

ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ

**Факультет ветеринарной медицины
Кафедра эпизоотологии и микробиологии**

**Ветеринарно-санитарные исследования микрофлоры окружающей
среды и пищевых продуктов**

Методическое пособие к практическим занятиям

Новосибирск 2021

УДК

Составитель к.б.н, доц. О.А.Колганова, к.в.н, Кречетова В.Н., ст. преп.
Юдина Н.В.

Рецензент к.в.н.,доцент Вольф В.Т.

Ветеринарно-санитарные исследования микрофлоры окружающей
среды и пищевых продуктов: методическое пособие к практическим
занятиям. Новосиб. гос.аграрный ун-т; сост. О.А.Колганова, Кречетова
В.Н.,Юдина Н.В. - Новосибирск, 2021.- 42 с.

В методическом пособии предложена примерная программа по
дисциплине «Санитарная микробиология». Изложены темы, методические
указания по самоподготовке студентов, даны методические пояснения по
самостоятельному изучению некоторых разделов санитарной
микробиологии.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов ветеринарных
факультетов очной и заочной формы обучения, а также для студентов по
специальности ветеринарно-санитарной экспертизы.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим
советом ФВМ НГАУ протокол № 30 от 14.05. 2021 г.

Новосибирский государственный аграрный университет

ВВЕДЕНИЕ

Санитарная микробиология – наука, которая изучает микрофлору окружающей среды, которая оказывает влияние на здоровье и качество жизни человека. То есть объектом изучения санитарной микробиологии являются внешняя среда (вода, воздух, почва) предметы обихода, продукты питания, лекарственные средства и пр.

Одной из главных задач практической санитарной микробиологии является контроль микробиологической безопасности окружающей среды, поэтому для оценки инфекционной опасности объектов внешней среды определяют наличие в них, так называемых санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ)

Пищевые продукты — самые сложные объекты в санитарной микробиологии. Это объясняется не только разнообразием и обилием микрофлоры в них, но также использованием микроорганизмов в производстве многих продуктов и, к сожалению, отсутствием полноценных методик выявления микробов. Наличие в пище большого количества различных факторов роста и витаминов способствует росту микроорганизмов. Этот факт является основным отличием изучения пищевых продуктов от прочих санитарно-микробиологических исследований, так как ни в воде или почве, ни тем более в воздухе столь бурного размножения микробов не происходит.

Микрофлора пищевых продуктов делится на: специфическую и неспецифическую. Специфическая микрофлора – культурная раса микроорганизмов, используемая для приготовления того или иного продукта и являющаяся обязательным звеном в технологии его получения. Специфическая микрофлора используется в приготовлении всех кисломолочных продуктов, хлеба, вина, пива, в квашении капусты, овощей. Неспецифическая микрофлора пищевых продуктов – случайно попадающие в пищевые продукты микроорганизмы из окружающей среды. Её составляют сапрофиты, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, а также виды, вызывающие порчу пищевых продуктов. Пищевые продукты обычно невозможно полностью освободить от присутствия микроорганизмов без риска изменения их вкусовых качеств. Обсеменение их микробами может происходить на всех этапах заготовки, хранения и приготовления.

Патогенные микроорганизмы попадают в пищевые продукты различными путями: распространяются воздушным путем, через воду, от больных людей и животных, бациллоносителей, насекомых, грызунов и т. д. Через пищевые продукты могут передаваться возбудители многих инфекционных болезней – брюшного тифа и паратифов, сальмонеллёзов, дизентерии, эшерихиозов, ботулизма, холеры, бруцеллёза, туберкулёза, сибирской язвы, некоторых риккетсиозов (Ку-лихорадка) и вирусных инфекций (ящур, полиомиелит и др.). Пищевые токсикоинфекции, вызываемые стафилококками и многочисленными условнопатогенными микроорганизмами, возникают после употребления в пищу зараженных пищевых продуктов.

Санитарно-микробиологический анализ качества пищевых продуктов предполагает изучение двух основных показателей – наличие, а также степень обсеменённости продуктов микроорганизмами и наличие патогенных микроорганизмов.

Для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов окружающей среды проводят санитарно-микробиологические исследования, цель которых состоит в определении эпизоотологической и эпидемиологической безопасности.

Базовые санитарно-микробиологические методы направлены на определение *общей микробной обсеменённости (общее микробное число), определение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ), выявление* в исследуемых объектах **патогенных микроорганизмов и их метаболитов.**

Для этого в санитарной микробиологии используется два основных метода оценки санитарно-эпидемического состояния внешней среды: *прямое обнаружение* патогенных микроорганизмов и *выявление косвенных признаков* пребывания патогенов во внешней среде.

Методы прямого обнаружения патогенных микроорганизмов

Методы прямого обнаружения – наиболее точные и надежные критерии оценки эпидемиологической опасности внешней среды. Наиболее часто проводят **посев исследуемого материала на питательные среды.** Однако на ожидаемые результаты влияют следующие факторы.

- *Содержание патогенных микроорганизмов во внешней среде относительно невелико*, так как они составляют лишь 1 / 30000 всего видового состава внешней среды. При этом патогенная микрофлора распределена во внешней среде неравномерно, что делает необходимым проведение серийных исследований в динамике определенного периода.
- *Выделение одного возбудителя далеко не всегда свидетельствует о присутствии других патогенных видов.* Указанное делает необходимым проведение разнонаправленных исследований, что

практически сложно осуществимо. Ситуацию значительно усугубляет возрастание роли условно-патогенных микроорганизмов, способных вызвать эпидемические вспышки заболеваний.

Методы косвенной идентификации

Эти методы предусматривают применение двух критериев, по которым можно косвенно судить о возможном присутствии возбудителя во внешней среде: **общее микробное число (ОМЧ)** и **содержание санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ)**.

О бактериальной обсемененности судят по *общему микробному числу (ОМЧ)*— общему количеству микроорганизмов (растущих на питательных средах), содержащихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).

Санитарно-показательными называют *микроорганизмы (СПМ)*, по которым можно косвенно судить о возможном присутствии патогенов во внешней среде. *Содержание СПМ определяют двумя методами.*

Прямой подсчет количества бактерий. Проводят с помощью специальных камер (например, Петрова, Гельбера) либо специальных электронных счетчиков. *Метод применяют в экстренных случаях при необходимости ответа о количественном содержании бактерий* (например, при авариях в системе водоснабжения, при оценке эффективности работы очистных сооружений и др.).

Посев на питательные среды. Менее точный метод, так как выявляет только группы микроорганизмов, растущих при заданном режиме (на определенных питательных средах и при определенной температуре). Содержание СПМ выражают *в титрах и индексах*.

Титр СПМ— минимальный объем исследуемого материала (мл) или весовое количество (г), в котором выявляют хотя бы одну особь СПМ.

Индекс СПМ — количество СПМ, содержащихся в определенном объеме (количестве) исследуемого объекта (для воды, молока, других жидких продуктов – в 1 л; для почвы и пищевых продуктов – в 1 г; для воздуха – в 1 м³). Индекс – величина, обратная титру. Зная один показатель, можно вычислить другой.

Основные характеристики санитарно-показательных микроорганизмов. К СПМ относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, для которых средой обитания являются кишечник или воздушно-дыхательные пути.

Такие бактерии характеризуются следующими свойствами:

- 1) постоянно обитают в естественных полостях человека и животных и постоянно выделяются во внешнюю среду;
- 2) не должны размножаться во внешней среде (исключая пищевые продукты), или их репродукция должна носить незначительный и кратковременный характер;
- 3) длительность выживания и устойчивость во внешней среде должна быть не меньше, чем у патогенных бактерий;

4) не должно быть во внешней среде «двойников» или аналогов, с которыми их можно перепутать;

5) не должны изменяться во внешней среде, во всяком случае в сроки выживания патогенных микроорганизмов;

6) методы идентификации и дифференциации СПМ должны быть простыми.

Индикаторы загрязнения. Между группами СПМ нет четко очерченных границ. Некоторые микроорганизмы являются показателями как фекального, так и орального загрязнения. Некоторые – показателями процессов самоочищения. В связи с этим *все СПМ расценивают как индикаторы биологического загрязнения.*

- **Группа А.** Включает обитателей кишечника человека и животных. Микроорганизмы расценивают как **индикаторы фекального загрязнения**. В неё входят бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – эшерихии, энтерококки, протеи, сальмонеллы. Также в группу А включены сульфитвосстанавливающие клостридии (*Clostridium perfringens* и др.), термофилы, бактериофаги, бактероиды, синегнойная палочка, кандиды, акинетобактеры и аэромонады.
- **Группа В.** Включает обитателей верхних дыхательных путей и носоглотки. Микроорганизмы расценивают как **индикаторы орального загрязнения**. В неё входят зеленящие, α - и β -стрептококки, стафилококки (плазмокоагулирующие, лицитиназа-положительные, гемолитические и антибиотикоустойчивые, в некоторых случаях – золотистый).
- **Группа С.** Включает сапрофитические микроорганизмы, обитающие во внешней среде. Микроорганизмы расценивают как **индикаторы процессов самоочищения**. В неё входят бактерии-протеолиты, бактерии-аммонификаторы, бактерии-нитрификаторы, некоторые спорообразующие бактерии, грибы, актиномицеты, целлюлозобактерии, вибрионы и сине-зеленые водоросли.

К основным санитарно-показательным микроорганизмам относят БГКП, энтерококки, протеи, сальмонеллы, *Clostridium perfringens*, термофильные бактерии, бактериофаги энтеробактерий (колифаги).

По нормативной документации к БГКП относятся граммотрицательные, не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37°C в течение 5—24 ч. По международной классификации такие микроорганизмы относят к *общим колиформным бактериям (ОКБ)*. Они попадают в окружающую среду, в том числе и в воду, с испражнениями человека и животных, поэтому обнаружение их свидетельствует о фекальном загрязнении и эпидемической опасности в отношении кишечных инфекций.

Тема № 1. Санитарно-микробиологическое исследование воды

Изучаемые вопросы:

1. Отбор проб воды.
2. Хранение и транспортировка проб воды.
3. Определение общего микробного числа (ОМЧ) воды.
4. Определение коли-титра и коли-индекса воды.

Вода — естественная среда обитания для разнообразных микроорганизмов. В воде рек, открытых водоемов, морей, океанов обнаруживают представителей всех таксономических групп бактерий, а также грибы, водоросли и простейшие.

Регулярному санитарно-микробиологическому надзору подвергают:

- *Воду питьевую*: централизованного водоснабжения и местного с забором воды из открытых водоемов (реки, водохранилища) или подземных источников (скважины, родники, колодцы).
- *Воду плавательных бассейнов, лёд медицинский и хозяйственный.*
- *Сточные воды*: хозяйственно-фекальные, промышленные, смешанные (хозяйственно-фекальные и промышленные), талые и ливневые.

Отбор проб воды. Важным правилом при отборе проб воды является соблюдение стерильности. Достоверность получаемых результатов и выводов зависят от правильности забора проб. Вода для санитарно-микробиологического анализа забирается в объеме 0,5 л в стеклянные бутылки или флаконы, закрытые притертыми пробками и завязанные сверху бумажными колпачками. При необходимости исследования воды на присутствие возбудителей кишечных инфекций количество воды увеличивают до 2,5 л.

Для взятия проб воды из глубины (открытых водоемов, колодцев, бассейнов и т. д.) используют специальные приборы: батометр, приборы Исаченко, Рутнера и др. Батометр представляет собой металлический каркас длиной 0,5—1 м. Каркас изготавливается из металла, не подвергающегося коррозии, и может компактно складываться, так как состоит из отдельных колец. Дно каркаса свинцовое и служит грузилом. Внутри устанавливают стерильную бутылку, закрытую стерильной резиновой или корковой пробкой с кольцом, к которому привязана веревка. При погружении в воду на необходимую глубину, потягивая за веревку, пробку открывают, сосуд заполняется водой, о чем свидетельствует прекращение появления пузырьков воздуха на поверхности воды. Вербку опускают, бутылку автоматически закрывается. После извлечения батометра притертую пробку заменяют стерильной ватной (которая должна быть завернута в бумагу и находиться в комплекте с батометром).

Для взятия проб с большой глубины (более 30 м) можно использовать приборы Исаченко, Рутнера, Романенко-Младова.

При отсутствии батометров пробу воды можно отбирать с помощью бутылки, в пробку которой монтируют две стеклянные трубки, соединенные резиновым шлангом. Одна трубка длинная и доходит до дна бутылки, другая - короткая. К резиновому шлангу привязывают веревку. Бутыль на тросе опускают в водоем и на заданной глубине, дернув за веревку, снимают резиновую перемычку со стеклянных трубок, вода начинает поступать в длинную трубку, а через короткую выходит воздух. После отбора пробы, бутылку вынимают из водоема, тут же закрывают ватными пробками отверстия стеклянных трубок и отправляют на исследование.

Для взятия проб питьевой воды используют емкости объемом 0,5—1 л. При взятии *проб воды из кранов*, их предварительно обжигают пламенем горящего ватного тампона, смоченного спиртом, затем полностью открывают и в течение 10 мин воду спускают. Воду наливают в бутылки с соблюдением стерильности, не смачивая горлышко, чтобы не допустить замачивания пробки. *Хлорированную воду* перед исследованием нейтрализуют тиосульфатом натрия из расчета 10 мл на 1 л воды. *Родниковую воду* берут непосредственно из струи или из середины текущего родника, на расстоянии 10- 15 см от поверхности и дна. *Артезианскую и колодезную воду* забирают на глубине 10—15 см от поверхности воды. *Из проруби* пробы отбирают на глубине 10—15 см от нижнего края льда. *Из открытых водоемов*, как правило, берут серию проб на разном удалении от берега на различной глубине с учетом места водозабора и движения воды.

Для анализа льда, используемого на пищевых предприятиях и в хранилищах берут кусок льда не менее 2 кг, в лаборатории его обмывают стерильной водой и стерильными инструментами из глубины вырубает несколько кусочков так, чтобы общая масса была около 500 г. Лед помещают в стерильную посуду и оставляют при комнатной температуре, после растаивания исследуют как воду.

Пробы сточных вод также забирают в стерильные бутылки. Однако объем каждой пробы может колебаться от 500 до 10 мл в зависимости от места взятия (при проверке отдельных этапов очистки, после обработки, перед сбросом в водоем) и от задач анализа.

Хранение и транспортировка проб воды. Все взятые для исследования пробы воды пронумеровываются, в сопроводительном документе должно быть указано: наименование водоема, водоисточника, его местонахождение; описание места отбора проб (для водоемов — расстояние от берега и глубина), близость источников загрязнения, быстрота течения, метеорологические условия — температура воды, воздуха, наличие осадков, ветра, волн и т. д.; дата взятия пробы (час, число, месяц, год), цель исследования. Сопроводительный документ подписывается лицом, бравшим пробу, с указанием его должности.

Транспортировать воду следует в сумках-холодильниках или в ящиках с термоизолирующей прокладкой (температура в которых не более 1—2°C),

предохранять от резких толчков (чтобы не замочить пробки), замерзания, действия солнечных лучей.

Исследование воды должно быть проведено не позднее 2 ч. с момента отбора пробы, в виде исключения допускается хранение пробы до 6 ч. при температуре 4-5°C. При более длительном и неправильном хранении может наступить размножение или гибель микрофлоры.

Доставленные пробы воды регистрируют в специальном журнале с пронумерованными и прошитыми страницами.

Определение общего микробного числа воды.
Методика. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, воду открытых водоемов — по 1,0; 0,1; 0,01 мл (1,11 мл). Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-12 мл расплавленного и охлажденного до 40-45°C питательного агара, который тщательно перемешивают с водой. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при 37°C в течение 1-2 суток. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37 °C в течение суток, другую — 2 суток при 20°C.

Учет результатов. Подсчитывают количество колоний, выросших на поверхности и в глубине питательной среды, что и будет соответствовать общему микробному числу воды, т. е. количеству микроорганизмов в 1 мл.

В водопроводной (или питьевой) воде в соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01 ОМЧ не должно превышать 50 КОЕ в 1 мл (таблица 1).

Таблица 1

**Микробиологические показатели безопасности питьевой воды
(в соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01)**

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Общее микробное число	Число бактерий образующих колонии в 1 мл	Не более 50
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл	Отсутствие
Общие колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл	Отсутствие
Колифаги	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий	Число спор в 20 мл	Отсутствие

Определение коли-титра и коли-индекса воды. Минимальный объем воды в мл, в котором обнаруживают бактерии группы кишечных палочек (БГКП), называют **коли-титром воды**. Количество БГКП, содержащихся в 1л исследуемой воды, называют **коли-индексом воды**. *Коли-титр и коли-индекс воды определяют титрационным (бродильным) методом или методом мембранных фильтров.*

Титрационный метод. Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду, с

последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

Объем засеваемой воды зависит от характера исследуемого объекта, но обязательно посев ведется в 2-3, а в некоторых случаях – в 5-ти повторностях.

Объемы воды выбирают с таким расчетом, чтобы в одном из разбавлений получить хотя бы один отрицательный результат (таблица 2).

Таблица 2

Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом

Объект исследования	Объемы засеваемой воды (в мл) для определения
	БГКП, E. coli
Вода питьевая централизованного водоснабжения	3 повторности по 100, 10, 1 мл
Вода нецентрализованного водоснабжения и плавательных бассейнов	50, 5 повторностей по 10, 1 мл или 2 повторности по 100, 10, 1 и 0,1 мл
Водные объекты, не загрязняемые сточными водами	50, 5 повторностей по 10, 1 мл или 2—3 повторности по 10; 1; 0,1; 0,01 мл
Водоемы, загрязняемые сточными водами	2-3 повторности по 1; 0,1; 0,01; 0,001 мл или 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 мл
Сточные воды до очистки и обеззараживания	От 0,01 до 0,000000001
Сточные воды после очистки и обеззараживания	От 0,1 до 0,00000001

Методика. В глюкозопептонную среду (1%-я пептонная вода, 0,5%-й раствор хлорида натрия, 0,5%-й раствор глюкозы, индикатор Андрее (способ приготовления: 0,5 г кислого фуксина растворяют в 100 мл дистиллированной воды, для обесцвечивания добавляют 16,4 мл нормального раствора едкого натра) и поплавок) проводят посевы различных объемов воды.

100 мл воды — добавляют в 10 мл концентрированной среды, 50 мл — в 15 мл концентрированной среды, 10 мл — в 1 мл также концентрированной среды; 1 мл и последующие разведения — в 10 мл глюкозопептонной среды. Большие объемы воды засеваются во флаконы или колбы, меньшие — в пробирки. Посевы инкубируют в термостате в течение суток при температуре 37°C.

Из пробирок с посевами, в которых наблюдается помутнение (а также образование кислоты и газа), делают высев в чашки со средой Эндо. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 16-18 ч. При наличии на среде Эндо характерных для БГКП колоний (красных с

металлическим блеском) готовят мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, с помощью которого дифференцируют бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter* от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде.

При проведении оксидазного теста из выросших колоний берут 2-3 изолированные колонии, наносят «штрихом» на фильтровальную бумагу, смоченную диметил-*n*-фенилендиамин. При отрицательном оксидазном тесте цвет бумаги не изменяется, при положительном – она окрашивается в синий цвет в течение 1 мин.

Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном тесте — вносят в полужидкий питательный агар с 0,5 % глюкозы и инкубируют при 37°C в течение суток.

Учет результатов. Положительный ответ на наличие БГКП дается в том случае, если наблюдается рост характерных колоний, образованных оксидазоотрицательными, Гр(-) бактериями, сбраживающих лактозу при 37°C с образованием кислоты и газа. Обращают внимание также на отпечаток, окрашенный в красный цвет, на среде после снятия изучаемой колонии. Таким образом, положительный ответ выдается через 40—42 ч. Результат выражается в виде индекса (титра) БГКП, цифровое значение которых определяют по таблице (таблица 3).

Таблица 3

Определение индекса (титра) бактерий группы кишечной палочки (БГКП) при исследовании воды

Количество положительных результатов			Коли-индекс	Пределы индекса		Коли-титр
из 3 объемов по 100 мл	из 3 объемов по 10 мл	из 3 объемов по 1 мл		нижний	верхний	
0	0	0	Менее 3	—	—	Более 333
0	0	1	3	0,5	9	333
0	1	0	3	0,5	13	333
1	0	0	4	0,5	20	250
1	0	1	7	1	21	143
...
3	3	2	1100	150	4800	0,9
3	3	3	Более 1100	—	—	Менее 0,9

Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации (основной метод).

Общие колиформные бактерии (ОКБ) – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциально-диагностических лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число общих колиформных бактерий, обладают такими же признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 44°C за 24 ч.

Определение **ОКБ** и **ТКБ** *методом мембранной фильтрации* предполагает фильтрацию установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивание посевов на дифференциальной питательной среде с лактозой и последующей идентификацией колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

Методика. Перед употреблением мембранные фильтры проверяют на отсутствие трещин, отверстий, пузырей и кипятят в дистиллированной воде в течение 10 мин (при этом нельзя допускать скручивания фильтров). Для полного удаления из фильтров остатков растворителей, которые применяются при их изготовлении, кипячение следует повторить 3-5 раз со сменой дистиллированной воды. Подготовленные таким образом фильтры сохраняются в банках с дистиллированной водой или в сухом виде. В день постановки опыта фильтры повторно стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 10 мин.

Фильтрование производят с помощью специальных приборов или фильтра Зейтца. Перед посевом воды аппарат стерилизуют фламбированием. После остывания на фильтровальный столик, на котором расположена сетка, стерильным пинцетом помещают мембранный фильтр, прижимают его воронкой или металлическим цилиндром и плотно закрепляют специальными винтами. Отросток колбы, в которую фильтруется вода, с помощью резиновой трубки соединяют с водоструйным или масляным насосом для создания вакуума в приемном сосуде (около 0,25 атм).

Объем воды для посева выбирают с учетом **таблицы 2**, он должен быть таким, чтобы на фильтре выросло не более 30 изолированных колоний. Исследуемую воду каждого объема фильтруют не менее чем через 2 фильтра. В воронку или стакан наливают необходимый объем воды. После фильтрования верхнюю часть прибора снимают и фильтр осторожно стерильным пинцетом переносят на среду Эндо в чашку Петри. Чашки с фильтрами помещают в термостат и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. При окончательном результате учитывают колонии, выросшие на фильтрах.

Учет результатов. При наличии в воде БГКП (ОКБ) на фильтрах появляется рост типичных для этих бактерий колоний: *темно-красные с металлическим блеском или красные, розовые с красным центром*, имеющие четкий отпечаток на обратной стороне фильтра (рис. 3). Бактерии из таких колоний окрашивают по Граму и микроскопируют. С культурой грамотрицательных бактерий лактозоположительных колоний ставят оксидазный тест для дифференциации бактерий семейства Enterobacteriaceae от Pseudomonadaceae (последние являются оксидазообразующими бактериями). Оставшуюся часть оксидазоотрицательной Гр(-) изолированной колонии засевают в пробирку с полужидкой лактозной средой и инкубируют при 37°С, 48 ч. При появлении кислоты и газа за более короткий промежуток времени, результат считают положительным.

Индекс ОКБ (БГКП) рассчитывают по формуле:

Индекс = $K \times 1000 / V$, где

K – количество проверенных на принадлежность к ОКБ (БГКП) колоний на фильтре;

V – объем профильтрованной воды через фильтр, на котором велся учет.

Например, профильтровано воды по 100 мл в трех повторностях, на одном фильтре выросло 5 колоний, на другом — 2, на третьем — нет роста.

Индекс ОКБ будет равен: $[(5+2) \times 1000] : 300 = 23$ КОЕ (колонийобразующих единиц).

Для перевода индекса в титр используют формулу:

Титр = $1000 : \text{индекс}$;

Соответственно, для рассмотренного случая Титр = $1000 : 23 = 43,5$ мл.

В соответствии с ГОСТ, у питьевой воды индекс ОКБ должен быть не более 3, у воды плавательного бассейна — не более 10.

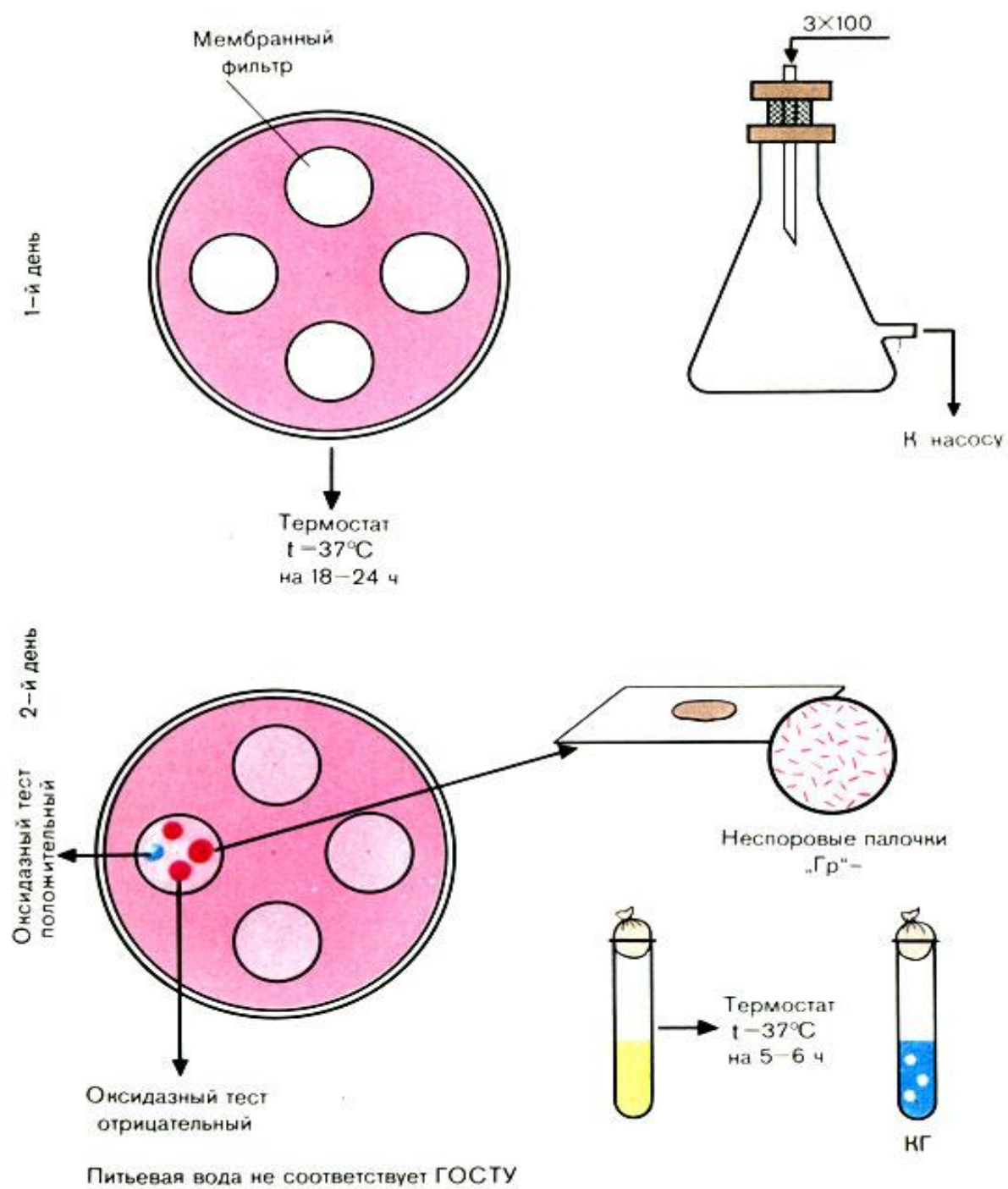


Рисунок 3. Метод мембранной фильтрации.

Тема 2. Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Изучаемые вопросы:

1. Отбор проб воздуха.
2. Седиментационный метод осаждения Коха.
3. Аспирационный метод.

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды. Воздух является неблагоприятной средой для обитания микроорганизмов из-за отсутствия питательных веществ, действия солнечных лучей, высушивания.

Наряду с сапрофитами в воздухе могут находиться патогенные бактерии, споры грибов родов *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям:

- 1) *определение микробного числа воздуха;*
- 2) *определение количества санитарно-показательных бактерий — гемолитических стрептококков, стафилококков, кишечной палочки.*

Отбор проб. В закрытых помещениях точки отбора проб устанавливаются из расчета на каждые 20 м² площади — одна проба воздуха, по типу конверта: 4 точки по углам комнаты (на расстоянии 0,5 м от стен) и 5-я точка — в центре. Пробы воздуха забираются на высоте 1,6—1,8 м от пола — на уровне дыхания в жилых помещениях. Пробы необходимо отбирать днем (в период активной деятельности человека и животных), после влажной уборки и проветривания помещения. Атмосферный воздух исследуют в жилой зоне на уровне 0,5—2 м от земли вблизи источников загрязнения, а также в зеленых зонах (парки, сады и т.д.) для оценки их влияния на микрофлору воздуха.

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

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

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

Учет результатов. Ведут подсчет выросших колоний для определения ОМЧ. **Микробное число воздуха** (общее количество бактерий в 1 м³) определяют по формуле Омелянского:

$$X = a \times 100 \times 1000 \times 5 / (b \times 10 \times T), \text{ где}$$

X — количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха;

a — количество выросших колоний в чашках;

b — площадь чашки;

T — время, в течение которого чашка была открыта;

5 — время по правилу Омелянского;

10 — объем воздуха в литрах.

Правило Омелянского предусматривает, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см² за 5 мин из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в его 10 л.

Таблица 4

Санитарная оценка воздуха по бактериологическим показателям

--

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

Механизм улавливания микрофлоры основан на «ударно-пробивном» действии струи воздуха, который проходит через узкую щель и ударяется о влажную поверхность питательной среды. Засасываемый воздух распределяется по поверхности среды чашки Петри, помещенной во вращающемся устройстве. Скорость просасывания воздуха должна быть около 25 дм³/мин. Экспозиция в течение 4–5 мин. Затем чашки инкубируют в термостате 24 ч. при температуре 37°C и выдерживают при комнатной

температуре еще 24 ч. Подсчитывают количество выросших колоний и определяют микробное число воздуха, пользуясь правилом Омелянского.

Тема 3. Санитарно-микробиологическое исследование почвы

Изучаемые вопросы:

1. Отбор проб почвы.
2. Подготовка проб почвы для анализа.
3. Определение общего микробного числа (ОМЧ) почвы.
4. Определение коли-титра почвы.
5. Определение перфрингенс-титра почвы.
6. Определение титра термофильных бактерий.

Качественный состав микрофлоры почвы очень разнообразен: множество видов бактерий (преимущественно спорообразующих), актиномицетов, спирохет, архибактерий, простейших, сине-зеленых водорослей, микоплазм, грибов, вирусов. Преобладающей флорой являются анаэробы (до 96% от всех видов): бифидобактерии, лактобактерии, пептококки, бактероиды; в меньшем количестве встречаются микроорганизмы родов *Escherichia*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Clostridium*, грибы *Candida*, и др.

Распределение микробов в почве неравномерно. На поверхности и в слое толщиной 1—2 мм относительно мало микробов, несмотря на постоянное обсеменение почвы, что объясняется губительным действием ультрафиолетовых лучей солнца и высушивания.

Наиболее обильна микрофлора на глубине 10—20 см. В этом слое протекают основные биохимические процессы превращения органических веществ, обусловленные жизнедеятельностью разнообразных микроорганизмов, последовательно сменяющих друг друга. В более глубоких почвенных слоях флора становится скудной и на глубине 4—5 м микроорганизмы обнаруживаются в очень малых количествах.

В ряде случаев почва представляет собой резервуар для некоторых патогенных микроорганизмов. Длительность выживаемости в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. При благоприятных условиях микробы в почве могут не только выживать, но и продолжительное время сохранять вирулентные свойства.

Анализ почвы включает в себя определение следующих показателей:

- 1) *микробное число*;
- 2) *коли-титр*;
- 3) *перфрингенс-титр*;
- 4) *титр термофильных бактерий*.

По эпидемиологическим признакам проводят определение в почве патогенных микроорганизмов: сальмонелл, шигелл, возбудителей столбняка, ботулизма, злокачественного отека, сибирской язвы. Бактериологический

анализ почвы нужен при выборе территории под пастбище, ферму, хозяйственные постройки, детские сады, больницы и др.

Отбор проб почвы. При исследовании территории в 100 м² выделяют два участка по 25 м²: один — вблизи источника загрязнения и второй (контрольный) — вдали. Образцы почвы забираются в 5 точках — по типу конверта: 4 — по углам участка и 1 — в центре. Взятые пробы массой по 200-300 г перемешивают в стерильной посуде и затем берут средний образец, который помещают в стерильный сосуд с ватно-марлевой пробкой (или пергаментный пакет). Объем образца почвы должен быть не менее 300 г, что необходимо для поддержания определенной влажности при его транспортировке. При *взятии проб с поверхностных слоев земли* снимают лопатой пласт почвы, затем с боковой, отвесной поверхности фламбированным ножом срезают землю толщиной 1-1,5 см, нож снова прожигают и из глубины срезанного участка набирают образец почвы. *Образцы с пахотных почв* берут на всю глубину пахотного слоя. *Из глубоких слоев почвы* пробы забирают буром Некрасова или Френкеля, представляющим собой штангу с рукояткой, которая служит для вращения бура. В нижней рабочей части бура имеется коробка для забора почвы. Во время бурения полость коробки закрыта, при достижении намеченного расстояния бур поворачивается в обратную сторону, полость открывается и заполняется почвой. С помощью бура можно брать пробы с глубины до 3 м.

Взятые пробы почвы помещают в стерильную посуду, маркируют и снабжают сопроводительным документом, в котором указывают номер образца, место и глубину взятия, дату отбора пробы. Обработку пробы желательно проводить в день исследования, хранение допускается в течение 6-18 ч. при температуре 4-5° С.

Подготовка проб почвы для анализа. Для приготовления среднего образца почвы (объемом 500 г) все образцы из одного участка высыпают на стерильный плотный лист бумаги, перемешивают и распределяют в форме квадрата, диагоналями почву делят на 4 треугольника, почву из двух противоположных треугольников отбрасывают, а оставшуюся вновь перемешивают и далее повторяется приведенная выше процедура до тех пор, пока не останется 500 г почвы.

Образцы почвы освобождают от крупных включений: камней, щебня, осколков стекол, корней, листьев растений и т. д. Затем помещают в стерильную фарфоровую ступку, просеивают через стерильное сито с диаметром пор 3 мм и забирают навески для приготовления почвенной суспензии. В зависимости от цели исследования навеска может быть различной: 1-30 г для определения санитарно-показательных микроорганизмов, 1-10 г для учета почвенных микроорганизмов, 50-60 г для обнаружения патогенных энтеробактерий. Навеску почвы высыпают в стерильную колбу и заливают стерильной водопроводной водой в соотношении 1:10. Полученную почвенную суспензию встряхивают в

течение 10-15 мин. Не давая отстояться частицам суспензии, *готовят серию десятикратных последовательных разведений.*

Для исследования относительно чистых почв достаточно 4 степени разведения ($1:10000$ (10^{-4})), для загрязненных — 6-9 разведений ($1:1000000$ (10^{-6}) – $1:1000\ 000000$ (10^{-9})). В штатив ставят нумерованные пробирки с 9 мл стерильной воды в каждой. В первую вносят 1 мл суспензии пробы почвы, смешивают, затем 1 мл из первой пробирки вносят во вторую, смешивают, из нее переносят — 1 мл в третью и т. д. В результате в пробирке № 1 получается разведение $1:100$ (10^{-2}), № 2 — $1:1000$ (10^{-3}) и т.д. Приготовленные разведения используются для посева на различные питательные среды, а также для учета численности микроорганизмов методом прямой микроскопии.

Определение общего микробного числа. Методика. Из последних 3-4 пробирок с разведенной суспензией отдельными стерильными пипетками вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри (каждое разведение в отдельности). В каждую чашку добавляют еще по 10-15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА. Равномерными осторожными круговыми движениями содержимое чашек перемешивают, оставляют на столе для застывания агара. С застывшей средой чашки переворачивают вверх дном, подписывают и помещают в термостат для культивирования на 24-48 ч. при 37°C .

Учет результатов. Выросшие колонии подсчитывают в каждой чашке, умножают на степень разведения, полученные числа суммируют и вычисляют среднеарифметическое число, что составит количество микробов, содержащихся в 1 г почвы.

Определение коли-титра. Методика. Из приготовленных разведений почвенной суспензии делают посевы во флаконы и пробирки с жидкой питательной средой Кесслера (на 1 л дистиллированной воды — 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи — 2,5 г лактозы, 4 мл 1%-го водного раствора генцианвиолета): 10 мл (из разведения $1:10$) — в 50 мл среды, по 1 мл из последующих разведений — в 9 мл среды. Посевы инкубируют в течение 48 ч. при температуре 37°C .

Учет результатов. При отсутствии во флаконе и пробирках роста, характеризующегося газообразованием и помутнением, дается отрицательный ответ на присутствие БГКП. Если в засеянных сосудах обнаруживается рост в виде помутнения среды или помутнения и газообразования, следует сделать высев в чашки Петри со средой Эндо, инкубировать 24 ч. при температуре 37°C . Дальнейшей идентификации (аналогично определению БГКП в воде) подвергаются типичные для *Escherichia* красные или розовые с металлическим блеском колонии. Результат выражается в коли-индексе, т. е. количество БГКП, обнаруженных в 1 г почвы.

Определение перфрингенс-титра. Присутствие *C. perfringens* в почве указывает на фекальное загрязнение ее и имеет определенное индикаторное

значение по отношению к группе патогенных клостридий (*C. tetani*, *C. botulinum*), которые также попадают в почву с испражнениями человека и животных. Определение перфрингенс-титра является важным критерием для санитарной оценки почвы и ее самоочищения, так как при фекальном загрязнении почвы уже через 4-5 месяцев *E.coli* исчезают, а *Cl.perfringens* обнаруживаются в титре 0,01 г.

Методика. Посев почвенной суспензии в среду Вильсона-Блера. Из приготовленных разведений почвенной суспензии (от 1:10 до 1:1000000) переносят по 1 мл в два параллельных ряда стерильных пробирок. Один ряд пробирок с разведениями суспензии прогревают при температуре 80° С в течение 15 мин. (для подавления размножения сопутствующей вегетативной микрофлоры почвы). Затем в пробирки обоих рядов вносят по 9-10 мл среды Вильсона — Блера, приготовленной непосредственно перед употреблением (*ex tempore*). Суспензию перемешивают со средой, вращая пробирки между ладонями рук, затем для быстрого застывания агара и выхода кислорода из среды пробирки помещают под струю холодной воды. Инкубируют в термостате при температуре 43° С в течение 24 ч., но уже через 2—3 ч.

Учет результатов. При положительном результате можно наблюдать в толще агара образование круглых колоний черного цвета, разрывающих агар в месте газообразования. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В мазках, приготовленных из черных колоний, видны характерные грамположительные палочки. После чего вычисляют перфрингенс-титр, который соответствует наибольшему разведению почвы, вызвавшему почернение и разрыв среды Вильсона— Блера в первые 12 ч. роста.

В 1968 г. Г.И. Сидоренко и Ю.И. Пивоваровым предложено использовать вместо среды Вильсона-Блера **сульфит-полимиксин-неомициновую среду (СПН)**. Добавленные к ней антибиотики подавляют сопутствующую флору, поэтому выросшие в этом агаре при температуре 44-45 ° С колонии не требуют дальнейшей идентификации. Время анализа составляет 10—12 ч.

Использование сред накопления. Методика. По 1 мл прогретых разведений почвенной суспензии высевают в пробирки с жидкими и полужидкими питательными средами, предварительно регенерированными кипячением (среда Клодницкого, Китта-Тароцци, бульон Мартена с ватой). После 18—20 ч. инкубации в термостате при 37° С делают высев в среду Вильсона-Блера или СПН. Дальнейшее исследование ведется по описанной выше методике.

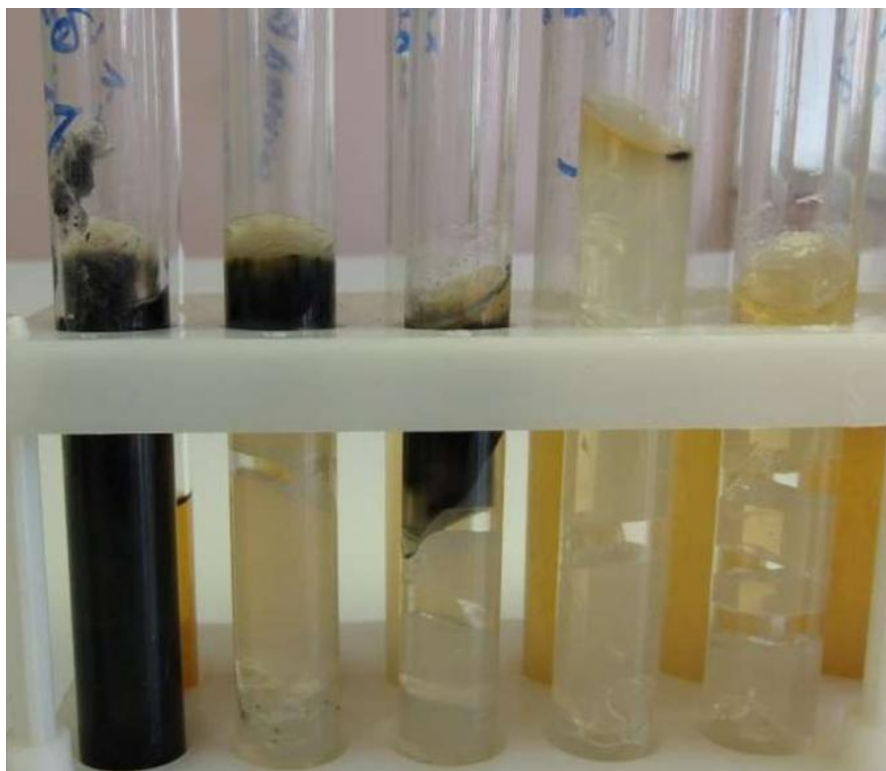


Рисунок 4. Разрыв среды Вильсона-Блера

Определение титратермофильных бактерий. Степень фекального загрязнения почвы можно определить по количеству термофильных бактерий, температурный оптимум развития которых равен 58-60°C.

Термофилы представлены в основном спорообразующими грамположительными бациллами и актиномицетами, активно размножаются в компостных кучах, навозе. Поэтому можно заключить, что почвы, в которых обнаруживается большое количество эшерихий и термофилов, были удобрены навозом или компостом. Почва, содержащая много эшерихий и незначительное количество термофилов, считается загрязненной фекалиями, так как флора кишечника человека и животных крайне бедна термофилами. Термофильные микроорганизмы не свойственны незагрязненным почвам.

Методика. Для обнаружения термофилов делают посев разведений почвенной суспензии (от 1:10-1:1000000) на 2-3 параллельные чашки с МПА, разлитые более толстым слоем, чем обычно (поверхностный посев). Инкубируют при температуре 60° С в течение 24 ч.

Учет результатов. Количество выросших колоний подсчитывают, перерасчет термофилов на 1 г почвы ведется, как при определении ОМЧ в почве.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по комплексу показателей (таблица 5).

Таблица 5

Оценка санитарного состояния почвы по основным микробиологическим показателям

Характеристика почвы	Коли-титр	Перфрингенс-титр	Количество термофильных бактерий в 1 г почвы
Чистая	1,0 и выше	0,01 и выше	100...1000
Загрязненная	0,9...0,01	0,009...0,0001	1000...100 тыс.
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,00009 и ниже	100 тыс....4 млн

Тема 4. Санитарно-микробиологическое исследование молока

Изучаемые вопросы:

1. Молоко. Экзогенное и эндогенное обсеменение
2. Пороки и причины порчи молока микробного происхождения.
3. Общий ход молочнокислого процесса в молоке.
4. Требования, предъявляемые к молоку.
5. Отбор проб молока.
6. Определение общего микробного числа (ОМЧ) в молоке.
7. Определение кислотности молока.
8. Определение степени чистоты молока.
9. Проба на редуктазу.
10. Определение ингибирующих веществ в молоке.

Молоко – секрет молочных желез самок млекопитающих. Состав коровьего молока: вода 87%; молочный сахар – 4,7%; молочный жир – 3,9%; белки – 3,3%; минеральные вещества – 0,7%; витамины и ферменты.

По своему составу молоко представляет благоприятную среду для развития и размножения различных микроорганизмов, поэтому в нем всегда можно встретить то или иное количество микробов.

Содержание микроорганизмов в сыром молоке отражает уровень гигиены получения молока, особенно степень чистоты доильных установок, условия его хранения и транспортирования. Известны два пути обсеменения молока микроорганизмами: *эндогенный* и *экзогенный*. При эндогенном пути молоко обсеменяется микроорганизмами непосредственно в вымени животного. Экзогенное обсеменение происходит из внешних источников: кожи животного, подстилочных материалов, кормов, воздуха, воды, доильной аппаратуры и посуды, рук и одежды работников молочной фермы.

Эндогенное обсеменение. В молоке вымени всегда содержится определенное количество микроорганизмов. В железистой части вымени микроорганизмы могут находиться непостоянно и в единичном количестве клеток. В выводных протоках и молочной цистерне количество бактерий может достигать нескольких десятков или сотен клеток в 1 см. Это микроорганизмы — комменсалы вымени. К ним относятся энтерококки, микрококки, иногда маститные стрептококки, коринебактерии и др.

Молоко вымени, получаемое стерильно не через сосковый канал, называют асептическим. Оно содержит незначительное количество

микроорганизмов — десятки-сотни клеток в 1 см^3 . У старых коров больше содержится в вымени микробов, чем у молодых.

Здоровый сосковый канал защищает вымя от внешней среды благодаря его анатомическому строению. Кроме того, свободные жирные кислоты, синтезируемые слизистой оболочкой соскового канала, оказывают бактерицидное воздействие. Секрет соскового канала содержит также фосфолипиды, убивающие маститные стрептококки и другие микроорганизмы. При нарушении защитных функций соскового барьера микроорганизмы, постоянно находящиеся в сосковом канале, могут попадать в вымя и там размножаться.

У входа в сосковый канал, в каплях молока, оставшихся от предыдущей дойки, постоянно размножаются микроорганизмы, образуя так называемую бактериальную пробку, в которой количество бактерий достигает сотен тысяч клеток в 1 см^3 молока. Поэтому перед дойкой первые струйки молока необходимо сдаивать в отдельную посуду, т. е. бактериальные пробки не должны попадать в общую массу молока.

Эндогенное обсеменение молока вымени может происходить также при маститах, септических инфекционных болезнях, травмах и воспалительных процессах соскового канала и вымени.

Экзогенное обсеменение. Важнейшим источником бактерий сырого молока является кожа животного и особенно кожа вымени и сосков, на которые надевают доильные стаканы. Молочная пленка, образующаяся в процессе доения между кожей сосков и доильными стаканами, наличие на коже грубых и мелких складок, а также относительно высокая температура создают благоприятные условия для развития микрофлоры. Она состоит из микрококков, энтерококков, кишечных палочек и других сапрофитов, а также патогенных и нежелательных для производства молока микроорганизмов.

Следует стремиться к тому, чтобы после обмывания и дезинфекции перед доением концентрация микробов на коже вымени была не выше 10^3 микробов на 1 см^2 .

Подстилочные материалы из соломы и сена являются существенным источником загрязнения кожного покрова животного, а затем и молока кишечными палочками, маслянокислыми бактериями, энтерококками, гнилостными спорообразующими дрожжами, плеснями, молочнокислыми бактериями и др.

В кормах также содержится много разнообразных микроорганизмов. В свежескошенной траве больше молочнокислых бактерий, в грубых кормах — гнилостных спорообразующих аэробных бацилл. В кормах содержатся пропионовокислые, уксуснокислые бактерии, актиномицеты, дрожжи и др.

Кормление коров прокисшим или смешанным с землей кормом, плохим силосом или кислой бардой в сочетании с имеющимися недостатками в гигиене содержания животных ведет к загрязнению молока маслянокислыми и другими бактериями.

Недоброкачественный корм вызывает у коров дарену, а молоко загрязняется бактериями через содержимое кишечника, в 0,1 г которого содержится от 10 до 100 тыс. бактерий. В содержимом кишечника возможно наличие патогенных и нежелательных для молочного производства микроорганизмов.

Часто выделяющиеся у коров сальмонеллы имеются только в сыром молоке, так как энтеробактерии уничтожаются при пастеризации.

Поскольку молоко в настоящее время получают и хранят преимущественно в замкнутых системах, сырое молоко загрязняется в основном при ручном доении. Однако при смене молокопроводов всегда подсасывается наружный воздух.

Общее количество микроорганизмов в воздухе составляет 300—1500 клеток в 1 м³.

Содержание микробов в воздухе в течение одного дня сильно меняется. Во время операций раздачи и приема корма количество микробов воздуха достигает максимальной величины. Качественный состав микрофлоры воздуха представлен чаще микрококками, сарцинами, клетками дрожжей и спорами плесеней.

Вода, отвечающая требованиям ГОСТа на питьевую воду и применяемая для мытья молочной посуды и аппаратуры, содержит незначительное количество микроорганизмов. Вода открытых водоемов или загрязненная вода содержит флюоресцирующие палочки, кокковую микрофлору, кишечные палочки, гнилостные бактерии и др. Доильные установки и резервуары для хранения молока являются основным источником заражения молока психротрофными бактериями, преимущественно псевдомонадами. Психрофильные микробы размножаются в молочно-водной среде на плохо вымытых и дезинфицированных установках, находясь в активной фазе размножения. У них отсутствует период адаптации — лагфаза. В плохо вымытой и непросушенной аппаратуре размножаются также молочнокислые бактерии, кишечные палочки, микрококки, гнилостные микроорганизмы и др.

Руки и одежда работников ферм могут стать источником обсеменения молока возбудителями (кишечными палочками, стафилококками, стрептококками и др.) различных болезней. Работники ферм, соприкасающиеся с молоком, обязаны строго выполнять правила личной гигиены, предупреждающие обсеменение молока микроорганизмами.

Микроорганизмы, встречающиеся в молоке и молочных продуктах, в зависимости от их роли в формировании качества продукции, можно разделить на три основные группы.

1. Технически важная микрофлора:

а) *Микроорганизмы, принимающие участие в процессе сквашивания* (молчнокислые микроорганизмы) и пробиотическая микрофлора (например, бифидобактерии, ацидофильные палочки);

б) *Микроорганизмы, вызывающие пороки и порчу молока* (например: микроскопические грибы, психрофильные и спорообразующие бактерии).

2. Патогенные микроорганизмы:

а) Возбудители антропонозных, зооантропонозных и зоонозных болезней (такие, как шигеллы, листерии, лептоспиры);

б) Возбудители пищевых отравлений (такие, как сальмонеллы, стрептококки);

3. Санитарно - показательные микроорганизмы (БГКП, коагулазоположительные стафилококки, энтерококки, протей, сульфитредуцирующие клостридии).

Пороки и причины порчи молока микробного происхождения

Попавшие в молоко микроорганизмы в зависимости от условий хранения могут развиваться, ферментировать составные части молока, выделять в него продукты своей жизнедеятельности. Это может привести к появлению отдельных или смешанных пороков молока и молочных продуктов и к его порче.

1. Изменение консистенции молока:

Преждевременное свертывание молока, имеющего нормальную кислотность, может вызывать развитие гнилостных микроорганизмов типа *V. mesentericus*, *V. subtilis* и т.п. Свертывание молока с незначительно повышенной кислотностью происходит при размножении в нем микрофлоры кожи вымени.

Ослизненное или тягучее молоко - это порок, который возникает как без нарастания в молоке кислотности, так и при нарастании её. Молоко может становиться тягучим без образования сгустка при размножении в нем особого микроорганизма - «палочки тягучего молока» - *Bact. lactis viscosum*. Кислотный тягучий сгусток образуется при росте в молоке некоторых штаммов сливочных стрептококков *Str. cremoris* и ацидофильной палочки *Lactobacillus acidophilus*, которые обладают способностью образовывать при сквашивании большое количество слизи.

2. Изменение вкуса и запаха:

Прокисание молока - порок, связанный с развитием микроорганизмов, сбраживающих лактозу с образованием молочной кислоты в молоке при его продолжительном хранении, особенно в условиях повышенной температуры. В большинстве случаев это многочисленные молочнокислые микроорганизмы. Однако при нарушении технологии производства и хранения молока вызывать нежелательное прокисание могут и бактерии группы кишечной палочки и другие бактерии. Прокисание молока - естественный процесс, приводящий к его свертыванию и превращению в кисломолочный продукт (простоквашу). Однако при промышленном производстве молока и кисломолочных продуктов самопроизвольное сквашивание молока считается крайне нежелательным. Получившиеся таким образом молочные продукты именуют «самоквасами». Такие продукты запрещены к реализации.

Горький вкус может возникнуть при долгом хранении пастеризованного охлажденного молока. Такой порок - результат развития спорогенных почвенных бацилл, споры которых не погибают при пастеризации.

Горький вкус, появившийся при продолжительном хранении у сырого молока, бывает обусловлен размножением целой группы микроорганизмов: микрококков, маммококков, спорообразующих и неспорообразующих гнилостных бактерий. Развиваясь в молоке, они выделяют протеолитические ферменты, разлагающие белки с образованием пептонов и горьких пептидов.

Прогорклый вкус - это следствие накопления в молоке масляной кислоты. Возбудитель порока - психрофильные флюоресцирующие палочки *Ps. fluorescens*, гидролизующие молочный жир.

Мыльный вкус возникает в результате белкового распада и омыления молочного жира в длительно хранящемся охлажденном молоке. Порок вызывают психрофильные палочки *B. lactis saponacei* и *B. sapolacticum*.

Травяной, репный, сырный, тухлый, навозный и другие ненормальные, неприятные запахи могут вызывать развивающиеся в молоке бактерии группы кишечной палочки (*E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*), а также *Pseudomonas fluorescens*. Они способны разлагать азотистые вещества и образовывать летучие продукты с разнообразными запахами.

3. Изменение цвета:

Красный или розовый цвет различной интенсивности может появиться в молоке при попадении в него крови животного при различных травмах вымени, при маститах и т.п. В этих случаях и неповрежденные, и разрушенные эритроциты, как правило, оседают при отстаивании на дне сосуда, пробирки. Однако красное окрашивание различной интенсивности может быть следствием накопления в молоке пигмента психрофильных «чудесных палочек» - *Serratia marcescens*.

Синий цвет появляется вначале на поверхности молока. Вначале образуются отдельные синие пятна, между которыми имеются неокрашенные пространства нормального цвета. Затем на поверхности молока образуется сплошная, тонкая синяя пленка. Возбудитель порока - «синегнойная палочка» - *Ps. aeruginosa*.

Жёлтый цвет молока может возникать в силу различных причин немикробной природы (например, при чрезмерном кормлении животных овощами, содержащими каротиноиды), а также при гнойных стафилококковых маститах. Изредка возбудителем порока может являться пигментообразующая палочка *B. sinxantun*.

«Бродящее» молоко - порок смешанного характера. Он проявляется изменением нормальных свойств молока - усиление выделения газов, образование пены, появлением дрожжевого, спиртового, прогорклого или навозного запаха. В сыром молоке возбудителями порока могут быть газообразующие бактерии группы кишечной палочки и дрожжи, выделяющие углекислый газ и этиловый спирт. В пастеризованном молоке возбудителями чаще всего являются маслянокислые бактерии, которые при брожении лактозы образуют масляную кислоту, углекислый газ и водород.

Общий ход молочнокислого процесса в молоке. В зависимости от формы клеток молочнокислые бактерии делят на две группы: молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки. Эти микроорганизмы имеют также и неодинаковые физиологические признаки. По отношению к температуре различают мезофильные и термофильные молочнокислые бактерии; по

характеру сбраживания молочного сахара — гомоферментативные (образуют почти одну молочную кислоту) и гетероферментативные (наряду с молочной кислотой образуют значительное количество побочных продуктов). После внесения небольшого количества молочнокислых стрептококков (петлей) в молоко при оптимальной температуре их развития (30° С) начинают размножаться бактерии. Если культура находится в состоянии полной активности (молодая), уже в самом начале процесса наблюдается максимальная скорость ее размножения. Если культура менее активная (старая), потребуется некоторое время, прежде чем бактерии начнут размножаться с максимальной скоростью.

Во время хранения молока изменяется количество содержащихся в нем микроорганизмов, а также соотношение между отдельными группами и видами бактерий. Характер этих изменений зависит от температуры и продолжительности хранения молока, а также от степени обсеменения и состава микрофлоры. Размножающаяся и накапливающаяся в процессе хранения молока микрофлора называется вторичной. Изменение вторичной микрофлоры происходит по определенным закономерностям, т. е. проходит через определенные естественные фазы развития, изученные С. А. Королевым: **бактерицидная фаза, фаза смешанной микрофлоры, фаза молочнокислых бактерий, фаза дрожжей и плесеней.**

Бактерицидная фаза. Время, в течение которого микроорганизмы не развиваются в свежесвыдоенном молоке и даже частично отмирают, называют **бактерицидной фазой**. Бактерицидные свойства молока обусловлены присутствием в нем лизоцимов, нормальных антител, лейкоцитов, некоторых ферментов, бактериолизин и др.

Лизоцимы (лактенины) представляют собой вещества белковой природы (ферменты), образующиеся в организме животного и обладающие бактерицидным и бактериостатическим действием по отношению ко многим видам бактерий. Большое количество лизоцимов находится в различных жидкостях организма: слезной жидкости, слюне, спинно-мозговой жидкости, молоке и особенно в молозиве и околоплодной жидкости.

В молоке коров находятся четыре группы лизоцимов: лизоцим М (молока), лизоцим В (вымени), лизоцим О (основной), лизоцим Т (термостабильный). Они вырабатываются молочной железой или поступают в молоко из крови. При пастеризации молока лизоцимы (кроме термостабильного) инактивируются.

Наибольшей бактерицидной активностью отличается лизоцим М. Он действует губительно на патогенных стафилококков, маститного стрептококка, сальмонелл, кишечных палочек, возбудителя сибирской язвы и других, особенно грамположительных, микроорганизмов. Отсутствие лизоцима М в свежесвыдоенном молоке свидетельствует о заболевании молочной железы; такое молоко является биологически неполноценным, так как в нем беспрепятственно могут размножаться многие виды микроорганизмов.

В молоке, содержащем большое количество микроорганизмов лизоцимы быстро расходуются и довольно скоро утрачивают свое антибактериальное действие.

Антитела— гамма-глобулины, образующиеся в макроорганизме в ответ на введение в него микроорганизмов, их продуктов обмена или других чужеродных белковых веществ. Антитела являются термолабильными, т. е. они разрушаются при пастеризации молока.

Лейкоциты (фагоциты) — клеточные элементы крови макроорганизма, способные активно поглощать и растворять живые и убитые микроорганизмы. Они всегда содержатся в небольшом количестве в молоке, выполняя защитную антибактериальную функцию. При воспалении молочной железы количество лейкоцитов в молоке увеличивается в сотни раз, что является диагностическим признаком ранних форм маститов. При тепловой обработке молока лейкоциты уничтожаются.

Таким образом, наличие бактерицидной фазы молока обусловлено присутствием биологических защитных факторов, созданных самой природой.

Продолжительность бактерицидной фазы составляет 1-2 часа и имеет большое значение в сохранении хорошего качества молока. Она зависит от температуры хранения молока, степени его обсеменения, состава микрофлоры и индивидуальных особенностей дойных животных. Особенно большое влияние на продолжительность бактерицидной фазы оказывает температура хранения молока. Чем она выше, тем короче бактерицидная фаза. Зависимость продолжительности бактерицидной фазы от степени обсеменения молока тоже обратная: чем больше микроорганизмов в молоке, тем менее продолжительна бактерицидная фаза. С увеличением концентрации бактерий в молоке на несколько тысяч при одной и той же температуре хранения продолжительность бактерицидной фазы сокращается в два раза.

Таким образом, существует два пути увеличения продолжительности бактерицидной фазы: получение бактериально чистого молока и его немедленное охлаждение до низких плюсовых температур.

Фаза смешанной микрофлоры. По окончании бактерицидной фазы начинается ничем не задерживаемое размножение всех групп микроорганизмов, находящихся в молоке и способных в нем размножаться при данных условиях. Интенсивность их размножения будет различна. Эта фаза является периодом наиболее быстрого размножения микрофлоры. Она *продолжается от 12 ч, до 1—2 сут.* В течение этого периода микрофлора молока возрастает от немногих тысяч, которые оно имеет к концу бактериальной фазы, до сотен миллионов. В остальных фазах развития концентрация микробов может увеличиться до 3 млрд. Такой быстрый темп размножения объясняется тем, что в молоке в это время еще не накопились продукты жизнедеятельности микроорганизмов, задерживающие их дальнейшее развитие. Лишь к концу фазы продукты обмена в виде повышения кислотности будут задерживать развитие многих групп микроорганизмов, чем и определяется граница между фазой смешанной микрофлоры и фазой молочнокислых бактерий.

Качественный состав микрофлоры в фазе определяется составом первичной микрофлоры молока, скоростью размножения различных видов микроорганизмов и температурными условиями хранения молока. В

зависимости от температуры хранения в данной фазе в молоке может развиваться микрофлора трех типов: *криофлора* (флора низких температур), *мезофлора* (флора средних температур), *термофлора* (флора высоких температур).

Криофлора развивается при хранении молока в охлажденном состоянии при температуре от 0 до 10° С. В этих условиях микроорганизмы размножаются очень медленно. Например, при температуре 4,5° С накопление биомассы за 24 ч. составляет 9 %. Молочнокислые бактерии практически не размножаются. Если молоко хранят и далее при низких температурах, то микрофлора не выходит за пределы фазы смешанной микрофлоры, которая может продолжаться довольно долго, не давая резких видимых изменений молока.

Однако количество микрофлоры в молоке неуклонно нарастает, и постепенно накапливаются продукты ее жизнедеятельности. Даже при температуре около 0°С в течение двух недель количество бактерий в молоке может увеличиваться в десятки тысяч раз и составлять сотни миллионов клеток в 1 см³. При этом характер изменений молока обусловлен Развитием сначала микрококков, затем палочек *Vac. megatherium*, *Vac. subtilis* и других гнилостных микроорганизмов, т. е. процессы идут в направлении гнилостного разложения белков и отчасти разложения жира.

Мезофлора развивается при хранении молока в температурных пределах от 10 до 35°С, т. е. при хранении молока без охлаждения. При этом характерны быстрое размножение микроорганизмов и неуклонное нарастание количества молочнокислой микрофлоры, которая, в конце концов, получает решительный перевес над остальными микроорганизмами, чем и обусловлен переход к следующей фазе — фазе молочнокислых бактерий. Однако в составе микрофлоры, особенно в начальной стадии фазы смешанной микрофлоры, развиваются бактерии группы кишечных палочек, флюоресцирующие и другие гнилостные бактерии, ухудшающие качество молока. Поэтому надо стремиться к тому, чтобы молоко вообще не находилось в фазе смешанной микрофлоры. В неконтролируемых условиях фаза смешанной микрофлоры продолжается одни сутки, реже — двое.

Термофлора развивается при температуре 40—45° С. Такие условия наблюдаются в сыроделии при производстве твердых сыров с высокой температурой второго нагревания.

Во время хранения молока при искусственно созданных высоких температурах (в термостате) развитие микрофлоры идет в сторону обогащения молочнокислыми термофильными палочками и стрептококками.

Фаза молочнокислых бактерий. Эта фаза начинается с момента заметного нарастания кислотности и преобладания молочнокислых бактерий в молоке (кислотность около 60°Т и свыше 50 % молочнокислых стрептококков от общего количества бактерий). В дальнейшем с накоплением молочной кислоты молочнокислые бактерии замедляют темп своего размножения, а остальные группы микроорганизмов постепенно отмирают.

Наиболее чувствительными к повышению кислотности являются флюоресцирующие бактерии, за ними погибают гнилостные

микроорганизмы, далее — микрококки, а также бактерий группы кишечных палочек, дольше всех выдерживающие нарастание кислотности среди немолочнокислых бактерий. Молочная кислота не является губительным фактором для спор дрожжей и плесеней, находящихся в молоке.

Следовательно, в течение молочнокислой фазы происходит как бы самоочищение молока почти от всех групп микроорганизмов, кроме молочнокислых бактерий, количество которых к концу фазы приближается к 100 % всей микрофлоры.

Количество молочнокислых бактерий в первичной микрофлоре оказывает некоторое влияние на скорость вытеснения остальных микроорганизмов, но на конечный результат почти не влияет. Первоначально в фазе молочнокислых бактерий преобладают молочнокислые стрептококки, максимальное количество которых (до 2 млрд в 1 см³) накапливается через 1—2 сут. При этом предельная кислотность достигает 120° Т и наблюдается массовое отмирание стрептококков. Молочнокислые палочки как более кислотоустойчивые продолжают размножаться, и уже на 4-е сутки их количество превышает количество стрептококков, а через 7 суток увеличение достигает почти 100 %. В дальнейшем после возрастания кислотности до 250—300°Т происходит отмирание и молочнокислых палочек. *Продолжительность молочнокислой фазы очень велика, она может длиться месяцами* без каких-либо заметных изменений в микрофлоре, кроме только что рассмотренных. Это объясняется наличием молочной кислоты, которая подавляет развитие микроорганизмов. В этот период времени не могут размножаться и дрожжи с плесеньями. Молочнокислую фазу можно назвать также фазой консервирования молока, хотя оно не является абсолютным, так как по истечении некоторого времени возникают новые микробиологические процессы — развиваются дрожжи и плесени.

Фаза молочнокислых бактерий охватывает то состояние молока, в котором оно перестает быть собственно молоком, а является кисломолочным продуктом. Молоко в начале этой стадии можно иногда использовать в производстве сыра или масла.

Закономерности кисломолочного процесса, обусловленные развитием молочнокислых бактерий, учитывают при производстве кисломолочных продуктов, кислосливочного масла и сыра.

Фаза развития дрожжей и плесеней. Эта фаза является заключительной во всем процессе микробиологических изменений молока. После полного ее завершения органическое вещество молока претерпевает почти полную минерализацию (разложение на неорганические вещества). Начальные стадии фазы могут наблюдаться в масле, сыре, твороге и сметане. Внешняя картина развития этой фазы выражается в том, что еще во время молочнокислой фазы на поверхности сгустка (если он не подвергается перемешиванию) образуются отдельные островки молочной плесени (*Oidium lactis*), постепенно смыкающиеся в сплошную белую пушистую пленку. В это же время появляются дрожжи рода *Mycoderma*, участвующие в образовании пленки. Позже появляются плесени родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Внешний вид и качество молока в это время изменяются сравнительно слабо. Появляется прогорклый вкус, обусловленный продуктами разложения жира, что особенно бывает заметно в кислых сливках (сметане). Появляются плесневый и дрожжевой привкусы. Через некоторое время под пленкой начинают появляться признаки пептонизации в виде слоя полупрозрачной жидкости светло-желтого или темно-бурого цвета. Слой быстро увеличивается за счет исчезающего сгустка, который в дальнейшем полностью растворяется, превращаясь в буроватую жидкость, закрытую сверху, как пробкой, толстой пленкой плесени. По мере распада белка реакция среды становится щелочной, в результате чего создаются условия для развития гнилостных бактерий.

Интересно отметить, что плесени, развиваясь во время продолжения молочнокислой фазы, разлагают белки и подщелачивают субстрат, что на время активизирует развитие отмирающих молочнокислых бактерий. Поэтому правильнее было бы сказать, что фаза плесеней «налагается» на молочнокислую, а не заменяет ее, как это имеет место между фазой смешанной микрофлоры и фазой молочнокислых бактерий.

Требования, предъявляемые к молоку. 12.06.2008 г вступил в действие Федеральный закон №88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию». Этот нормативный документ в настоящее время должен регламентировать вопросы безопасности молока и молочных продуктов и методы контроля их качества.

Согласно главе 2 «Технического регламента на молоко» условия получения от сельскохозяйственных животных молока, перевозки, реализации и утилизации сырого молока и сырых сливок, молочных продуктов промышленного производства должны соответствовать требованиям законодательства Российской Федерации о ветеринарии.

Сырое молоко должно быть получено от здоровых сельскохозяйственных животных на территории, благополучной в отношении инфекционных и других общих для человека и животных заболеваний.

Не допускается использование в пищу сырого молока, полученного в течение первых семи дней после дня получения приплода (молозивного) и в течение пяти дней до дня их запуска (стародойного) и (или) от больных животных и находящихся на карантине.

Изготовитель должен обеспечивать безопасность сырого молока в отношении отсутствия в нем остаточных количеств ингибирующих моющих, дезинфицирующих и нейтрализующих веществ, стимуляторов роста животных (в том числе гормональных препаратов), лекарственных средств (в том числе антибиотиков), применяемых в животноводстве в целях откорма, лечения скота и (или) профилактики его заболеваний.

Молоко, получаемое от разных видов сельскохозяйственных животных, за исключением коровьего молока, должно соответствовать показателям, установленным стандартами, нормативными документами федеральных органов исполнительной власти, сводами правил и техническими документами.

Массовая доля сухих обезжиренных веществ в коровьем сыром молоке должна составлять не менее чем 8,2%. Плотность коровьего молока, массовая доля жира в котором составляет 3,5%, должна быть не менее чем 1027 кг/м³ при температуре 20°C или не менее чем эквивалентное значение для молока, массовая доля жира в котором другая.

После доения сырое молоко должно быть очищено и охлаждено до температуры 4±2°C в течение 2 часов.

Допускается хранение сырого молока изготовителем при температуре 4±2° С не более чем 24 ч. с учетом времени перевозки, хранение сырых сливок при температуре не выше чем 8° С не более чем 36 ч. с учетом времени перевозки.

Во время перевозки охлажденного сырого молока и сливок к месту переработки вплоть до начала переработки температура таких продуктов не должна превышать 10°C. Сырое молоко и сырые сливки, не соответствующие установленным требованиям к их температуре, подлежат немедленной переработке.

Отбор проб. Для бактериологического исследования молока и сливок после тщательного перемешивания отбирают около 50 см³ продукта стерильным пробоотборником или черпаком в стерильную колбу, которую затем закрывают пробкой. Взятые пробы необходимо сразу же исследовать. Если взятые пробы предназначены для отправки в лабораторию, то их необходимо охладить до 5-6°C. При такой температуре можно перевозить или хранить пробы, но не более 4 ч. с момента отбора. Перед отправкой образцы пломбируют или опечатывают, оформляют сопроводительный документ, в котором указывают дату, час отбора пробы, температуру продукта, должность и подпись бравшего пробу.

Определение общего микробного числа (ОМЧ) в молоке. Количество бактерий определяют в 1 мл исследуемого молока.

Методика. 1 мл молока вносят в первую пробирку с 9 мл стерильной воды - получается первое разведение 1:10 (10⁻¹), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды - получается разведение 1:100 (10⁻²) и так далее до разведения 1:1 000 000 (10⁻⁶). Из двух последних разведений (10⁻⁵ и 10⁻⁶) по 1 мл вносят в две чашки Петри, каждую заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 45 °С МПА, перемешивают путем легкого вращательного покачивания и, после застывания агара, помещают в термостат при температуре 37°C на 24-48 ч.

Учет результатов. После этого подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке и определяют среднее арифметическое. При этом для подсчета берут те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 300 колоний. ОМЧ в 1 мл молока определяют умножением количества выросших колоний на степень разведения.

Сорт молока зависит от ОМЧ в 1 мл. СанПиН 2.3.2.1078-01 регламентирует содержание бактерий (таблица 6).

Таблица 6

Сорт молока	Количество бактерий в 1 мл молока
Высший сорт	не более 3×10^5
Первый сорт	не более 5×10^5
Второй сорт	не более 4×10^6

Определение кислотности молока. Служит одним из основных показателей санитарного качества молока, по которому при приеме осуществляется сортировка молока. Кислотность молока прямо связана с бактериальной обсемененностью. Свежее молоко имеет нейтральную реакцию и почти не содержит в своем составе молочной кислоты.

Кислотность молока обозначают в **условных градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$)**. Под **условными градусами Тернера** понимают количество миллилитров 0,1 н раствора едкого натра (калия), необходимых для нейтрализации 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой при индикаторе фенолфталеине.

Показатель титруемой кислотности позволяет установить повышение кислотности в результате размножения молочнокислых бактерий, сбрасывающих лактозу до молочной кислоты. Чем дольше хранится молоко в неохлажденном состоянии, при температуре выше $+10^{\circ}\text{C}$, тем больше в нем накапливается молочной кислоты, тем выше его кислотность. Нормальная кислотность свежего молока колеблется от 16 до 18 $^{\circ}\text{T}$. При кислотности выше 21 $^{\circ}\text{T}$, начинается первая степень порчи молока - прокисание. Такое молоко не выдерживает тепловой обработки и не может быть сырьем для выработки стандартных молочных продуктов.

Методика. В колбунносят 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и 2-3 капли 1 %-ого спиртового раствора фенолфталеина. Воду при определении кислотности добавляют для того, чтобы отчетливее уловить розовый оттенок при титровании. Затем при медленном взбалтывании содержимого колбы добавляют по каплям из бюретки 0,1 н раствор щелочи до слабо-розового окрашивания, соответствующего контрольному эталону окраски, не исчезающему в течение минуты.

Учет результатов. Количество пошедшей на титрование щелочи (отмеряют по уровню нижнего мениска на бюретке) умножают на 10 (т.е. пересчитывают на 100 мл молока). Полученное значение будет выражать кислотность молока в $^{\circ}\text{T}$.

Определение степени чистоты. Показателем санитарных условий получения молока является определение степени чистоты молока, которая характеризуется наличием механических примесей.

Методика. Из объединенной пробы отбирают 250 мл хорошо перемешанного молока в колбу, которое подогревают до температуры $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$, что способствует растворению комочков сливок, которые задерживаясь на фильтре маскируют наличие механических примесей. Фильтр помещают в

воронку и через него пропускают тщательно перемешенное молоко. По окончании фильтрации фильтр вынимают и помещают на чистый лист непромокаемой бумаги и сравнивают полученный осадок на фильтре с эталоном.

Учет результатов. В зависимости от количества механических примесей на фильтре молоко подразделяют на 3 группы чистоты (I, II, III) путем сравнения фильтра с образцом (таблица 7).

Таблица 7

Образец сравнения для определения группы чистоты молока (при фильтровании пробы объемом 250 см³)

Группа чистоты	Образец сравнения	Характеристика
Первая		На фильтре отсутствуют частицы механической примеси. Допускается для сырого молока наличие на фильтре не более двух частиц механической примеси
Вторая		На фильтре имеются отдельные частицы механической примеси (до 13 частиц)
Третья		На фильтре заметный осадок частиц механической примеси (волоски, частицы корма, песка)

Проба на редуктазу. Является косвенным методом определения общей микробной обсемененности молока, основанном на изменении биохимических показателей. Преимущество этого метода - простота и быстрота проведения анализа по сравнению с бактериологическим исследованием.

Суть этого метода заключается в том, что микроорганизмы, попавшие в молоко, в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду, наряду с другими окислительно-восстановительными ферментами, анаэробные дегидразы, которые по старой классификации называются редуктазами. Существует зависимость между общим количеством бактерий в молоке и содержанием в нем редуктазы, что позволяет использовать редуктазную пробу, как косвенный показатель бактериальной обсемененности сырого молока. Фермент редуктаза обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, которая при этом обесцвечивается.

Методика. В пробирки наливают 20 мл исследуемого молока и 1 мл рабочего раствора метиленовой сини, закрывают резиновой пробкой,

смешивают путем трехкратного переворачивания пробирки (молоко при этом окрашивается в синий цвет). Пробирки помещают в водяную баню при 37 °С. Наблюдение за изменением окраски ведут через 20 мин, через 2 ч и через 5 ч 30 мин после начала анализа. В чистом свежем молоке фермента редуктазы содержится очень мало, поэтому оно обесцвечивается долго.

Учет результатов. В зависимости от времени обесцвечивания метиленовой сини молоко относится к одному из четырех классов в соответствии с ГОСТ. Показатели классификации молока по редуктазе представлены в таблице 8.

Таблица 8

Классификация молока по редуктазе (по Колычеву Н.М., 2010)

Класс	Оценка качества молока	Продолжительность обесцвечивания	Количество бактерий в 1 мл молока
1-й	Хорошее	Свыше 5ч 30 мин	Менее 500 тыс
2-й	Удовлетворительное	Свыше 2 ч до 5ч 30 мин	От 500 тыс. до 4 млн
3-й	Плохое	Свыше 20мин до 2 ч	От 4 млн до 20 млн
4-й	Очень плохое	20 мин и менее	20 млн и более

Определение ингибирующих веществ в молоке. Молочные предприятия не принимают молоко с нейтрализующими, консервирующими веществами, содержащее антибиотики и другие ингибирующие вещества. Эти вещества задерживают или подавляют (ингибируют) развитие молочнокислых микроорганизмов, применяемых для выработки кисломолочных продуктов.

Для определения в молоке формалина, перекиси водорода, антибиотиков предложена резазуриновая проба. Сущность метода заключается в том, что микроорганизмы *S. thermophilus*, чувствительные к ингибирующим веществам, размножаясь, выделяют вещества, восстанавливающие резазурин.

Методика. К 10 мл молока добавляют 1 мл рабочего раствора резазурина и 3-4 капли термофильного стрептококка (*S. thermophilus*), чувствительного к антибиотикам. Содержимое пробирок перемешивают, молоко окрашивается в фиолетовый цвет. Пробирки ставят в водяную баню при 40°С на 45 мин.

Учет результатов. Заключение о качестве молока делают по следующим изменениям: *сине-стальной или фиолетовый цвет исследуемого молока* в пробирке указывает на наличие антибиотиков (ингибирующих веществ) в молоке. Наблюдается ингибирование размножения молочнокислого стрептококка, поэтому молочная кислота не выделяется и цвет индикатора не изменяется;

окрашивание содержимого пробирки в белый или розовый цвет указывает на то, что в молоке нет антибиотиков, молочнокислый стрептококк беспрепятственно размножается, поэтому образовавшаяся молочная кислота обесцвечивает резазурин.

Тема 5. Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясных продуктов

Доброкачественность (свежесть) мяса оценивают по результатам органолептического, биохимического, бактериоскопического и микробиологического исследований согласно ГОСТам.

Органолептическое исследование мяса

Органолептические свойства мяса определяют по состоянию мяса, жира и костного мозга

Органолептические свойства мяса	Санитарное заключение по качеству мяса		
	Пригодное	Условно годное	Непригодное
Цвет, внешний вид	Красное, блестящее, влажное	Темно-красное, сухое	Серо-зеленое, слизистое
Консистенция	Упругая	Упругость снижена, мясо липкое	Мягкая, ямка не выравнивается
Состояние жира	Белый, хрупкий	Серый, мажущийся	Серый, липкий и покрыт плесенью
Состояние костного мозга трубчатых костей	Цвет желтый, заполняет всю полость кости	Темный, отстает от костей, объем уменьшен	Темный, отстает от костей, объем уменьшен
Запах	Приятный мясной	Кисловатый	Гнилостный

Биохимическое исследование включает определение pH мяса ; постановку качественной реакции на пероксидазу; реакция с 5% раствором сернокислой меди, а говядину исследуют реакцией с нейтральным формалином (формольная проба), а также проводят пробу

варки. Определение рН мяса можно определять колориметрическим методом.

Оценка свежести мяса:

Качество мяса	рН	Бактериоскопическая картина
1. Свежее	5,6-6,2	В мазках-отпечатках микробов нет или имеются единичные бактериальные клетки на поверхности мяса
2. Пониженной свежести	6,3-6,5	В мазках-отпечатках из глубины мяса обнаруживают 20-30 кокков и единичные палочки, на поверхности - несколько десятков клеток в поле зрения. Имеются распавшиеся мышечные волокна
3. Несвежее	6,6 и выше	В мазках-отпечатках с поверхности и с глубины мяса выявляются масса клеток с преобладанием палочек, имеется множество распавшихся мышечных волокон

Бактериоскопическое исследование выполняют следующим образом: готовят мазки-отпечатки с поверхности мяса, с глубины 2-2,5 см и 3-4 см, окрашивают их по Граму. В каждом мазке изучают не менее 5-ти полей зрения, в которых подсчитывают число бактерий и отмечают изменения.

Определение количества КМАФАнМ в мясе

Каждый представленный к исследованию образец (мышцы, лимфатические узлы, паренхиматозные органы) перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в спирт и два раза обжигают с поверхности. Затем стерильными ножницами из глубины различных мест каждого образца вырезают кусочки

размером не менее 2,0х1,5х2,5 см; лимфатические узлы разрезают пополам. Затем все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами.

Для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных органов (печени, почки и селезенки). Каждую пробу в отдельности помещают в стерильный стакан (колбу) гомогенизатора для приготовления взвеси. Для этого в стакан (колбу) добавляют по 15 см физиологического раствора, количество которого равно массе каждой пробы, и гомогенизируют пробы в электрическом гомогенизаторе. Вначале измельчают материал замедленной частотой оборотов, затем с большей частотой оборотов не более 2,5 мин (в зависимости от числа оборотов).

Полученные взвеси отстаивают 10 мин. Из верхней части надосадочной жидкости готовят ряд последовательных разведений 1:10, 1:100, 1:1000 и по 1 мл из каждого разведения вносят параллельно в 2 чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до 45-50⁰С МПА. Каждую чашку тщательно перемешивают, охлаждают, переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате 72 часа при 30⁰С.

Индикация кишечной палочки

Для выявления наличия БГКП в определенной навеске мяса, готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе с таким расчетом, чтобы в посевах на плотных питательных средах получить изолированные колонии. Затем по 1 мл различных разведений вносят в жидкие селективные питательные среды (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью или в среду Кесслера). Посевы выдерживают в термостате при 37⁰, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный – через 48 ч по интенсивному росту микроорганизмов, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета индикатора (в результате подкисления pH).

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к БГКП проводят высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Смирнова). Инкубируют в термостате в течение 24 ч. На агаре Эндо они образуют красные колонии с металлическим блеском (и без), на среде Смирнова – желтые колонии с

изменением среды в тот же цвет. Для более быстрого получения результатов разрешено проводить первичный посев 0,1 мл исходного или 10-кратного разведения непосредственно на плотные питательные среды, что позволяет сделать заключение о наличии (отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта через 24 ч. Для этого отбирают чашки с посевами, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства.

Метод выявления бактерий рода *Salmonella*

Бактерии рода *Salmonella* могут присутствовать в продукте в небольшом количестве вместе с большим количеством других бактерий из семейства Enterobacteriaceae или других семейств. Поэтому предварительное обогащение необходимо для выявления небольшого числа бактерий рода *Salmonella* или сублетально поврежденных бактерий рода *Salmonella*.

Определяют наличие (отсутствие) сальмонелл и их количество в навеске продукта массой 25 г. Для этого готовят измельченную навеску массой 25 г, вносят ее в колбу с 225 мл среды обогащения (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате (соответственно при температуре +37 или +42_С) в течение 24–48 ч.

При появлении роста на средах обогащения из них делают пересев на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (агар Эндо, Левина, ВСА) по секторам для получения изолированных колоний.

Посевы выдерживают в термостате 24 ч при температуре +37_С, исследуют на наличие колоний, подозрительных по своим характеристикам — на сальмонеллы. Сальмонеллы, как не ферментирующие лактозу микроорганизмы, в подавляющем большинстве дают типичный рост на дифференциально-диагностических средах:

- Эндо (фуксин-сульфитный агар) — круглые, бесцветные колонии;
- Левина — прозрачные, нежно-розовые колонии;
- Смирнова — прозрачные, серовато-фиолетовые колонии;
- Плоскирева — бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо;

-висмут_сульфитном агаре (ВСА), который применяется для **целенаправленного выделения сальмонелл**, — как правило, черные или коричневые колонии с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, в частности, *S. typhisuis*, растущие на ВСА в виде светло-зеленых колоний. Из колоний, подозрительных на сальмонеллы, готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают культуральные и ферментативные свойства. У всех подозрительных культур определяют антигенную структуру, устанавливают род и идентифицируют до вида.

Сальмонеллы — грамотрицательные палочки; подвижные, за исключением *S. pullorum_gallinarum*; не ферментируют лактозу и сахарозу; расщепляют глюкозу и маннит; выделяют сероводород; не образуют индол.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют сальмонеллы в 25 г исследуемого мяса.

Качество мяса и мясопродуктов после проведения микробиологического анализа оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН), по которым в 25 г мяса не допускается присутствие патогенных бактерий, в том числе сальмонелл и листерий.

Библиография

- 1.Радчук Н.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М. и др. Ветеринарная микробиология и иммунология. ... М.: Агропромиздат, 1991. — 384 с.
- 2.Микробиологический контроль мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки /С.А. Артемьева, Т.Н. Артемьева, А.И. Дмитриев, В.В. Доротина // М.: Колос, 2002.- 288 с.
- 3.Дячук Т.И. Экологическая оценка качества мяса по микробиологическим показателям / Т.И. Дячук, В.Н. Кисленко // Практик. –2006.- № 4.- С. 32-35.
- 4.Санитарная микробиология/ Госманов Р.Г., Волков А.Х.,Галиуллин А.К. Ибрагимова А.И/ Издательство «Лань»2018.-252с.
- 5.Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований/А.С. Лабинская, Л.П.Блинкова, А.С.Ещина//М.:Медицина,2004-575с.
6. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. Учебник для вузов. М.: Колос. 2000 – 413.
7. Антипова Л.В., Глотова И.А. , Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. М.:Колос, 2011

Ветеринарно-санитарные исследования микрофлоры окружающей
среды и пищевых продуктов

Методическое пособие к практическим занятиям

Составители: Колганова Ольга Арсентьевна
Кречетова Валерия Николаевна.
Юдина Наталья Владимировна

В авторской редакции