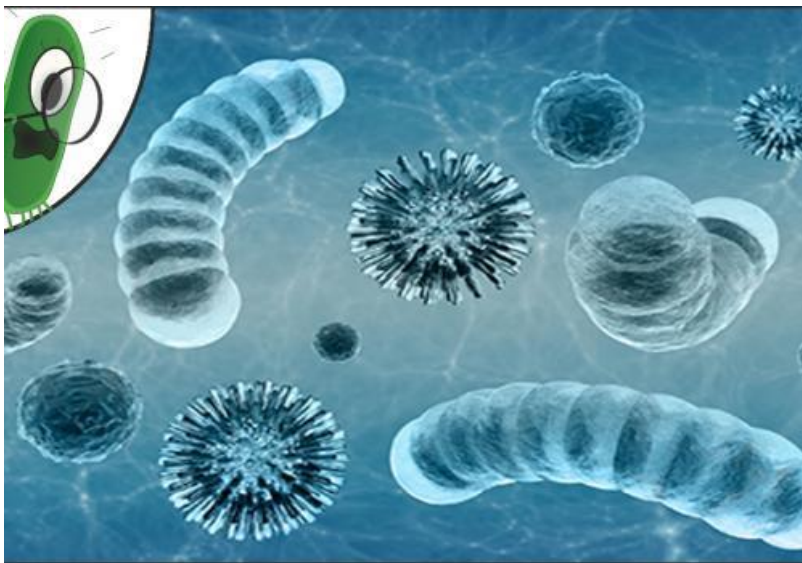




САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Методичні вказівки для студентів II–III курсів спеціальності «Медицина», «Стоматологія» освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр»

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Харківський національний медичний університет

САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

***Методичні вказівки для студентів II–III курсів
спеціальності «Медицина», «Стоматологія»
освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр»***

Затверджено
Вченою радою ХНМУ.
Протокол № 3 від 25.02.2021.

**Харків
ХНМУ
2020**

Санітарна мікробіологія : метод. вказ. з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія» для студентів-магістрів II–III курсів за спеціальністю «Медицина», «Стоматологія» освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр» / упоряд. Н. І. Коваленко, Г. М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2021. – 48 с.

Упорядники Н. І. Коваленко
 Г. М. Замазій

Обґрунтування теми

Мікроби поширені всюди в навколишньому середовищі. Вони знаходяться у ґрунті, повітрі, воді, рослинах, тваринах, харчових продуктах, різному посуді, в організмі людини та на поверхні людського тіла. Взаємозв'язок мікроорганізмів із навколишнім середовищем отримав назву екологія (гр. *oikos* — рідний край, будинок, маєток і *logos* — наука). Вивчення екології мікроорганізмів є основою для розуміння паразитизму, інфекційних захворювань, а також для розробки заходів боротьби з ними.

Санітарна інспекція навколишнього середовища, аналіз даних та їх інтерпретація — найважливіші елементи, що характеризують мікробіологічну безпеку. Вона дозволяє виявити джерела інфекції, а дані мікробіологічної якості води, повітря, лікарських засобів, продуктів харчування, ґрунту тощо підтверджують наявність небезпеки.

Все частіше виникають шпитальні інфекції, спричинені патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами. Все це вимагає розробки нових і вдосконалення існуючих методів лабораторного дослідження мікрофлори води, повітря, ґрунту, інших об'єктів навколишнього середовища, харчових продуктів. Важливого значення набуває визначення дисбактеріозів людини, носійства золотистих стафілококів, менінгококів, збудників дифтерії, холери, черевного тифу, дизентерії. Лікар будь-якого профілю повинен знати, як правильно взяти досліджуваний матеріал, доставити його до профільної лабораторії, провести мікробіологічне дослідження, правильно оцінювати його результати.

МЕТА

Загальна: оволодіти методами мікробіологічного дослідження об'єктів навколишнього середовища.

Конкретна:

а) знати:

1) правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила — ДСП 9.9.5.03599);

б) вміти:

1) підготувати робоче місце;

2) дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою;

3) відбирати та транспортувати матеріал для дослідження;

4) готувати матеріал для мікробіологічного дослідження;

5) досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення санітарно-показових і патогенних мікроорганізмів;

6) давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення теми: музейні мікропрепарати, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас, презентація.

ПРЕДМЕТ І ЗАВДАННЯ САНІТАРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

У біосфері Землі практично відсутні середовища, позбавлені мікроорганізмів. Життєдіяльність їх здійснює вагомий внесок у кругообіг основних життєво важливих елементів — вуглецю, азоту, сірки, фосфору та ін., а також підтримує динамічну рівновагу в біосфері.

Санітарна мікробіологія (СМ) — розділ медичної мікробіології, що вивчає мікрофлору навколишнього середовища та її вплив на здоров'я людини й стан довкілля. При цьому слід пам'ятати, що людина й теплокровні тварини є основним резервуаром збудників більшості інфекційних захворювань і переважна кількість збудників передається за допомогою повітряно-краплинного і фекально-орального механізмів.

Об'єктами вивчення санітарної мікробіології є:

- потенційно патогенні й санітарно-показові мікроорганізми зовнішнього середовища;
- фізичні, хімічні та біологічні фактори зовнішнього середовища, що сприяють або перешкоджають існуванню цих груп мікроорганізмів у зовнішньому середовищі та їх проникненню в організм людини.

Санітарно-мікробіологічний контроль об'єктів зовнішнього середовища — це найважливіший розділ державного санітарного контролю. Основною його метою є профілактика інфекційних захворювань людини, оскільки різні об'єкти зовнішнього середовища — вода, ґрунт, повітря, інвентар, одяг та ін., забруднені хвороботворними мікроорганізмами, можуть сприяти передачі збудників захворювання від хворої людини до здорової.

Завдання СМ:

- 1) раннє виявлення патогенної мікрофлори в зовнішньому середовищі;
- 2) вивчення життєдіяльності мікроорганізмів у зовнішньому середовищі;
- 3) вивчення біоценозів, у яких існують патогенні для людини мікроби, закономірностей кругообігу потенційно небезпечних для людини мікробів між популяціями людей, тварин і об'єктами навколишнього середовища;
- 4) оцінка шляхів впливу людини й тварин на навколишнє середовище — у результаті промислової та індивідуальної діяльності людей відбувається контамінація об'єктів навколишнього середовища патогенними мікроорганізмами, при цьому особлива увага приділяється вивченню порушень процесів самоочищення води, ґрунту;
- 5) розробка методів мікробіологічних досліджень об'єктів зовнішнього середовища й мікробіологічних нормативів, які визначають відповідність якісного та кількісного складу мікрофлори конкретних об'єктів зовнішнього середовища гігієнічним вимогам;

б) висування рекомендацій із метою оздоровлення зовнішнього середовища за допомогою санітарно-гігієнічних заходів і оцінки їх ефективності.

ПРИНЦИПИ ПРОВЕДЕННЯ САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Правильний забір проб. Його проводять із дотриманням усіх необхідних умов, регламентованих для кожного досліджуваного об'єкта. Забір проб здійснюють із дотриманням правил стерильності; при транспортуванні слід створити оптимальні умови, що дозволяють уникнути спотворення результатів. Дослідження необхідно проводити швидко, при неможливості негайного проведення аналізу матеріал зберігають у холодильнику не довше 6–8 год.

2. Серійність проведених аналізів. Більшість досліджуваних об'єктів містять найрізноманітніші мікроорганізми, які розподілені вкрай нерівномірно й перманентно перебувають в антагоністичних взаєминах. Відповідно для отримання адекватних результатів проводять забір серії проб із різних ділянок об'єкта. У лабораторії зразки змішують, потім точно відміряють необхідну кількість матеріалу (зазвичай середнє по відношенню до досліджуваного матеріалу в цілому).

3. Повторність відбору проб. Як правило, в досліджуваних об'єктах склад мікрофлори змінюється досить швидко, крім того, патогенні мікроорганізми розподіляються в них нерівномірно. Відповідно повторний відбір дозволяє отримати більш адекватну інформацію щодо контамінації субстратів.

4. Застосування тільки стандартних і уніфікованих методів дослідження. Використання підходів, затверджених стандартами та інструкціями, що дає можливість отримати порівняльні результати в різних лабораторіях.

5. Використання комплексу тестів. Отримання більш адекватної інформації можливо при залученні прямих (які виявлятимуть патогени) та непрямих (вказують на забруднення об'єктів навколишнього середовища виділеннями людини і тварин і його ступеня) методів.

6. Проведення оцінки об'єктів за сукупністю отриманих результатів. Інтерпретацію результатів санітарно-мікробіологічних досліджень слід проводити з урахуванням інших гігієнічних показників (органолептичних, хімічних, фізичних та ін.).

ОСНОВНІ ГРУПИ САНІТАРНО-ПОКАЗОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Об'єктами вивчення СМ є, з одного боку, потенційно патогенні й санітарно-показові мікроорганізми (СПМ) зовнішнього середовища, з іншого – фізичні, хімічні та біологічні фактори зовнішнього середовища, що сприяють або перешкоджають існуванню цих груп мікроорганізмів у зовнішньому середовищі та їх проникненню в організм людини.

Санітарно-показові мікроорганізми (СПМ) – це мікроорганізми, за якими можна опосередковано судити про можливу присутність патогенів у зовнішньому середовищі (*табл. 1*). Тобто при їх визначенні виходять із припущення, що чим більше об'єкт забруднений екстрактами людини і тварин, тим більше буде санітарно-показових мікроорганізмів і тим імовірніше присутність патогенів. До санітарно-показових мікроорганізмів належать представники облигатної мікрофлори людини й теплокровних тварин, для яких місцем існування є кишечник або дихальні шляхи. Всі СПМ розцінюють як індикатори біологічного забруднення.

Таблиця 1

Санітарно-показові мікроорганізми довкілля та харчових продуктів

Об'єкт	Характер забруднення	Санітарно-показові мікроорганізми
Вода	Фекальне	Бактерії групи кишкової палички: <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
ґрунт	Фекальне	Ті ж бактерії та клостридії (<i>Clostridium perfringens</i>)
	Промислове-побутове (відходи, які розкладаються)	Термофільні бактерії та <i>Proteus vulgaris</i>
Повітря	Краплинне	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
Харчові продукти	Фекальне	Бактерії групи кишкової палички: <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. vulgaris</i>
	Краплинне	<i>Staphylococcus aureus</i>
Предмети побуту	Фекальне	Бактерії групи кишкової палички: <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>P. vulgaris</i> і <i>E. faecalis</i>
	Краплинне	<i>Staphylococcus aureus</i>

Основні характеристики СПМ

1. Мікроорганізм повинен постійно жити в порожнинах людини і тварин і постійно виділятися у великій кількості з калом або краплинками слизу з дихальних шляхів у зовнішнє середовище.

2. Мікроб не повинен розмножуватися в зовнішньому середовищі (включаючи харчові продукти), або його репродукція має незначний чи короткочасний характер.

3. СПМ повинні зберігатися в навколишньому середовищі протягом тих же термінів, як і патогенні бактерії, що паразитують у кишечнику та дихальних шляхах.

4. Стійкість СПМ у зовнішньому середовищі повинна бути аналогічною або перевищувати таку у патогенних мікроорганізмів.

5. Мікроб не повинен змінювати свої властивості в зовнішньому середовищі, в усякому разі в терміни виживання патогенних мікроорганізмів.

СПМ умовно поділяються на 3 групи

1. Група А містить мешканців кишечника людини й тварин. Мікроорганізми цієї групи розцінюють як індикатори фекального забруднення. До неї належать т. зв. бактерії групи кишкових паличок (БГКП), які належать до різних родів сімейства *Enterobacteriaceae* (ешерихії, сальмонели, протеї), а також ентерококи, клостридії, термофіли, бактеріофаги, бактероїди, синьогнійна паличка.

Виявлення *E.coli* в різних об'єктах навколишнього середовища, харчових продуктах вважається найбільш достовірним показником свіжого фекального забруднення. Наявність у цих же об'єктах бактерій родів *Citrobacter* і *Enterobacter* вказує на відносно давнє фекальне забруднення.

Присутність *C.perfringens*, *C.sporogenes* та інших клостридій у ґрунті свідчить про її фекальне забруднення, причому як свіже, так і давнє, оскільки ці бактерії утворюють спори, що дозволяє їм тривалий час переживати в навколишньому середовищі (зокрема, в ґрунті).

Виявлення в об'єктах навколишнього середовища *Enterococcus faecalis* також свідчить про їх свіже фекальне забруднення.

До термофільних бактерій належать групи різних бактерій (*Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* та ін.), що розмножуються при температурі 60 °С і вище. Вони не перебувають постійно в кишечнику людини й не є критерієм фекального забруднення навколишнього середовища. Різке збільшення їх кількості в компості може свідчити про забруднення ґрунту відходами, які розкладаються.

Бактерії роду *Proteus* належать до родини *Enterobacteriaceae* і виявлення їх у харчових продуктах свідчить про гнильний процес.

2. Група В включає мешканців верхніх дихальних шляхів і носоглотки. Мікроорганізми даної групи розцінюють як індикатори орального забруднення. До її складу належать зеленіючий, α - і β -стрептококи, стафілококи (плазмокоагулюючий, лецитиназо-позитивні, гемолітичні).

Гемолітичні стрептококи *Streptococcus pyogenes* є транзитними мешканцями носоглотки й зів, вони виділяються з краплинками слизу орально-краплинним шляхом. Терміни виживання їх у навколишньому середовищі практично не відрізняються від термінів, характерних для більшості збудників інших повітряно-краплинних інфекцій. Виявлення гемолітичних стрептококів у повітрі приміщень вказує на можливе його забруднення мікроорганізмами, що містяться у верхніх дихальних шляхах людини та є збудниками повітряно-краплинних інфекцій.

S.aureus є факультативним мешканцем носоглотки, зіва, а також шкірних покривів людини. Його присутність у повітрі приміщень або на предметах, що там знаходяться, є показником орально-краплинного забруднення.

Одночасне виявлення золотистого стафілокока й гемолітичних стрептококів свідчить про високий ступінь забруднення повітря.

3. Група С містить сапрофітні мікроорганізми, що мешкають у зовнішньому середовищі. Їх розцінюють як індикатори процесів самоочищення. До її складу належать бактерії-протеоліти, бактерії-амоніфікатори й бактерії-нітрифікатори, деякі спороутворюючі бактерії, гриби, актиноміцети, целюлозобактерії й синьо-зелені водорості.

МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Базові санітарно-мікробіологічні методи спрямовані на визначення загального мікробного обсіменіння (загальне мікробне число), визначення та титрування СПМ, виявлення в досліджуваних об'єктах патогенних мікроорганізмів і їх метаболітів, визначення ступеня недоброякісності досліджуваних об'єктів або продуктів, викликаной діяльністю мікробів. *Практична санітарна мікробіологія використовує два основні методи оцінки санітарно-епідемічного стану зовнішнього середовища: пряме виявлення патогенних мікроорганізмів і виявлення непрямих ознак перебування патогенів у зовнішньому середовищі.*

Методи, які використовують у санітарній мікробіології, можна розділити на 2 групи: прямі і непрямі.

Методи прямого виявлення патогенних мікроорганізмів

Прямі методи передбачають безпосереднє виявлення збудників інфекційних хвороб або їх токсинів у об'єктах навоколишнього середовища.

Для визначення патогенних мікроорганізмів можуть бути використані наступні методи:

- прямий посів досліджуваного матеріалу на живильні середовища;
- попередня концентрація патогенних мікроорганізмів пропусканням досліджуваного об'єкта (рідкої консистенції) через мембранні фільтри або посівом у середовища накопичення;
- виявлення патогенних мікроорганізмів методом зараження чутливих тварин (біопроба);
- застосування прискорених методів: серологічних, імунолюмінесцентного й радіоімунного аналізів.

Методи прямого виявлення – найбільш точні й надійні критерії оцінки епідеміологічної небезпеки зовнішнього середовища. Найчастіше проводять *посів досліджуваного матеріалу на живильні середовища*. Однак на очікувані результати впливають такі чинники.

- Наявність патогенних мікроорганізмів у зовнішньому середовищі відносно невелика, оскільки вони складають лише 1/30 000 усього видового складу мікрофлори зовнішнього середовища. При цьому патогенна мікрофлора розподілена в зовнішньому середовищі нерівномірно, що робить необхідним проведення серійних досліджень у динаміці певного періоду.

- Виділення одного виду збудника далеко не завжди свідчить про присутність інших патогенних видів. Зазначене робить необхідним проведення різноспрямованих досліджень, що практично складно здійснити. Ситуацію значно погіршує зростання ролі умовно-патогенних мікроорганізмів, здатних викликати епідемічні спалахи захворювань.

Незважаючи на те, що на сьогодні розроблені методи прямого, прискореного й кількісного визначення потенційно патогенних мікробів, даний метод має цілий ряд недоліків. До них належать такі:

- патогенні мікроорганізми знаходяться в навколишньому середовищі не постійно – порівняно легко їх можна виявити в період епідемії тієї чи іншої інфекції, але дуже важко в міжепідемічному періоді; основна ж діяльність санітарних мікробіологів спрямована на попередження виникнення епідемій і тому вся робота ведеться в міжепідемічний період;

- концентрація патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі значно поступається непатогенним і поширення їх в об'єктах нерівномірне;

- при виділенні патогенних мікроорганізмів методами культивування на поживних середовищах, навіть інгібіторних, вони неминуче страждають від конкуренції сапрофітної флори.

У зв'язку з вищевикладеним, одержані негативні результати прямого визначення патогенних мікроорганізмів у об'єктах навколишнього середовища ще не свідчать достовірно про їх відсутність.

Методи непрямой ідентифікації

Виявлення в об'єктах зовнішнього середовища патогенних мікроорганізмів є показником епідеміологічної небезпеки. Оскільки пряме їх виявлення пов'язане з рядом труднощів, насамперед через низьку концентрацію даних мікроорганізмів, у санітарно-мікробіологічній практиці застосовують непрямі методи, засновані на визначенні мікробного обсіменіння того чи іншого об'єкта й на виявленні в ньому *санітарно-показових мікроорганізмів*.

Використовують 2 критерії, за якими можна опосередковано судити про можливу присутність збудника в зовнішньому середовищі: загальне мікробне число і вміст санітарно-показових мікроорганізмів.

Про мікробне обсіменіння судять за *загальним мікробним числом (ЗМЧ)* – загальною кількістю мікроорганізмів, що містяться в одиниці об'єму або маси досліджуваного об'єкта (1 см³ води, 1 г ґрунту, 1 м³ повітря). Використовуючи цей критерій, зазвичай виходять із припущення, що чим

більше об'єкт забруднений органічними речовинами, тим вище ЗМЧ і тим імовірніше присутність патогенів. Наприклад, ЗМЧ для води не повинно перевищувати 100. Однак це не завжди так: ЗМЧ може бути більшим за рахунок сапрофітів, а патогени можуть бути відсутніми, або переважання сапрофітів значно вкорочує терміни виживання патогенів у зовнішньому середовищі. Тому більш адекватно розцінювати ЗМЧ як показник інтенсивності забруднення зовнішнього середовища органічними речовинами.

Вміст СПМ визначають двома методами.

1. Прямий підрахунок кількості бактерій проводять за допомогою спеціальних камер або спеціальних електронних лічильників. Метод застосовується в екстрених випадках при необхідності термінової відповіді про кількісний вміст бактерій (наприклад, при аваріях у системі водопостачання, при оцінці ефективності роботи очисних споруд та ін.).

Посів на поживні середовища. Менш точний метод, тому що виявляє тільки групи мікроорганізмів, що ростуть при заданому режимі (на певних поживних середовищах і при певній температурі).

Вміст СПМ оцінюється за двома показниками – титром та індексом. **Титр СПМ** – це той мінімальний об'єм досліджуваного матеріалу (в мілілітрах) або вагова кількість (у грамах), у яких можна знайти хоча б одну особину СПМ. **Індекс СПМ** – кількість особин СПМ, що містяться в певному об'ємі (кількості) досліджуваного матеріалу (1 л рідини, 1 г щільних речовин, 1 м³ повітря). Індекс – величина, зворотна титру; знаючи один показник, можна обчислити інший.

САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВІТРЯ

Основне завдання санітарно-бактеріологічного дослідження повітря – гігієнічна та епідеміологічна оцінка повітряного середовища, а також розробка комплексу заходів, спрямованих на профілактику аерогенної передачі збудників інфекційних хвороб. При оцінці санітарного стану закритих приміщень залежно від завдань дослідження визначають ЗМЧ, наявність СПМ (стафілококів, α - і β -гемолітичних стрептококів), які є показниками контамінації мікрофлорою носоглотки людини.

Мікробна забрудненість повітря має непостійний характер, тобто мікрофлора повітря залежить від місця й часу забору проб. Улітку забрудненість повітря в кілька разів вища, ніж взимку. Особливо насичене атмосферне повітря мікроорганізмами над великими містами. При розгляді якісного складу мікрофлори слід розрізняти мікрофлору атмосферного повітря й повітря закритих приміщень, яка значно різниться за кількісним і якісним складом. Бактеріальна забрудненість закритих приміщень завжди перевищує забрудненість атмосферного повітря, в т. ч. патогенними мікроорганізмами, що потрапляють у повітря від хворих людей, тварин і бактеріоносіїв.

Мікрофлора атмосферного повітря. В атмосферному повітрі СПМ (стафілококи і стрептококи) виявляють лише в 3,7 % проб, узятих у місцях великого скупчення людей. Серед мікроорганізмів домінують види, що мешкають у ґрунті.

В атмосферному повітрі в основному зустрічаються три групи мікроорганізмів:

1) пігментують коки, вміст яких у сонячні дні складає до 70–80 % всієї флори (пігмент захищає бактерії від інсоляції);

2) ґрунтові спорові й гнильні мікроорганізми, вміст яких різко збільшується в суху й вітряну погоду;

3) пліснява й дріжджі, вміст яких збільшується при підвищенні вологості повітря.

Мікрофлору повітря умовно поділяють на резидентну (виявляють більш часто) і тимчасову, менш стійку до впливу різних чинників (виявляють спорадично).

Постійна мікрофлора повітря формується за рахунок ґрунтових мікроорганізмів. Відносно регулярно до її складу належать *Micrococcus roseus*, *M.flavus*, *M.candicans*, *Sarcina flava*, *S.alba*, *S.rosea*, *Bacillus subtilis*, *B.mycoides*, *B.mesentericus*, види *Actinomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* та ін.

Тимчасова мікрофлора повітря формується переважно за рахунок мікроорганізмів ґрунту, а також за рахунок видів, що надходять із поверхні водойм. Циркулюючи в атмосферному повітрі мікроорганізми перманентно перебувають під впливом сонячних променів, коливань температури, змін швидкості й напрямку вітру, атмосферних опадів тощо. Тому мікрофлора повітря дуже динамічна й піддається безперервному оновленню.

На відміну від повітря закритих приміщень, в атмосферному повітрі постійно відбуваються процеси самоочищення завдяки опадам, інсоляції, температурним впливам та іншим факторам. У свою чергу, атмосферне повітря само по собі є фактором очищення повітря закритих приміщень.

Мікрофлора повітря закритих приміщень більш одноманітна й відносно стабільна. Серед мікроорганізмів домінують мешканці носоглотки людини, в т. ч. патогенні види, які потрапляють у повітря при кашлі, чханні або розмові. Основне джерело забруднення повітря патогенними видами – бактеріоносії. Рівень мікробного забруднення залежить головним чином від щільності заселення, активності руху людей, санітарного стану приміщення, в т. ч. пилової забрудненості, вентиляції, частоти провітрювання, способу збирання, ступеня освітленості та інших умов. Самоочищення повітря закритих приміщень не відбувається.

Стафілококи (*S.aureus*), а також зеленіючий і гемолітичний стрептококи є санітарно-показовими мікроорганізмами забруднення повітря закритих приміщень. Джерелами забруднення патогенними стрептококами і стафілококами є хворі люди, які страждають на хронічну інфекцію, і здорові

люди-носії. У зовнішньому середовищі стрептококи зберігають життєздатність протягом приблизно тих же термінів, що й збудники дифтерії, а стафілококи – навіть довше. Чим більшу кількість стрептококів виявляють у повітряному середовищі, тим імовірніша можливість зараження людини повітряно-краплинними інфекціями. Наростання обсіменіння повітря *S.aureus* і часте його виявлення свідчать про санітарно-епідеміологічне неблагополуччя. У лікувальних установах вторинним джерелом обсіменіння повітря золотистим стафілококом можуть бути забруднені постіль, білизна, з яких ці мікроорганізми потрапляють у повітря. Найбільш повну картину повітряно-краплинного забруднення повітря дає визначення і стрептококів, і стафілококів. Однак з огляду на те, що стрептококи досить важко культивувати, в лабораторній практиці обмежуються виділенням *S.aureus*.

Умови циркуляції мікроорганізмів у повітрі. Контамінація повітря патогенними мікроорганізмами відбувається в основному краплинним шляхом у складі аерозолі, що утворюється при розмові, кашлі, чханні. Рідше мікроби потрапляють у повітря з епітелієм шкірних покривів, з пилом забрудненої постільної білизни й зараженого ґрунту. Аерозоль є колоїдною системою, що складається з повітря, краплин рідини або твердих частинок, що містять різні мікроорганізми. Розмір аерозольних часток може бути різним (від 10–100 до 2000 нм). При чханні може утворюватися до 40 000 краплин. Залежно від розміру краплин, їх електричного заряду, швидкості руху в повітрі виділяють три основні фази бактеріального забруднення.

Краплинна, чи великоядерна фаза складається з бактеріальних клітин, оточених водно-сольовою оболонкою. Діаметр частинок близько 0,1 мм і більше. Частинки осідають досить швидко: тривалість перебування в повітрі становить кілька секунд, а максимальна швидкість пересування – в середньому 30 см/с.

Дрібноядерна фаза утворюється при висиханні частинок і складається з бактеріальних клітин, що зберегли тільки хімічно зв'язану воду на своїй поверхні й вільну воду всередині клітин. У цій фазі частинки мають найменші розміри, легко переміщуються потоками повітря, тривалий час перебувають у ньому в підвішеному стані. Це найбільш стійка фаза, тому що діаметр більшості частинок не перевищує 0,05 мм, а швидкість осідання частинок становить у середньому 0,013 см/с. При цьому швидкість їх пересування перевищує 30 см/с, тому вони можуть розсіюватися на великі відстані. Ця фаза є найбільш епідеміологічно небезпечною, оскільки до її складу належить більшість збудників повітряно-краплинних інфекцій, особливо малостійких до зовнішніх впливів (наприклад, збудник коклюшу).

Фаза "бактеріального пилу". З перших двох фаз бактерії можуть переходити до складу більш великих частинок, які осідають у вигляді пилу на різних предметах, утворюючи т. зв. «бактеріальний пил». Важливою особливістю є здатність легко диспергувати під впливом навіть малих

потоків повітря. Розмір частинок варіює від 0,01 до 1 мм. Залежно від розміру частинок і швидкості повітряних течій, швидкість їх переміщення знаходиться в межах 0,5–30 см/с. Унаслідок тривалого перебування в підвішеному стані й здатності частинок проникати в дистальні відділи легень дрібнодисперсний «бактеріальний пил» також представляє епідеміологічну небезпеку. Ця фаза бактеріального аерозолі переважає в повітрі закритих приміщень і з нею розсіюються патогенні мікроорганізми, стійкі до висушування (мікробактерії, клостридії, стафілококи, стрептококи, гриби).

Санітарно-показові мікроорганізми повітря закритих приміщень. До СПМ повітря відносять золотистий стафілокок, стрептококи, грамнегативні бактерії, гриби. Санітарно-мікробіологічні показники повітря нормуються залежно від типу і призначення приміщень (табл. 2).

Таблиця 2

Допустимі рівні мікробного обсіменіння повітря приміщень деяких відділень стаціонарів

Місце відбору проб	Час відбору проб	Результати дослідження (КУО/м ³)		
		Загальна кількість мікроорганізмів	1 м ³ повітря	
			Золотистий стафілокок	Грамнегативні бактерії
Операційний блок	До роботи	Не більше 100	Відсутній	Відсутній
	Після роботи	Не більше 1000	Відсутній	Відсутній
Реанімаційне відділенні (палати)	Підготовані до роботи	Не більше 1000	Не більше 4	Відсутній
Процедурна	До роботи	Не більше 50	Відсутній	Відсутній
	Під час роботи	Не більше 1000	Не більше 1–2	Не більше 1–2

У повітрі лікарняних приміщень домінують золотистий стафілокок і стрептококи. При цьому в 1 м³ повітря операційних залів, післяопераційних палат, перев'язувальних, відділень реанімації, пологових залів вони повинні бути відсутніми.

У зв'язку зі зростанням частоти захворювань, що викликаються грамнегативними бактеріями, у нормативи включено визначення їх кількості в 1 м³ повітря приміщень лікувальних установ.

Особливий випадок – повітря аптечних приміщень, де через наявність антимікробних препаратів можуть швидко гинути бактерії, але зберігатися гриби, тому їх обов'язково необхідно виявляти при дослідженні повітря аптек.

Додаткові критерії. Як показник запиленості та відсутності вологого прибирання розцінюють присутність спороутворюючих паличок, а показником вологості є наявність цвілевих грибів. Показник поганої освітленості – відсутність пігментуючих форм бактерій (іноді цей показник може бути визначений за завданням фтизіатрів).

При санітарно-бактеріологічному дослідженні повітря проводять наступне:

- 1) визначення загального бактеріального обсіменіння повітря (загальне число бактерій в 1 м³);
- 2) виявлення санітарно-показових мікроорганізмів;
- 3) за епідемічними показаннями – виділення вірусів і патогенних бактерій із повітря закритих приміщень;
- 4) при дослідженні атмосферного повітря – додаткове визначення якісного складу мікрофлори з урахуванням наявності спороутворюючих аеробів і анаеробів, які є показниками забрудненості повітря мікроорганізмами ґрунту.

При оцінці санітарного стану закритих приміщень залежно від завдань дослідження визначається загальне мікробне число, присутність санітарно-показових мікроорганізмів (стафілококів, α - і β -гемолітичних стрептококів), а також безпосередньо патогенних мікроорганізмів (залежно від характеру приміщень – мікобактерій туберкульозу, коринебактерій дифтерії, дріжджів і міцеліальних грибів та ін.). Наприклад, при дослідженні повітря медичних установ визначається присутність мікроорганізмів, що відносяться до умовно-патогенної флори (синьогнійна паличка, бактерії роду *Proteus* та інші грамнегативні палички), що викликають внутрішньолікарняні інфекції.

Санітарно-мікробіологічне дослідження повітря можна розділити на 4 етапи:

- 1) відбір проб;
- 2) обробка, транспортування, зберігання проб, отримання концентрату мікроорганізмів (якщо необхідно);
- 3) бактеріологічний посів, культивування мікроорганізмів;
- 4) ідентифікація виділеної культури (визначення патогенних і санітарно-показових мікроорганізмів, ЗМЧ).

Правильне взяття проб гарантує точність дослідження. У закритих приміщеннях точки відбору проб встановлюються з розрахунку на кожні 20 м² площі – одна проба повітря, за типом конверта: 4 точки по кутах кімнати (на відстані 0,5 м від стін) і 5-а точка – в центрі. Проби повітря забираються на висоті 1,6–1,8 м від підлоги – на рівні дихання в закритих приміщеннях. Проби необхідно відбирати вдень (у період активної діяльності людини), після вологого прибирання й провітрювання приміщення.

Атмосферне повітря досліджують у житловій зоні на рівні 0,5–2 м від землі поблизу джерел забруднення, а також у зелених зонах (парки, сади та ін.) для оцінки їх впливу на мікрофлору повітря.

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

Методи відбору проб повітря для бактеріологічного дослідження поділяють на такі:

1) аспіраційні, засновані на активному прокачуванні повітря за допомогою різних приладів;

2) седиментаційні, засновані на принципі механічного осідання мікробів.

Методи виділення мікроорганізмів з повітря. Відомі два методи забору проб для бактеріологічного аналізу повітря. Найпростіший, який не потребує спеціальної апаратури, – *седиментаційний метод Коха*, за яким про ступінь мікробного обміненія судять за кількістю колоній, що виросли на МПА в чашці Петрі після того, як 2 чашки витримують відкритими на повітрі протягом 30 хв, потім посіви інкубують у термостаті при 37 °C і виявляють видову приналежність мікроорганізмів. Найчастіше в повітрі визначають ЗМЧ (застосовують чашки з МПА), вміст стафілококів (застосовують чашки з жовтково-сольовим агаром), за епідемічними показаннями визначають вміст стрептококів (застосовують чашки з кров'яним агаром). При обстеженні повітря аптек проводять визначення вмісту грибів, використовуючи чашки з середовищем Сабуро. Результати оцінюють за сумарним числом колоній, які виросли на обох чашках. Про спокійному стані повітря на площу 100 см² осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 0,01 м³ повітря. Цей метод використовується як орієнтовний.

Більш досконалим є *аспіраційний метод* з використанням апарату Кротова (рис. 1), який заснований на примусовому осадженні мікроорганізмів із повітря на поверхню щільного поживного середовища або в рідину (м'ясо-пептонний бульйон, буферний розчин, ізотонічний розчин хлориду натрію та ін.). Принцип дії приладу заснований на механічному прокачуванні повітря через клиноподібну щілину в кришці, розташованій над поверхнею живильного середовища в чашці Петрі, яка обертається. За 1 хв через вузьку щілину плексигласової пластини прокачується 25 л повітря, мікроби з якого осідають на поверхню живильного середовища в чашці Петрі, при цьому завдяки постійному обертанню чашки під входною щілиною мікроорганізми рівномірно фіксуються по всіх поверхні середовища. У якості поживного середовища для визначення мікробного числа використовується МПА, а для визначення СПМ – кров'яний агар. Великою перевагою цього методу є можливість посіву певного об'єму повітря.

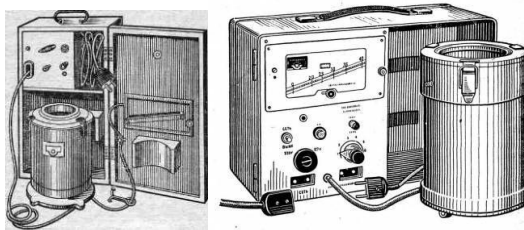


Рис. 1. Апарат Кротова для бактеріологічного дослідження повітря

Після інкубації посіву в термостаті підраховують кількість колоній і проводять розрахунок мікробного числа за формулою:

$$x = \frac{a \times 1000}{V}$$

де: a – кількість колоній, що вирости на чашці Петрі;
 V – об'єм пропущеного повітря через прилад, дм^3 ;
 1000 – досліджений об'єм повітря, дм^3 .

Основні показники санітарного стану повітря

Загальне мікробне число (ЗМЧ) повітря – кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) у 1 м^3 повітря (підраховують колонії, які виростають на поверхні поживного агару при посіві певного об'єму повітря й інкубації протягом 24 год при 37°C і 24 год при кімнатній температурі).

Визначення стафілококів. Відбір проб повітря проводиться за допомогою апарату Кротова кількістю 250 л на 2–3 чашки з жовтково-сольовим агаром і на чашку з кров'яним агаром. Чашки інкубують при температурі 37°C протягом 48 год. Вивчають культуральні ознаки всіх видів колоній, з підозрілих готують мазки і фарбують за Грамом.

Підраховують кількість колоній стафілококів і визначають число мікробів у 1 м^3 повітря.

При виникненні внутрішньолікарняних інфекцій стафілокової етіології проводять дослідження, спрямовані на виявлення джерел і шляхів поширення інфекції: шляхом фаготипування визначають ідентичність стафілококів, виділених із об'єктів навколишнього середовища, а також від хворих і обслуговуючого персоналу.

Визначення стрептококів. Відбір проб повітря при дослідженні наявності α - і β -гемолітичних стрептококів виробляють за допомогою апарату Кротова на чашки з кров'яним агаром. Забирають 200–250 л повітря, чашки з посівами витримують у термостаті 18–24 год і потім ще 48 год при кімнатній температурі (після попереднього перегляду та обліку). Підрахунок кількості колоній, що вирости, проводять на 1 м^3 з подальшою

контрольною мікроскопією й вибірковим пересівом колоній на кров'яний агар або цукровий бульйон.

Визначення патогенних мікроорганізмів. З огляду на малі концентрації патогенних мікроорганізмів у повітрі закритих приміщень їх виділення є досить важким завданням. За епідеміологічними показниками в повітрі визначають наявність мікобактерій, вірусів та ін.

При дослідженні внутрішньолікарняних інфекцій визначають у повітрі присутність стафілококів, стрептококів, синьогнійної палички та ін. Відбір проб повітря проводять в об'ємі не менше 1000 л. Посів роблять на відповідні елективні середовища. Якщо використовується рідке середовище, то пробірку з рідиною поміщають у термостат на добу для підروшування (отримання накопичувальної культури), а потім висівають на елективне середовище.

При дослідженні повітря на наявність мікобактерій туберкульозу використовують середовище Левенштейна-Йенсена, коринебактерій дифтерії – середовище Клауберга.

Визначення грибів. Визначають наявність у повітрі дріжджоподібних і пліснявих грибів – підраховують кількість колоній, що виростають на середовищі Сабуро за 96 год при 22–28 °С.

САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДИ

Вода – природне середовище проживання для різноманітних мікроорганізмів. У воді річок, відкритих водойм, морів, океанів виявляють представників усіх таксономічних груп бактерій, а також гриби, водорості й найпростіші. Сукупність усіх мікроорганізмів, що заселяють водойми, позначають терміном "мікробіологічний планктон".

Відповідно до чинних нормативних документів санітарно-мікробіологічному нагляду підлягають:

- вода питна (централізованого та місцевого водопостачання, тобто з водопроводу, колодязів, джерел і свердловин);
- вода плавальних басейнів;
- вода відкритих водойм (річок, водосховищ);
- стічні води (господарсько-фекальні, промислові, талі й зливові);
- вода очищена для приготування ліків;
- лід медичний і господарський.

Попереджувальний нагляд здійснюють:

- при вирішенні питань водопостачання й каналізації населених територій;
- при санітарній оцінці басейнів, пляжів, місць колективного відпочинку та ін.;

Поточний санітарний нагляд здійснюють:

- при оцінці якості питного водопостачання населених місць;

- при оцінці санітарного стану поверхневих вод для встановлення ступеня впливу біологічної контамінації на здатність води до самоочищення;
- при контролі знешкодження стічних вод;
- за епідемічними показаннями для з'ясування можливого шляху передачі інфекційних захворювань (проводять виявлення СПМ і патогенних мікроорганізмів).

Автохтонна й алохтонна мікрофлора відкритих водойм. Мікрофлору водойм утворюють дві групи мікроорганізмів: **автохтонні** (постійно живуть і розмножуються в водоймі) й **алохтонні** (попадають ззовні при забрудненні різних джерел).

Як правило, мікробний склад води нагадує мікрофлору ґрунту, з якого вода стікає. Тобто більшість водних мікроорганізмів також є поширеними мешканцями ґрунтів. Мікроорганізми, що пристосувалися до умов існування в воді й регулярно виявляються в ній, можна вважати специфічною для води флорою. До них належать аеробні коки: мікрококи, сарцини, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, бактерії родів *Pseudomonas*, *Proteus*, *Leptospira*. Анаеробних бактерій у незабруднених водоймах мало; найбільш часто в них виявляють клостридії. Кількість мікроорганізмів у відкритих водоймах варіює в широких межах: від декількох десятків, сотень до мільйонів у 1 мл, що залежить від виду водойми, ступеня його забруднення, пори року та ін. Мікрофлора водойм залежить від речовин, що містяться в них, і від біоценозу, тобто видового складу та чисельності інших живих істот. Так, фаги й найпростіші, що знаходяться у воді, знищують бактерії. Мікроорганізми, здатні утворювати антибіотики, викликають загибель інших бактерій, чутливих до цих речовин.

Мікроорганізми води відіграють значну роль у круговороті речовин у природі. Вони розщеплюють органічні речовини з утворенням субстратів, які використовують у харчуванні інші водні мікроорганізми. Біологічна активність у водоймах максимальна в літньо-осінній період.

Води поверхневих водойм (річки, струмки, озера, водосховища) відкриті для всіх видів контамінації. Забруднення їх мікроорганізмами, що потрапляють зі стічними, зливовими, талими водами, різко змінює мікробний пейзаж і санітарний режим водойми. Основний шлях мікробного забруднення водойм – попадання неочищених міських відходів і стічних вод. Кількість мікроорганізмів у воді поверхневих стоків у весняно-паводковий період збільшується до 2,8–3 млн у 1 мл. У період паводку можливо вторинне забруднення водопровідної мережі. Мікрофлора господарсько-фекальних стічних вод складається з мікроорганізмів, що виділяються з кишечника людини і тварин, серед яких є представники нормальної та умовно-патогенної флори (ешерихії, ентерококи, клебсієли, клостридії, гриби роду *Candida*, найпростіші та ін.), але можуть перебувати й патогенні – збудники кишкових інфекцій (сальмонели, шигели, вібріони, ерсинії, лептоспіри, віруси поліомієліту, гепатиту А, Е та ін.). Небезпека

зараження останніми особливо велика, якщо в водойми потрапляють недостатньо знезаражені стічні води інфекційних лікарень.

Самоочищення відкритих водойм. Вода не є середовищем, сприятливим для розмноження патогенних мікробів, для яких природні біотопи – організми людини й тварин. На життєздатність патогенних бактерій впливає супутня, конкурентна флора (мікроби-антагоністи, фаги, найпростіші, водорості), а також температура, інсоляція, різні хімічні речовини та ін. Самоочищення відкритих водойм від контамінуючих мікроорганізмів спостерігають після органічного забруднення. Основний фактор очищення – конкурентна активація сапрофітної автохтонної мікрофлори, яка призводить до швидкого розкладання органічних речовин і зменшення чисельності бактерій. Здатність водойми до самоочищення пов'язана з присутністю в ній автохтонних мікроорганізмів, що належать до конкретного біоценозу. Однак кількісні та якісні співвідношення в біоценозах нестійкі й змінюються під дією різних факторів, тобто змінюються за сапробністю. Терміном «**сапробність**» (від грец. *Sapros* – гнилий) позначають комплекс особливостей водойми, в т. ч. склад і кількість мікроорганізмів у воді, що містить органічні й неорганічні речовини в певних концентраціях. Процеси самоочищення води в водоймах відбуваються послідовно і безперервно, з поступовою зміною біоценозів. Розрізняють полісапробні, мезосапробні й олігосапробні зони.

Полісапробні (зони сильного забруднення) містять велику кількість органічних речовин, які легко розкладаються, і майже повністю позбавлені кисню. Мікробний біоценоз подібних зон особливо рясний, але видовий склад обмежений анаеробними бактеріями, грибами, актиноміцетами. Кількість бактерій у 1 мл води в полісапробній зоні досягає мільйона і більше.

Мезосапробні (зони помірного забруднення) характеризуються домінуванням окислювальних і нітрифікаційних процесів. Якісний склад різноманітний. В основному це нітрифікуючі, облигатно аеробні бактерії, а також види *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Candida* та ін. Загальна кількість мікроорганізмів – сотні тисяч у 1 мл.

Олігосапробні (зони чистої води) характеризуються закінченим процесом самоочищення, невеликим вмістом органічних сполук і закінченням процесу мінералізації. Вода відрізняється високим ступенем чистоти. Кількість бактерій від 10 до 1000 в 1 мл води.

Патогенні мікроорганізми, що потрапляють у водойми, досить рясні в полісапробних зонах, поступово відмирають у мезосапробних зонах і практично не виявляються в олігосапробних зонах.

При визначенні обсіменіння води розраховують колі-титр та колі-індекс. **Колі-титр води** вимірюється мінімальною кількістю води (мл), в якому виявляються БГКП, **колі-індекс** – кількістю БГКП, що містяться

в 1 л досліджуваної води. Ці показники визначають **титраційним (бродильним) методом або методом мембранних фільтрів**. При титраційному методі проводять виділення та ідентифікацію бактерій на живильних середовищах. При методі мембранних фільтрів воду спочатку фільтрують, використовуючи колбу Бунзена зі вмонтованою в неї лійкою Зейтца з мембранним фільтром і за допомогою вакуум-насоса проганяють воду через фільтри, які потім поміщають на поверхню живильного середовища в чашки Петрі й після інкубації в термостаті підраховують кількість колоній, що вирости, типових для БГКП, а потім за допомогою біохімічних тестів проводить їх ідентифікацію.

Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води. Санітарно-мікробіологічне дослідження питної води складається з визначення ЗМЧ, кількості ентеробактерій, спор сульфітредуруючих клостридій і коліфагів.

Визначення ЗМЧ при оцінці якості питної води. Загальне мікробне число (ЗМЧ) – це кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій у 1 см^3 (1 мл) води, яке визначають у всіх видах води. Досліджувану воду вносять по 1 мл у дві стерильні чашки Петрі і заливають розплавленим і охолодженим живильним агаром (метод глибинного посіву). Інкують при 37°C 24 год, після чого при кімнатній температурі ще 24 год. Підраховують на 2 чашках число колоній (на поверхні й у глибині поживного агару) і розраховують середнє арифметичне значення. Для виявлення цвілевих і дріжджових грибів досліджувану воду засівають по 0,5 мл на середовище Сабуро й інкують при кімнатній температурі протягом 3–4 діб. Підраховують число колоній і також розраховують середнє арифметичне. Результат (ЗМЧ) обчислюють шляхом підсумовування середнього арифметичного числа бактерій, дріжджових і цвілевих грибів і виражають у колонієутворюючих одиницях (КУО/мл).

ЗМЧ дозволяє оцінити рівень мікробного забруднення води, доповнюючи показники фекального забруднення, й одночасно виявити забруднення з інших джерел (наприклад, промислові викиди). Несподіване збільшення ЗМЧ (навіть у межах нормативу), виявлене повторно, є сигналом для пошуку причини забруднення. Також цей показник незамінний для термінового виявлення в питній воді масивного мікробного забруднення невідомого походження.

Визначення кількості ентеробактерій. Присутність ентеробактерій (коліформних бактерій) також визначають у всіх видах води. Поняття «коліформні бактерії» включає бактерії родини *Enterobacteriaceae* і термотолерантні коліформні бактерії.

До **бактерій родини *Enterobacteriaceae*** належать грамнегативні аспорогенні палички, що не володіють оксидазною активністю й зброджують лактозу з утворенням кислоти й газу при 37°C протягом 24–48 год (або зброджують глюкозу з утворенням кислоти й газу при температурі

37 °C протягом 24 год). Виявлення в питній воді бактерій родини *Enterobacteriaceae* вказує на потенційну епідемічну небезпеку водокористування. Наявність бактерій роду *Escherichia* в харчових продуктах, воді, ґрунті, на обладнанні свідчить про свіже фекальне забруднення, що має велике санітарне та епідеміологічне значення. Вважають, що бактерії родів *Citrobacter* і *Enterobacter* є показниками давнішого (кілька тижнів) фекального забруднення й тому вони мають менше санітарно-показове значення порівняно з бактеріями роду *Escherichia*.

Термотолерантні коліформні бактерії мають ті ж характеристики, але додатково зброджують лактозу з утворенням кислоти й газу при 44,5 °C через 24 год. Термотолерантні коліформні бактерії швидко відмирають у зовнішньому середовищі, тому їх виявлення свідчить про свіже фекальне забруднення води.

Для визначення ентеробактерій у питній воді використовують **метод мембранних фільтрів**. Досліджувану воду (3 проби по 100 мл) пропускають через 3 бактеріальні фільтри з нітроцелюлози, які потім поміщають на середовище Ендо й інкубують при 37 °C 24 год. Підраховують кількість вирослих на фільтрах лактозопозитивних колоній, ідентифікованих як коліформні бактерії. З 2–3 колоній червоного кольору готують мазки, фарбують за Грамом і визначають оксидазну активність. Для цього фільтр із вирослими на ньому колоніями бактерій переносять пінцетом, не перегортаючи, на клаптик фільтрувального паперу, змоченого диметил-п-фенілдіаміном. При наявності оксидази індикатор забарвлює колонію в синій колір. 2–3 колонії, що не змінили первісного забарвлення, засівають у напіврідке середовище з 0,5 % розчином глюкози. Посіви інкубують протягом доби при 37 °C. При наявності газоутворення підраховують число червоних колоній на фільтрі і визначають колі-індекс.

Бактерії роду *Enterococcus* є нормальними мешканцями кишечника, але виділяються в зовнішнє середовище в меншій кількості, ніж кишкові палички. Ентерококи швидше відмирають у воді та ґрунті. Як правило, вони не розмножуються в цих об'єктах, що дозволяє розглядати їх як показник свіжого фекального забруднення.

Присутність ентерококів вважають додатковим показником фекального забруднення води й інших об'єктів. Однак їх виділення вимагає більш складних середовищ при приготуванні і ростуть вони повільніше.

Бактерії роду *Proteus* мешкають як в кишечнику людини і тварин (*P.mirabilis*), так і в гниючих залишках (*P.vulgaris*). Присутність протеїв у об'єктах навколишнього середовища свідчить про їх забруднення субстратами, які розкладаються, і вкрай несприятливий санітарний стан.

Виявлення спор сульфітредукуючих клостридій. Спори сульфітредукуючих клостридій більш стійкі до знезараження й дії несприятливих чинників навколишнього середовища, ніж інші індикаторні бактерії. На

підставі цієї властивості показник рекомендований для оцінки ефективності технологічних процесів очищення води. Особливе значення цей показник має при оцінці первинного хлорування, оскільки воно інактивує практично всі індикаторні бактерії. Виявлення клостридій у воді перед надходженням у розподільну мережу вказує на недостатню очистку й на те, що стійкі до знезараження патогенні мікроорганізми, ймовірно, не загинули при очищенні.

Для визначення клостридій воду, що досліджується, вносять у розплавлене й охолоджене середовище Вільсона–Блера. Середовище містить тіосульфат (гіпосульфїт) і безбарвну сіль заліза. У результаті проростання спор, розмноження клостридій і відновлення ними сульфїту утворюється сульфід заліза, що надає середовищу чорного кольору.

Визначення кількості коліфагів. Присутність коліфагів (бактеріофагів, які паразитують на *E.coli*) визначають у воді поверхневих джерел і підготовленій із неї питній воді, а також у стічних водах. Вони є індикаторами ефективності охорони ґрунтових вод і очищення питної води. Дослідження проводять **методом агарових шарів Грація**. Для титрування коліфагів досліджувану воду змішують із розплавленим і охолодженим живильним агаром, куди вносять також індикаторний штам *E.coli*. Отриману суміш виливають другим шаром на поживний агар у чашці Петрі й після застигання середовища чашку інкубують при 37 °C 24 год. У результаті індикаторна культура утворює рівномірний суцільний ріст, а при наявності коліфагів у цьому «газоні» утворюються прозорі пляшки («негативні колонії» бактеріофагів). Результат дослідження виражають у пляшкоутворюючих одиницях (БУО/мл).

Нормативи для питної води: число мікроорганізмів у 1 мл води – не більше 50, колі-індекс – не більше 3 бактерій у 1 л води. Бактерії родини *Enterobacteriaceae* й термофільні бактерії мають бути відсутні в 300 мл питної води, спори сульфїтредукуючих клостридій повинні бути відсутніми в 20 мл води, а коліфаги – в 100 мл води.

САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ҐРУНТУ

Ґрунт являє собою найбільш насичений мікроорганізмами біотоп, що відрізняється стабільністю складу мікрофлори. На формування мікробних ґрунтових біоценозів, що мають у т. ч. і санітарне значення, на їх якісний і кількісний склад впливає безліч факторів.

Тип ґрунту і ступінь його окультурення. Чим він вищий, тим більша мікробна забрудненість. Відповідно, вихідний «нормальний» показник ЗМЧ для різних ґрунтів не однаковий.

Фізико-хімічні властивості ґрунту: структурованість, аерація, вологість, водопроникність, наявність вільного та зв'язаного кисню.

Вік, географічне розташування ґрунтів. У напрямку з півдня на північ вміст у ньому органічних речовин, а відповідно, і мікроорганізмів зменшується.

Кліматичні умови й сезонність. Навесні в ґрунті переважають анаеробні, влітку – спороутворюючі бактерії. До кінця літа збільшується вміст актиноміцетів, що засвоюють органічні речовини, які не були утилізовані бактеріями. Біологічна активність усіх ґрунтових мікроорганізмів збільшується восени й помітно знижується в зимовий період.

Глибина ґрунтового шару. У товщі ґрунту виділяють три основні горизонти: А (0–10 см), В (10–20 см) і С (20–30 см). На поверхні й у горизонті А мікроорганізмів мало внаслідок низької вологості і мікрободичності дії прямого сонячного світла. У необробленому ґрунті горизонту А вміст мікроорганізмів найбільший на глибині 5–10 см (тобто в зоні, граничній із горизонтом В), а в обробленому їх особливо багато на межі горизонтів В і С. На глибині 1 м виділяють одиничні мікроорганізми. Види, які виділяються на глибині 4 м і більше, розглядають не як ґрунтові, а як такі, що мають геологічне значення.

Групи ґрунтових мікроорганізмів. Ґрунтові мікроорганізми безпосередньо впливають на власне утворення й формування ґрунту, на мінералізацію (розкладання) органічних залишків і утворення гумусу. Тому, не маючи уявлень про основні екологічні, фізіологічні, морфологічні групи ґрунтової мікрофлори неможливо об'єктивно оцінити санітарний стан ґрунту, активність процесів його самоочищення від патогенних мікроорганізмів. При проведенні санітарно-мікробіологічних досліджень особливо увагу приділяють фізіологічним групам ґрунтових мікроорганізмів.

Фізіологічні групи ґрунтових мікроорганізмів містять види, які беруть участь у кругообігу азоту, вуглецю, сірки й фосфору. Однак для повномасштабної оцінки санітарного стану ґрунту й процесів його самоочищення необхідно визначати наявність не тільки видів, що беруть участь у круговороті речовин, але й окремих груп мікроорганізмів, що сприяють швидкому розкладанню органічних речовин: спороутворюючих бактерій (насамперед бацил), актиноміцетів, грибів (у першу чергу пеніцилінів і кандид).

Групи ґрунтових мікроорганізмів, патогенних для людини (табл. 3). Як правило, в ґрунті патогенні мікроорганізми довго не виживають. Однак деякі види входять до складу ґрунтових біоценозів, стаючи їх постійними мешканцями. Подібні мікроорганізми поділяють на три групи:

1) мікроорганізми, для яких ґрунт служить природним біотопом – збудник ботулізму, актиноміцети, збудники глибоких мікозів аспергілі, що утворюють мікотоксини;

2) мікроорганізми, які потрапляють у ґрунт із виділеннями людини, тварин і зберігаються там тривалий час (роками й десятиліттями) – паличка сибірки, збудник правця, газової гангрени;

3) мікроорганізми, які потрапляють у ґрунт із виділеннями людини і тварин, але зберігаються в ньому порівняно недовго (тижні й місяці) – кишкова паличка (до 8 міс), сальмонели (до року при мінусовій температурі), шигели (до 100 днів), холерний вібріон (2 міс).

Таблиця 3

Патогенні мікроорганізми, які виявляються в ґрунті

Мікроби, для яких ґрунт є природним біотопом	Мікроби, які потрапляють у ґрунт із виділеннями людини і тварин	
	Зберігаються довго	Зберігаються порівняно недовго
Збудники підшкірних мікозів, <i>Clostridium botulinum</i> , види <i>Actinomyces</i>	<i>Clostridium tetani</i> , види <i>Clostridium</i> , які викликають анаеробні інфекції, <i>Bacillus anthracis</i>	Види <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Francisella</i> , <i>Brucella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Leptospira</i> , вірус ящура, ентеровіруси

Хвороботворні бактерії, які не виробляють спори, через нестачу необхідних поживних речовин, а також унаслідок летальної активності світла, висушування, антагоністичних мікробів і фагів не живуть довго в ґрунті (від кількох днів до кількох місяців). Зазвичай ґрунт є несприятливим середовищем існування для більшості патогенних видів бактерій, рикетсії, вірусів, грибів та найпростіших. Період виживання деяких патогенних бактерій показаний у табл. 4. Однак ґрунт як фактор передачі ряду збудників інфекційних захворювань є досить складним субстратом. Так, наприклад, бацили сибірської виразки після потрапляння в ґрунт утворюють спори, які можуть залишатися життєздатними протягом багатьох років. У сприятливих умовах (у темно-бурому ґрунті та чорноземі) вони проходять весь цикл розвитку: у літні місяці спори проростають у вегетативні форми, після чого цей цикл повторюється.

Таблиця 4

Період виживання деяких патогенних мікроорганізмів у ґрунті

Види бактерій	Середній період виживання, тижні	Максимальний період виживання, місяці
<i>Salmonella typhi</i>	2–3	12
<i>Shigella</i>	1,5–5	9
<i>Vibrio cholerae</i>	1–2	4
<i>Vibrio cholerae El Tor</i>	4	6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13	7
<i>Brucella</i>	0,5–3	2
<i>Yersinia pestis</i>	0,5	1
<i>Francisella tularensis</i>	1,5	2,5

Як відомо, спори клостридій, що викликають правець, анаеробні інфекції та ботулізм, і багатьох ґрунтових мікробів довго виживають у ґрунті. Ґрунт є середовищем існування для різних тварин (гризунів), які є переносниками збудників чуми, туляремії, вірусів геморагічної лихоманки, енцефаліту, лейшманіозу та ін. Цисти кишкових найпростіших (амеб, балантидій тощо) проводять певний етап у ґрунті. Ґрунт відіграє важливу роль у передачі глистових інвазій (аскариди, нематодні черви тощо). Деякі гриби

живуть у ґрунті. Потрапляючи в організм, вони викликають фузаріотоксикоз, аспергільоз, мукомікоз, пеніциліоз тощо.

Враховуючи певну епідеміологічну роль, яку відіграє ґрунт у поширенні деяких інфекційних захворювань тварин і людини, санітарно-епідеміологічна практика передбачає заходи, спрямовані на захист ґрунту від забруднення та зараження патогенними видами мікроорганізмів.

Індикаторні мікроорганізми для оцінки санітарного стану ґрунту.

Здійснення санітарного нагляду за станом ґрунту населених місць має важливе значення в профілактиці кишкових інфекцій та інших захворювань. Тому для адекватної оцінки ґрунту особливу значимість має вибір індикаторних мікроорганізмів. До СПМ, що вказують на фекальне забруднення ґрунту, відносять БГКП, *Clostridium perfringens*, термофільні бактерії й нітрифікуючі бактерії (табл. 5.)

З усіх ентеробактерій найдовше зберігається в ґрунті кишкова паличка, тому за її вмістом судять про наявність у ґрунті інших ентеробактерій. Термофільні бактерії потрапляють у ґрунт із гноєм, що перепрів або компостом, тому їх доцільно виявляти для з'ясування характеру й давності органічного забруднення ґрунту. Свіжий гній, стічні води зазвичай містять багато БГКП, але мало термофільних бактерій. Протягом розкладання органічних речовин кількість термофілів збільшується. Поява нітрифікуючих бактерій (нітрифікаторів) указує на розвиток процесу самоочищення, оскільки вони завершують цикл розкладання азотовмісних сполук, перетворюючи аміак на азот. При свіжому фекальному забрудненні нітрифікаторів не буде, оскільки субстрат для їх розвитку відсутній. У ході життєдіяльності мікроорганізмів, які розкладають органічні речовини, утворюється аміак, що призводить до розвитку нітрифікаторів.

Таблиця 5

Вимоги до мікробіологічної чистоти ґрунтів

Категорія ґрунту	Титр БГКП*	Титр нітрифікуючих бактерій	Титр клостридій	Індекс термофільних мікроорганізмів**
Чистий	$\geq 1,0$	$\geq 0,1$	$\geq 0,01$	10^2-10^3
Забруднений	$0,9-0,01$	$0,01-0,001$	$0,009-0,0001$	10^3-10^5
Дуже забруднений	$< 0,009$	$< 0,0009$	$< 0,00009$	$1 \times 10^5-4 \times 10^6$

Примітка: * – найменша кількість матеріалу (г), у якому ще виявляються ці СПМ;
** – кількість особин СПМ у 1 г досліджуваного ґрунту.

На свіже фекальне забруднення ґрунту вказують виявлення ентерококів, високі титри БГКП при низьких титрах нітрифікаторів і термофіли, а також відносно високий вміст вегетативних форм *C.perfringens*.

Виявлення ентерококів завжди свідчить про свіже фекальне забруднення, які б не були інші показники.

Визначення термофільних бактерій допомагає оцінити забруднення ґрунту гноєм, компостом або стічними водами й стадію розкладання їх органічного субстрату.

Поява нітрифікуючих бактерій указує на розвиток процесів самоочищення. Для більш повної оцінки цих процесів визначають також групи мікроорганізмів, які швидко руйнують органічний субстрат: бацили, актиноміцети, гриби. Великий вміст всіх СПМ свідчить про закінчення самоочищення ґрунту та його звільнення від ентеробактерій і органічних речовин.

Цілі санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту. Знання складу й значення мікрофлори ґрунту для людини, впливу на неї різних умов необхідні для коректної санітарно-мікробіологічної оцінки ґрунтів (у плані їх епідемічної небезпеки). Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту регламентується інструкціями з попереджувального й поточного санітарного нагляду.

Попереджувальний нагляд здійснюють:

а) при плануванні, будівництві й реконструкції знову заселених ділянок і населених місць;

б) при виборі ділянок для будівництва лікувально-профілактичних та аптечних закладів, санаторіїв, дитячих установ;

в) при вирішенні питань водопостачання й каналізації населених територій;

г) при санітарній оцінці пляжів, місць колективного відпочинку тощо.

Поточний санітарний нагляд здійснюють:

а) при оцінці санітарного стану ґрунту та його здатності до самоочищення після забруднень (наприклад, ґрунт на території дитячих садків, лікарень, зон відпочинку досліджують 2 рази на рік);

б) при контролі за ґрунтовими й біотермічними водами, методами знешкодження стічних вод і відходів (1–4 рази на місяць);

в) за епідемічними показаннями для з'ясування можливого шляху передачі інфекційних захворювань.

Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту залежно від цілей дослідження передбачає короткий і повний аналіз.

Короткий санітарно-мікробіологічний аналіз проводять при здійсненні поточного санітарного нагляду. Він складається з визначення ЗМЧ, титру БГКП, ентерококів, *C.perfringens*, термофільних і нітрифікуючих бактерій. Отримані показники вказують на наявність і ступінь фекального забруднення. За ним можна визначити також і стан процесів самоочищення ґрунту від патогенних ентеробактерій і органічного забруднення.

Повний санітарно-мікробіологічний аналіз складається з визначення всіх показників короткого аналізу, а також загальної чисельності сапрофітів; ЗМЧ і процентного вмісту спорових мікроорганізмів; аеробних бактерій, що руйнують клітковину; актиноміцетів і амоніфікаторів, основних груп ґрунтового мікробіоценозу та низки додаткових досліджень (наприклад,

токсичність ґрунтів для мікроорганізмів). За епідемічними показаннями в ході досліджень виявляють патогенні мікроорганізми. Повний аналіз проводять при здійсненні попереджувального санітарного нагляду, первинному обстеженні при виборі території для розміщення окремих об'єктів тощо.

Періодичність контролю. Для контролю забруднення ґрунту дитячих садків, ЛПЗ, зон відпочинку відбір проб проводять не менше двох разів на рік – навесні й восени. На інших контрольованих об'єктах аналіз ґрунту проводять із періодичністю, регламентованою нормативами, але не рідше одного разу на рік. При вивченні динаміки самоочищення ґрунту на забруднених територіях проби беруть протягом першого місяця після попереднього забруднення – щотижня, в наступні місяці – один раз на місяць протягом вегетаційного періоду до завершення активної фази самоочищення.

Відбір проб проводять з квадратної ділянки (не менше 5×5 м) з 5 точок («метод конверта»). В умовах асептики зразки забирають із глибини 20–30 см із кожного кута й центру квадрата для приготування змішаної проби. Об'єм зразків 1 кг.

Методика дослідження. ЗМЧ ґрунту визначають глибинним посівом (на щільному середовищі) з 10-кратних розведень або методом прямої мікроскопії (за Перфільєвим). Якщо передбачається невисокий ступінь фекального забруднення, БГКП у ґрунті визначають методом бродильних проб або методом мембранних фільтрів (див. вище); при високому ступені – прямим посівом ґрунтової суспензії (1:10) на середовище Ендо. Важливим критерієм санітарного стану ґрунту та його здатності до самоочищення є перфрингенс-титр ґрунту (мінімальна кількість ґрунту, в якому ще визначається *C.perfringens*). При фекальному забрудненні ґрунту вже через 4–5 міс ешерихії зникають, а клостридії виявляють у титрі 0,01 г. Визначають перфрингенс-титр глибинним посівом на середовище Вільсона–Блера з 10-кратних розведень ґрунтової суспензії. Посіви інкубують при 43 °С протягом 24–48 год, після чого враховують результати за утворенням чорних колоній *C.perfringens* в агаровому стовпчику. Із колоній роблять мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують і обчислюють перфрингенс-титр. Число термофільних бактерій визначають глибинним посівом на щільні середовища з інкубацією при 60 °С протягом доби. Титр нітрифікуючих бактерій визначають посівом з 10-кратних розведень ґрунтової суспензії на рідке живильне середовище.

САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Харчові продукти – найскладніші об'єкти в санітарній мікробіології. Це пояснюється різноманітністю й великою кількістю мікрофлори в них, а також використанням мікроорганізмів у виробництві багатьох продуктів і, на жаль, відсутністю повноцінних методик виявлення мікробів. Через

харчові продукти можуть передаватися збудники багатьох інфекційних хвороб – черевного тифу і паратифів, сальмонельозів, дизентерії, ешеріхіозів, ботулізму, холери, бруцельозу, туберкульозу, сибірки, деяких рикетсіозів (Ку-лихоманки) і вірусних інфекцій (яшур, поліомієліт та ін.). Харчові токсикоінфекції, що викликаються численними умовно-патогенними мікроорганізмами, виникають після вживання в їжу заражених харчових продуктів. Обсіменіння їх мікробами може відбуватися на всіх етапах заготівлі, зберігання та приготування. Харчові продукти зазвичай неможливо повністю звільнити від присутності мікроорганізмів без ризику зміни їх смакових якостей.

Наявність у їжі великої кількості різних факторів росту й вітамінів сприяє росту мікроорганізмів. Цей факт є основною відмінністю вивчення харчових продуктів від інших санітарно-мікробіологічних досліджень, тому що ні в воді або ґрунті, ні тим більше в повітрі не відбувається настільки бурхливого розмноження мікробів. Уява про мікрофлору харчових продуктів може дати якісне й кількісне вивчення її популяції. У продуктах харчування розрізняють специфічну та неспецифічну мікрофлору.

Специфічна мікрофлора харчових продуктів представлена "культурними" мікроорганізмами, які використовуються для приготування різних продуктів і є обов'язковою ланкою в технології їх приготування. Специфічні мікроорганізми використовують у приготуванні всіх кисломолочних продуктів, хліба, пива, вина, в квашенні овочів тощо. При приготуванні кефіру, кислого молока, кумису, сиру, сметани, масла використовують *Lactococcus lactis* (молочнокислий стрептокок). Для заквашування кефіру використовують т. зв. кефірні зерна, що складаються з казеїну, в якому знаходяться асоціації мікроорганізмів: молочнокислі стрептококи, лактобацили, молочні та дріжджоподібні гриби. Молочнокислі коки й палички, гідролізуючи лактозу, постачають грибам кислоту, необхідну для їх життєдіяльності, а гриби, викликаючи спиртове бродіння, насичують продукт вуглекислотою, що надає кефіру особливого смаку. У приготуванні деяких кисломолочних продуктів використовують *Lactobacillus bulgaricus* (болгарська паличка) і *Lactobacillus acidophilus* (ацидофільна паличка).

Неспецифічна мікрофлора харчових продуктів містить мікроорганізми, які випадково потрапляють на харчові продукти з навколишнього середовища. Її складають сапрофіти, патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми, а також види, що викликають псування харчових продуктів. Присутність деяких сапрофітів сприяє розвитку біохімічних процесів, закономірних для харчового продукту, від яких залежить його якість і нерідко збереження в результаті антагоністичної протидії патогенних бактерій, що потрапляють у продукти. Ступінь забрудненості сторонньою мікрофлорою залежить від багатьох факторів: правильності заготівлі харчового продукту, його транспортування, зберігання, технології подальшої обробки й, на всіх етапах, від дотримання санітарного режиму.

Розмноження деяких мікроорганізмів може спричинити псування харчових продуктів, які стають непридатними для вживання в їжу. У деяких випадках харчові продукти можуть бути засіяні сальмонелами та шигелами, стафілококами, кишковою паличкою, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* та іншими мікробами, які викликають харчові токсикоінфекції та інші захворювання людини.

Молоко може бути заражене *Mycobacterium bovis*, *Brucellae*, *Coxiella burnetti*, патогенними стрептококами та вірусом енцефаліту від хворих тварин. Під час транспортування або ж розливу чи обробки молоко може бути заражене сальмонелами та шигелами, патогенними стрептококами та стафілококами, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholera*.

М'ясо може бути інфіковане від хворих тварин чи птиці, або під час їх забою, розрізання або при неправильному зберіганні та транспортуванні туші. Зазвичай містяться в м'ясі *C.perfringens*, *B.cereus*, *E.coli*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus* та інші бактерії. М'ясо та м'ясні продукти, зокрема фарш, найчастіше забруднюються під час приготування, коли патогенні мікроби виявляються на поверхні м'ясорубки, на руках та кухонному посуді (обробна дошка тощо).

М'якоть риби заражається великою кількістю мікробних видів, що знаходяться у воді, лусках та кишках риби, на руках у осіб, які беруть участь у переробці рибної продукції, та на різних предметах (ножі, столи, дошки, які використовуються для приготування риби, палуба рибальського човна тощо). Найнебезпечнішими мікроорганізмами є *C.botulinum*, який виробляє екзотоксин у рибних консервах та *Vibrio parahaemolytica*. Коли санітарні режими не дотримуються, *S.typhi*, *S.flexneri*, а в деяких випадках вібріон *El Tor* виявляється в м'ясі риб і устриць.

Овочі та фрукти можуть бути засіяні шигелами та сальмонелами, холерним вібріоном та мікрофлорою, що знаходяться у ґрунті та на руках осіб, які беруть участь у їх збиранні, пакуванні, перевезенні та тих, хто їх продає. Неправильно консервовані овочі (помідори, гриби тощо) іноді можуть бути причиною ботулізму.

Різна мікрофлора, патогенні види (сальмонели, гриби, актиноміцети), досить часто проникають у яйця; яєчний порошок може бути забруднений стафілококами.

Санітарно-мікробіологічний аналіз якості харчових продуктів переслідує три мети:

- 1) контроль якості сировини, що використовується у виробництві харчових продуктів та оцінка санітарно-гігієнічних умов їх виготовлення;
- 2) контроль режимів зберігання харчових продуктів і оцінка санітарно-гігієнічних умов їх транспортування й реалізації;
- 3) контроль забезпечення епідемічної безпеки харчових продуктів.

На характер мікробного обсіменіння впливають фізико-хімічні властивості продуктів. Більшість мікроорганізмів погано виживає в продуктах із дуже низкими й високими значеннями рН. Особливо рясно вони розмножуються в продуктах із рідкою й напіврідкою консистенцією. У щільних, особливо сухих або порошкоподібних продуктах умови для розмноження мікробів утруднені, там вони розташовуються «гніздами». На забрудненість харчових продуктів впливають деякі особливості технології їх виробництва та зберігання.

Механічна переробка (виготовлення фаршу, пюре та ін.) збільшує ймовірність обсіменіння й сприяє гомогенному поширенню мікроорганізмів по всьому продукту.

Хімічна обробка (соління, маринування) сприяє різкому зменшенню кількості мікроорганізмів.

На зростання мікроорганізмів істотно впливає температурний режим їх виробництва й зберігання. Підвищення температури більш несприятливо діє на мікроби, ніж зниження, тому дію високих температур широко використовують для обробки харчових продуктів.

Гігієнічні нормативи за мікробіологічними показниками містять контроль над 4 групами мікроорганізмів:

- 1) СПМ, до яких відносять мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми – МАФМ (дають ріст після інкубування при 30 °С протягом 72 год при глибинному методі посіву) і БГКП;
- 2) умовно-патогенні мікроорганізми, до яких відносять *E.coli*, *S.aureus*, *Bacillus cereus*, протеї та сульфїтредукуючі кластридії;
- 3) патогенні мікроорганізми, в першу чергу сальмонели;
- 4) мікроорганізми, що викликають псування продуктів, у першу чергу дріжджі й цвілеві гриби.

Для різних груп харчової сировини і продуктів харчування існують конкретні стандарти на ці продукти. При відсутності стандарту використовують гігієнічні вимоги до якості та безпеки продовольчої сировини і харчових продуктів. Регламентування за показниками мікробіологічної якості й безпеки харчової сировини та продуктів харчування для більшості груп мікроорганізмів здійснюють за альтернативним принципом, тобто нормують масу продукту, в якій не допускається вміст БГКП, більшості умовно-патогенних мікроорганізмів, а також патогенних мікроорганізмів, у т. ч. сальмонел. В інших випадках норматив відображає допустиму кількість КУО в 1 г (мл) продукту.

Особливістю санітарно-мікробіологічного контролю харчових продуктів є використання як прямих, так і непрямих методів виявлення хвороботворних мікробів. Прямими методами виділяють мікроорганізми та їх токсини. Непрямі методи служать для визначення санітарної небезпеки харчових продуктів за непрямыми ознаками, наприклад, за загальною мікробною забрудненістю й вмістом СПМ.

Загальноприйнятими санітарно-мікробіологічними показниками якості харчових продуктів є загальне мікробне число, наявність СПМ і деяких видів умовно-патогенних бактерій.

ЗМЧ – це кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів у 1 г або 1 мл продукту. Санітарна оцінка показника: підвищена кількість мікроорганізмів у готових харчових продуктах свідчить про порушення технологічного режиму виробництва продукту або умов його зберігання.

Класичними СПМ, що свідчать про забруднення середовища випорожненнями, є бактерії групи кишкової палички. Санітарне значення мають три роди сімейства *Enterobacteriaceae*: рід *Escherichia*, рід *Citrobacter* і рід *Enterobacter*. Санітарна оцінка показника: присутність у готовому продукті підвищеної кількості БГКП свідчить про незадовільні санітарні умови обробки й зберігання продукту.

Умовно-патогенні мікроорганізми, що представляють санітарну небезпеку при знаходженні в харчових продуктах, – це золотистий коагулазопозитивний стафілокок, бактерії роду *Proteus*, сальмонели та спорові анаеробні сульфітредуруючі палички.

S.aureus становить небезпеку, тому що він здатний виробляти ентеротоксин і викликати харчові інтоксикації. Підвищена кількість у готових продуктах коагулазопозитивного стафілокока свідчить, як правило, про вторинне забруднення продукту через контакт із забрудненим устаткуванням, руками персоналу, а також повітряно-краплинним шляхом.

Бактерії роду *Proteus*, виявлені в готових продуктах, свідчать про забруднення субстратами, що розкладаються, а також про небезпеку розвитку гнильних процесів.

Присутність сальмонел у харчових продуктах не допускається, оскільки ці мікроорганізми при масивному розмноженні в продуктах здатні викликати не тільки токсикоінфекції, але й інфекційні захворювання.

Спороутворюючі сульфітредууючі палички (рід *Clostridium*) обмежуються, оскільки вони можуть інтенсивно розмножуватися в харчових продуктах при наявності анаеробних умов і при концентрації 10^6 і більше в 1 мл/г викликати харчові отруєння.

Відбір проб. Для визначення загальної кількості мікроорганізмів у одиниці об'єму або маси продукту досліджують т. зв. середню пробу. Середня проба – це кількість досліджуваного матеріалу, взята як сума проб із різних ділянок, що становить середній вміст мікроорганізмів у матеріалі.

Правила відбору середньої проби різні залежно від природи й консистенції досліджуваного зразка, а також мети аналізу.

Рідкі продукти (вода, молоко, сметана, соуси) перемішують стерильною ложкою (або піпеткою), після чого відбирають у стерильний посуд від 50 до 300 мл залежно від виду продукту.

Із продуктів напіврідкої консистенції (наприклад, морозива) стерильною ложкою знімають верхній шар товщиною до 2,5 см, розмішують продукт і відбирають для дослідження 50 мл.

Проби твердих продуктів (м'ясо, риба, ковбаси, кулінарні вироби), взяті з декількох місць у товщі продукту, подрібнюють, перемішують і відбирають для дослідження 15–20 г отриманої маси. Для відбору проб із поверхні продуктів (ковбаси без оболонки, деякі готові кулінарні вироби та ін.) користуються методами змиву й зскрібка. Змив певної поверхні проводять стерильним зволженим тампоном або серветкою, обмеживши площу металевим трафаретом. Знімають тонкий (близько 1 см) поверхневий шар досліджуваного матеріалу площею 1 см² і переносять його в стерильний фізіологічний розчин.

Сипучі продукти відбирають стерильною ложкою – близько 50 г продукту з різних місць. Для аналізу порційних, розфасованих продуктів, продуктів тваринного й рослинного походження в невеликому обсязі відбирають певну кількість одиниць.

Проби беруть, чітко дотримуючись умов стерильності, транспортують в охолоджену вигляді і починають аналіз не пізніше, ніж через 2 год з моменту взяття проби.

Методика дослідження. Перед проведенням дослідження проби гомогенізують і готують серійні розведення (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 та ін.).

Визначення загального мікробного обсіменіння. ЗМЧ визначають у тих продуктах і стравах, які не повинні містити специфічних мікроорганізмів (не досліджують молочнокислі продукти, квашення та ін.). Методики дослідження рідких і щільних продуктів такі ж, як для води і ґрунту відповідно, але посіви інкубують при 30 °С протягом 72 год в умовах природної аерації. Зазначені умови культивування дозволяють виявити в субстраті мезофільні аеробні й факультативні анаеробні мікроорганізми. Суть методу полягає в посіві чітко визначеного об'єму досліджуваної речовини на щільне середовище в чашках Петрі й підрахунку колоній, що вирости.

Вміст бактерій групи кишкової палички визначають за допомогою рідких поживних середовищ (середовище Кесслера), які отримали назву бродильних, тому що виявлення бактерій засноване на їх здатності зброджувати вуглеводи з утворенням газоподібних продуктів. Ряд розведень продукту засівають у пробірки з середовищем Кесслера з поплавками і витримують у термостаті при температурі 43 °С протягом 24 год, а потім переглядають і за наявності газоутворення (бульбашка в поплавку) встановлюють бродильний титр – найменшу кількість продукту, виражену в г або мл, у якій виявлені ознаки бродіння, характерні для БГКП. Продукт вважається незабрудненим, якщо в середовищі Кесслера відсутнє газоутворення. Для визначення колі-титру потрібна ідентифікація кишкової палички. Із цією метою з пробірок, у яких виявлено газоутворення, проводять висів на диференційно-діагностичні середовища (середовище Ендо) з наступною ідентифікацією культури за біохімічними властивостями.

Визначення *Staphylococcus aureus*. Певну кількість досліджуваного матеріалу засівають для накопичення стафілококів у сольовий бульйон і інкубують при 37 °С протягом 24 год. При наявності росту (помутніння середовища) роблять висів на жовтково-сольовий агар для отримання ізольованих колоній, які потім ідентифікують за культуральними, морфологічними, біохімічними (ферментація глюкози й маніту) властивостями й наявністю плазмокоагулази.

Визначення інших умовно-патогенних мікроорганізмів проводять мікробіологічними методом із використанням відповідних накопичувальних і диференційно-діагностичних середовищ.

Визначення сальмонел. Гомогенізовану навіску продукту (зазвичай 25 г) вносять у середовище збагачення (селенітовий бульйон) й інкубують при 37 °С. Через добу роблять висів на щільні диференційні середовища (вісмут-сульфіт агар) та ідентифікують підозрілі культури за біохімічними та іншими ознаками.

ХАРЧОВІ ОТРУЄННЯ МІКРОБНОЇ ЕТІОЛОГІЇ

При потраплянні в харчові продукти й розмноженні в них умовно-патогенних мікроорганізмів з'являються умови для виникнення харчового отруєння бактеріальної природи. Розмноження мікроорганізмів і накопичення їх токсинів у харчових продуктах стає можливим у результаті порушення норм їх заготівлі та процесу виготовлення напівфабрикатів або готових виробів, при неправильному транспортуванні, зберіганні, перевищенні термінів реалізації продуктів.

Харчові отруєння – гострі системні захворювання, що виникають у результаті вживання продуктів, масивно засіяних мікробами, або тих, які містять отруйні для людини речовини.

Відмінні риси харчових отруєнь:

- масовий («вибуховий») характер захворювань;
- короткий інкубаційний період (2–48 год);
- гострий початок і нетривалість захворювань (1–3 дні);
- наявність у анамнезі хворих "загального" продукту харчування;
- припинення спалаху захворювань після вилучення причинного продукту;
- відсутність т. зв. «епідемічного хвоста» (ланцюжків послідовних заражень людини від людини);
- схожість клінічної картини у хворих і залежність її вираженості від кількості вжитого продукту.

Харчові отруєння бактеріальної природи поділяються на харчові токсикоінфекції та мікробні токсикози.

Харчові токсикоінфекції – гострі кишкові захворювання з інфекційним запаленням кишечника й загальною інтоксикацією, що виникають у результаті вживання в їжу масивно засіяних деякими бактеріями продуктів.

Харчові токсикоінфекції обумовлюють ентеробактерії (представники родів *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Yersinia*), вібріони (*Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*), бацили (*Bacillus cereus*), псевдомонади (*Pseudomonas aeruginosa*), стрептококи (*Streptococcus pyogenes*), клостридії (*Clostridium perfringens*) тощо. Збудник бурхливо розмножується в тонкому кишечнику, проникає в лімфоїдний апарат, де відбувається його масова загибель, що супроводжується виділенням ендотоксину. Ендотоксин викликає ураження інтрамурального нервового апарату кишечника, дрібних судин і клітин ЦНС, а бактерії – продуценти токсину – запальний процес кишкової стінки. Захворювання починається раптово, з нудоти, блювання, проносу, болю в животі. До місцевих ознак нерідко приєднуються загальні: головний біль, іноді підвищення температури, падіння серцево-судинної діяльності аж до колапсу. Одуjuanня настає швидко, але слабкість і виділення збудника з випорожненнями можуть затягуватися.

Мікробні токсикози – гострі захворювання, що виникають у результаті вживання в їжу продуктів, які містять мікробні токсини. До мікробних токсикозів належать ботулізм (*Clostridium botulinum*) і токсикоз, викликаний стафілококовим ентеротоксином (*Staphylococcus aureus*). Останній зазвичай пов'язаний зі вживанням в їжу молочних і кремкових виробів, консервів, м'ясних і овочевих салатів тощо. Їжа, в якій міститься ентеротоксин, не змінює своїх органолептичних властивостей. Прогрівання не рятує її від токсину. Харчові отруєння, обумовлені стафілококовим ентеротоксином, проявляються блюванням, болем у животі й водянистою діареєю вже через 2–6 год після вживання в їжу інфікованих продуктів. Патогенез уражень обумовлений здатністю ентеротоксину індукувати надмірне утворення інтерлейкіну-2 (з проявами загальних симптомів інтоксикації й порушенням гладкої мускулатури кишечника).

Ботулізм – важке токсинемічне захворювання людини з групи ентеральних клостридіозів. Виникає в результаті прийому їжі, що містить екзотоксин *Clostridium botulinum*. Бактерії можуть продукувати екзотоксини 7 сероварів: А, В, С1–2, D, E, F, G. Токсин має надзвичайно високу отруйність для людини, стійкість до нагрівання (10–15 хв при 100 °С), кислій реакції, травних ферментів, добре всмоктується через кишкову стінку в лімфу та кров у незмінному стані й обумовлює тривалу токсинемію. Токсин зв'язується нервовими клітинами й блокує передачу імпульсів через нервово-м'язові синапси. Клініка в початковій стадії, до незворотної фіксації токсину, поліморфна. Специфічні ознаки обумовлені розладом діяльності нервових ядер довгастого мозку.

Всі випадки харчових токсикозів і токсикоінфекцій підлягають обов'язковому розслідуванню із застосуванням бактеріологічних методів.

Бактеріологічне дослідження. Виділення, ідентифікація та підрахунок збудників харчового отруєння в досліджуваному матеріалі є основним методом діагностики. Для виділення та ідентифікації бактерій використовують відповідні поживні середовища та тести. Кількість виявлених бактерій у досліджуваному матеріалі виражають у вигляді показника КУО/г або КУО/мл. Крім факту виявлення бактерій і ступеня обсіменіння ними матеріалу, у виділених культурах виявляють епідеміологічні маркери (серовар, фаговар та ін.). Такі маркери допомагають установити ідентичність культур, виділених від хворих і з підозрюваних харчових продуктів. У ряді випадків у виділених культурах або безпосередньо в досліджуваному матеріалі визначають фактори патогенності збудників. Із цією метою використовують різні моделі: зараження лабораторних тварин (ботулінічний нейротоксин, стафілококовий ентеротоксин, токсин ерсиній тощо), зараження культур тканин («блювотний» токсин *B.cereus*). Крім того, застосовують імунологічні методи виявлення токсинів (преципітація в гелі, імунодифузія, РНГА, реакція зворотної пасивної аглютинації латексу та ін.), а також геноіндикацію специфічних нуклеотидних послідовностей, що кодують синтез токсинів (ПЛР).

Основний метод діагностики ботулізму – встановлення наявності й типу токсину в харчових продуктах (або сировині, з якої вони виготовлені), з якими пов'язують захворювання, в сироватці і плазмі крові, в блювотних масах, промивних водах шлунка, випорожненнях, сечі. Продукти (20–30 г) розтирають у ступці з 20–30 мл фізіологічного розчину або желатинофосфатного буфера. Суспензію продуктів, так само як і випорожнення, блювотні маси й інший досліджуваний матеріал центрифугують, надосадову рідину відсмоктують. Наявність токсину в такому матеріалі й сироватці та його тип установлюють у реакції нейтралізації на білих мишах. Техніка біопроб полягає в тому, що кожен із типів досліджуваного матеріал (1,4 мл) змішують з 0,6 мл полівалентної (А, В, Е) діагностичної антитоксичної сироватки, інкубують при кімнатній температурі 5 хв, після чого суміш у об'ємі 0,7–1 мл вводять у черевну порожнину або внутрішньовенно двом білим мишам. Двом контрольним мишам роблять ін'єкції з такою ж дозою матеріалу, змішаного з 0,6 мл фізіологічного розчину. Для контамінованих бактеріями проб необхідний ще один контроль – прогрітий при 80–90 °С протягом 20 хв матеріал, який вводять двом мишам. Кожен матеріал вводять окремим шприцом. У разі наявності в ньому токсину контрольні тварини гинуть зазвичай через 6–24 год (спостереження ведеться до 4 діб) при явищах паралічу м'язів, западання м'язів черевної стінки («осина талія»), дихальної недостатності. Миші, що отримували суміш матеріалу з сироваткою, виживають. Аналогічним способом установлюють тип токсину. При наявності типових антитоксичних еритроцитарних діагностикумів серотип токсину краще визначати в РПГА.

При діагностиці стафілокової токсикоінфекції проводять виділення й ідентифікацію стафілоkokів за допомогою бактеріологічного методу з використанням жовтково-сольового й кров'яного агару з подальшим визначенням плазмокоагуляційної й лецитиназної активності, здатності ферментувати маніт в анаеробних умовах. Для виявлення ентеротоксину у виділеній культурі стафілокока застосовують РНГА та біологічну пробу – внутрішньовенне зараження мишей фільтратом бульйонної культури (2–3 мл/кг). При потрапленні у кровотік токсинів у мишей виникають блювання й діарея.

За типом харчових отруєнь можуть протікати захворювання, викликані деякими патогенними бактеріями (сальмонелами, шигелами, ерсиніями, ешеріхіями, холерним вібрионом та ін.). При виділенні зазначених бактерій із харчового продукту і/або клінічного (секційного) матеріалу замість діагнозу харчового отруєння ставлять діагноз відповідної інфекції.

Слід враховувати, що певні харчові продукти можуть бути як субстратом для розмноження збудників харчових отруєнь, так і фактором передачі кишкових інфекцій.

МІКРОФЛОРА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Джерела забруднення лікарських засобів. Сучасний арсенал лікарських засобів (ЛЗ) налічує великий асортимент препаратів. При цьому технологія їх виробництва далеко не завжди гарантує повну мікробну чистоту.

Основні джерела забруднення ЛЗ: сировина, технологічна вода, виробниче обладнання, повітря робочих приміщень, робочий персонал, упаковка готової продукції. Мікробна контамінація лікарського препарату може викликати захворювання у людини і, крім того, порушує його стабільність. Розмноження мікробів змінює консистенцію мазевих основ, викликає їх згіркнення, появу неприємного запаху тощо. У рідких формах метаболіти мікроорганізмів можуть змінити хімічний склад препарату, а також призвести до утворення токсичних продуктів. У твердих лікарських формах ризик мікробного псування мінімальний через відсутність умов для розмноження мікробів.

Ін'єкційні та офтальмологічні препарати повинні бути стерильними, для інших препаратів забруднення небажане, але можливе, тому що регламент їх виготовлення не вимагає підтримки суворої стерильності.

Мікрофлора лікарської рослинної сировини. Мікроби, що живуть на лікарській рослинній сировині, можуть містити представників нормальної епіфітної та фітопатогенної мікрофлори. Мікробна забрудненість рослинної лікарської сировини залежить від вихідної забрудненості, але може підвищуватися на етапах первинної обробки, подрібнення, приведення до стандартного стану. Псування сировини відбувається в основному при підвищеній вологості, що сприяє розмноженню гнильних мікроорганізмів.

Епіфітна мікрофлора (від грец. *Epi* – на + *phyton* – рослина) представлена мікроорганізмами, що живуть на поверхні рослин. Мікроорганізми-епіфіти не заподіюють шкоди рослині, а в деяких випадках складають конкуренцію фітопатогенним мікробам. Основні представники епіфітної мікрофлори – *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mesentericus*.

Фітопатогенна мікрофлора. Здатністю викликати хвороби рослин володіють різні віруси, бактерії, гриби й віроїди. Потрапляючи всередину клітини, мікроорганізми порушують нормальний хід фізіологічних процесів, перш за все фотосинтезу й дихання, викликаючи тим самим її загибель. Багато хвороб рослин викликаються бактеріями родів *Pseudomonas*, *Agrobacter*, *Acetobacter*, *Erwinia*, *Xanthomonas*. При порушенні правил зберігання сировини й ЛЗ мікроби не тільки тривало зберігаються, а й розвиваються, викликаючи істотні зміни в лікарській сировині. Ознаки мікробного псування сировини: зміна кольору та консистенції, поява неприємного запаху, пліснявіння, загнивання. Уражена сировина непридатна до вживання, оскільки в ній знижується вміст діючих речовин і вона втрачає фармакологічні властивості.

Мікробне забруднення готових лікарських форм. Систематизація та аналіз отриманих відомостей дозволили зробити висновок про найбільш часті випадки виявлення в препаратах, що викликали захворювання, бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *Enterococcus*, а також деяких видів спорових паличок, дріжджових і цвілевих грибів. У зв'язку з цим Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) запровадила фармакопейні норми, що обмежують мікробну забрудненість нестерильних готових лікарських форм. Відповідно до вимог ВООЗ та фармакопеї в 1 г (мл) лікарського препарату для прийому всередину має бути не більше 1 000 бактерій і 100 цвілевих і дріжджових грибів. У лікарських препаратах, які не потребують стерильності, не повинні бути присутні бактерії сімейства ентеробактерій, синьогнійна паличка, золотистий стафілокок.

При виготовленні лікарської продукції її мікробіологічна чистота забезпечується дотриманням правил асептики – комплексом заходів, спрямованих на попередження потрапляння мікроорганізмів на операційне поле, в даному випадку – в ліки.

Асептичні умови досягаються шляхом використання дистильованої води, стерильного посуду, інструментарію, знезаражування повітря приміщень за допомогою бактерицидних ламп, вологого прибирання з дезінфікуючими розчинами, дотриманням особистої гігієни працівниками.

В умовах хіміко-фармацевтичних виробництв якості лікарських засобів, включаючи мікробну чистоту, гарантовано дотриманням зводу обов'язкових принципів, норм і правил, іменованих «Good manufacturing practise» (GMP) – «Належна виробнича практика» (НПП). Основна ідея GMP пов'язана із забезпеченням відповідної системи виробництва й контролю, що гарантує отримання якісних лікарських засобів.

Алгоритм «Визначення загального мікробного числа води»

Суть методу полягає у визначенні в 1 см^3 води загального вмісту мезофільних аеробів і факультативних анаеробів, здатних рости на поживному агарі даного складу при температурі 37°C протягом 24 год, утворюючи колонії, видимі при збільшенні в 2–5 разів.

Визначення загального мікробного числа води можна проводити методом серійних десятикратних розведень із посівом на м'ясо-пептонний агар (МПА) і методом прямого мікроскопічного підрахунку мікроорганізмів у досліджуваній воді.

При першому методі проводять посів проб води на поживні середовища з подальшим підрахунком колоній, що виросли.

Об'єм води для посіву вибирають із таким розрахунком, щоб на чашках виросло від 30 до 300 колоній. Водопровідну воду засівають в об'ємі 1 мл, воду відкритих водойм – в об'ємах 1; 0,1 і 0,01 мл. Для посіву $0,1\text{ см}^3$ і менших об'ємів води використовують розведення аналізованої води. Для цього в пробірку з 9 см^3 стерильної води вносять 1 см^3 аналізованої води. Іншою стерильною піпеткою продуванням повітря ретельно перемішують вміст пробірки, відбирають із неї 1 см^3 і переносять у чашку, що буде відповідати посіву $0,1\text{ см}^3$ аналізованої води. При необхідності посіву менших об'ємів води цією ж піпеткою переносять 1 см^3 вмісту першої пробірки в наступну з 9 см^3 стерильної води. Посів 1 см^3 з другої пробірки буде відповідати посіву $0,01\text{ см}^3$ аналізованої води та ін.

Із флаконів із пробою води знімають паперові ковпачки, виймають пробки, шийки фламбірують, після чого воду ретельно перемішують обережним продуванням повітря через стерильну піпетку.

Засів кожного розведення проводять глибинним способом. Для цього стерильною піпеткою відбирають по 1 мл води і вносять у 2 стерильні чашки, злегка відкриваючи кришку. Після внесення води в чашки Петрі її заливають $10\text{--}12\text{ см}^3$ охолодженого поживного агару. Воду швидко змішують із агаром, обережно нахилиючи або обертаючи чашку по поверхні столу. Після цього чашки залишають на горизонтальній поверхні до застигання середовища. Після застигання агару чашки з посівами поміщають у термостат і вирощують при 37°C протягом 24 год.

Воду з відкритих водойм засівають паралельно на дві серії чашок, одну з яких інкубують при температурі 37°C протягом 24 год, а іншу – при $20\text{--}22^\circ\text{C}$ 48 год. При температурі 20°C виростає більша кількість сапрофітів і саме вони є найбільш активними учасниками процесу самоочищення водойми. У місцях великого забруднення стічними водами чисельне значення обох груп сапрофітів близьке, тому динаміка чисельності цього показника вважається чутливим індикатором забруднення водойм, особливо органічними речовинами.

Для виявлення цвілевих і дріжджових грибів досліджувану воду засівають по 0,5 мл на середовище Сабуро й інкубують при кімнатній температурі протягом 3–4 діб. Підраховують число колоній і також розраховують середнє арифметичне. Результат (ЗМЧ) обчислюють шляхом підсумовування середнього арифметичного числа бактерій, дріжджових і цвілевих грибів і виражають у КУО/мл.

Облік результатів. Колонії, що вирости як на поверхні, так і в глибині агару, підраховують за допомогою лупи зі збільшенням у 2–5 разів або приладу для рахунку колоній. Для цього чашку кладуть догори дном на чорний фон. Для більшої точності рахунку кожен розрахований колонію відзначають із боку дна тушшю або чорнилом для скла.

Оцінюють тільки ті розведення, при посіві яких на чашці виросло від 30 до 300 колоній. При посіві 1 см³ нерозведеної проби враховують будь-яку кількість колоній, але не перевищують 300. Якщо в чашці з найбільш високим розведенням виросло понад 300 колоній і аналіз не можна повторити, то допускається підраховувати колонії за допомогою пластинки з сіткою і лупи при сильному бічному освітленні. Підраховують не менше 20 квадратів площею 1 см² кожний у різних місцях чашки, потім виводять середнє арифметичне число колоній на 1 см², значення якого множать на площу чашки в см², обчислену за формулою: $S = \pi r^2$.

Результат підрахунку колоній у кожній чашці виражають у кількості бактерій на 1 см³ аналізованої води з урахуванням посіяного об'єму. За остаточну кількість бактерій приймають середнє арифметичне результатів підрахунку на двох паралельних чашках або різних розведень. Результати округлюють наступним чином: якщо результат знаходиться в межах чисел від 1 до 100, то записують ті числа, які отримані; якщо результат знаходиться в межах чисел від 101 до 1000, його округлюють до 10; якщо результат знаходиться в межах чисел від 1001 до 10000, його округлюють до 100 та ін.

Кількість колоній враховують, орієнтуючись на одну чашку, у таких випадках: якщо на іншій чашці при посіві з розведення виросло менше 20 колоній; при повзучому рості бактерій, що поширилися на всю поверхню чашки; при кількості колоній понад 300.

Рахункову пластинку рекомендується застосовувати при підрахунку кількості колоній, коли на обох чашках відзначений повзучий ріст. При цьому прораховують квадрати на вільних від суцільного росту місцях чашки.

Прямий мікроскопічний метод визначення загальної кількості мікроорганізмів полягає в концентрації бактерій на мембранних фільтрах (при пропущенні через них досліджуваної води), подальшому фарбуванні еритрозином і мікроскопії.

Прямий метод зручний тим, що результат, тобто кількість мікроорганізмів у 1 мл води, може бути отриманий протягом декількох годин. Тому рекомендується використовувати цей метод, якщо необхідно дати швидку санітарну оцінку води: при оцінці процесу природного самоочищення

водойм, ефективності роботи очисних споруд на всіх етапах та ін. Для фільтрування води використовують мембранні фільтри, фільтр Зейтца або спеціальний апарат Долгова–Разумова.

Мембранний фільтр із пофарбованими мікроорганізмами висушують і поміщають на предметне скло, попередньо додавши краплю імерсійної олії на скло й на фільтр, який накривають тонким покривним склом. Мікроскопують з імерсійним об'єктивом, в окуляр вкладають сітчастий мікромір, розділений на дрібні квадрати. Підраховують мікроорганізми в 20 полях зору (в кожному полі зору в 4 маленьких квадратах, розташованих по діагоналі). Розрахунок загальної кількості бактерій в 1 мл (X) ведеться за формулою:

$$X = S \times N \times 10^6 / (S1 \times V)$$

де: S – фільтруюча площа приладу (мм²);

10⁶ – перевідний коефіцієнт квадратних міліметрів у квадратні мікрометри;

N – середня кількість бактерій в одному квадраті;

S1 – площа квадрата окулярного мікромітра (мкм²);

V – об'єм профільтрованої води (мл).

Алгоритм «Визначення коліформних бактерій (БГКП)»

Кількість коліформних бактерій виражають у вигляді колі-титру або колі-індексу. Колі-індекс води – мінімальна кількість БГКП у 1 л води. Колі-титр води – мінімальна кількість води, яка містить 1 бактерію із БГКП.

Для визначення цих показників використовують метод мембранних фільтрів і титраційний (бродильний) метод.

Дослідження води методом мембранних фільтрів. Метод заснований на фільтрації встановленого об'єму води через мембранні фільтри (рис. 2), вирошуванні посівів на диференційно-діагностичному середовищі й подальшій ідентифікації колоній за культуральними та біохімічними ознаками.

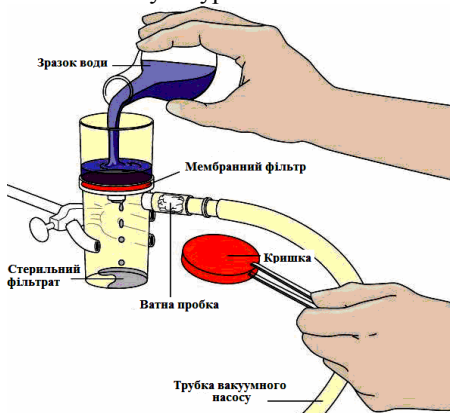


Рис. 2. Фільтрування води за допомогою фільтра Зейтца

Перед використанням мембранні фільтри перевіряють на відсутність тріщин, отворів, міхурів і кип'ятять у дистильованій воді протягом 10 хв (при цьому не можна допускати скручування фільтрів). Для повного видалення з фільтрів залишків розчинників, які застосовуються при їх виготовленні, кип'ятіння слід повторити 3–5 разів зі зміною дистильованої води. Підготовлені таким чином фільтри зберігаються в банках з дистильованою водою або в сухому вигляді. У день постановки досліду фільтри повторно стерилізують кип'ятінням у дистильованій воді протягом 10 хв.

Фільтрування проводять за допомогою спеціальних приладів або фільтра Зейтца (рис. 3). На нижню частину фільтрувального апарату (столік) кладуть пінцетом стерильний мембранний фільтр, притискають його верхньою частиною приладу (склянкою, лійкою) і закріплюють пристроєм, передбаченим конструкцією приладу. Відросток колби, в яку фільтрується вода, за допомогою гумової трубки з'єднують із насосом для створення вакууму в приймальному посуді (близько 0,25 атм).

Об'єм проби води залежить від цілей дослідження. При аналізі води, що надходить у водопровідну мережу, і в найбільш характерних її точках необхідно аналізувати обсяг не менше 333 см³, профільтровуючи цей об'єм не менше ніж через два фільтри.

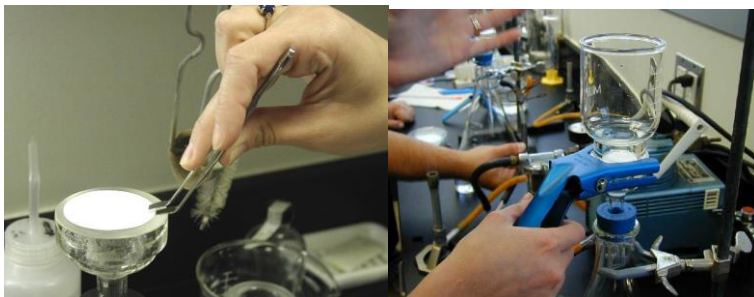


Рис. 3. Підготовка фільтрувального апарату

На етапах очистки аналізують не менше двох десятикратних об'ємів води, обраних залежно від її якості таким чином, щоб на одному з фільтрів виростало не більше 30 колоній бактерій групи кишкових паличок. При цьому необхідно орієнтуватися на результати попередніх аналізів води в цих же пунктах (наприклад, для води після первинного хлорування можуть бути обрані об'єми 10 і 100 см³; для незнезараженої води – 0,1, 1 і 10 см³). При аналізі води невідомої якості слід засівати 3–4 десятикратних об'ємів (наприклад, із водопровідної мережі можна фільтрувати 3; 30; 100; 200 см³ води; на етапах очистки – 0,1; 1; 10; 100 см³ води).

Для фільтрування у воронку або стакан наливають необхідні об'єми води, починаючи з менших, а потім великі, щоразу змінюючи фільтри.

Найменший об'єм води 1 мл слід фільтрувати через фільтр, попередньо змочений стерильною водою. Після фільтрування верхню частину приладу знімають і фільтр обережно (при збереженні вакууму для видалення надлишку вологи на фільтрі) стерильним пінцетом переносять на середовище Ендо в чашку Петрі. Фільтр накладають вгору поверхнею, на якій осіли бактерії, уникаючи появи бульбашок повітря між фільтром і середовищем. На одну чашку можна розмістити 4 фільтри, під кожним на дні чашки слід надписати об'єм води, номер проби і число.

Якщо вода каламутна, то фільтрування ведеться відразу через два фільтри: попередній фільтр № 6 (для затримання великих часток) поміщають на фільтр № 2. Після фільтрування обидва фільтри переносять на середовище Ендо. Чашки з фільтрами поміщають у термостат та інкубують при температурі 37°C протягом 24 год. При остаточному результаті враховують колонії, що вирости на обох фільтрах.

При наявності у воді БГКП на фільтрах з'являється ріст типових для цих бактерій колоній: темно-червоні з металевим блиском або червоні, рожеві з червоним центром мають чіткий відбиток на зворотному боці фільтра (рис. 4). Бактерії з таких колоній забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопію. Із культурою грамнегативних бактерій лактозопозитивних колоній ставлять оксидазний тест для диференціації бактерій родини *Enterobacteriaceae* від *Pseudomonadaceae* (останні є оксидазоутворюючими бактеріями). Для цього фільтр із колоніями бактерій переносять пінцетом, не перегортаючи, на клаптик фільтрувального паперу, змоченого диметил-п-фенілендіаміном. При наявності оксидази реактив забарвлює колонію в синій колір. 2–3 колонії, що не змінили забарвлення (оксидазонегативні) засівають у пробірку з напіврідким середовищем з 0,5 % розчином глюкози й інкубують при 37°C. При появі кислоти й газу результат вважають позитивним. Підраховують кількість червоних колоній на фільтрі й визначають колі-індекс.



Рис. 4. Колонії *E.coli* на фільтрі

Колі-індекс (індекс ОКБ, БГКП) вираховують так: кількість бактерій групи кишкових паличок, які вирости в уже згадуваному об'ємі води, множать на 1000 см³ і ділять на цей об'єм води.

$$\text{індекс} = \frac{K \times 1000}{V},$$

де: K – кількість перевірених на належність до БГКП колоній на фільтрах;
 V – об'єм профільтрованої води через фільтри, на яких проводили облік.

Приклад 1. При посіві трьох об'ємів води по 100 см³ на одному фільтрі виросло три колонії бактерій групи кишкових паличок, на двох інших немає росту; колі-індекс дорівнює $(3 \times 1000) : 300 = 10$.

Приклад 2. При посіві 10 і 100 см³ води на одному фільтрі виросла одна колонія, на іншому виросло п'ять колоній; колі-індекс дорівнює $(6 \times 1000) : 110 = 54$.

Якщо на одному з фільтрів суцільний ріст бактерій і підрахунок їх неможливий, тоді в розрахунок приймають той об'єм води, при фільтруванні якого на фільтрі виросли ізольовані колонії.

Для переведу індексу в титр використовують формулу:

$$1000 / \text{Титр} = \text{Індекс}$$

Відповідно до стандарту, у води питної індекс ЗКБ повинен бути не більше 3, у води плавального басейну – не більше 10.

Метод мембранних фільтрів є сучасним, точним, менш трудомістким і дешевшим порівняно з титраційним. Він зручний і тим, що дозволяє концентрувати бактерії, які містяться в значних об'ємах води на невеликій поверхні фільтра. Однак одним із найбільш істотних його недоліків є те, що цим методом виявляється менша кількість бактерій порівняно з титраційним. Для більшої точності рекомендується проводити дослідження води паралельно обома методами.

Титраційний метод дослідження води заснований на накопиченні бактерій після посіву встановленого об'єму води в рідке живильне середовище з подальшим пересівом на диференційно-діагностичне середовище та ідентифікації колоній за культуральними та біохімічними тестами.

Об'єм засіяної води залежить від характеру досліджуваного об'єкта, але обов'язково посів ведеться в 2–3, а в деяких випадках – в 5 повторях. Об'єм води вибирають із таким розрахунком, щоб в одному з розведень отримати хоча б один негативний результат. При дослідженні на етапах очистки та знезараження засівають 100; 10; 1 і 0,1 см³ води; на виході у водопровідну мережу і в найбільш характерних її точках засівають три об'єми по 100 см³, три об'єми по 10 см³ і три об'єми по 1 см³.

Посів води проводиться в глюкозо-пептонне середовище (1 % пептонна вода; 0,5 % розчин глюкози; 0,5 % розчин хлориду натрію; індикатор Андреде; поплавок). Для посівів великих об'ємів води використовують

концентроване середовище, що містить 10-кратні кількості зазначених речовин. Так, посів 100 мл води роблять у 10 мл концентрованого середовища, 50 мл – у 15 мл концентрованого середовища, 10 мл – у 1 мл концентрованого середовища, 1 мл і наступні розведення – у 10 мл глюкозо-пептонного середовища нормальної концентрації. Великі об'єми води засівають у флакони або колби, менші – в пробірки. Посіви інкубують у термостаті протягом доби при температурі 37°C.

З пробірок із посівами, в яких спостерігається помутніння (а також утворення кислоти й газу в поплавку), роблять висів петлею штрихами на поверхню середовища Ендо, розділеного на 3–4 сектори. Посіви витримують у термостаті при температурі 37°C протягом 16–18 год. При наявності на середовищі Ендо характерних для БГКП колоній (червоних з металевим блиском) слід провести всі тести, перераховані вище. Позитивна відповідь на наявність БГКП дається в тому випадку, якщо спостерігається ріст характерних колоній, утворених оксидазонегазивними, Гр (–) бактеріями, які викликають бродіння глюкози при 37°C з утворенням кислоти й газу. Таким чином, позитивна відповідь видається через 40–42 год.

Результат виражається у вигляді індексу (титру) БГКП, цифрове вираження якого визначають за таблицями: при аналізі питної води на виході у водопровідну мережу і з неї – за *табл. 6*, при аналізі води на етапах очистки та знезараження – за *табл. 7*.

Таблиця 6

Визначення колі-індексу БГКП при дослідженні 500 см³ води

Кількість позитивних результатів аналізу води з п'яти флаконів по 100 см ³	Колі-індекс	Межі індексу (довірчі границі)		Колі-титр
		нижня	верхня	
0	Менше 2	0	6,0	Більше 455
1	2	0,1	12,6	455
2	5	0,5	19,2	196
3	9	1,6	29,4	109
4	16	3,3	52,9	62
5	Більше 16	8,0	-	Менше 62

Таблиця 7

Визначення колі-індексу БГКП при дослідженні води на етапах очистки

Об'єм дослідженої води, см ³				Колі-індекс	Колі-титр
100	10	1,0	0,1		
–	–	–	–	Менше 9	Більше 111
–	–	+	–	9	111
–	+	–	–	10	105

Алгоритм «Визначення термотолерантних коліформних бактерій (ТКБ)»

ТКБ визначають тими ж методами, як і БГКП, крім останнього етапу ідентифікації, який проводиться по ферментації лактози на напіврідкому поживному середовищі при 44,5°C. У разі зростання на середовищі Ендо типових лактозопозитивних колоній, Гр (–), оксидазонегативних, здатних ферментувати лактозу при 44,5°C, їх ідентифікують як ТКБ, індекс чи титр визначають за табл. 6.

Алгоритм «Визначення коліфагів»

Присутність коліфагів (бактеріофагів, які паразитують на *E.coli*) визначають методом агарових шарів за Грація.

Для визначення використовують чутливі музейні культури мікроорганізмів (тест-організми): мутант *Salmonella taphimurium*, непатогенних для людини, штам *Escherichia coli* K-12 Hfr із відповідної колекції культур ATCC 23631 або NTCT12486, штам *E.coli* роду CN, WG5, а також бактеріофаги MS2, NCTC12487 або ATCC 15597 для контролю чутливості тест-організмів.

За 18–24 год перед проведенням аналізу необхідно зробити посів тест-культури *E.coli* K12 F + на скошений поживний агар (МПА). Перед проведенням аналізу зробити змив із «косяка» 5 мл стерильної водопровідної води і за стандартом мутності приготувати суспензію тест-організму в концентрації 10⁹ клітин/мл.

Розплавити й остудити до 45°C 2 % живильний агар. Досліджувану воду кількістю 100 мл внести в 5 стерильних чашок Петрі (по 20 мл у кожную). У живильне середовище додати змив *E.coli* (з розрахунку 1 мл на 100 мл агару) і добре перемішати. Отриману суміш залити по 30 мл спочатку в порожню чашку Петрі (контроль), а потім у всі чашки, що містять досліджувану воду. Вміст чашок перемішують обертальними рухами. Після застигання живильного середовища чашки перевертають догори дном і ставлять для інкубації в термостат при 37 °C на 18–24 год.

У результаті індикаторна культура утворює рівномірний суцільний ріст, а при наявності коліфагів у цьому «газоні» утворюються прозорі пляшки («негативні колонії» бактеріофага). Облік результатів проводять шляхом підрахунку й підсумовування пляшок, які виросли на 5 чашках Петрі. Результати виражають у пляшкоутворюючих одиницях (БУО) на 100 мл води. У контрольній пробі пляшки мають бути відсутні.

Алгоритм «Визначення спор сульфїтредукуючих клостридій»

Випробувану воду вносять у розплавлене й охолоджене середовище Вільсона–Блера. Середовище містить тіосульфат (гіпосульфїт) і безбарвну сіль заліза. У результаті проростання спор, розмноження клостридій і відновлення ними сульфїту утворюється сульфїд заліза, який надає середовищу чорного кольору.

Кількісно ці мікроорганізми в воді можна визначити методом мембранної фільтрації або прямим посівом.

Перед посівом пробу води прогрівають на водяній бані при температурі $75 \pm 5^\circ\text{C}$ протягом 15 хв для знищення вегетативних форм. При дослідженні хлорованої води можна її не прогрівати. Застосовуючи метод мембранної фільтрації, пробу води певного об'єму пропускають через фільтр, який потім поміщають у пробірку з підготовленим розплавленим живильним середовищем верхньою стороною всередину (пробірка з живильним середовищем після посіву повинна бути негайно охолоджена в холодній воді, щоб уникнути потрапляння повітря) або в чашку Петрі на поверхню живильного середовища, яка потім заливається товстим шаром такого ж живильного середовища.

Метод прямого посіву передбачає посів у стерильні пробірки 20 мл води наступним чином: по 10 мл у 2 пробірки (об'ємом не менше 30 мл), або по 5 мл у 4 пробірки (об'ємом не менше 15 мл).

Зверху посіви води заливають гарячим ($70\text{--}80^\circ\text{C}$) залізусульфітним агаром у кількості, що перевищує об'єм води в 2 рази. Середовище заливають по стінці пробірки, намагаючись не допустити утворення бульбашок повітря. Пробірки з посівами швидко охолоджують у склянці з холодною водою, інкубують при 44°C протягом 24 год.

Кількісному обліку підлягають тільки ті посіви, де отримані ізольовані колонії. Підраховують чорні колонії, що виростили як на фільтрі, так і в товщі живильного середовища. Результат аналізу виражають числом колонієутворюючих одиниць (KVO) спор сульфітредукуючих клостридій у певному об'ємі води (підданої аналізу).

Термінологія. Санітарно-показові мікроорганізми, автохтонна й алохтонна мікрофлора, сапробність, загальне мікробне число, колі-титр, колі-індекс, седиментаційний метод, аспіраційний метод, титраційний (бродильний) метод, метод мембранних фільтрів.

Запитання для контролю знань

1. Предмет, методи й об'єкти вивчення санітарної мікробіології.
2. Які санітарно-показові мікроорганізми використовуються для характеристики об'єктів навколишнього середовища при санітарно-мікробіологічних дослідженнях? Які вимоги пред'являють до них? Яке вони мають значення для характеристики об'єктів навколишнього середовища?
3. У чому полягають принципи санітарно-мікробіологічних досліджень об'єктів навколишнього середовища?
4. Вода як середовище існування й збереження мікроорганізмів. Автохтонна й алохтонна мікрофлора відкритих водойм. Що таке сапрофіти? Які мікроорганізми є показниками процесу самоочищення води?
5. У чому полягає санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води? Які методи використовуються для санітарно-мікробіологічного дослідження води?

6. Які санітарно-показові мікроорганізми використовуються при оцінці якості питної води? Які вимоги Держстандарту до питної води?

7. Опишіть мікрофлору ґрунту. Яка роль ґрунту в передачі інфекційних захворювань? Які чинники впливають на виживання патогенних мікроорганізмів у ґрунті?

8. Які санітарно-показові мікроорганізми використовуються при оцінці забруднення ґрунту?

9. Які методи застосовуються для санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту?

10. Яка роль повітря в передачі інфекційних захворювань? Дайте характеристики мікрофлори повітря.

11. Назвіть санітарно-показові мікроорганізми повітря закритих приміщень, методи їх виявлення. Які критерії оцінки чистоти повітря закритих приміщень?

12. Наведіть класифікацію харчових отруєнь і назвіть збудників, які їх викликають.

13. Назвіть методи санітарно-мікробіологічного дослідження харчових продуктів.

14. Які санітарно-показові мікроорганізми використовуються при оцінці якості харчових продуктів?

15. Як проводяться санітарно-мікробіологічні дослідження харчових продуктів із метою виявлення ботулотоксину, патогенних стафілококів і сальмонел – збудників гострих гастроентеритів?

Тестові завдання

1. У бактеріологічній лабораторії проводиться дослідження якості питної води, її мікробне число виявилось близьким до 100. Які мікроорганізми враховувалися при цьому?

А. Всі бактерії, які вирости на поживному середовищі.

Д. Умовно-патогенні бактерії.

В. Бактерії групи кишкової палички.

Е. Ентеропатогенні бактерії і віруси.

С. Бактерії, патогенні для людей і тварин.

2. При визначенні мікробного числа повітря в лікарняній палаті виявилось, що воно становить $1\ 500\ \text{КУО}/\text{м}^3$. Які групи мікроорганізмів враховувалися при цьому?

А. Всі бактерії, які вирости на поживному середовищі.

Д. Всі патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми.

В. Стафілококи й гемолітичні стрептококи.

Е. Збудники шпитальних інфекцій.

С. Бактерії й віруси – збудники респіраторних інфекцій.

3. Під час санітарно-бактеріологічного дослідження водопровідної води отримали наступні результати: загальна кількість бактерій у 1 мл – 80, колі-індекс – 3. Як розцінити результат дослідження?

- A. Вода придатна до вживання. D. Вода забруднена.
B. Вода сумнівної якості. E. Вода дуже забруднена.
C. Вода дуже сумнівної якості.

4. Під час санітарно-бактеріологічного дослідження води методом мембранних фільтрів виявлено дві червоні колонії на мембранному фільтрі (середовище Ендо), через який пропустили 500 мл досліджуваної води. Розрахуйте колі-індекс та колі-титр досліджуваної води.

- A. 4 і 250. B. 2 і 500. C. 250 і 4. D. 500 і 2. E. 250 і 2.

5. У лікарні вирішили провести контроль якості стерилізації інструментів у автоклаві за допомогою біологічного методу. Які мікроорганізми доцільно використовувати як тест-системи?

- A. Споріві. C. Кислотостійкі. E. Термофіли.
B. Капсульні. D. Патогенні.

ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник / за ред. В. П. Широбокова. – 2-е вид. – Вінниця Нова книга, 2011. – 952 с.
2. Санитарная микробиология (Справочник) / В. П. Иванов, А. Г. Бойцов, А. А. Порин и др. – Санкт-Петербург, 1998. – 286 с.
3. Санитарная микробиология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. А. Ожередова, А. Ф. Дмитриев, В. Ю. Морозов и др. – Ставрополь : АГРУС, 2014. – 180 с.: ил. – ISBN 978-5-9596-0993-1. – Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/314406>

Додаткова

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 480 с.
2. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований : учеб. пособие / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. – Москва : ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 600 с.
3. USML Step 1. Lecture notes. – New York, 2018. – 2568 p.
4. Murray P. R. Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed / P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller. – Washington: ASM Press, 2015. – 848 p.
5. Ananthanarayan. Textbook of Microbiology. 9th Ed. / Ananthanarayan, Paniker. – Orient Blackswan, 2013. – 657 p.
6. Medical Microbiology, 18th Ed. with studentconsult online access / D. Greenwood, R. C. B. Slake, M. Barer, L. Irving. – Churchill Livingstone, 2012. – 794 p.
7. Конспект лекцій.

Навчальне видання

САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

**Методичні вказівки для студентів II–III курсів
спеціальності «Медицина», «Стоматологія»
освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр»**

Упорядники Коваленко Наталія Іллівна
 Замазій Тетяна Миколаївна

Відповідальний за випуск Н. І. Коваленко



Редактор С. В. Рубцова
Комп'ютерна верстка О. Ю. Лавриненко
Комп'ютерний набір Н. І. Коваленко

Формат А5. Ум. друк. арк. 3,0. Зам. № 21-34091

**Редакційно-видавничий відділ
ХНМУ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022
izdatknmurio@gmail.com**

Свідцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.