение о присутствии в пробе БГКП.

Посевы на среде Эндо просматривают после инкубирования и отмечают рост характерных для *Escherichia coli* колоний.

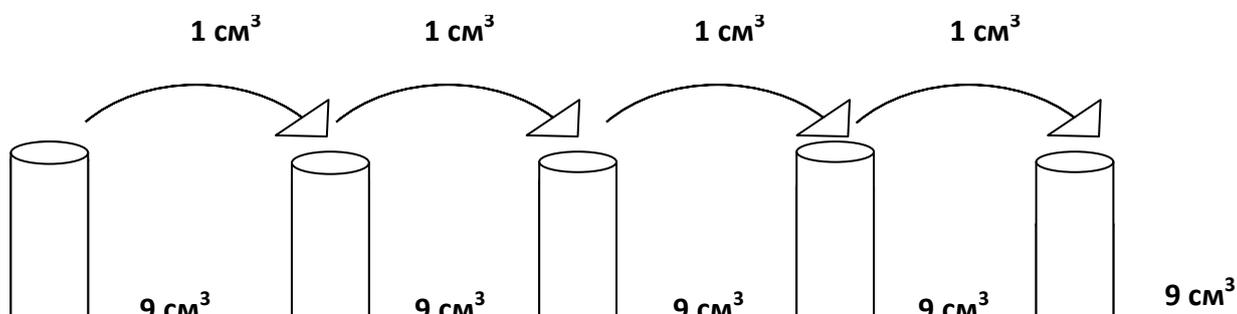
Определение бактерий вида *E. coli* проводят согласно ГОСТ 30726–2001 "Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*".

На среде Эндо *E. coli* образуют колонии от бледно-розового до темно-красного цвета часто с металлическим блеском.

Для подтверждения принадлежности выросших колоний к *E. coli* отбирают по три колонии каждого типа. Из отобранных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму (ГОСТ Р 51446–99 (ИСО 7218–96). Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований). Параллельно у бактерий из каждой отобранной колонии убеждаются в отсутствии оксидазы (ГОСТ Р 51446–99 (ИСО 7218–96). Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований).

Оксидазоотрицательные бактерии пересевают на поверхность мясопептонного агара или среды, приготовленной из сухого питательного агара. Посевы инкубируют до появления видимого роста при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

У оксидазоотрицательных грамотрицательных культур (палочки размером $1,1-1,5 \times 2,0-6,0$ мкм), выросших на среде Эндо, определяют возможность образования индола, ацетона, сероводорода, утилизации цитрата, интенсивность ферментации углеводов с образованием кислоты, ферментацию сорбита, глюкозы и лактозы.



||

Рис. 3

Определение образования индола

Культуру высевают в пробирку с бульоном Хоттингера или мясопептонным бульоном с триптофаном. Под пробку в пробирку помещают полоску индикаторной бумажки. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Если за время инкубирования посевов в среде накапливается индол, то желтый цвет индикаторной бумажки изменяется от сиренево-розового до интенсивного малинового.

Образование индола можно определить с помощью реактивов Эрлиха и Ковача. Для этого к 5 см³ 24-часовой культуры добавляют 1 см³ одного из реактивов. Образование красного слоя на поверхности культуральной жидкости указывает на положительную реакцию.

E. coli образует индол.

Определение образования ацетона

(реакция Фогес – Проскауэра)

Исследуемую культуру высевают в пробирки со средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч.

После инкубирования посевов к 1 см³ отобранной культуральной жидкости добавляют 0,6 см³ раствора α-нафтола и 0,2 см³ раствора гидроокиси калия. После добавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через 15–60 мин указывает на положительную реакцию.

E. coli не образует ацетона.

Определение утилизации цитрата

Культуру высевают в пробирки со средой Козера или на поверхность среды Симмонса. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24–48 ч. Изменение оливково-зеленого цвета сред на васильковый или синий указывает на положительную реакцию.

E. coli не утилизирует цитрата.

Определение интенсивности ферментации углеводов

с образованием кислоты (реакция с метил-рот)

Культуру высевают в пробирки с глюкозо-фосфатным бульоном или средой Кларка. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч. Затем к 5 см³ культуральной жидкости добавляют 5–10 капель реактива Кларка. Окрашивание через 1 мин культуральной жидкости в красный цвет указывает на ферментацию углеводов до pH < 5,0.

E. coli интенсивно ферментируют углеводы (реакция с метил-рот положительная).

Определение ферментации сорбита, глюкозы и лактозы

Исследуемую культуру высевают в пробирки со средой Гисса с сорбитом (глюкозой, лактозой). Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч, пробирки со средой Гисса с лактозой – при температуре (44 ± 1) °С в течение 24 ч.

E. coli ферментирует глюкозу, лактозу и сорбит.

На ферментацию глюкозы в засеянных косяках трехсахарного агара или среде Клиглера указывает изменение цвета столбика среды и образование в нем газа, на ферментацию лактозы – изменение цвета скошенной поверхности среды Клиглера, на ферментацию сорбита – изменение цвета среды.

У культур, типичных для *E. coli* по всем изученным признакам, но не ферментирующих сорбит, определяют возможность ферментации целлобиозы на среде Гисса при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

E. coli не ферментирует целлобиозу; цвет среды не меняется.

Определение образования сероводорода

Образование сероводорода учитывают в посевах на среду Клиглера или трехсахарный агар после инкубирования посевов при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. Почернение в столбике среды указывает на образование сероводорода.

E. coli не образует сероводорода.

Для биохимической идентификации выявленных бактерий допускается использование тест-систем промышленного производства.

Обработка результатов анализа

Результаты каждой пробы оценивают отдельно.

К бактериям *E. coli* относят оксидазоотрицательные, не образующие спор грамотрицательные палочки, ферментирующие лактозу при температуре (44 ± 1) °С, а также глюкозу и сорбит, дающие положительную реакцию с метил-рот, образующие индол, не образующие ацетона и не утилизирующие цитрата. Бактерии, не ферментирующие сорбита и целлобиозы, но по другим биохимическим признакам давшие типичные для *E. coli* реакции, относят к сорбитотрицательным штаммам *E. coli*.

Посевы навески продукта в жидкие среды считают положительными, если при последующем пересеве и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будут обнаружены *E. coli*.

Наиболее вероятное число (НВЧ) *E. coli* в 1 г (см³) продукта определяют по количеству положительных колб (пробирок) по ГОСТ 26670–91.

Если при подтверждении характерных колоний (при определении количества *E. coli* посевом "в" или "на" агаризованные среды) в 66 % случаев, т. е. не менее чем в двух из трех колоний, подтвержден рост *E. coli*, считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к *E. coli*. В остальных случаях количество *E. coli* определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения.

Пересчет количества *E. coli*, определенного посевом "в" (или "на") агаризованные среды, на 1 г (см³) продукта проводят по ГОСТ 26670–91.

Результаты определения количества *E. coli* и выявления их в определенной навеске продукта оформляются в соответствии с ГОСТ 26670–91.

2.2.3. Определение золотистых стафилококков

Стафилококки – шарообразные, грамположительные, факультативные анаэробы, спор, капсул и жгутиков не образуют, вырабатывают каталазу, лецитиназу, в анаэробных условиях сбраживают глюкозу до кислоты, оксидазоотрицательные, коагулазоположительные. Эти свойства используют для их идентификации и ограничения от микрококков.

Определение золотистого стафилококка проводят согласно ГОСТ 10444.2–94 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества *Staphylococcus aureus*".

Метод основан на выявлении характерного роста бактерий на селективных средах, изучении морфологических свойств и постановке теста плазмокоагуляции.

Проведение исследований

Соблюдая правила антисептики, в пробирку с 6–7 см³ солевого рыбобептонного бульона (РПБ с 6,5 % NaCl) вносят 1 г продукта или 1 см³ разведения 10⁻¹. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С на 18–24 ч.

Из среды обогащения (солевой бульон) бактериологической петлей производят посев на селективные среды: желточно- или молочно-солевой агар (ЖСА или МСА). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 ч (рис. 4).

Подозрительные на стафилококки колонии (непрозрачные, золотистые, хромовые, эмалевые, лимонно-желтые, имеющие форму правильных дисков от 2 до 4 мм в диаметре, слегка выпуклые с "радужным венчиком" вокруг колоний – зона лецитиназной активности), отсеивают на скошенный агар и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Для идентификации следует брать не менее пяти колоний. Стафилококки положительно окрашиваются по Граму, имеют шарообразную форму диаметром 0,6–1,0 мм и часто располагаются в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда (от лат. *Staphyl* – гроздь).

Определение каталазной активности

К части культуральной жидкости добавляют такое количество 10 %-го раствора едкой щелочи или 10 %-го раствора соляной кислоты, чтобы питательная среда приобрела нейтральную реакцию (проверяют по индикаторной бумажке). Обезжиренной пипеткой 0,5 см³ жидкости переносят на профламбированное, обезжиренное и охлажденное до комнатной температуры предметное стекло, а затем другой пипеткой добавляют каплю 3 %-го раствора перекиси водорода. Если в течение 3 мин не появятся пузырьки газа, считают, что исследуемые микроорганизмы каталазы не образуют.

Стафилококки дают положительную реакцию на каталазу. Со скошенного агара делают мазки, окрашивают их по Граму, проверяют чистоту выделенных культур. С односуточной культурой ставят реакцию плазмокоагуляции.

Реакция плазмокоагуляции (способность коагулировать плазму крови кролика)

В пробирку с 0,5 см³ кроличьей плазмы, разведенной изотоническим раствором хлорида натрия (физиологическим раствором) в пропорции 1 : 5 (1 см³ плазмы + 4 см³ физиологического раствора), вносят петлю суточной культуры стафилококка. Для контроля одну пробирку с плазмой оставляют не засеянной. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С. Результаты плазмокоагуляции учитывают через 2 ч. Реакция считается положительной, если сгусток образовался в течение 24 ч.

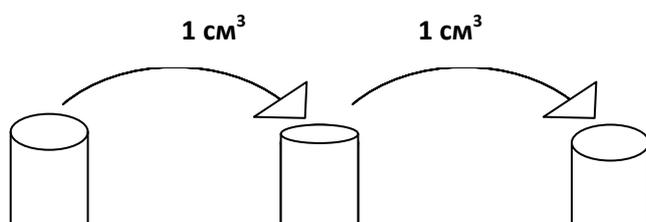


Рис. 4

Обработка результатов

При выявлении *St. aureus* в определенной навеске продукта посева считают положительными, если при подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будет обнаружен *St. aureus*.

2.2.4. Определение сульфитредуцирующих клостридий (сульфитвосстановителей)

К группе санитарно-показательных клостридий относят сульфитредуцирующие, каталазоотрицательные, грамположительные, облигатные анаэробы, образующие споры палочки. Размер палочек $0,3-2,0 \times 1,5-20,0$ мкм, с закругленными концами, часто расположенные в парах или коротких цепочках. Как правило, плеоморфные. Чаще всего подвижные за счет перетрихальных жгутиков. Образуют овальные или сферические эндоспоры, обычно растягивающие клетки. Большинство видов хемоорганотрофны. Могут быть сахаролитическими, протеолитическими.

Сульфитредуцирующие клостридии определяют по ГОСТ 29185–91 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий".

Метод основан на способности вызывать почернение питательной среды определенного состава в результате образования сернистого железа.

Проведение исследований

В соответствии с нормативно-технической документацией навеску продукта или его разведения вносят в пробирку с 10–13 см³ предварительно расплавленной и остуженной до 45 °С питательной среды Вильсон – Блера или Китт-Тароцци (рис. 5).

Инкубацию проводят при температуре 37 °С в течение 20–24 ч. При наличии роста клостридий на дне пробирки в среде образуется почернение высотой более 1 см. Чтобы получить рост изолированных колоний, из отобранных пробирок петлей проводят пересевы в чашки Петри на агаризованную среду Вильсон – Блера. Посевы инкубируют в анаэробных условиях при 37 °С в течение 24–48 ч. Не менее пяти овальных черных или окруженных черным (серым) ореолом колоний диаметром 4–5 мм высевают отдельно в свежерегенерированную среду Китт-Тароцци. Посевы инкубируют при 37 °С не более 48 ч.

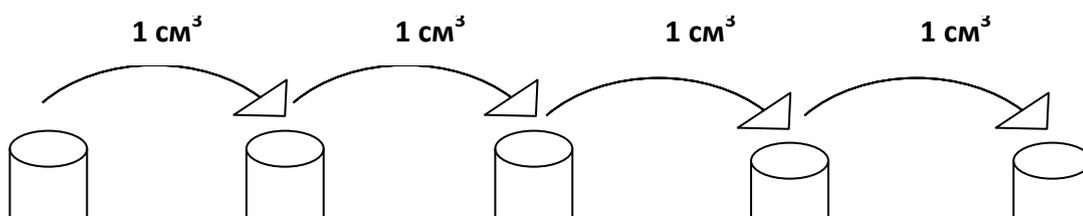


Рис. 5

Из культур выросших на среде Китт-Тароцци готовят два мазка-препарата (первый окрашивают по Граму,

второй – используют для выявления бактериальных спор) и микроскопируют. Сульфитредуцирующие клостридии представляют собой грамположительные палочки, расположенные одиночно, попарно в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. При спорообразовании споры овальные или сферические, центральные, субтерминальные или терминальные.

Определение каталазной активности.

Метод описан в п. 2.2.3 "Определение золотистых стафилококков".

Отрицательная проба на каталазу свидетельствуют о присутствии в среде облигатных анаэробных микроорганизмов.

Подтверждение анаэробного роста. Для подтверждения анаэробного роста проводят посев культур, выросших на среде Китт-Тароцци, в чашки Петри на агаризованную среду Вильсон – Блера под стекло. Посевы инкубируют в аэробных условиях при 37 °С в течение 18–72 ч.

Для сульфитредуцирующих клостридий характерен анаэробный рост.

Обработка результатов

При определении наличия сульфитредуцирующих клостридий в навеске продукта посева в вязкие среды считают положительными, если при последующем пересеве и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будут обнаружены сульфитредуцирующие клостридии.

2.2.5. Определение бактерий сальмонелл

Метод основан на способности бактерий рода сальмонелл образовывать на дифференциально-диагностических средах специфические колонии и давать реакцию агглютинации с сальмонеллезными сыворотками.

Определение бактерий рода *Salmonella* проводят согласно ГОСТ 30519–97 "Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*".

Проведение исследований

К бактериям рода сальмонелл относятся граммотрицательные палочки с закругленными концами, длина которых варьирует от 2 до 5 мкм, ширина – от 0,7 до 1,5 мкм. Обычно подвижны благодаря наличию перитрихальных жгутиков. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладают и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37 °С, реакция среды слабощелочная (рН 7,2–7,4). Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, индолотрицательные. Образуют H₂S. Реакция Фогес – Проскауера отрицательная. Мочевины не гидролизуют.

Неселективное предварительное обогащение

Навеску продукта массой 25 г засевают в 225 см³ забуференной пептонной воды. Посевы помещают на 18–20 ч в термостат при температуре 37 °С.

Селективное обогащение

По 10 см³ культур, полученных после инкубирования, переносят в 100 см³ магниевой и в 100 см³ селенитовой среды. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч при температуре 37 °С.

Выделение и идентификация культур на агаризованных дифференциально-диагностических средах

Из сред обогащения делают посев в чашки Петри на три плотные дифференциально-диагностические среды: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева, среду Левина или Эндо. Перед посевом среду необходимо подсушить в термостате. Чашки термостатируют при температуре 37 °С со средами Эндо и Плоскирева в течение 15–18 ч, с висмут-сульфит агаром – 48 ч (рис. 6).

На висмут-сульфит агаре сальмонеллы образуют черные или коричневые с металлическим блеском колонии, цвет среды под колониями черный. Исключение составляют *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi suis* и некоторые другие, растущие в виде мелких серовато-зеленых колоний с черным центром и без него.

На среде Эндо колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные; на среде Плоскирева – бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо; на среде Левина – прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний проводят их дальнейшее изучение.

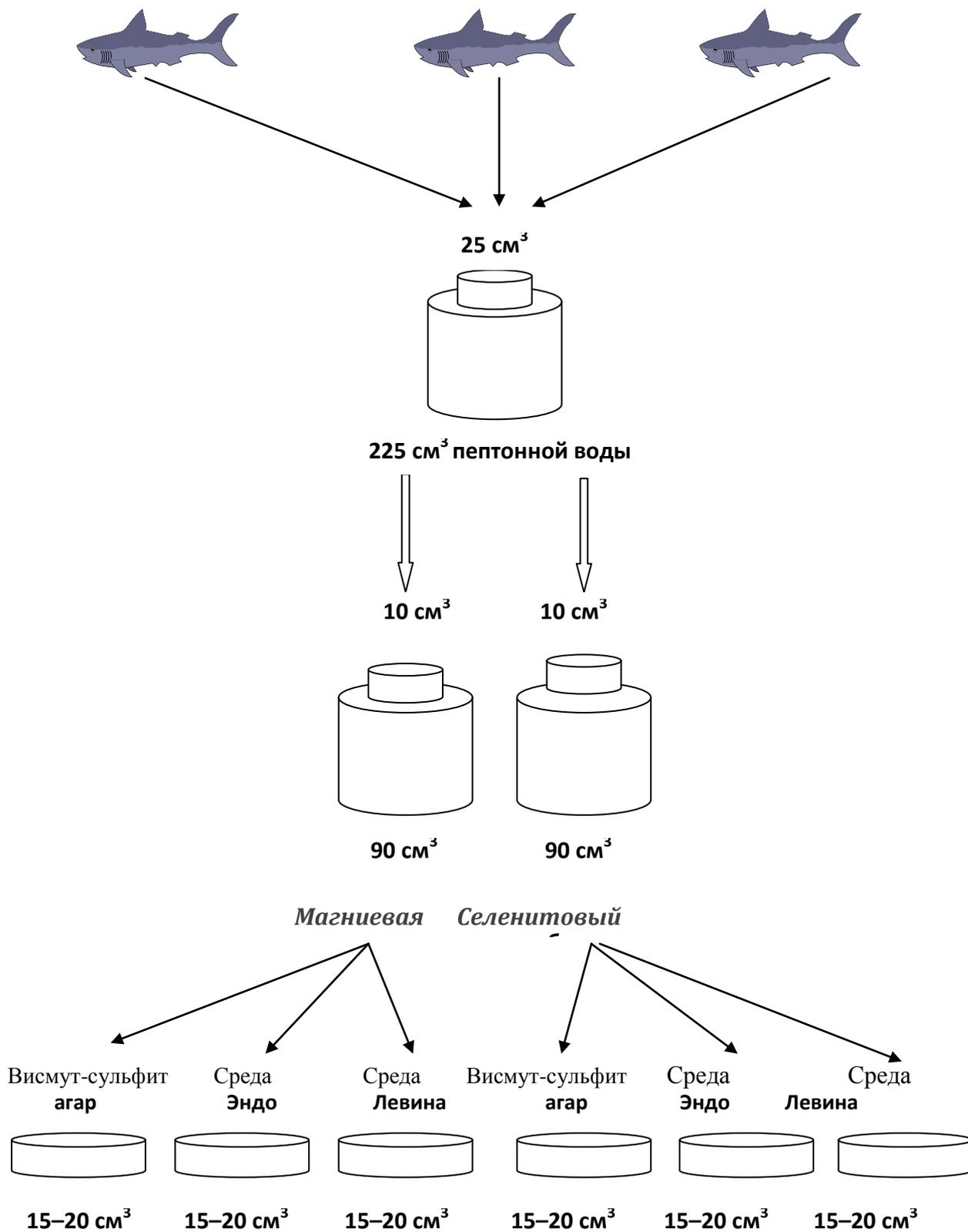


Рис. 6

Биохимическое подтверждение принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода *Salmonella*.

Подозрительные на сальмонеллы колонии окрашивают по Граму. Колонии, в которых обнаружены грамтрицательные с закругленными концами палочки, пересевают на скошенный трехсахарный агар штрихом по поверхности с уколом в столбик агара. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. После инкубирования посевы оценивают на способность ферментировать лактозу, глюкозу и сахарозу на трехсахарном агаре:

- пожелтение скошенной части среды указывает на ферментацию лактозы или сахарозы или обоих сахаров;
- пожелтение столбика среды с разрывом агара или пузырьками газа указывает на ферментацию глюкозы с образованием газа, пожелтение столбика без разрывов или пузырьков газа – на ферментацию глюкозы без образования газа;

- почернение среды в столбике указывает на образование сероводорода.

Типичными для бактерий рода *Salmonella* являются культуры, которые ферментируют лактозу, сахарозу и глюкозу (до кислоты и газа), дают почернение среды и выделяют сероводород.

Определение расщепления мочевины

Культуры пересевают штрихом на поверхность агара Кристианна с мочевиной. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

В случае положительной реакции (при расщеплении мочевины) цвет среды изменяется от розового до светло-вишневого. Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования.

Бактерии рода *Salmonella* не расщепляют мочевины.

Определение образования ацетона (реакция Фогес – Проскауера)

Описание метода приведено в п. 2.2.2 "Определение БГКП".

Бактерии рода *Salmonella* не образуют ацетона, т. е. реакция Фогес – Проскауера отрицательная.

Определение образования индола

Метод описан в п. 2.2.2 "Определение БГКП".

Бактерии рода *Salmonella* не образуют индола.

Определение ферментации маннита и сахарозы

Культуры пересевают в пробирки со средой Гисса с маннитом или сахарозой. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Бактерии рода *Salmonella* не сбраживают сахарозы и маннита. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

Определение подвижности

Культуры пересевают уколом в полужидкий мясопептонный агар. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

При росте подвижных культур отмечается диффузный рост по всему столбику агара, при росте неподвижных культур – только вдоль места укола.

Большинство штаммов бактерий рода *Salmonella* подвижны.

Для окончательной идентификации принадлежности к бактериям рода *Salmonella* культуру направляют в санэпидстанцию для проведения серологических исследований. Делают выводы о принадлежности исследованных культур к бактериям рода *Salmonella*.

2.2.6. Выявление и определение патогенных листерий

Листерии – короткие палочки правильной формы, 0,4–0,5 × 0,5–2,0 мкм, с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках, реже в длинных нитях. Грамположительные; спор и капсул не образуют; не кислотоустойчивые. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы; метаболизм бродильного типа. Каталазоположительные; оксидазоотрицательные.

Подавляющее число изолятов патогенных листерий идентифицированы как *Listeria monocytogenes*. Этот возбудитель относится к III группе патогенных бактерий и представляет опасность для здоровья человека.

Определение патогенных листерий проводят согласно ГОСТ 50396–92 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения патогенных листерий".

Стадию накопления листерий и диагностические высевы осуществляют на высокоселективных питательных средах. Изоляты, подозрительные на наличие патогенных листерий, идентифицируют по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Проведение исследований

Из каждой точечной пробы стерильным инструментом вырезают спинные мышцы с кожей, измельчают, перемешивают и отвешивают 25 г в стерильную колбу.

К навеске добавляют 225 см³ среды накопления и взбалтывают в течение 100 с.

Стадия накопления.

Культивирование в одной из сред накопления (LEB, PALCAM-бульон) проводят при 30 °С в течение 48 ч.

В случае использования среды LEB признаки роста могут быть слабо выражены на фоне рыбного гомогената. Поэтому независимо от активности роста в этой среде проводят последующий высев на диагностическую среду.

При использовании PALCAM-бульона размножение листерий сопровождается гидролизом гликозида эскулина до глюкозы и эскулетина. Это приводит к изменению исходного красного цвета среды на черно-коричневый. Отсутствие почернения указывает на отсутствие листерий в исследуемом образце.

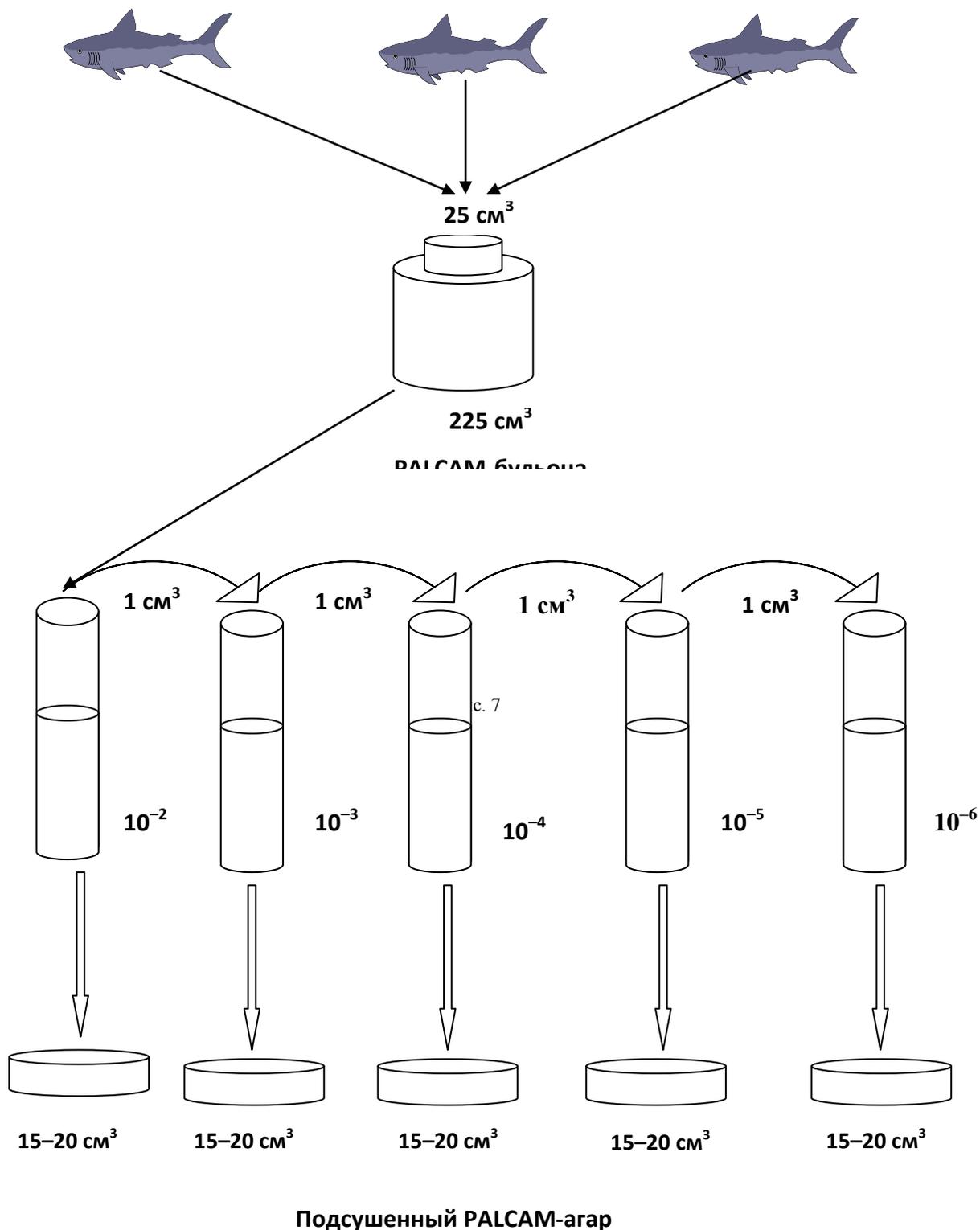
Диагностический высев.

Из PALCAM-бульона делают серийные десятикратные разведения и проводят поверхностный высев по 0,1 см³ на подсушенный PALCAM-агар. Посевы инкубируют в течение 48 ч при 30 °С. Рост листерий сопровождается потреблением эскулина и почернением PALCAM-агара (рис. 7). Для последующего анализа пересевают 5–10 подозрительных на патогенные листерии, полупрозрачных, мутноватых небольших колоний с черным ореолом.

Стадия подтверждения.

1. Из отобранных колоний изготавливают мазки-препараты, окрашивают их по Граму и микроскопируют. При окрашивании листерии выглядят как короткие грамположительные палочки. Исследуют не менее пяти колоний, содержащих бактерии данного морфотипа, для чего отсеивают их штрихами на питательный агар с 1 %-й глюкозой.

2. Подвижность проверяют в суточных культурах на питательном бульоне с 1 %-й глюкозой, выращенных при 22 и 37 °С. Листерии подвижны при 22 °С и малоподвижны или неподвижны при 37 °С.



3. Для оценки наличия каталазы из 1–2-суточной культуры на поверхность предметного стекла наносят мазок, добавляют каплю 3–5 %-го свежего водного раствора перекиси водорода. Выделение пузырьков газа указывает на наличие каталазы. Листерии образуют каталазу.

4. Для определения ферментативных свойств культуру пересевают на короткий пестрый ряд в среду Гисса, содержащую рамнозу, ксилозу и маннит. Культивируют семь дней при 37 °С, ежедневно проверяя кислото- и газообразование. У патогенных листерий (иногда уже на вторые сутки) можно установить брожение с образованием кислоты без газа.

5. Восстановление нитрата до нитрита. Исследуемые культуры засевают в питательный бульон с 0,1 % KNO₃, инкубируют при 30 °С не менее 48 ч. Для обнаружения нитритов к 0,1 см³ культуры добавляют по 1 см³ реактивов А (0,6 г NN-диметил-1-нафтиламиндигидрохлорида + 100 см³ 5 н уксусной кислоты) и Б (0,8 г сульфаниловой кислоты + 100 см³ 5 н уксусной кислоты). Появление розовой или красной окраски указывает на превращение нитрата в нитрит. Патогенные листерии не восстанавливают нитрат до нитрита.

6. Способность к гемолизу (растворению эритроцитов) определяется наличием у бактерий гемолизинов. Гемолиз проявляется в образовании зон растворения эритроцитов вокруг колоний на кровяном агаре. Патогенные листерии обладают β-гемолитической активностью. Для определения гемолитической активности дно чашки Петри делят на 25 квадратов, исследуемые культуры листерий высевают короткими штрихами по одному на квадрат, инкубируют в течение 48 ч при 37 °С.

7. CAMP-тест позволяет установить вид патогенных листерий и подтвердить наличие гемолитической активности. Для проведения теста необходимы 2–3-суточные культуры гемолитических штаммов *St. aureus* и *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* дает положительную CAMP-реакцию (происходит расширение зоны гемолиза) около штриха *St. aureus* и отрицательную CAMP-реакцию (наблюдается отсутствие изменений зоны гемолиза) рядом со штрихом *Rhodococcus equi*.

1. Для серологической идентификации листерий культуру направляют в санэпидстанцию.

Обработка результатов

Результаты оценивают по каждой пробе (25 г) отдельно. В образце констатируют присутствие *L. monocytogenes*, если из среды накопления выделены короткие грамположительные палочки, каталазоположительные, подвижные при 18...26 °С, неподвижные при 37 °С, утилизирующие эскулин, сбраживающие рамнозу с образованием кислоты и не сбраживающие маннита и ксилозы, обнаруживающие бета-гемолиз, положительную реакцию в CAMP-тесте со *St. aureus* и отрицательную с *Rhodococcus equi*, положительную реакцию с поливалентной листериозной сывороткой в реакции агглютинации на стекле.

2.2.7. Выявление и определение галофильных вибрионов

Типичными представителями галофильных вибрионов являются *Vibrio parahaemolyticus*, вызывающие острые гастроэнтериты. По клиническому течению они напоминают дизентерийные заболевания, которые занимают первое место среди пищевых бактериальных отравлений. Их вспышки связаны исключительно с употреблением моллюсков или сырой рыбы.

Vibrio parahaemolyticus – мезофильные грамотрицательные, прямые или слегка изогнутые подвижные палочки с одним полярным жгутиком, факультативные анаэробы, не образующие спор, активно подвижны, содержат цитохромоксидазу, не расщепляют лактозы и сахарозы, растут на питательных средах с содержанием хлорида натрия от 3 до 8 %, декарбоксилируют лизин, образуют индол, ферментируют (без газообразования) арабинозу, глюкозу, мальтозу, не образуют ацетил-метилкарбинол.

Весьма чувствительны к понижению и повышению температуры, низкому значению pH среды. При охлаждении до 0 °С и замораживании в чистой культуре они быстро погибают, но в рыбе даже при низкой температуре остаются жизнеспособными. Галофильные вибрионы хорошо растут на обычных питательных средах, содержащих 2–3 % NaCl. Оптимальная температура роста 30...37 °С, оптимальный pH 7,5–8,8.

Определение *Vibrio parahaemolyticus* проводят согласно Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных № 5319–91.

Проведение исследований

Метод определения *Vibrio parahaemolyticus* основан на выявлении типичных колоний на дифференциально-диагностических средах определенного состава и установлении принадлежности бактерий к парагемолитическим вибрионам по морфологическим и биохимическим свойствам.

Для определения количества парагемолитических вибрионов в 1 г продукта делают высев из разведений.

Для приготовления разведений из усредненной пробы отбирают навеску массой 25 г и растирают с кварцевым песком в стерильной ступке или гомогенизируют в измельчителе тканей. Добавляют 225 см³ 0,1 %-й пептонной воды с 3 % хлорида натрия (разведение 10⁻¹), размешивают, отстаивают в течение 5 мин, из надосадочной жидкости готовят последующие разведения.

Чтобы получить 0,1 г продукта производят посев из разведения 10⁻¹ по 0,2 см³ надосадочной жидкости на пять чашек с плотной средой дифференциально-диагностическим агаром (ДДА). Из разведения 10⁻² параллельно высевают по 0,1 см³ на две чашки, что соответствует посеву по 0,001 г продукта на одной чашке. При необходимости засевают последующие разведения. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Производят подсчет типичных колоний. На ДДА вибрионы образуют плосковыпуклые полупрозрачные колонии круглой формы с ровными краями диаметром от 1 до 5 мм, с влажной гладкой блестящей поверхностью голубовато-зеленого цвета (рис. 8).

Результаты роста на ДДА оценивают следующим образом: отсутствие роста парагемолитических вибрионов на всех пяти чашках посева из разведения 10⁻¹ означает, что в 1 г продукта парагемолитические вибрионы отсутствуют или содержатся в количестве менее 10 клеток.

Обнаружение роста 10–50 типичных колоний на пяти чашках с посевом из разведения 10⁻¹ при отсутствии роста на двух чашках с посевом из разведения 10⁻² указывает, что в 1 г продукта содержится от 100 до 500 жизнеспособных клеток парагемолитических вибрионов.

Для выявления присутствия параземолитических вибрионов в 25 г продукта 25 г подготовленной пробы переносят в 100 см³ жидкой среды обогащения. Посевы помещают в термостат при 37 °С, через 18–24 ч производят пересев на плотный ДДА. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. Выявляют типичные колонии параземолитических вибрионов.

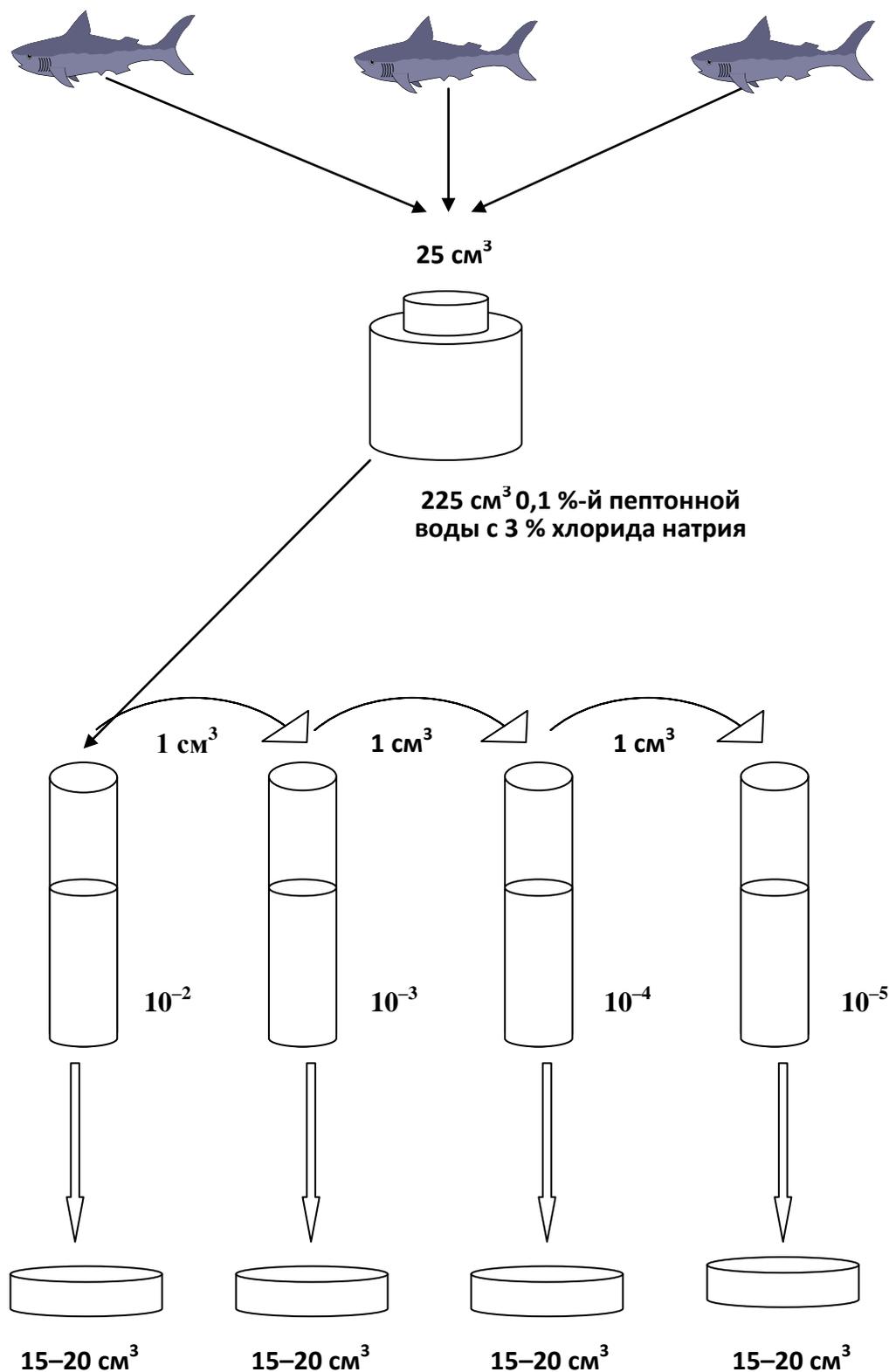


Рис. 8

ДДА

Для подтверждения принадлежности выделенных на дифференциально-диагностических средах микроорганизмов к параземолитическим вибрионам проводят изучение их морфологических свойств и ставят биохимические тесты.

Для идентификации бактерий делают пересев с ДДА в 1 %-ю пептонную воду с 3 % хлорида натрия (о наличие роста в пептонной воде свидетельствует помутнение с образованием нежной голубой пленки) и на ДДА.

Из выросших на ДДА колоний готовят мазки, окрашивают по Граму (ГОСТ 18963–73; в модификации Хукера – ГОСТ 10444.1–84) и изучают морфологию клеток.

Подвижность определяют микроскопированием фазово-контрастным методом в раздавленной капле или при посеве уколом в полужидкий агар (0,25 % агара), содержащий 3 % хлорида натрия. Засевают односуточную бульонную культуру и инкубируют ее при температуре 37 °С в течение 24 ч. Подвижные формы вызывают диффузное помутнение, слабоподвижные – вырастают по ходу укола.

Декарбоксилазную активность определяют в среде ДАГВ с лизином. Для этого в две пробирки с ДАГВ (1-я пробирка с аминокислотой лизином и 2-я – контрольная) засевают по 0,1–0,2 см³ односуточной культуры или по две петли агаровой культуры. После посева в каждую пробирку добавляют по 0,5 см³ стерильного вазелинового масла, помещают в термостат при температуре 37 °С и наблюдают. Обычно реакция наблюдается через 24 ч. При отрицательной реакции происходит только окисление глюкозы, среда становится желтой. Если микроорганизмы вырабатывают декарбоксилазу, то после окисления глюкозы происходит подщелачивание среды, и она становится темно-фиолетовой. Парагемолитические вибрионы дают в тесте на лизин декарбоксилазную положительную реакцию.

Образование декарбоксилазы к лизину является отличительным признаком от образующих газ представителей рода *Aeromonas*, к которому относятся и галофильные вибрионы.

Образование индола

Описание метода приведено в п. 2.2.2 "Определение БГКП".

При росте парагемолитических вибрионов образуется индол.

Для определения *цитохромоксидазы* односуточную культуру засевают на поверхность щелочного агара (рН 8), содержащего 3 % хлорида натрия и термостатируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Затем наносят на выросшую в чашке культуру одну каплю реактива для определения цитохромоксидазы или делают штрих из колонии на фильтровальную бумагу, смоченную этим реактивом. Если окислительный тест положительный, через 1–3 мин наблюдается окрашивание в ярко-синий цвет. Наличие цитохромоксидазы позволяет отличить *Vibrio parahaemolyticus* от бактерий семейства кишечных палочек, которые не обладают оксидазной активностью.

Способность ферментировать лактозу и сахарозу определяют путем посева культуры на скошенный агар, содержащий 3 % хлорида натрия, лактозу, сахарозу и индикатор (можно использовать среды Клиглера, Ресселя), штрихом по поверхности и уколом в столбик среды. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. Парагемолитические вибрионы цвета среды не изменяют, газа не образуют (не расщепляют лактозу и сахарозу).

Для определения *галофильных свойств* исследуемую культуру засевают в 5 см³ 1 %-й пептонной воды (рН 7,8) без хлорида натрия и с 3, 8, 10 % хлорида натрия. Посевы термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Парагемолитические вибрионы активно развиваются в средах, содержащих 3 и 8 % хлорида натрия и не дают роста в средах, не содержащих хлорида натрия и содержащих 10 % и более.

Способность к образованию ацетилметилкарбинола (реакция Фогес – Проскауэра) определяют методом, описанным в п. 2.2.2 "Определение БГКП".

Парагемолитические вибрионы не образуют ацетилметилкарбинола.

Для определения *интенсивности кислотообразования* (реакция Кларка) засевают исследуемую культуру в среду Кларка с 3 % хлорида натрия, термостатируют при температуре 37 °С в течение 24–48 ч. При наличии роста добавляют 2–3 капли 0,04 %-го раствора метилового красного (0,04 г метилового красного растворяют в 40 см³ этилового спирта и 60 см³ дистиллированной воды), встряхивают и помещают в термостат на 1 ч. При сильном кислотообразовании среда окрашивается в красный цвет, при слабом – в желтый. Парагемолитические вибрионы дают положительную реакцию в 84 % случаев.

Для определения *ферментативной активности* односуточную культуру засевают на среды Гисса с 1 % углеводов и 3 % NaCl (пестрый ряд), инкубируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч. В результате расщеплении углеводов с образованием кислых продуктов распада цвет среды изменяется при образовании газа, который собирается в поплавке. Парагемолитические вибрионы ферментируют без образования газа глюкозу, мальтозу, арабинозу.

Для вибрионов характерно расщепление глюкозы с образованием кислоты без газа как в анаэробных (в высоком столбике), так и в аэробных условиях на среде Хью – Лейфсона в пробирках. Определение типа расщепления глюкозы позволяет отличать вибрионы от сходных с ними по морфологии представителей рода *Pseudomonas* и *Lomonomonus*.

Для идентификации вибрионов можно использовать системы инди-каторные бумажные (СИБ).

2.2.8. Выявление и определение энтерококков

К группе *Enterococcus* относятся организмы, образующие клетки сферические или лишь слегка овальные и почти всегда четко грамположительные., в парах или коротких цепочках в жидкой среде. Эндоспор не образуют. Подвижность не типична. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Метаболизм бродильного типа. Сбраживают разнообразные углеводы с образованием в основном молочной кислоты, но не газа, снижая рН до 4,2–4,6. Каталазоотрицательные.

Определение энтерококков проводят согласно ГОСТ 28566–90 "Метод выявления и определения количества энтерококков".

Проведение испытания

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить минимальное количество продукта, содержащего энтерококки, или высевают навеску исследуемого продукта, которая указана в нормативно-технической документации на этот продукт.

Если необходимо выявить энтерококки в навеске продукта определенной массы или определенного объема, то навеску продукта или его разведение высевают в жидкую питательную среду (азидно-глюкозный бульон или щелочная полимиксиновая среда).

Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевов на жидких средах учитывают пробирки с признаками роста микроорганизмов (помутнение среды и изменение ее окраски до желтой). Из пробирок с признаками роста производят пересев на

поверхность агаризованной молочно-ингибиторной среды с теллуридом калия таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч.

После инкубирования посевов на агаризованных средах учитывают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных для энтерококков колоний окрашенных в черный цвет (рис. 9).

После 24–48 ч инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для энтерококков.

Для дальнейшего подтверждения принадлежности характерных колоний к энтерококкам отбирают не менее пяти колоний и пересевают их на чашки Петри с агаризованной средой (глюкозо-триптонный агар с дрожжевым экстрактом) таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч.

Подтверждение принадлежности характерных колоний

к энтерококкам.

Из колоний, выросших на глюкозо-триптонном агаре с дрожжевым экстрактом, готовят препараты и окрашивают их по Граму.

Энтерококки – грамположительные кокки, расположенные парами, короткими или длинными цепочками.

У колоний определяют наличие каталазы. Энтерококки каталазы не образуют.

При более углубленном анализе и в целях эпидемиологической безопасности проводят дальнейшее подтверждение принадлежности характерных колоний к энтерококкам.

Для определения возможности роста бактерий при температуре $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН $7,2 \pm 0,1$. Посевы инкубируют при $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48–72 ч. Энтерококки растут в данном температурном режиме, вызывая помутнение среды.

Для определения возможности роста энтерококков в среде с массовой концентрацией NaCl 65 г/дм^3 культуры высевают в солевой бульон и инкубируют при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч. Энтерококки вызывают помутнение среды и выпадение осадка.

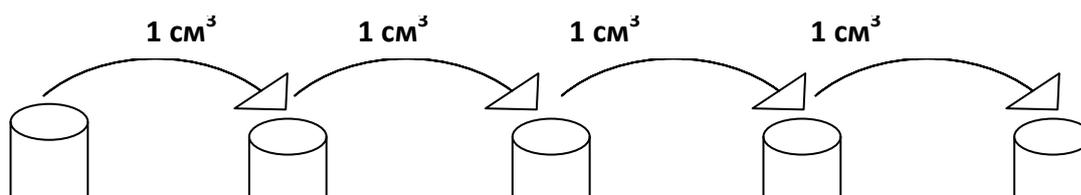


Рис. 9

Для определения возможности роста в щелочной питательной среде исследуемые культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом и рН 9,6 и инкубируют в течение 24–48 ч при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Энтерококки растут в щелочной среде, вызывая ее помутнение.

Для постановки теста на *терморезистентность* культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН (7,2 ± 0,1), пробирки выдерживают при (60 ± 1) °С в течение 30 мин и инкубируют 24–48 ч при (37 ± 1) °С. Энтерококки вызывают помутнение среды.

Для определения возможности роста в среде с 40 % желчи исследуемые культуры высевают в 40 %-й желчный бульон и инкубируют в течение 24–48 ч при (37 ± 1) °С. Энтерококки растут в средах с 40 %-м содержанием желчи, вызывают ее помутнение.

Обработка результатов

Результаты каждой пробы оценивают отдельно.

Если при изучении культуральных и морфологических свойств микроорганизмов обнаружены грамположительные, не образующие каталазы кокки, то это свидетельствует о принадлежности их к энтерококкам.

Если при исследовании колоний в 80 % случаев, т. е. не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост энтерококков, считают, что все колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к энтерококкам.

В остальных случаях количество энтерококков определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

При посеве навески продукта или разведения продукта на жидкие среды, посеvy считают положительными, если при последующем пересеве на агаризованные среды и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной характерной колонии обнаружены энтерококки.

Результаты определения количества энтерококков пересчитывают на 1 г/см³ продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670–91.

Результаты выявления энтерококков в определенной навеске записывают следующим образом: энтерококки обнаружены или не обнаружены (при этом указывается навеска продукта).

НТД

1. ГОСТ 31904-2012. Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает методы отбора проб для микробиологических испытаний. Настоящий стандарт не распространяется на молоко и продукты переработки молока

2. ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые и вкусовые продукты и устанавливает подготовку проб для микробиологических анализов

3. ГОСТ 31747-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов, и устанавливает метод выявления в определенной навеске пищевого продукта колиформных бактерий и три метода определения их количества: метод наиболее вероятного числа (НВЧ) и методы посева в или на агаризованные селективно-диагностические среды. Метод определения НВЧ колиформных бактерий предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта менее 150 или в 1 см куб. жидкого продукта менее 15 клеток колиформных бактерий. Метод определения количества колиформных бактерий посевом в агазирозованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 150 или в 1 см куб. жидкого продукта более 15 колониеобразующих единиц (КОЕ) колиформных бактерий. Метод определения количества колиформных бактерий посевом на агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 1500 или в 1 см куб. жидкого продукта более 150 КОЕ колиформных бактерий. Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в масложировой продукции

4. **ГОСТ 32064-2013.** Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, а также корма для животных, пробы окружающей среды в сфере производства и обработки пищевых продуктов и устанавливает: качественный метод выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae*; количественный метод наиболее вероятного числа; количественные методы посева в или на агаризованные селективно-диагностические среды.

5. **ГОСТ 30726-2001.** Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli* действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления в определенной навеске пищевого продукта бактерий вида *Escherichia coli* (*E.coli*) и три метода определения их количества: метод наиболее вероятного числа и методы посева в или на агаризованные селективно-диагностические среды

6. **ГОСТ 28560-90.** Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia*

7. **ГОСТ 31659-2012.** Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella* действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления в определенной массе или объеме продукта бактерий рода *Salmonella*, включая *Salmonella Typhi* и *Salmonella Paratyphi*. Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления бактерий рода *Salmonella* в масложировой продукции.

8. **ГОСТ 28566-90.** Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления и количественного определения энтерококков (*Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Streptococcus avium, Streptococcus gallinarum*)

9. **ГОСТ 29185-2014.** Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления в определенной навеске пищевого продукта сульфитредуцирующих клостридий и два метода определения их количества: метод наиболее вероятного числа и метод посева в агаризованную среду

10. **ГОСТ 10444.8-2013.** Продукты пищевые. Метод определения *Bacillus cereus* действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод определения *Bacillus cereus*, в том числе близких к нему видов *B. anthracis, B. thuringiensis, B. cereus. var. mycoides*

11. **МУК 4.2.2046-06** Методы выявления и определения параземолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах. Методические указания устанавливают порядок выявления и определения параземолитических вибрионов - возбудителей пищевых токсикоинфекций и острых кишечных заболеваний в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля), а также при санитарно-эпидемиологическом расследовании вспышек пищевых отравлений и инфекций с пищевым путем передачи.

12. **ГОСТ 32031-2012.** Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes* действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, в том числе на продукты детского, лечебного и специализированного питания: мясо, включая мясо птицы, субпродукты и мясные продукты; рыбу, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них; молоко и молочные продукты;

маргарин, майонез, свежие и свежемороженые овощи, картофель, салаты из овощей и устанавливает метод выявления и определения в них бактерий вида *Listeria monocytogenes*

13. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* и методы определения их количества: метод наиболее вероятного числа; метод посева на агаризованные селективно-диагностические среды - подсчет колоний. Метод определения наиболее вероятного числа предусмотрен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не более 1500 или в 1 см куб. жидкого продукта не более 150 клеток бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*. Метод определения количества посевом на агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 1500 или в 1 см куб. жидкого продукта не менее 150 КОЕ бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

14. ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов, и устанавливает методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) посевом: в жидкую селективную среду (с предварительным обогащением) и на (в) агаризованные селективно-диагностические среды. Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* в масложировой продукции.

15. ГОСТ 10444.12-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод определения в них дрожжей и плесневых грибов. Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления дрожжей и плесневых грибов в масложировой продукции

16. ГОСТ 28805-90. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества осмолоерантных дрожжей и плесневых грибов действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает методы определения количества осмолоерантных дрожжей и плесневых грибов посевом пищевого продукта или его разведения в агаризованную среду, определения наиболее вероятного числа и выявления присутствия (отсутствия) осмолоерантных дрожжей и плесневых грибов в определенной навеске продукта

17. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов действующий Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (бактерий, дрожжей и плесневых грибов): метод посева в агаризованные питательные среды и метод наиболее вероятного числа (НВЧ)

18. ГОСТ 10444.11-89 действующий Заменяет ГОСТ 10444.11-75 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. Распространяется на пищевые и кисломолочные продукты, закваски, бактериальные концентраты и бактериальные препараты молочнокислых бактерий и устанавливает метод определения жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов и их наиболее вероятного числа, а также методы определения в пищевых продуктах (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий) бактерий родов *lactobacillus*, *leuconostoc*, стрептококков группы п рода *streptococcus*, *pediococcus*, *s.thermophilus* и определение наиболее вероятного числа бактерий рода *lactobacillus*.

Задание: Заполнить таблицу «*Характеристика микроорганизмов*»

Название группы	Морфология	Культуральные свойства	Биохимические свойства	Устойчивость	Санитарно-показательное значение отдельных родов	Дифференциация	НТД
БГКП Семейство: <i>Enterobacteriaceae</i> Роды:							

Лабораторная работа № 13 «Микробиологический анализ пресервов. Выделение условно-патогенной и патогенной микрофлоры р. р. *Proteus*, *Escherichiae*. *Staphilococcus*, *Salmonella*, идентификация этих бактерий.»

Пресервы - это вид соленых рыбных продуктов, упакованных в герметически закрытую тару с добавлением антисептика, с ограниченным сроком хранения и температурой хранения.

Пресервы с учетом технологии приготовления и уровня бактериальной обсемененности для удобства осуществления микробиологического контроля условно разделены на три группы.

К I группе относятся пресервыпряного и специального посола, ко II - пресервы из рыбы и морских беспозвоночных в масле, соусах, заливках и маринадах, к III - пресервы пастообразные.

Основной микробиологический контроль пресервов включает: контроль санитарного состояния производства с обязательным ежедневным визуальным осмотром сырья, вспомогательных материалов, цеха и выполнение анализов пресервов II и III групп.

В пресервах выявляют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличие бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл (табл. 1).

Таблица 1

Основной микробиологический контроль пресервов

Группа	Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Периодичность контроля
			бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	патогенная микрофлора, в том числе сальмонеллы	
II	Пресервы из разделанной рыбы и нерыбных объектов морского промысла с добавлением растительных масел, заливок, соусов, с гарнирами и без гарниров (в том числе из лососевых в масле с консервантом)	2×10^5	0,01	25	2 раза в месяц
III	Пресервы "Пасты": пасты рыбные из белковой пасты "Океан"	5×10^5	0,01	25	2 раза в месяц То же
		1×10^5	0,1	25	

Дополнительный микробиологический контроль пресервов проводят, если в пресервах была обнаружена стойкая повышенная обсемененность. Для выявления источника обсеменения определяют качество сырья, в том числе соленого полуфабриката, анализируют вспомогательные материалы, входящие в рецептуру данного изделия, а также проводят более подробные микробиологические анализы пресервов, повторяют санитарно-микробиологические анализы.

Пресервы I группы исследуют только при дополнительном контроле - по требованию заказчика и по эпидпоказаниям, а также по решению заведующего лабораторией, если пресервы были приготовлены с различными нарушениями (табл. 3).

Таблица 3

Дополнительный микробиологический контроль пресервов

Группа	Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются				
			бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	золотистые стафилококки	сульфитредуцирующие клостридии	плесени, дрожжи	патогенная микрофлора в т.ч. сальмонеллы
I	Пресервы пряного и специального посола	1×10^5	0,1	1,0	0,01	0,1	25
II	Пресервы из разделанной рыбы и нерыбных объектов морского промысла с добавлением растительных масел, заливок, соусов, с гарнирами и без гарниров (в том числе из лососевых в масле с консервантом)	2×10^5	0,01	0,1	0,1	0,1	25
III	Пресервы "Пасты": пасты рыбные из белковой пасты "Океан"	5×10^5	0,01	0,1	0,01	0,1	25
		1×10^5	0,1	0,1	0,1	0,1	25

* В случае исследования пресервов на содержание паразитических вибрионов их количество не должно превышать 10 КОЕ/г.

При повышенной обсемененности соленого полуфабриката его тщательно моют или отмачивают в воде, соответствующей СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. При неблагоприятных санитарных анализах проводят внеплановую санитарную обработку оборудования.

Лабораторная работа № 14 «Микробиологический анализ вспомогательных материалов (томат продуктов, овощного сырья, пряностей, муки, сахара, соли и др.)»

Вспомогательные материалы анализируются при дополнительном контроле для выяснения источника и причин повышенного обсеменения готового продукта (табл. 1). При поступлении на предприятие и ежедневно осуществляется визуальный контроль.

Таблица 1

**Дополнительный микробиологический контроль
вспомогательных материалов (г, см³)**

Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Плесневые грибы, КОЕ/г, не более	Бактерии рода протеев	Масса продукта, в которой не допускаются			
				бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	золотистые стафилококки	сульфитредуцирующие клостридии	Патогенная микрофлора, в т.ч. сальмонеллы
Соль	1×10 ³	-	-	-	-	-	-
Сахар	1×10 ³	-	-	-	-	-	-
Пряности натуральные	1×10 ⁶ , в т.ч. споры	-	-	-	-	0,01	-
Томат-паста	1×10 ³	-	-	-	-	-	-
Овощное сырье сушеное	5×10 ⁵	1×10 ³	-	0,01	-	-	-
Крупа	5×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Мука, сухари	5×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Молоко цельное сухое	7×10 ⁴	-	-	0,1	-	-	25
Яичный порошок	-	-	0,1	0,1	-	-	25
Меланж, белки, желтки	5×10 ⁵	-	1,0	0,1	1,0	-	25
мороженые	-	-	-	-	-	-	-
Агар пищевой	5×10 ⁴	1×10 ²	-	-	-	-	-
Желатин пищевой	1×10 ⁵	-	-	0,01	-	-	-
Овощи отварные после нарезки	1×10 ³	-	-	1,0	-	-	-
Яйца сырые	-	-	-	0,01	-	-	25
Яйца отварные после нарезки	1×10 ³	-	1,0	1,0	-	-	-
Масло сливочное	-	-	-	0,01	-	-	25
Масло растительное	-	-	-	-	5 см ³	-	-

При высокой обсеменности овощей их обжаривают. При повышенной обсеменности овощного сырья усиливают его термическую обработку, т.е. направляют на изготовление соусов. Проверяют также режим хранения овощей. Овощное сырье с измененными органолептическими свойствами, имеющее затхлый запах, а также следы плесневения, для производства не допускается.

При обнаружении золотистых стафилококков в растительном масле его подвергают прогреванию при 120 °С в течение 30 мин. Одновременно проводят тщательную санитарную обработку маслопроводов. Для снижения обсеменности сушеных овощей, крупы, желатина, агара их тщательно промывают, дают воде стечь, подсушивают, а крупу после промывки варят. Муку пассируют. Такую муку можно использовать для панировки

при обжарке рыбы и для выпечки кулинарных изделий. При высокой обсемененности соли ее прокаливают при температуре 150 °С 15 мин. или при 100 °С 30 мин.

Яйца перед употреблением моют сначала теплой водой с добавлением 1 - 2-процентной кальцинированной соды, затем 0,5-процентным раствором хлорамина и ополаскивают теплой водой. Мойка яиц производится в специально выделенном месте в сырьевом отделении

Лабораторная работа № 15 «Микробиологический анализ кулинарных продуктов.»

Как правило, кулинарные изделия полностью подготовлены к употреблению в пищу, но некоторые из них требуют дополнительной термической обработки.

Учитывая определенную специфичность в технологии приготовления, характере и уровне бактериальной обсемененности, все кулинарные изделия по способу кулинарной обработки и для удобства осуществления микробиологического контроля условно делятся на девять групп:

I - подвергнутые термической обработке (жареные, отварные, печеные, рулеты, шашлыки; из фарша - котлеты, рыба фаршированная, вареные колбасы, сосиски; с добавлением муки - пирожки и пельмени жареные, пирожки печеные, кулебяки, чебуреки, расстегаи, пироги, крабовые палочки, соломка, палочки во фритюре и др.; в различных заливках, в том числе в герметически укупоренной таре);

II - желированные продукты (студень, рыба заливная и др.);

III - рыбные пастообразные и измельченные слабосоленые продукты, в том числе масла (паштеты, сельдь рубленая, масло селечное, килечное, крилевое, икорное и др.);

IV - многокомпонентные (салаты, солянки, пловы, закуски, тушеные морепродукты с овощами и др.);

V - варено-мороженые: быстрозамороженные обеденные, закусовые блюда (солянки, рыба отварная, жареная под соусами, с гарниром и др.); фаршевые изделия (крабовые палочки, жареные рыбные палочки, котлеты, крокеты и др.); нерыбные объекты морского промысла (мясо краба, криля и др.);

VI - сырые замороженные полуфабрикаты (пельмени, рыбные крокеты и др., в том числе разделанная рыба и нерыбные объекты морского промысла - сырье);

VII - рыба разделанная слабосоленая, соленая с добавлением растительных масел, в разных заливках, соусах, маринадах или без заливок, с добавлением или без добавления гарниров, со специями и без них (филе пикантное, любительское, сочинское, закуское, хамса в горчичном соусе, сельдь в соусах, рыба соленая внарезку и др.), без консервантов в мелкой расфасовке;

VIII - икорные продукты (различные запеканки, хлебцы, икра минтая закусовая, крем икорный и др.);

IX - продукты, упакованные под вакуумом, готовые к употреблению.

Таблица 1

Основной микробиологический контроль кулинарных изделий

Группа	Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Периодичность контроля
			бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	золотистые стафилококки	патогенная микрофлора**, в том числе сальмонеллы	
I	Подвергнутые термической обработке:					2 раза в месяц
	рыба разделанная	5×10^3	1,0	1,0	25	
	рыба неразделанная	1×10^4	1,0	1,0	25	
	рыба фаршированная, рулеты, шашлыки, пельмени жареные	2×10^4	1,0	1,0	25	
	в различных заливках	1×10^4	1,0	-	25	

	(соусах, маринадах)					
	фаршевые с добавлением муки	1×10^3	1,0	1,0	25	
II	Желированные*:					3 раза в месяц
	студень	5×10^4	0,1	1,0	25	
	заливная рыба	1×10^4	0,1	1,0	25	
III	Пастообразные:					3 раза в месяц
	паштеты, сельдь рубленая и т.п.	2×10^5	0,01	0,1	25	
	масло (селедочное, крилевое и т.п.)	-	0,001	0,1	25	
IV	Многокомпонентные:					2 раза в месяц
	не подвергнутые термообработке после смешивания компонентов (салаты)	5×10^4	0,01	1,0	25	
	подвергнутые термообработке после смешивания компонентов (солянки, пловы, закуски, тушеные морепродукты с овощами и др.)	1×10^4	0,1	1,0	25	
V	Варено-мороженые:					2 раза в месяц
	быстрозамороженные обеденные, закусочные блюда	2×10^4	0,1	0,1	25	
	фаршевые изделия (крабовые палочки и др.)	1×10^3	1,0	1,0	25	То же
	мясо антарктической креветки (крыля), паста "Океан"	5×10^4	1,0	1,0	25	Ежедневно
	мясо крабовое в мелкой расфасовке	1×10^5	0,1	1,0	25	То же
	крабовая продукция в панцире	5×10^4	1,0	1,0	25	Ежедневно
	мидии	2×10^4	1,0	1,0	25	То же
VI	Сырые замороженные полуфабрикаты	5×10^4	-	-	25	При
	в том числе мидии	5×10^4	0,1	0,1	25	дополнительном контроле
VII	Рыба разделанная слабосоленая, соленая (в т.ч. лососевые без консервантов):					То же
	с растительным маслом, в заливках, с гарниром, без заливок, без добавления гарнира, в нарезку со специями (филе пикантное и др.)	5×10^4	0,1	1,0	25	2 раза в месяц
	со специями (филе пикантное и др.)	1×10^5	0,01	1,0	25	
VIII	Икорные продукты:					2 раза в месяц
	подвергнутые термической обработке без термической обработки	1×10^4	1,0	1,0	25	
	икра минтая, лососевых рыб	1×10^5	0,1	0,1	25	3 раза в месяц
	"Закусочная"					3 раза в месяц
	икра макруруса, чека	2×10^5	0,01	0,1	25	То же

IX	икра солёная "Деликатесная"	1×10^4	0,1	1,0	25	- " -
	Упакованные под вакуумом***	5×10^3	1,0	1,0	25	- " -

* Бактерии рода протеев должны отсутствовать в 1 г продукта.

** В случае исследования кулинарной продукции на присутствие паразитических вибрионов их количество не должно превышать 10 КОЕ/г.

*** Сульфитредуцирующие клостридии должны отсутствовать в 1 г продукта.

Основной микробиологический контроль на кулинарном производстве включает контроль готовой продукции.

На судах, где производится мясо краба и креветки (криля), систематически анализируются полуфабрикаты после расфасовки перед заморозкой (1 раз в неделю) и варено-мороженый продукт после упаковки (ежедневно).

Микробиологические анализы готовой кулинарной продукции проводятся с определенной периодичностью:

кулинарная продукция (группы I, IV, V, VII, VIII), подвергнутая термообработке, исследуется 2 раза в месяц;

желированные и пастообразные кулинарные изделия (группы II и III), икорные продукты, не подвергнутые термообработке (VIII группа), упакованные под вакуумом (IX группа), исследуются 3 раза в месяц.

Исключение представляют сырые замороженные полуфабрикаты (VI группа), которые контролируются только при дополнительном контроле.

Основной контроль включает определение в готовых продуктах количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, наличие бактерий группы кишечных палочек, золотистых стафилококков, сальмонелл, для некоторой продукции - бактерий рода протеев, для продуктов, упакованных под вакуумом, - сульфитредуцирующих клостридий (табл. 1).

Микробиологический контроль сырья и полуфабрикатов при производстве продукции из морских беспозвоночных (криля и крабов) на судах проводится согласно табл. 2.

Таблица 2

Микробиологический контроль: сырья, полуфабрикатов при производстве крабовых конечностей, мяса краба, мяса антарктической креветки (криля) варено-мороженных"

Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Периодичность контроля
		бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	золотистые стафилококки	
Исходное сырье (крабы, криль свежельвовленные)	1×10^4	-	-	При дополнительном контроле
Полуфабрикат после варки: конечности крабовые в панцире	1×10^3	1,0	-	При дополнительном контроле
мясо краба после извлечения из панциря	1×10^4	1,0	-	То же
мясо криля	1×10^2	1,0	-	- " -
белок-коагулят (после измельчения) при производстве пасты	5×10^2	1,0	-	- " -
Полуфабрикат после расфасовки перед заморозкой: конечности крабовые в панцире	5×10^3	1,0	1,0	1 раз в неделю

мясо крабовое	3×10^4	1,0	1,0	То же
мясо криля	1×10^4	1,0	1,0	- " -

При обнаружении повышенной бактериальной обсемененности готового продукта, наличии в нем санитарно-показательных микроорганизмов необходимо в первую очередь визуально оценить санитарное состояние производства, проверить режим технологического процесса, температуру хранения, сроки реализации, провести повторный микробиологический анализ готовой продукции.

Если при повторном исследовании будет обнаружена повышенная обсемененность продукта, то с целью обнаружения и устранения источника бактериального загрязнения проводят дополнительный микробиологический контроль. При этом анализируются сырье, полуфабрикаты, вспомогательные материалы и выполняются санитарные анализы. В табл. 3 приводятся данные дополнительного микробиологического контроля сырья и полуфабрикатов при производстве крабовых палочек.

Таблица 3

Дополнительный микробиологический контроль сырья и полуфабрикатов при производстве крабовых палочек

Объект контроля	Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			
		бактерии рода протеев	бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	Золотистые стафилококки	патогенная микрофлора, в т.ч. сальмонеллы
Фарш	5×10^4	-	-	-	25
Белки яичные	5×10^5	1,0	0,1	1,0	25
Крабовые палочки после охлаждения	5×10^2	1,0	1,0	1,0	25

При микробиологическом контроле производства пасты, мяса криля варено-мороженого, крабовых конечностей и мяса крабового варено-мороженого в случаях несоответствия результатов контроля сырья показателям, проверяют режим, условия и время хранения сырца до обработки, санитарное состояние сырьевых площадок, бункеров. Для переработки используют криль, хранившийся на палубе не более 4 ч при температуре не выше 7 °С, крабов - не более 3 ч.

При повышенной контаминации криля, белка-коагулята и мяса крабов и крабовых конечностей после варки проверяют качество срывки панциря у крабов, режим термической обработки криля, крабов, качество воды в процессе варки ракообразных, периодичность замены воды, качество санитарной обработки крабоварочных машин и варильников для криля.

Особое внимание уделяют ручной разделке крабовых конечностей (при выработке мяса крабового варено-мороженого), при этом ужесточают режим мойки и дезобработки разделочных досок, ножей и ножниц. При изготовлении пасты проводят тщательную санобработку размельчителя белка-коагулята.

При повышенной бактериальной обсемененности мяса криля или мяса крабов перед заморозкой проверяют качество мойки и сортировки мяса, качество воды, санитарное состояние оборудования и инвентаря (шелушилок, центрифуг, щелевого барабана, корзин, металлических форм и др.), принимают срочные меры по сокращению нахождения вареного полуфабриката на линии до заморозки.

Большое значение для сохранения качества варено-мороженой продукции из ракообразных имеет соблюдение режима хранения (не выше -18 °С).

При неправильном хранении паста "Океан" приобретает селедочный запах, не исчезающий после тепловой обработки.

Более высокое качество пасты обеспечивается при размораживании при пониженных температурах от 4 до 8 °С в течение 20 - 24 ч.

Партии варено-мороженого мяса краба, криля и других морских беспозвоночных с повышенной обсемененностью направляются на производство консервов или кулинарных изделий с термической обработкой.

С целью предохранения от развития токсинообразующих микроорганизмов в продуктах, упакованных под вакуумом, необходимо хранить их при температуре ниже 0 °С.

Лабораторная работа № 16 «Микробиологический анализ консервов. Выделение массовых форм бактерии, обсеменяющих сырье, в чистую культуру, определение их таксономической принадлежности.»

Выпуск доброкачественной продукции, безопасной в эпидемиологическом отношении и стабильной в хранении, обеспечивается, кроме строгого соблюдения технологических режимов и санитарной дисциплины, четко организованным санитарно-микробиологическим контролем.

Консервирование это процесс, применяемый для сохранения пищевого продукта, который заключается в уничтожении микроорганизмов, способных развиваться в продукте и вызывать его порчу.

Данные рекомендации распространяются на полные консервы и полуконсервы и устанавливают порядок их санитарно-технического контроля при производстве, во время хранения и в период реализации в торговой сети.

Полные консервы – продукты, укупоренные в герметичную тару, подвергнутые тепловой обработке, обеспечивающей микробиологическую стабильность и безопасность продукта при хранении и реализации в нормальных, вне холодильника условиях.

Полуконсервы – продукты, укупоренные в герметичную тару, подвергнутые тепловой обработке, обеспечивающей гибель нетермостойкой неспорообразующей микрофлоры, уменьшающей количество спорообразующих микроорганизмов и гарантирующей микробиологическую стабильность и безопасность продукта в течение ограниченного срока хранения при температурах, указанных в нормативно-технической документации на конкретный вид продукта.

Порядок проведения контроля качества консервов в процессе их производства зависит от принадлежности консервируемого продукта к определенной группе. Консервы в зависимости от величины рН и содержания сухих веществ делят на группы:

А. Консервированные продукты, имеющие рН 4,2 и выше, а также овощные, мясные, мясорастительные, рыбораствительные и рыбные консервированные продукты с нелимитируемой кислотностью, приготовленные без добавления кислоты; компоты, соки и пюре из абрикосов, персиков и груш с рН 3,8 и выше; сгущенные стерилизованные молочные консервы.

Б. Консервированные томатопродукты:

а) неконцентрированные томатопродукты (цельноконсервированные томаты, томатные напитки, в том числе «Сок томатный», «Томаты натуральные», «Томаты консервированные с зеленью» и другие);

б) концентрированные томатопродукты, с содержанием сухих веществ 12% и более (томатная паста, томатные соусы и другие).

В. Консервированные слабокислые овощные маринады, салаты, винегреты и другие продукты, имеющие рН 3,7-4,2, в том числе огурцы консервированные, маринады овощные и другие консервы с регулируемой кислотностью.

Г. Консервированная квашенная капуста; овощные маринады с рН ниже 3,7; соки, компоты и пюре из абрикосов, персиков и груш с рН ниже 3,8; фруктовые и плодоваягодные консервы (плоды и ягоды протертые с сахаром, маринады плодовые и ягодные, сок виноградный натуральный, компоты из плодов, ягод, ревеня и дыни, соусы фруктовые, соки плодовые и ягодные с сахаром, соки плодовые и ягодные натуральные, соки плодовые и ягодные с мякотью, соки плодовые и ягодные концентрированные, соки

из citrusовых плодов, варенье, джем плодоваягодные и другие); консервы для общественного питания с сорбиновой кислотой и рН ниже 4,0.

Д. Пастеризованные мясные и мясорастительные консервированные продукты (шпик, соленые и копченые бекон, сосиски, ветчина и другие).

Е. Пастеризованные газированные фруктовые соки и газированные фруктовые напитки с рН 3,7 и ниже.

Деление консервов детского питания на группы аналогично указанному выше. Требования, предъявляемые к консервам детского питания, распространяются и на консервы диетического питания.

Консервируемые продукты групп А, Б, В, Г и Е относятся к полным консервам, а группы Д – к полуконсервам.

Выработка консервов разрешается на предприятиях, обеспеченных ежедневным микробиологическим контролем.

Санитарно-микробиологический контроль производства консервов группы А подразделяется на основной и дополнительный.

Основной контроль производится систематически бактериологическими лабораториями предприятий и периодически – технологическими лабораториями производственных объединений, лабораториями центральных проектно-конструкторских и технологических бюро (ЦПКТБ) Всесоюзных рыбопромышленных объединений (ВРПО) и органами санэпидслужбы согласно их плану.

Основной микробиологический контроль проводится систематически с определенной периодичностью и охватывает консервы до стерилизации, а так же сырье, полуфабрикаты, вспомогательные материалы, входящие в состав консервов. Контролируется также санитарное состояние предприятия. При этом анализируют смывы с оборудования и инвентаря, с санитарной одежды и рук работников, занятых на операциях укладки в банки термически обработанного полуфабриката, воду, используемую на технологические нужды, воздух цехов, где производится термическая обработка полуфабриката и укладка его в банки.

Дополнительный контроль проводится по решению заведующего лабораторией, старшего бактериолога или ведомственных санитарных врачей учреждений санэпидслужбы.

Дополнительный контроль включает подробный микробиологический анализ вспомогательных материалов и полных консервов после стерилизации для проверки их промышленной стерильности, проводят в случае:

- отступления от технологического процесса;
- закладки консервов на длительное хранение;
- отсутствия показателя по количеству МАФАНМ в консервах перед стерилизацией;
- обнаружения в консервах перед стерилизацией повышенного количества МАФАНМ или присутствия в них или в воде спор мезофильных клостридий;
- изготовления консервов на экспорт;
- изготовления консервов для детского питания.

Промышленная стерильность – отсутствие в консервируемом продукте микроорганизмов, способных развиваться при температуре хранения, установленной для конкретного вида консервов, и микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья человека.

1. Методики определения микробиологических показателей сырья, вспомогательных материалов, полуфабрикатов, консервов перед стерилизацией.

1.1. Отбор и подготовка проб

Для проведения микробиологических исследований пробы пищевых продуктов отбирают по ГОСТ 26668 и ведомственной нормативно-технической документации. Пробы сырья, вспомогательных материалов и полуфабрикатов отбирают по ходу технологического процесса.

Для микробиологических исследований вспомогательных материалов отбирают 5% неповрежденных единиц транспортной упаковки от всех мест партии, но не менее чем от 5 упаковок. Сырье, полуфабрикат после разделки и мойки, полуфабрикат после термической обработки и охлаждения отбирают общей массой не менее 300 г. Мелкие рыбу и объекты морского промысла отбирают по несколько штук с поверхности, с разной глубины и разных мест соприкосновения продукта с тарой. Отбор проб от средних и крупных образцов рыбы проводят, вырезая куски из приголовной и прихвостовой частей. Мороженое сырье перед отбором проб размораживают в таре, в которой оно было упаковано, до температуры от 2 до 5°C, т.е. до состояния, при котором возможен отбор рыбы и нерыбных объектов морского промысла. Размораживание производят на воздухе при температуре не выше 20°C. Полуфабрикат после разделки и мойки отбирают по истечении 1 ч после начала процесса разделки. Пробы термически обработанного полуфабриката отбирают после его охлаждения.

Содержимое упаковок, позволяющих перемешивание мешалкой или металлическим щупом, тщательно перемешивают. Сыпучие продукты в крупных упаковках (мешках) и нефасованные (свободно складуемые) составляют из отдельных выемок, взятых стерильным щупом или пробоотборником с поверхности, из разной глубины и из слоев, соприкасающихся с тарой (не менее 5 выемок).

Крупы, муку, сахар, соль и томат-пасту отбирают массой около 300 г, пряности и сухое овощное сырье – около 50 г.

При отборе проб мороженых продуктов в виде блоков из среднего в ящике блока отделяют два противоположных по диагонали куска массой до 0,1 кг каждый, а из середины блока массой до 0,2 кг. Отбор проб тузлука проводят из посолочной ванны после 1,5 – 2 ч работы емкости, в случае посола с рециркуляцией тузлука – через 1 ч работы III смены. В стерильную колбу половником или пробоотборником отбирают около 100 см³ тузлука.

Для отбора проб масла вскрывают 10% упаковочных единиц (контейнеры, бочки, фляги), но не менее 4-х, и отбирают общим объемом 250 см³. Отбор проб проводят стерильным пробоотборником или металлической трубкой (диаметр не менее 10 мм). Из трубопроводов отбирают непосредственно в стерильную посуду в количестве 100 – 200 см³. При отборе проб из резервуара, оснащенного краном, кран сначала промывают, вытирают, затем фламбируют смоченной в спирте и зажженной ватой и выпускают часть масла.

Пробы консервов, фасованные в мелкую тару до 1 куб. дм включительно, отбирают непосредственно перед поступлением консервов на стерилизацию (пастеризацию), а от консервов, фасованных в крупную тару, во время фасовки отбирают с соблюдением правил асептики около 100 г продукта в стерильную тару (банку, колбу).

Отобранные пробы подготавливают к исследованию по ГОСТ 26669. Величину pH контролируют по индикаторной бумаге, для чего небольшое количество продукта отбирают в отдельную пробирку.

Для посева на или в питательные среды или для приготовления разведений навески отбирают одним из способов описанных ниже:

- от консервов с жидкой фазой – из жидкой фазы;
- от пюреобразных, фаршевых, паштетных, пастообразных консервов – непосредственно из содержимого банок (для консервов жидкой консистенции);

- от консервов, не содержащих жидкой фазы или содержащих ее в незначительном количестве, после их измельчения (если необходимо), отбирают в стерильную посуду навеску и добавляют стерильную воду или пептонно-солевой раствор в соотношении 1:1, закрывают стерильной крышкой и тщательно перемешивают.

Если консервы расфасованы в мелкую тару, то для приготовления исходного разведения используют все количество продукта, находящегося в банке.

1.2. Контроль сырья, полуфабрикатов и вспомогательных материалов.

Входной контроль сырья, полуфабрикатов и вспомогательных материалов (сахар, масло, мука и др.) осуществляют на соответствие показателям, предусмотренным СанПиН 2.3.2.1078 - 01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Результаты контроля заносят в журнал, форма которого предусмотрена ведомственной нормативно-технической документацией.

Сырье контролируют визуально ежедневно и при поступлении его на рыбоконсервное предприятие. Визуальное обследование замороженной рыбы проводится поле ее дефростации.

У доброкачественной рыбы глаза прозрачные, чешуя блестящая, плотно удерживается на коже. Жабры красные, без запаха и слизи. Брюшко не вздутое. Мясо на ощупь плотное, упругое, от костей отделяется с трудом. Если доброкачественность сырья вызывает сомнение, то для объективной оценки проводят исследования мазков-отпечатков с мышц.

Хранить сырье до переработки необходимо в условиях, исключающих возможность развития микроорганизмов.

При основном микробиологическом контроле технологического процесса приготовления консервов 1-2 раза в месяц обследуют полуфабрикаты, включающие – сырье после разделки и мойки; полуфабрикат после подсаливания и полуфабрикат после термической обработки и охлаждения.

При обнаружении повышенной обсемененности полуфабриката после разделки и мойки проверяется качество сырья. Кроме того, принимаются меры по улучшению качества разделки и мойки. Все операции, связанные с разделкой рыбы, должны производиться с максимальной быстротой, особенно в летний период, когда повышается температура воздуха в помещениях.

При повышенной обсемененности тузлука коррелируют режим его сменности, определяют обсемененность соли, проверяют санитарное состояние посольных емкостей, и если оно не удовлетворительно, проводят дополнительную санитарную обработку.

При повышенной обсемененности полуфабриката после термической обработки и охлаждения проверяют режим термической обработки, обсемененность воздуха цеха, санитарное состояние емкостей, куда загружается полуфабрикат, предназначенный для изготовления консервов, особенно паштетов. Необходимо строго соблюдать сроки и режим хранения полуфабриката, идущего на изготовление фаршевых и паштетных консервов.

Контроль вспомогательных материалов

При производстве рыбных консервов используют томат-пасту, соль, сахар, овощное сырье, растительное масло, пряности и др. Томат-паста, соль, сахар обычно бывают обсеменены в пределах допустимых показателей и не содержат специфических микроорганизмов, вызывающих порчу консервов, поэтому их исследуют только при дополнительном контроле. В то же время овощное сырье, крупа, мука и, особенно, перец часто содержат споровые формы, поэтому их подвергает систематическому микробиологическому контролю. Во всех перечисленных вспомогательных материалах определяют наличие спор мезофильных анаэробных микроорганизмов, присутствие которых в 0,1 г продукта не допускается. В растительном масле определяют патогенные стафилококки; масло с наличием патогенных стафилококков для производства консервов не допускается.

Допускается стерилизация пряностей в жестяных и других емкостях многократного пользования без строгой герметичной упаковки.

При наличии спор в овощном сырье усиливают его термическую обработку, т.е. отправляют на изготовление соусов, проверяют также режим его хранения. Овощное сырье с измененными органолептическими свойствами (затхлый запах, плесневение) для производства консервов использоваться не может.

При обнаружении стафилококков в растительном масле, его подвергают прокаливанию при 120°C в течение 30 мин. Одновременно проводят тщательную санитарную обработку маслопроводов. Для более полной гарантии получения консервов, безопасных в отношении стафилококковой интоксикации, рекомендуется проводить их стерилизацию при температуре 120°C (стерилизующий эффект не ниже 5,1 условных мин).

Если в 0,1 г крупы обнаружены споры анаэробных микроорганизмов, крупу тщательно моют и повторно делают анализ на присутствие спор. Если при повторном анализе обнаружатся споры, то дополнительно проводят анализ консервов до стерилизации на присутствие спор анаэробных микроорганизмов.

При обнаружении в 0,1 г муки спор мезофильных клостридий мука пассируется.

1.3. Контроль консервов перед стерилизацией.

Проверка микробиологической обсемененности содержимого консервных банок перед стерилизацией включает следующие определения:

- а) количество МАФАНМ;
- б) спор мезофильных клостридий – возбудителей бомбажа;
- в) спор термофильных бацилл – возбудителей плоскокислой порчи консервов;
- г) спор мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Определение количества МАФАНМ в содержимом консервных банок перед стерилизацией проводят ежедневно, один раз в каждую смену по каждому виду вырабатываемых консервов. Для анализа отбирают одновременно три образца не ранее 1 часа после начала работы линии. Количество МАФАНМ в каждом образце консервов перед стерилизацией не должно превышать числа микроорганизмов, указанных в таблице 1.

При микробиологическом контроле каждой партии готовых консервов допускается проводить определение количества МАФАНМ в содержимом консервных банок перед стерилизацией два раза в неделю.

Выявление спор мезофильных клостридий – возбудителей бомбажа в содержимом консервных банок перед стерилизацией проводят в следующих случаях:

- при повышенном количестве МАФАНМ в консервируемых продуктах перед стерилизацией – немедленно после регистрации повышенного количества;
- при обнаружении микробиологического брака по дефектам (бомбаж – банки со вздутыми доньшками и крышками; «хлопуши» – выпуклость доньшек или крышек банок, которая исчезает на одном конце и одновременно возникает на другом, создавая при этом характерный хлопающий звук; признаки микробиологической порчи продуктов – плесневение, брожение, ослизнение) немедленно после регистрации брака, если продолжается изготовление данного вида консервов;
- при профилактическом контроле, но не реже одного раза в неделю по каждому виду вырабатываемой продукции.
- При удовлетворительном санитарном состоянии технологической линии в 0,1 г содержимого консервных банок перед стерилизацией не должны обнаруживаться споры мезофильных клостридий – возбудителей бомбажа.

Выявление спор термофильных бацилл – возбудителей плоскокислой порчи в содержимом консервных банок перед стерилизацией проводят в следующих случаях:

- при обнаружении бактериологического брака более 0,2%, при прокисании продукта с образованием газа или при обнаружении плоскокислой порчи – немедленно после регистрации брака, если продолжается изготовление данного вида консервов;
- при профилактическом контроле производства натуральных консервов из крабов и консервов детского питания периодически, но не реже одного раза в неделю, по каждому виду вырабатываемой продукции.

При удовлетворительном санитарном состоянии технологической линии в натуральных крабовых консервах перед стерилизацией указанные микроорганизмы не допускаются в 10 г.

Выявление спор мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводят в следующих случаях:

- при повышенном количестве МАФАНМ в продукте перед стерилизацией – немедленно после регистрации повышенного количества;
- при обнаружении микробиологического брака более 0,2% (признаки микробиологического брака, плоскокислое свертывание) – немедленно после регистрации повышенного количества;
- при профилактическом контроле, проводимом не реже одного раза в неделю по каждому виду консервов.

При удовлетворительном санитарном состоянии технологической линии в 1 г содержимого консервных банок перед стерилизацией не должно обнаруживаться более 5 спор мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Допустимое количество МАФАНМ в консервах перед стерилизацией в соответствии с инструкцией № 01 – 19/9 – 11 «Инструкция о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания».

Таблица 1.

Наименование консервов	Допустимое количество МАФАНМ в 1 г (1 см ³) продукта (КОЕ), не более
1. Консервы детского питания (с тепловой обработкой компонентов по ходу технологического процесса):	
- рыбные	5,0 x 10 ²
2. Рыбные консервы с предварительной термической обработкой рыбы, молоко, печени и овощей (в томатном соусе, в масле, в бульоне, в масляно-томатном соусе, рыборастворительные, рыбокрупянные, в желе)	1,0 x 10 ⁴
3. Рыбные консервы без предварительной термической обработки рыбы, молоко, печени или овощей (в томатном соусе и без него, рыбокрупянные, натуральные, натуральные с добавлением масла, в желе, супы рыбные, уха, рагу, тушенка)	8,0 x 10 ⁴
4. Фарши, пудинги, паштеты, рыборастворительные фаршевые:	5,0 x 10 ⁴
- с предварительной термической обработкой рыбы (кроме паштетов из копченной рыбы)	1,0 x 10 ⁵
- без предварительной термической обработки рыбы, молоко, печени, икры	3,0 x 10 ⁵
- паштеты и копченной рыбы	1,0 x 10 ⁴
5. Консервы из морских беспозвоночных и водорослей:	1,0 x 10 ⁵
	2,0 x 10 ⁵

<ul style="list-style-type: none"> - из водорослей с предварительной термической обработкой - креветки натуральные, мидии - натуральные (крабы, кальмары и др.) в том числе рыбные консервы с добавлением морских беспозвоночных 	
---	--

В случае обнаружения в консервах перед стерилизацией повышенного количества МАФАНМ или присутствия в 0,1 г (0,1 см³) продукта спор мезофильных клостридий и присутствия в 1 г (1 см³) более 5 спор мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов необходимо:

а) выявить и устранить очаги микробного загрязнения путем последовательного определения количества МАФАНМ на технологическом оборудовании, сырье, полуфабрикатах и воде. Микробная обсемененность сырья, вспомогательных материалов и полуфабрикатов не должна превышать значений, указанных в СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Вода должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.4.1074 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества.» и не содержать спор мезофильных клостридий в 100 см³.

б) провести микробиологический анализ готовой продукции для проверки ее промышленной стерильности по ГОСТ 30425 – 97 «Консервы. Методы определения промышленной стерильности».

В случае обнаружения в консервах перед стерилизацией спор термофильных микроорганизмов – возбудителей бомбажа или прокисания продукта необходимо:

а) выявить источники загрязнения продукции термофильными микроорганизмами – возбудителями бомбажа или прокисания путем последовательного микробиологического обследования технологической линии производства (сырье, вспомогательные материалы, полуфабрикаты и оборудование), обратив особое внимание на труднопромываемые участки оборудования и технологические процессы предусматривающие тепловую обработку продукта.

б) провести дополнительный анализ готовой продукции для выявления в ней термофильных микроорганизмов – возбудителей бомбажа или плоскокислой порчи консервов.

2. Контроль готовых консервов в соответствии с ГОСТ 30425-97 «Консервы. Метод определения промышленной стерильности».

Таблица 2

№ п/п	Микроорганизмы, выявленные в консервах	Консервы общего назначения
1.	Спорообразующие мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы группы <i>B. subtilis</i> .	Отвечают требованиям промышленной стерильности. В случае определения количества этих микроорганизмов оно должно быть не более 11 клеток в 1 г (см ³) продукта.
2.	Спорообразующие мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы группы <i>B. cereus</i> и (или) <i>B. polymyxa</i>	Не отвечают требованиям промышленной стерильности.
3.	Мезофильные клостридии	Отвечают требованиям промышленной стерильности, если выявленные мезофильные клостридии не относятся к <i>C. botulinum</i> и (или) <i>C. perfringens</i> . В

		случае определения мезофильных клостридий их количество должно быть не более 1 клетки в 1 г (см ³) продукта.
4.	Спорообразующие термофильные анаэробные, аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	Отвечают требованиям промышленной стерильности, но температура хранения не должна быть выше 20 ⁰ С.

Обнаружение в консервах непатогенных спорообразующих бацилл группы *B. subtilis* при отсутствии бомбажа и при нормальных органолептических показателях не служит препятствием к выпуску их с завода и употреблению в пищу. Такие консервы не могут быть отгружены потребителю в случае особых требований к стерильности в договорах на поставку консервов.

При санитарно-эпидемиологическом анализе (при пищевых отравлениях) нормальных по внешнему виду консервов в них подсчитывают количество мезофильных спорообразующих бацилл группы *B. subtilis* методом НВЧ по ГОСТ Р 51446 – 99 “Общие правила микробиологических исследований.”

Наиболее вероятное число (НВЧ) мезофильных спорообразующих бацилл группы *B. subtilis* в 1 г (см³) промышленно стерильного консервированного продукта не должно превышать 11. Бациллы групп *B. cereus* и *B. polymyxa* в промышленно стерильных консервах не допускаются.

При обнаружении в консервах неспорообразующих микроорганизмов данную партию консервов подвергают дополнительному микробиологическому анализу с отбором одной банки на каждые 500 от данной партии консервов, но не более 50 банок и не менее 3. Все отобранные образцы консервов подвергают микробиологическому анализу. В случае подтверждения результатов предыдущего микробиологического анализа вопрос о возможности и условиях реализации партии консервов, содержащей неспорообразующую микрофлору, передается на решение органов Госсаннадзора. В случае не подтверждения результатов микробиологического анализа партия консервов реализуется в обычном порядке.

При обнаружении в консервах мезофильных клостридий посеvy культур направляют на идентификацию в санитарно-эпидемиологические станции для исследования по ГОСТ 10444.7 и ГОСТ 10444.9. В случае установления присутствия *Cl. botulinum* и (или) *Cl. perfringens* данная партия консервов запрещается для употребления в пищу, на что выдается заключение органов Госсаннадзора с предписанием об уничтожении данной партии консервов. В этом случае проводится обследование всего процесса производства с целью выявления причин выпуска недоброкачественной продукции.

Если в результате идентификации установлено, что в посевах присутствуют клостридии, не относящиеся к *Cl. botulinum* или *Cl. perfringens*, то допускаются консервы, сохранившие после термостатирования (в отобранной для анализа выборке) нормальный вид и отвечающие по другим микробиологическим, а также органолептическим и химическим показателям требованиям нормативно-технической документации, считать промышленно стерильными.

При санитарно-эпидемиологическом анализе нормальных по внешнему виду консервов подсчитывают количество мезофильных клостридий методом НВЧ по ГОСТ Р 51446 – 99 “Общие правила микробиологических исследований.”

Наиболее вероятное число (НВЧ) мезофильных клостридий в 1 г (1 см³) промышленно стерильного консервированного продукта не должно превышать 1. При этом также проводят идентификацию для определения отсутствия среди выделенных мезофильных клостридий *Cl. botulinum* или *Cl. perfringens*.

В консервах детского питания не допускается присутствие мезофильных клостридий. При обнаружении мезофильных клостридий в 10 г (10 см³) консервов детского питания дают заключение о том, что эти консервы не отвечают требованиям промышленной стерильности.

При необходимости определяют стабильность технологического процесса производства.

Определение стабильности технологического процесса и способы его регулирования.

Методика предназначена для разработки и уточнения нормативов по микробиологическим показателям с построением контрольно-аналитических карт, используемых для последующего контроля стабильности технологического процесса и его регулирования.

Результаты текущих микробиологических анализов продуктов можно оценить, только сравнивая их с показателями микробиологической обсемененности, характерными для стабильного технологического процесса.

Для микробиологической оценки стабильности технологических режимов используются контрольно-аналитические карты. Они строятся для каждой контролируемой технологической операции по результатам анализа многократно отобранных выборок, не менее 5, включающих каждая 3-5 одновременно анализируемых проб продукта и состоит из двух диаграмм: средних арифметических значений и вариационных размахов.

Отбор проб для микробиологического анализа проводят при удовлетворительных санитарно-гигиенических условиях производства случайным образом.

2.1. Подготовка консервов к анализу.

Для определения стерильности, промышленной стерильности, для выявления возбудителей порчи в нормальных по внешнему виду консервах, отбор образцов производят по ГОСТ 26668.

При санитарно-эпидемиологическом анализе консервов при пищевых отравлениях и для выяснения причин возникновения дефектов от анализируемой партии отбирают:

- дефектные консервы (банки с вибрирующими концами, бомбажные и хлопущи) не менее трех единиц фасовки;
- нормальные по внешнему виду консервы с отбором одной банки на каждые 500 единиц фасовки, но не менее трех и не более 50 единиц фасовки.

Поступившие в лабораторию консервы осматривают и устанавливают соответствие надписи на литографическом оттиске или на этикетках описанию в препроводительном документе. Каждой банке или любой другой таре с консервами присваивают регистрационный номер, который фиксируют на банке или на крышке так, чтобы номер не пропал во время санитарной обработки и при вскрытии тары.

Банки моют водой с мылом или детергентом, швы протирают щеткой, затем банки ополаскивают чистой водой и высушивают.

В лабораторном журнале отмечают регистрационный номер консервов, условное обозначение тары и маркировку, отсутствие или тип обнаруженного дефекта внешнего вида продукта.

2.2. Дефекты консервов, учитываемые при микробиологическом анализе.

Дефекты консервированного продукта:

- видимые невооруженным глазом признаки развития микроорганизмов (брожение, плесневение, ослизнение и др.).
- осадок на дне банки или на границе поверхности продукта с тарой («кольцо»).
- помутнение жидкой фазы.
- коагуляция.

- скисание или плоскокислая порча. Порок возникает в результате деятельности бактерий-термофилов, выражается в возникновении кислого вкуса и запаха содержимого банок (разлагают углеводы с образованием органических кислот без выделения газа), бомбажа не наблюдается. Основные возбудители – термофильные споровые аэробные микроорганизмы рода *Bacillus*.

- посторонний, не свойственный продукту, запах и (или) привкус.
- изменение цвета.

Дефекты внешнего вида тары с расфасованной в нее продукцией.

- видимые невооруженным глазом признаки негерметичности: пробоины, сквозные трещины, подтеки или следы продукта, вытекающего из банки.

- бомбаж – выражается в том, что концы (донышко и крышка) металлической банки под давлением газов, образующихся в консервах, или в результате расширения содержимого банок выгибаются наружу и при надавливании на них рукой в нормальное положение не приходят. Различают микробиологический, химический и физический бомбаж. Микробиологический бомбаж – обусловлен скоплением в банке газов, образующихся в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Размножаясь в консервах, микроорганизмы разлагают органические вещества продукта (углеводы и белки) с образованием больших количеств газообразных веществ (CO_2 , H_2 , H_2S). Основные возбудители мезофильные облигатные анаэробы рода *Clostridium*.

Химический бомбаж возникает в рыбных консервах, содержимое которых агрессивно по отношению к металлу. В результате реакции содержимого банки с жестью образуются газообразные продукты (главным образом водород), накопление которых ведет к повышению внутреннего давления и напряжению бомбажных колец.

Холодный бомбаж. Этот порок возникает при замораживании консервов. При размораживании таких консервов концы банок не сразу принимают нормальное положение.

Термический (горячий) бомбаж – результат недостаточного охлаждения вышедших из автоклава банок.

- хлопуши или ложный бомбаж – выражается в том, что на крышке или донышке жестяной банки образуется небольшая выпуклость: при нажиме она исчезает, но одновременно образуется на другом конце банки в сопровождении характерного хлопающего звука, издаваемого жестью. Если выпуклость при нажиме полностью исчезает и банка принимает нормальное положение, значит это не хлопуша. Причинами образования банок-хлопуш могут быть недостаточный вакуум в банках, переполнение банок содержимым, пороки в изготовлении и закатке самих банок, и в частности деформация концов, а также разнотолщинности жести, применяемой для изготовления корпусов и концов банок, и использование для штамповки концов банок слишком тонкой жести.

- банки с вибрирующими концами – легкая вибрация части крышки или донышка при нажиме (тонкая жесь).

- неправильно оформленный закаточный шов жестяных банок (язычки, зубцы, подрез, фальшивый шов, раскатанный шов).

- ржавчина, после удаления которой остаются раковины.

- деформация корпуса, донышек, фальцев или продольного шва жестяных банок в виде острых граней и «птичек». «Птичками» называется деформация наружных поверхностей донышек и крышек банок в виде уголков у бортиков банки, которые угрожают герметичности тары. Порок чаще всего возникает вследствие чрезмерно быстрого снижения давления в автоклаве по окончании процесса стерилизации.

- перекося крышек на стеклянных банках, подрез гофры крышек по закатанному полю, выступающее резиновое кольцо («петля»).

- трещины или скол стекла у закаточного шва, неполная посадка крышек относительно горла банки.

- деформация (вдавливание) крышек стеклянных банок, вызвавшая нарушение закаточного шва.

Внешний вид консервированного продукта, упакованного в металлическую и другую непрозрачную тару, регистрируют после проведения микробиологического анализа.

Наличие или отсутствие постороннего, несвойственного консервированному продукту, запаха устанавливают во время отбора проб для микробиологического анализа.

Если дефекты тары или внешнего вида консервированного продукта возникли при термостатировании консервов, то их описывают после охлаждения консервов до комнатной температуры.

2.3. Подготовка помещения для микробиологического анализа консервов.

Консервы вскрывают в боксе-помещении, специально приспособленном для микробиологического анализа. В боксе не должно быть недоступных для влажной дезинфекции поверхностей и исключено движение воздуха, создаваемое сквозняками. Стены, пол и потолок в боксе должны быть облицованы материалом или выкрашены краской, устойчивой к влажной обработке дезинфицирующими веществами. Для стерилизации воздуха бокс оборудуется ультрафиолетовыми лампами из расчета 1,5 – 2,5 Вт на 1 м³.

В боксе должен присутствовать только микробиолог, проводящий анализ; допускается присутствовать помощнику.

В боксе должны быть стол и табурет. Лишних предметов, кроме тех, которые требуются для проведения анализа консервов, не должно быть.

На столе должны стоять:

- спиртовка или газовая горелка;
- банка с притертой пробкой со спиртом;
- закрытая крышкой банка с предварительно заготовленными плотными стерильными ватными тампонами размером 3х3 см или ватными кольцами;
- банки с дезинфицирующим раствором (высота слоя 3 см) для помещения отработанных после анализа пипеток или трубок;
- небольшой металлический или эмалированный поднос, на который ставят анализируемые банки;
- стерильные пипетки или трубки, с помощью которых отбирают пробу.

В выдвижном ящике стола должен храниться вспомогательный инвентарь: пинцет и пробойник. Пробойник может иметь форму копы с поперечным сечением в виде ромба с диагоналями 1х1,5 см или с сечением в виде равнобедренного треугольника.

При вскрытии большого количества банок используют пробойник, укрепленный на штативе. В этом случае вскрытие производят путем нажима пробойника на крышку банки при помощи рычага.

Перед вскрытием банки пробойник фламбируют в пламени тампона.

Бокс моют и дезинфицируют непосредственно перед проведением анализа, (не ранее, чем за 24 ч до начала анализа) и после окончания проведения анализа. Дезинфекцию производят протираанием всех поверхностей хлорными или другими дезинфицирующими препаратами по соответствующей для каждого препарата инструкции, ориентируясь на активность дезинфицирующего раствора, содержащего активного хлора 200 мг/л. За 45 мин до начала работы в боксе на 30±5 мин включают бактерицидные лампы.

2.4. Определение герметичности консервов, предназначенных для микробиологического анализа.

Герметичность металлической тары определяют тремя способами:

- при помощи вакуума (арбитражный метод) – банки с консервированными продуктами помещают на 3 мин в нагретую до 70-80°С воду, затем тщательно вытирают

сухой тряпкой и протирают швы и фальцы смоченной бензином ватой. Корпус банки обертывают полоской фильтровальной бумаги, на оба конца банки (у фальце) надевают резиновые кольца. Подготовленную таким образом банку помещают в герметически закрывающийся сосуд, соединенный с вакуум-насосом, и выкачивают воздух из сосуда до разрежения 745-750 мм рт. Ст. (остаточное давление 15-10 мм). Банки держат в вакууме 2-3 мин.

При негерметичности банки на бумаге останутся пятна выступающих из банки жира, сока или заливки.

- аппаратом Бомбаго (состоящего из стеклянного резервуара и поршневого насоса) – в стеклянный резервуар прибора наливают свежeproкипяченную в течение 15 мин и охлажденную до 40-45°C воду так, чтобы опущенные банки полностью были погружены в нее (не более 3 банок), герметически закрывают и создают с помощью насоса разрежение 500 мм рт. Ст. (остаточное давление 260 мм). Герметичность банок устанавливают по количеству и месту выделения пузырьков воздуха в процессе удаления воздуха из резервуара. Негерметичной считается банка, в которой из одного и того же места выходит струйка или периодически несколько пузырьков воздуха.

- погружением в теплую воду – банки помещают в один ряд в предварительно нагретую до кипения воду так, чтобы после погружения банок температура воды была не ниже 85°C. Воду берут в четырехкратном количестве по отношению к массе банок, чтобы слой воды над банками был не менее 25-30 мм. Появление струйки пузырьков воздуха в каком-либо месте банки указывает на ее негерметичность. Банки следует выдерживать в горячей воде по 5-7 мин установленными в вертикальном положении на доньшко, а затем на крышки.

При использовании для укупорки консервов эластичных крышек (резиновых и из полимерных материалов) герметичность консервов определяют визуально.

Поверхность эластичных крышек герметичных консервов должна быть слегка вогнута внутрь.

2.5. Термостатирование консервов.

Термостатированию подлежат герметически укупоренные бездефектные по внешнему виду консервы, предназначенные для установления стерильности или промышленной стерильности продукта, для определения общего количества микроорганизмов подсчетом на чашках Петри, для выявления в продуктах токсигенной и патогенной микрофлоры, для выявления в продуктах возбудителей порчи, для определения внешнего вида консервов по показателям, влияющим на микробиологическую оценку качества.

При установлении причины дефектов термостатированию подлежат банки с вибрирующими концами и хлопущи в герметически укупоренной таре. Термостатирование проводят непосредственно перед микробиологическим анализом. Термостатированию не подлежат консервы, предназначенные для выявления в них ботулинического токсина, бомбажные и другие консервы с признаками микробиологической порчи, консервы в негерметичной таре.

При установлении стерильности или промышленной стерильности консервов для выявления жизнедеятельности мезофильных и факультативно-анаэробных, анаэробных микроорганизмов и для определения общего количества микроорганизмов подсчетом на чашках Петри стерилизованные консервы из морских продуктов (крабы, креветки, кальмар и др.), рыбные консервы, а также другие консервы с $pH \geq 4,4$ термостатируют при $37 \pm 0,5^\circ C$.

Консервы в таре вместимостью 1 л и менее выдерживают в термостате 5 сут. Консервы в таре вместимостью более 1 л выдерживают в термостате 10 сут.

При установлении стерильности или промышленной стерильности для выявления жизнедеятельности термофильных аэробных и факультативно-анаэробных и

термофильных анаэробных микроорганизмов консервы в таре любой вместимостью термостатируют 3 сут при $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ непосредственно перед высевом.

Во время термостатирования консервы ежедневно просматривают, испорченные банки удаляют из термостата. После термостатирования консервы выдерживают в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего отмечают отсутствие или тип дефекта тары, укупорки и продукта.

2.6. Вскрытие консервов для проведения микробиологического анализа.

Для определения стерильности или промышленной стерильности вскрывают герметичные консервы, прошедшие или не прошедшие термостатирование.

При установлении причин возникновения дефектов дефектные консервы, кроме бомбажных, вскрывают также после термостатирования. Бомбажные банки вскрывают без их предварительного термостатирования. Банки с вибрирующими концами и хлопуши вскрывают после охлаждения до комнатной температуры.

Непосредственно перед вскрытием консервируемый продукт, кроме бомбажных банок, перемешивают десятикратным переворачиванием с доньшка на крышку. После перемешивания консервированного продукта крышку или конец консервной тары стерилизуют. У металлических банок стерилизуют конец, противоположный тому, на котором дана маркировка. Для этого пинцетом берут заранее заготовленный стерильный ватный тампон, смачивают спиртом, излишек спирта отжимают, тампоном протирают крышку (конец) и затем его зажигают и оставляют на крышке (конце). Металлические крышки (концы) хлопуш и бомбажных банок, резиновые колпачки, металлические корончатые крышки стерилизуют аналогично, но ватный тампон не зажигают.

После стерилизации крышки (конца) консервы вскрывают в условиях, исключающих внесение микроорганизмов из внешней среды в консервированный продукт. Рядом с консервами ставят зажженные горелки.

Для вскрытия консервов под горящий ватный тампон или сквозь пламя кольца на крышке подводят острие предварительно обожженного пробойника и с некоторым усилием прокалывают крышку. Затем, не отнимая пробойника, отверстие в крышке расширяют путем осторожного углубления и одновременного вращения пробойника. Отверстие должно быть расширено до 1-1,5 см в диаметре. Если анализируют консервы, не содержащие жидкой фазы, то делают подряд три-четыре прокола пробойником так, чтобы длина образовавшегося отверстия была не меньше 3 см.

После этого пробойник убирают и отверстие в крышке закрывают горячей ватой, стерильной крышкой или половинкой чашки Петри.

Хлопуши и бомбажные банки помещают в предварительно простерилизованный металлический лоток.

Непосредственно перед вскрытием хлопуш или бомбажных банок металлические крышки и резиновые колпачки, которыми они укупорены, протирают стерильными тампонами, смоченными спиртом, бакелитовые и пластмассовые крышки протирают стерильными тампонами, смоченными 5%-ным раствором формалина. Остатки спирта или формалина удаляют сухими стерильными тампонами. После стерилизации крышки консервы накрывают перевернутой стерильной металлической воронкой так, чтобы воронка полностью закрыла крышку. Через открытое узкое отверстие воронки внутрь вводят предварительно обожженный пробойник, которым осторожно при легком нажиме прокалывают крышку, образуя очень небольшое, «игольчатое», отверстие. После того, как из банки перестанут выходить газ и продукт, воронку убирают, крышку еще раз протирают стерильным тампоном и «игольчатое» отверстие расширяют пробойником до необходимого диаметра. Затем пробойник удаляют, и отверстие в крышке закрывают стерильной крышкой или половинкой чашки Петри.

Вместо металлической воронки можно использовать полиэтиленовый пакет. Для этого после стерилизации крышки консервы помещают в полиэтиленовый пакет, предварительно протертый 70%-ным этиловым спиртом таким образом, чтобы дно пакета

покрывало крышку (конец) консервной банки. Снизу пакет плотно завязывают. Осторожно, легким нажимом пробойника, делают вначале очень небольшое, «игольчатое», отверстие одновременно в крышке консервной банки и в плотно прижатом к ней полиэтиленовом мешке, который быстро смещают относительно отверстия в крышке (конце) банки. После того, как из банки перестанут выходить газ и продукт, полиэтиленовый пакет снимают, банку обрабатывают обеззараживающим раствором, отверстие расширяют до 1,5 см в диаметре; далее поступают, как при вскрытии нормальных по внешнему виду консервов.

2.7. Методы отбора и приготовления пробы консервированного продукта для микробиологического анализа.

Пробу консервированного продукта отбирают из банки немедленно после ее вскрытия в непосредственной близости от пламени горелки или зажженного ватного тампона с соблюдением условий асептики.

Пробу консервированного продукта, состоящего только из жидкой фазы, отбирают для посева в питательные среды или для приготовления препарата стерильной пипеткой так, чтобы пипетка прошла через весь столб жидкости.

Пробу консервированного продукта, состоящего из жидкой и твердой фазы, отбирают стерильной трубкой так, чтобы в отобранную пробу попала жидкая и твердая фаза продукта.

Пробу консервированного продукта, имеющего только твердую фазу, отбирают для предварительного измельчения в чашки Петри, дробят скальпелем на мелкие кусочки и перемешивают. Раздробленный продукт переносят в стерильный стакан или в стерильную колбу, добавляют в них на один объем продукта девять объемов стерильного физиологического раствора или пептонной воды, измельчают и используют для посева в питательные среды или для приготовления препаратов.

После отбора навесок продукта консервы сохраняют до окончания анализа и оформления результатов при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ в условиях, исключающих их повторное заражение микроорганизмами. Если в посевах будут выявлены жизнеспособные микроорганизмы, то при необходимости, из соответствующей банки, отбирают дополнительные навески продукта для высева в питательные среды с целью количественного подсчета обнаруженных микроорганизмов.

Для определения промышленной стерильности консервов в каждой единице упаковки консервов устанавливают отсутствие (присутствие) тех групп микроорганизмов, показатели и нормы по которым приведены в нормативном документе на анализируемый вид консервов.

2.8. Выявление и определение количества аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов.

Для выявления жизнеспособных **мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов** в каждую из двух пробирок, содержащих по 5-6 см³ в мясо-пептонный или рыбо-пептонный бульон с глюкозой, вносят по $(1,0\pm 0,1)$ г или $(1,0\pm 0,1)$ см³ консервированного продукта.

Для выявления жизнеспособных **мезофильных анаэробных микроорганизмов** на дно каждой из двух пробирок, со средой Китт-Тароцци с углекислым кальцием (регенерированной: поддержание заданного значения окислительно-восстановительного потенциала жидкой среды – добавление в среду редуцирующих веществ (кусочки мяса или печени); наслаивание голодного агара – защита от проникновения кислорода; удаление кислорода из среды – прогревание пробирок в течение 10 – 15 мин в кипящей водяной бане с последующим быстрым охлаждением до температуры $(40\pm 1)^\circ\text{C}$ – при выявлении мезофильных микроорганизмов или до $55-62^\circ\text{C}$ – при выявлении термофильных микроорганизмов), вносят по $(1,0\pm 0,1)$ г или $(1,0\pm 0,1)$ см³ консервированного продукта.

Посевы термостатируют 5 суток при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ и ежедневно наблюдают за появлением признаков роста микроорганизмов. Образование пленки, появление осадка, помутнение среды и т.д.

После появления признаков роста из посева приготавливают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Если в мазках не обнаружены спорообразующие клетки на пятые сутки, приготавливают мазки из посевов повторно.

В посевах, содержащих спорообразующие бактерии, проверяют присутствие каталазы.

По признакам роста на питательной среде, морфологии клеток, спорообразованию, способности к окраске по Граму, наличию каталазы определяют, присутствуют ли в посевах только мезофильные бациллы или развиваются и другие микроорганизмы (кокки или кокковая форма, грамотрицательные палочки, грамположительные неспорообразующие палочки, не образующие каталазу и другая микрофлора).

Мезофильные микроорганизмы группы *B. subtilis* не выделяют в посевах газа, имеют форму палочек со спорами, положительно или вариабильно окрашиваются по Граму и образуют каталазу. Факультативно-анаэробные газообразующие микроорганизмы из группы *B. polymyxa* в анаэробных условиях каталазу могут не образовывать.

При необходимости подтверждения присутствия в консервах бацилл или клостридий в споровой форме навески консервированного продукта дополнительно вносят параллельно в две пробирки с соответствующими средами и прогревают при температуре $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин при выявлении спор мезофильных микроорганизмов, при температуре $(95 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин при выявлении спор термофильных микроорганизмов.

К группе мезофильных спорообразующих анаэробных микроорганизмов относятся грамположительные клостридии, способные к спорообразованию только в анаэробных условиях. Растущие при $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ не образующие каталазы.

Признаками развития мезофильных клостридий является образование мути, газа, возникновение постороннего запаха.

Посевы сразу после появления роста исследуют под микроскопом. Материал для приготовления препарата берут пипеткой со дна сосуда. При наличии в мазках грамположительных палочек со спорами ставят каталазную пробу. Отрицательная проба на каталазу свидетельствует о присутствии в среде облигатных мезофильных клостридий.

Для окончательного вывода о присутствии мезофильных клостридий

2 капли накопительной культуры вносят расплавленный и охлажденный до 45°C питательного агара с глюкозой и тщательно перемешивают. Сразу после застывания агара на его поверхность пинцетом кладут стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Затем чашку переворачивают крышкой вниз и ставят в термостат с температурой $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 24 – 48 ч.

Облигатные анаэробные микроорганизмы растут на чашке под стеклом в центральной части, отступая от края стекла на 1 – 3 мм, образуя под стеклом пузырьки газа и (или) разрывы агара. Факультативные анаэробные бактерии растут под стеклом в виде сплошной зоны и по всей поверхности чашки.

Одновременно 1-2 капли из среды обогащения переносят в стерильную пробирку и заливают уплотненным глюкозным рыбопептонным агаром (11 – 12 см) высоким столбиком. После застывания агара пробирку помещают в термостат с температурой $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 24 – 40 ч. Анаэробные микроорганизмы растут в глубине агара, отступая от поверхности, часто с разрывом среды.

Для выявления гнилостных или протеолитических анаэробов посевы в чашках заливают расплавленной и охлажденной до 45°C средой Вильсон-Блера, тщательно перемешивают и застывшую поверхность заливают голодным агаром. Посевы термостатируют 24 – 48 ч при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Появление в агаре черных или коричневых

колоний или потемнение среды вокруг колоний свидетельствует о присутствии в посевах гнилостных или протеолитических анаэробов.

Для обнаружения сахаролитических анаэробов этот способ непригоден, так как не все сахаролитические анаэробы вызывают потемнение среды.

При обнаружении в посевах признаков роста, характерных для бактерий группы *B. subtilis*, указывают на присутствие этой группы микроорганизмов в консервированном продукте.

При отсутствии роста мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в посевах пробы на промышленную стерильность, указывают на отсутствие активно развивающихся микроорганизмов этой группы в консервированном продукте.

2.9. Остаточная микрофлора консервов.

Микроорганизмы, сохранившиеся жизнеспособными после стерилизации, составляют остаточную микрофлору консервов. В большинстве случаев остаточная микрофлора (особенно споровая аэробная) в консервах после стерилизаций не развивается из-за ослабления в результате термического воздействия на клетку, низкого окислительно-восстановительного потенциала, низкого рН консервов и других факторов. Такие консервы считаются промышленно стерильными и поступают в продажу. В определенных условиях остаточная микрофлора может размножиться в консервах и вызвать значительные биохимические и органолептические изменения в готовом продукте. Чаще это происходит в первые 10—15 суток после приготовления консервов, но иногда процесс реактивации микроорганизмов продолжается в течение длительного времени.

Наряду с реактивацией в процессе хранения в некоторых видах консервов наблюдается отмирание микроорганизмов и консервы становятся стерильными. Развитие остаточной микрофлоры в консервах часто сопровождается газообразованием, в результате чего банка визуально изменяется, возникает хлопущая бомбаж. Содержимое консервов под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов обычно сильно изменяется, наблюдается мацерация ткани, кислый или гнилостный запах. Обычно эти изменения наблюдаются при высоком уровне обсемененности 10^7 — 10^8 клеток в 1 г. Такие консервы по внешним признакам легко отбраковываются.

В некоторых случаях органолептические изменения выражены нечетко, однако консервы могут содержать продукты жизнедеятельности микроорганизмов — токсины. Таким образом, остаточная микрофлора, вызывая порчу консервов, может приносить большой экономический ущерб предприятиям или представлять серьезную опасность для здоровья потребителя.

Микрофлора, сохранившаяся в консервах после стерилизации, в большинстве случаев представлена термоустойчивыми споровыми аэробами или анаэробными микроорганизмами, относящимися к мезофилам или термофилам. Неспоровая нетермоустойчивая микрофлора — *E. coli*, *Proteus*, *Micrococcus*, дрожжи и плесени — в стерилизованных рыбных консервах обычно отсутствует. Присутствие этих микроорганизмов в консервах может быть связано или с нарушением технологического процесса приготовления консервов или с негерметичностью банки, в результате чего могло произойти вторичное инфицирование продукта. Обнаружение в стерилизованных консервах термоустойчивой остаточной микрофлоры может быть объяснено различными причинами. Здесь имеет значение и правильно установленный режим стерилизации и уровень первоначальной обсемененности консервов перед стерилизацией, и термоустойчивость микроорганизмов, изменяющаяся в зависимости от химического состава, жирности, рН консервов, и других факторов. Так, например, выживаемость спор микроорганизмов в процессе стерилизации в рыбных консервах в масле выше, чем в томатных и натуральных консервах. Здесь сказываются защитные свойства масла, различная теплопроводность среды, с другой стороны, консервы в масле бывают менее обсеменены термоустойчивой микрофлорой до стерилизации. Действие различных

факторов приводит к тому, что процент нестерильных банок в разных группах консервов неодинаков. Так, среди рыбных консервов в томатном соусе процент нестерильных банок ниже, чем среди натуральных и паштетов.

Большое значение имеет и температура хранения консервов после стерилизации. Во всех случаях при более низкой температуре хранения реактивация остаточной микрофлоры и ее размножение замедляется. Ниже приводятся некоторые данные о микроорганизмах, встречающихся среди остаточной микрофлоры рыбных консервов.

Мезофильные бациллы. Эти микроорганизмы представляют собой аэробные или факультативно-анаэробные грамположительные палочки, образующие споры и обитающие в основном в почве. Мезофильные бациллы развиваются в широком диапазоне температур (5—50° С). Оптимальной температурой является 28—37°С. При производстве консервов они обычно присутствуют на сырье, материалах и оборудовании. Эти микроорганизмы могут встречаться среди остаточной микрофлоры как доброкачественных, так и испорченных консервов. Среди представителей мезофильных бацилл в рыбных консервах часто встречаются *Bac. subtilis cohn.*, *Bac. licheniformis*, *Bac. cereus*, *Bac. flexus*, *Bac. asterosporus*, *Bac. solanipetra migula*, *Bac. mycoides flugee*, *Bac. megatherium*, *Bac. panis viscosus*, *Bac. polymyxa*, *Bac. macerans* и др.

Аэробные бациллы в большинстве своем обладают слабыми протеолитическими и бродильными свойствами, поэтому при хранении консервов они являются менее опасными, чем анаэробы, и обычно не влияют на доброкачественность консервов.

В случае большой обсемененности эти микроорганизмы могут испортить продукт, вызвав его прогоркание или скисание. Большинство из этих микроорганизмов воздействует на углеводы с образованием кислоты без газа, некоторые же из них, например, *Bac. asterosporus*, *Bac. maceraus*, *Bac. polymyxa*, *Bac. mesentericus* при развитии в консервах интенсивно сбраживают сахара с выделением органических кислот, ацетона, углекислого газа, что вызывает бомбаж банок. Типичными представителями мезофильных бацилл являются микроорганизмы группы *subtilis*. Некоторые бациллы этой группы обладают аммонифицирующими свойствами и иногда вызывают порчу консервов без образования бомбажа. При этом происходит прокисание, прогоркание продукта, изменяется цвет, запах консервов, наблюдается так называемая плоскокислая порча. В литературе опубликованы сообщения о плоскокислой порче консервов из лосося, крабов, креветок, вызванной *Bac. cereus*, *Bac. mesentericus*, *Bac. panis viscosus*. Развитие *Bac. cereus* в консервах сопровождается появлением пристенного кольца на границе продукта с банкой, белого осадка на дне. При pH 3,5—4,5 размножение *Bac. cereus* не наблюдается, для развития благоприятна щелочная среда. Споры *Bac. cereus* не термостойкие и встречаются в рыбных консервах редко.

В последнее время из группы субтилис-лихениформис выделены некоторые штаммы, относящиеся к *Bac. cereus*, способные вызывать при массивной обсемененности (более 10⁵ клеток на 1 г) пищевые отравления. Обнаружение микробов этой группы в консервах в небольшом количестве при отсутствии явлений бомбажа и при нормальных органолептических свойствах не служит препятствием к выпуску их с завода и употреблению в пищу. Однако такие консервы не подлежат длительному хранению.

Мезофильные клостридии. облигатно-анаэробные бактерии из рода *Clostridium* являются в основном почвенными бактериями. Это спорообразующие грамположительные палочки с оптимальной температурой развития 30—37°С. Споры анаэробов отличаются высокой термоустойчивостью. Обычно в продукте до стерилизации встречаются единичные споры клостридий, отсюда частота находок строгих анаэробов в доброкачественных консервах значительно меньше (5%), чем аэробов (33%).

Первая группа — гнилостные клостридии — включает виды, вызывающие протеолиз молока и разжижение желатина. Одни представители этой группы сбраживают углеводы, другие нет. Они хорошо разлагают белки рыбы и при развитии в продуктах образуют жирные кислоты, аммиак, углекислый газ, летучие амины — триметиламин,

гистамин и др. Среди остаточной микрофлоры рыбных консервов – типичными представителями этой группы являются *Cl. sporogenes*, *Cl. subterminalis*, *Cl. biferrnentans*, *Cl. putrificum*.

Cl. sporogenes обладает протеолитическими и сахаролитическими свойствами, быстро образует раздувающие клетку споры, отличающиеся высокой термоустойчивостью. Поэтому споры этого микроорганизма используют в качестве тест-культуры при разработке оптимальных режимов стерилизации консервов. При развитии *Cl. sporogenes* в консервах — томатных, масляных, натуральных и других наблюдается разложение тканей рыбы, газообразование, сильный гнилостный запах.

Cl. subterminalis по своим свойствам близок к *Cl. sporogenes*, но не разлагает ни один из сахаров.

Cl. bilermentans образует споры, почти не изменяющие форму клеток. Этот микроорганизм обладает протеолитическими и сахаролитическими свойствами, образует индол и не сбраживает крахмал. *Cl. biferrnentans* выделяют из испорченной рыбы, нередко из бомбажных консервов как натуральных, так и с томатной заливкой. Присутствие *Cl. bifermentans* свидетельствует о том, что при производстве консервов использовалось несвежее сырье.

Споровый анаэроб *Cl. putrificum* (*Cl. lentoputrescens*) — широко распространенный сапрофит, встречается в почве, кишечнике рыб. Этот микроорганизм может быть возбудителем бомбажа консервов, вызывает гнилостную порчу продукта, образуя большое количество газов — сероводорода и аммиака. В отличие от *Cl. sporogenes* этот микроб не сбраживает сахара. *Cl. putrificum* часто вызывает порчу натуральных масляных и томатных консервов, паштетов, крабов, креветок. *Cl. putrificum* часто вызывает бомбажную порчу тресковых консервов.

К рассматриваемой группе гнилостных клостридий относится токсигенный микроб *Cl. botulinum* все штаммы типа А и некоторые типа В. Споровому облигатному анаэробу *Cl. botulinum* в консервной промышленности уделяется большое внимание. Этот микроб, развиваясь в консервах, образует ботулинический яд, опасный для здоровья людей. Споры этого микроорганизма могут развиваться в различных рыбных консервах с рН 4,4 и выше, вегетативные клетки развиваются в консервах с рН 4,1. Как правило, развитие *Cl. botulinum* в консервах идет без образования бомбажа, содержимое банки не имеет признаков видимой порчи, без постороннего запаха, вкуса. При массивном заражении консервов может развиваться бомбаж, продукт приобретает кислотопрогорклый, иногда сырноватый запах. Известны случаи отравления ботулинумом при употреблении в пищу консервов из частичковой рыбы, кильки не разделанной в томатном соусе, тунца. В консервах наиболее вероятно присутствие ботулинических токсинов и возбудителей ботулизма типов А и В, менее вероятно присутствие токсинов и возбудителей типов Е и F и еще реже встречаются токсины и возбудители типов С и D.

Вторая группа — протеолитические клостридий — включает виды, вызывающие разжижение желатина и свертывание молока без последующего протеолиза. Одни представители этой группы сбраживают углеводы, другие нет. К этой группе относятся *Cl. boiulinum* типа С, D, Е, некоторые штаммы типа В и F. *Cl. perfringens*, *Cl. acetobutylicum* и другие виды.

В консервной промышленности *Cl. perfringens* уделяют большое внимание. Этот микроб часто встречается в кишечнике многих пород рыб, особенно салаки, кильки. Обладая сахаролитическими свойствами, этот микроорганизм может быть возбудителем бомбажной порчи консервов с томатной заливкой, масляных, в желе и др. *Cl. perfringens* встречается чаще в консервах из неразделанных рыб в случае нарушения технологических режимов. Развитие *Cl. perfringens* в консервах при рН 5,6 и выше почти всегда сопровождается накоплением летальных токсинов. Развитие во всех случаях сопровождается явлениями бомбажа, среда подкисляется, пенится, рыба становится рыхловатой, мясо розовеет, иногда эти изменения незначительные. Термическое

воздействие (бланширование, варка, обжаривание) обычно уменьшает число находок *Cl. perfringens* в продукте, кратковременный прогрев напротив активизирует прорастание спор. В последнее время исследователи считают, что продукт, инфицированный большим числом клеток — 10^6 — 10^7 любого штамма *Cl. perfringens*, может быть опасным для человека.

Cl. acetobutylicum — сапрофитный микроб, относится к кислотоустойчивым бактериям, способным образовывать споры в среде с рН выше 5,0—5,5. Этот микроорганизм часто встречается в овощном сырье, вызывает порчу томатных консервов, выделяя при этом большое количество углекислого газа и водорода.

К третьей группе клостридий относятся сахаролитические виды, не пептонизирующие молоко и не разжижающие желатина. При развитии в продуктах эти микроорганизмы сбраживают углеводы с обильным газообразованием (CO_2 и H_2) и накоплением, главным образом, масляной кислоты и других кислот. Поэтому их называют маслянокислыми бактериями. Эта группа, типичными представителями которой являются *Cl. butyricum*, *Cl. butylicum*, *Cl. pasteurianum* и др., широко распространена в природе, обитает в почве, овощном сырье, может встречаться в рыбных консервах в томатном соусе. При спорообразовании клетки многих маслянокислых бактерий имеют форму веретена или сигары. Споры сахаролитических клостридий менее термоустойчивы, чем споры гнилостных и протеолитических видов, но более кислотоустойчивы. В результате развития этой группы микроорганизмов в продукте консервы становятся бомбажными, возможно выпадение осадка и образование пристенного кольца, рН снижается до 4,0—3,6, продукт сильно пенится. Развитие микроорганизмов может протекать в консервах и без видимого газообразования и бомбажа. Для идентификации сахаролитических клостридий используют их отношение к различным углеводам.

Так, *Cl. butyricum* гидролизует картофельный и кукурузный крахмал, сбраживает лактат кальция только в присутствии уксусной кислоты.

Cl. butylicum сбраживает только картофельный крахмал, не сбраживает лактат кальция.

Cl. pasteurianum не гидролизует крахмал, не сбраживает лактат кальция и лактозу.

Термофильные бациллы и клостридии. Среди остаточной микрофлоры консервов встречаются не только мезофильные организмы, имеющие температурный оптимум развития 35—37°C, но и термофильные организмы, лучше всего развивающиеся при 55—65°C. Термостойкость спор многих термофилов гораздо выше термостойкости спор мезофильных бактерий, поэтому они иногда переносят процесс стерилизации, и при нарушении режима хранения могут вызывать брак консервов. Основным источником термофильных микроорганизмов является почва. Вместе со вспомогательными материалами (особенно сахарным песком, томат-пастой, специями) термофилы попадают в консервы.

Различают три вида порчи консервов, вызываемой термофильными микроорганизмами: плоскокислую порчу, водородный бомбаж и сероводородную порчу.

Плоскокислую порчу консервов вызывают *Bac. aerothermophilus*, *Bac. stearothermophilus*, *Bac. coagulans*, *Bac. nondiastaticus*, *Bac. thermoliquefaciens*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Cl. thermoaceticum* и др. Эти микроорганизмы сохраняют жизнеспособность и развиваются в консервированных продуктах, богатых углеводами, в условиях хранения при повышенных температурах (55 – 70°C).

Сероводородная порча консервов вызывается облигатно-анаэробными и термофильными клостридиями типа *D. nigrificans*. При развитии *D. nigrificans* в консервированных продуктах появляется запах сероводорода, продукт чернеет. Это обусловлено тем, что *D. nigrificans* разлагает цистеин белковых соединений с образованием сероводорода, а последний растворяется в содержимом банки. В результате взаимодействия сероводорода продукта с железом тары, продукт приобретает черную окраску.

Водородный бомбаж консервов вызывается термофильными клостридиями чаще всего типа *Cl. thermosaccharolyticum*. Развитие *Cl. thermosaccharolyticum* в продукте сопровождается выделением большого количества газообразных веществ, главным образом углекислого газа, водорода и кислот – уксусной, масляной и молочной. Соотношение CO₂ и H₂ при этом составляет 1 : 8. Банка вздувается, жидкая часть продукта становится пенистой и приобретает слабо или явно выраженный кислосырный запах. Газы, накопившиеся в банке, могут образовать в ней свищ. Белки этот вид бактерий не разлагает.

Вопросы для самопроверки.

1. Особенности микробиологического контроля производства консервов.
2. Факторы, гарантирующие безопасность употребления консервов в пищу.
3. Термостатирование консервов как метод выявления микрофлоры в консервированных продуктах.
4. Условия проведения микробиологического анализа консервов.
5. Определение промышленной стерильности консервированных продуктов.
6. Дефекты консервов.
7. Развитие остаточной микрофлоры консервов.