

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ**  
**Федеральное государственное бюджетное**  
**образовательное учреждение**  
**высшего профессионального образования**  
**«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

---

---

**Н. А. Правосудова, В. Л. Мельников,**  
**Л. В. Мельников**

# **Основы санитарной и фармацевтической микробиологии**

**Учебное пособие**

**ПЕНЗА 2014**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Пензенский государственный университет» (ПГУ)

---

Н. А. Правосудова, В. Л. Мельников,  
Л. В. Мельников

# Основы санитарной и фармацевтической микробиологии

Учебное пособие

Пенза  
Издательство ПГУ  
2014

УДК 579.63

П68

**Р е ц е н з е н т ы:**

кандидат медицинских наук, руководитель Управления  
федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека по Пензенской области

*А. П. Дмитриев;*

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник  
клинического отдела инфекционной патологии  
Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии

*Д. В. Усенко*

**Правосудова, Н. А.**

П68 Основы санитарной и фармацевтической микробиологии : учеб. пособие / Н. А. Правосудова, В. Л. Мельников, Л. В. Мельников. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2014. – 118 с.

ISBN 978-5-94170-907-6

Изложены задачи, методы и принципы санитарной микробиологии. Приведены методы санитарно-микробиологического исследования лекарственных препаратов, сырья, воздуха аптечных помещений, аптечного оборудования и посуды.

Издание подготовлено на кафедре микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней Медицинского института ПГУ и составлено в соответствии с программой по микробиологии для студентов медицинских вузов специальности «Фармация».

Рекомендовано для самостоятельной подготовки студентов медицинских вузов специальности «Фармация» к практическим и контрольным занятиям.

**УДК 579.63**

*Одобрено и рекомендовано к изданию методической комиссией  
Медицинского института Пензенского государственного университета  
(протокол № 1 от 11.09.2014)*

**ISBN 978-5-94170-907-6**

© Пензенский государственный  
университет, 2014

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	6
1. ЗАДАЧИ САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ.....	7
2. МЕТОДЫ САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ .....	8
2.1. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.....	9
2.2. Характеристика основных групп санитарно-показательных микроорганизмов .....	10
2.3. Косвенные показатели загрязнения.....	12
3. ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	15
4. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА.....	17
4.1. Микрофлора воздуха.....	17
4.2. Исследование воздуха.....	19
5. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ.....	26
5.1. Микрофлора воды.....	26
5.2. Исследование воды .....	27
6. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ.....	47
6.1. Микрофлора почвы.....	47
6.2. Исследование почвы.....	49
7. МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....	54
7.1. Нормальная микрофлора растений.....	55
7.2. Фитопатогенные микроорганизмы.....	57
8. МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ .....	60
9. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АПТЕК.....	62
9.1. Микрофлора готовых лекарственных форм.....	63
9.1.1. Источники загрязнения лекарственных средств .....	63
9.1.2. Микрофлора лекарственных средств и ее влияние на свойства препаратов .....	65
9.1.3. Влияние микроорганизмов-контаминантов на здоровье человека .....	66
9.2. Санитарно-микробиологический контроль лекарственных средств.....	68
9.2.1. Испытание на стерильность.....	71
9.2.2. Определение микробиологической чистоты .....	81

9.2.3. Состав питательных сред, используемых для испытания лекарственных средств на стерильность и микробиологическую чистоту.....	100
9.2.4. Испытание на пирогенность .....	109
9.2.5. Исследование на содержание бактериальных эндотоксинов.....	112
9.3. Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, лабораторной посуды, рук и спецодежды персонала.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	116

## **Введение**

Контроль качества лекарственных средств, поступающих на потребительский рынок, находится в тесной связи с безопасностью их применения. В фармацевтической отрасли внедряется система обеспечения качества лекарственных средств от их создания до реализации и применения потребителем. В связи с этим в практической деятельности провизорам необходимы знания в области санитарной и фармацевтической микробиологии. Провизор должен иметь четкое представление о распространении микроорганизмов в природе и об их влиянии на свойства лекарственных препаратов.

В данном пособии представлены вопросы, касающиеся микрофлоры растений, лекарственного сырья и готовых лекарственных средств, микробиологических показателей качества лекарственных препаратов, методов санитарно-микробиологического контроля аптек. Приведенные в пособии сведения позволят овладеть практическими навыками выполнения санитарно-микробиологического исследования лекарственных препаратов, сырья, воздуха аптечных помещений, аптечного оборудования и посуды.

Пособие предназначено для студентов очного и заочного отделений фармацевтических факультетов, а также может быть использовано аптечными работниками.

## **Список сокращений**

- БГКП – бактерии группы кишечной палочки
- ИПМ – изопропилмиристат
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- ЛКП – лактозоположительные кишечные палочки
- ЛС – лекарственное средство
- МПА – мясо-пептонный агар
- НВЧ – наиболее вероятное число
- ОМЧ – общее микробное число
- ОЧС – общее число сапрофитов
- СПМ – санитарно-показательные микроорганизмы
- ТКБ – термотолерантные колиформные бактерии
- ЦПХ – цетилпиридиний хлорид

# 1. ЗАДАЧИ САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Санитарная микробиология – медико-биологическая наука, исследующая закономерности существования потенциально опасных для человека микроорганизмов в окружающей среде и обуславливаемые ими процессы, которые могут непосредственно или косвенно оказывать вредное влияние на здоровье людей.

Санитарная микробиология относится к группе профилактических наук и находится на стыке микробиологии, гигиены и эпидемиологии.

**Объектами** изучения санитарной микробиологии являются:

- потенциально патогенные и санитарно-показательные микроорганизмы внешней среды;
- физические, химические и биологические факторы внешней среды, способствующие или препятствующие существованию этих групп микроорганизмов во внешней среде и их проникновению в организм человека.

Важнейшими **задачами** санитарной микробиологии являются:

1) изучение закономерностей взаимообмена (круговорота) потенциально опасных для человека микробов между микропопуляциями людей, животных и совокупностью объектов окружающей среды, включая условия существования микробов в этих трех средах;

2) поиск и использование микробиологических методов оценки безопасности для человека пищевых продуктов, воды, воздуха и разнообразных предметов и материалов;

3) разработка нормативов, устанавливающих соответствие качественного и количественного состава микрофлоры конкретных объектов внешней среды гигиеническим требованиям;

4) оценка путей воздействия человека и животных на окружающую среду. В результате промышленной и индивидуальной деятельности людей происходит контаминация объектов окружающей среды патогенными микроорганизмами, при этом особое внимание уделяется изучению нарушений процессов самоочищения воды, почвы;

5) выдвижение рекомендаций с целью оздоровления внешней среды посредством антимикробных мероприятий и оценки их эффективности.



## 2. МЕТОДЫ САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Методы, используемые в санитарной микробиологии, можно разделить на две группы: прямые и косвенные.

*Прямые методы* предполагают непосредственное обнаружение возбудителей инфекционных болезней или их токсинов в объектах окружающей среды.

Для определения патогенных микроорганизмов могут быть использованы следующие методы:

- прямой посев исследуемого материала на питательные среды;
- предварительная концентрация патогенных микроорганизмов пропусканием исследуемого объекта (жидкой консистенции) через мембранные фильтры или посевом в среды накопления;
- обнаружение патогенных микроорганизмов методом заражения чувствительных животных (биопроба);
- применение ускоренных методов: серологических, иммунолюминисцентного и радиоиммунного анализов.

Методы прямого обнаружения – наиболее точные и надежные критерии оценки эпидемиологической опасности внешней среды. Несмотря на то, что в настоящее время разработаны методы прямого, ускоренного и количественного определения потенциально патогенных микробов, данный метод имеет целый ряд недостатков. К ним относятся следующие:

- патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде непостоянно – сравнительно легко их можно обнаружить в период эпидемии той или иной инфекции, но очень трудно – в межэпидемические периоды. Основная же деятельность санитарных микробиологов направлена на предупреждение возникновения эпидемий и поэтому вся работа ведется в межэпидемические периоды;
- концентрация патогенных микроорганизмов в окружающей среде значительно уступает непатогенным и распространение их в объектах неравномерно;
- при выделении патогенных микроорганизмов методами культивирования на питательные среды, даже ингибиторные, они неизбежно страдают от конкуренции сапрофитной флоры.

Из вышеизложенного следует, что получаемые отрицательные результаты прямого определения патогенных микроорганизмов

в объектах окружающей среды еще не говорят с достоверностью об их отсутствии.

*Косвенные методы* предполагают определение общего числа микробов и обнаружение санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ).

## **2.1. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах**

Микроорганизмы, обитающие в кишечнике или в верхнем отделе дыхательных путей человека и животных и постоянно выделяющиеся в окружающую среду, называются *санитарно-показательными*.

По количеству СПМ можно косвенно судить о возможном присутствии патогенов во внешней среде. То есть при их определении исходят из предположения, что чем больше объект загрязнен выделениями человека и животных, тем больше будет СПМ и тем вероятнее присутствие патогенов.

Основные требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам:

1) постоянное обитание в естественных полостях организма человека и животных (которые являются их единственной природной средой обитания – биотопом) и выделение их в большом количестве в окружающую среду;

2) продолжительность выживания их в окружающей среде должна быть такой же или большей, чем патогенных микроорганизмов, выводимых из организма теми же путями;

3) не должны размножаться в окружающей среде;

4) не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства при попадании в окружающую среду;

5) должны быть достаточно типичными с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда;

6) индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легко доступными и экономичными микробиологическими методами.

Все санитарно-показательные микроорганизмы являются индикаторами биологического загрязнения. Выделяют несколько групп микроорганизмов, обнаружение которых в объектах окружающей среды говорит о различных видах загрязнения. Но между

группами СПМ нет четких границ, так как некоторые микроорганизмы являются показателями различных видов загрязнения.

**Группа А** включает *обитателей кишечника человека и животных*. Они являются индикаторами *фекального загрязнения*. В нее входят бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – эшерихии, цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы. Кроме того, в эту группу входят энтерококки, протеи, сальмонеллы, клостридии, термофилы, бактериоиды, бактериофаги и др.

**Группа В** включает *обитателей верхних дыхательных путей и носоглотки*. Они являются индикаторами *орального загрязнения*. В нее входят стафилококки (*S. aureus*), а также зеленящие и гемолитические стрептококки, постоянно обитающие на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и выделяющиеся в воздушную среду при разговоре, кашле, чиханье.

**Группа С** включает *микроорганизмы-сапрофиты, обитающие во внешней среде*. Они являются индикаторами *процессов самоочищения*. В нее входят аммонифицирующие, нитрифицирующие бактерии, некоторые спорообразующие бактерии, грибы, актиномицеты, сине-зеленые водоросли и др.

## **2.2. Характеристика основных групп санитарно-показательных микроорганизмов**

**Бактерии группы кишечной палочки.** Группа кишечных палочек относится к семейству *Enterobacteriaceae* и включает рода: *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter*. Бактерии, относящиеся к этим родам, очень сходны между собой по морфологическим и биологическим свойствам.

К бактериям группы кишечных палочек относятся грамотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при 37 °С в течение 24–48 ч или сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа при 37 °С в течение 24 ч и не обладающие оксидазной активностью. На среде Эндо они растут в виде темно-красных колоний с металлическим блеском или без него либо в виде розовых колоний с темным центром.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают теми же характеристиками, но дополнительно сбраживают лактозу с образованием кислоты и газа при 44,5 °С через 24 ч.

Обнаружение бактерий группы кишечных палочек следует рассматривать как показатель фекального загрязнения объекта исследования, а их количество позволяет судить о степени этого загрязнения. Санитарно-показательное значение отдельных родов бактерий группы кишечных палочек неодинаково. Обнаружение бактерий рода *Escherichia* в пищевых продуктах, воде, почве, на оборудовании свидетельствует о свежем фекальном загрязнении, что имеет большое санитарное и эпидемиологическое значение. Считают, что бактерии родов *Citrobacter* и *Enterobacter* являются показателями более давнего (несколько недель) фекального загрязнения, и поэтому они имеют меньшее санитарно-показательное значение по сравнению с бактериями рода *Escherichia*.

**Бактерии рода *Enterococcus*** являются нормальными обитателями кишечника, но выделяются во внешнюю среду в меньших количествах, чем кишечные палочки. Энтерококки быстрее отмирают в воде и почве. Как правило, они не размножаются в этих объектах, что позволяет рассматривать их как показатель *свежего фекального загрязнения*.

Присутствие энтерококков считают дополнительным показателем фекального загрязнения воды и других объектов. Однако их выделение требует более сложных методов при приготовлении сред и растут они медленнее.

**Бактерии рода *Proteus*** обитают как в кишечнике человека и животных (*P. mirabilis*), так и в гниющих остатках (*P. vulgaris*). Присутствие протеев в объектах окружающей среды свидетельствует об их загрязнении разлагающимися субстратами и крайне неблагоприятном санитарном состоянии.

**Бактерии рода *Clostridium***. К санитарно-показательным клостридиям относят группу грамположительных, спорообразующих анаэробных палочек, редуцирующих сульфит (почернение среды Вильсона-Блера) при инкубации в условиях 45 °С в течение 12–24 ч. Эта группа в основном представлена *Cl. perfringens*, которые встречаются в кишечнике большинства людей в значительно меньших количествах, чем кишечная палочка. Клостридии более устойчивы, чем не образующие спор БГКП и энтерококки. Присутствие микроорганизмов рода *Clostridium* в различных объектах окружающей среды свидетельствует об их фекальном загрязнении, причем как свежем, так и давнем. Определение санитарно-показательных кло-

стридий рекомендуют проводить в почве и воде, а также при выборе новых источников водоснабжения.

**Термофильные бактерии** представлены полиморфной группой преимущественно спорообразующих бактерий, способных размножаться при 50–70 °С (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* и др.). Во внешней среде термофилы обнаруживают на субстратах, загрязненных навозом или компостом, так как в процессе гниения в этих субстратах создается оптимальная температура для роста этих микробов.

**Бактериофаги кишечных бактерий** – эшерихий, шигелл и сальмонелл – постоянно обнаруживают там, где есть бактерии, к которым они адаптированы. Однако колифаги выживают во внешней среде дольше (8–9 месяцев), чем соответствующие бактерии (4–5 месяцев), а также способны адаптироваться к другим видам бактерий.

**Стафилококки (*S. aureus*), а также зеленящие и гемолитические стрептококки** являются санитарно-показательными микроорганизмами загрязнения воздуха закрытых помещений. Источниками загрязнения патогенными стрептококками и стафилококками являются больные люди, страдающие хронической инфекцией, и здоровые люди – носители. Во внешней среде стрептококки сохраняют жизнеспособность в течение примерно тех же сроков, что и возбудители дифтерии, а стафилококки – даже дольше. Чем большее количество стрептококков обнаруживают в воздушной среде, тем вероятнее возможность заражения человека воздушно-капельными инфекциями. Нарастание обсемененности воздуха *S. aureus* и частое его обнаружение свидетельствуют о санитарно-эпидемиологическом неблагополучии. В лечебных учреждениях вторичным источником обсеменения воздуха золотистым стафилококком могут быть загрязненные постельные принадлежности, белье, с которых эти микроорганизмы попадают в воздух. Наиболее полную картину воздушно-капельного загрязнения воздуха дает определение и стрептококков, и стафилококков. Однако ввиду того, что стрептококки довольно трудно культивировать, в лабораторной практике ограничиваются выделением *S. aureus*.

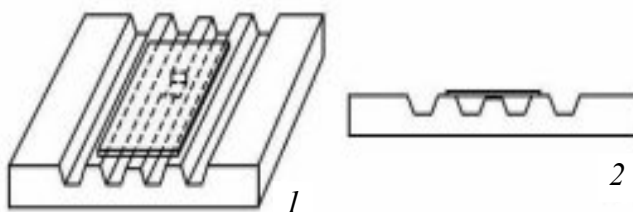
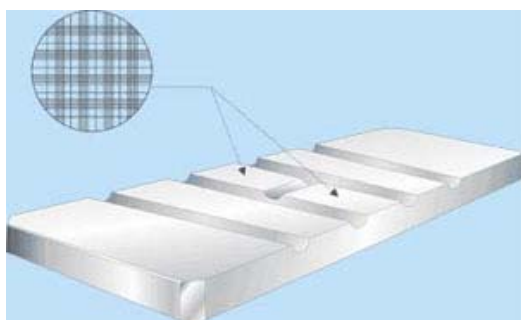
### **2.3. Косвенные показатели загрязнения**

В качестве косвенных показателей загрязнения объектов окружающей среды используют общее микробное число, титр или индекс санитарно-показательных микробов.

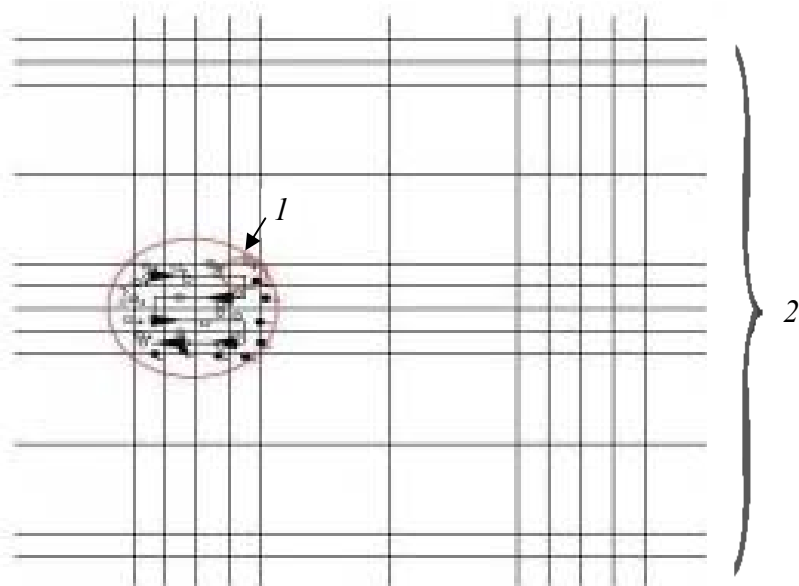
**Общим микробным числом (ОМЧ)** называют количество микробов (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных) в 1 мл жидкости, 1 г твердого вещества или 1 кубометре воздуха.

Существует два метода определения микробной обсемененности: метод прямого подсчета и метод количественного посева проб исследуемого объекта или его разведений на питательные среды.

*Прямой подсчет микроорганизмов* в исследуемом объекте проводится под микроскопом в счетных камерах Горяева (рис. 1) или в камерах, специально сконструированных для счета бактерий. Предварительно пробу исследуемого объекта подвергают обработке, чтобы получить гомогенную взвесь. Для лучшего учета бактерий в исследуемую суспензию добавляют краситель, чаще всего эритрозин. Можно проводить прямой подсчет и на мембранных фильтрах, через которые пропускают исследуемую жидкость или взвесь.



а) Камера Горяева:  
1 – вид сверху; 2 – вид сбоку



б) Сетка Горяева:  
 1 – маленький квадрат; 2 – большой

Рис. 1. Камера Горяева

Метод прямого подсчета применяется в экстренных случаях, когда необходимо срочно дать ответ о количественном содержании бактерий, например, при авариях в системе водоснабжения, при оценке эффективности работы очистных сооружений и т.п. Метод прямого подсчета прост и удобен, однако он имеет ряд существенных недостатков, снижающих его ценность. К недостаткам этого метода можно отнести: невозможность подсчитать бактерии, когда образуются их скопления или когда они «прилипают» к частицам исследуемого субстрата; невозможность подсчитать мелкие микроорганизмы, не говоря уже о вирусах; отсутствие возможности отличить живые микроорганизмы от погибших. Из-за этого метод довольно редко используется. Создание автоматических приборов для регистрации общей микробной обсемененности, таких как фотоэлектрические и электронные счетчики, делает метод прямого подсчета более перспективным.

*Метод количественного посева* исследуемого материала на плотные питательные среды применяется наиболее часто. Для определения делают мерные посева материала на питательный агар с подсчетом выросших колоний (1 колонию обычно образует 1 клетка). Результат выражают в колониобразующих единицах (КОЕ) – КОЕ/мл, КОЕ/г или КОЕ/м<sup>3</sup>.

**Индекс** – количество СПМ в единице объема (1 л, 1 г или 1 м<sup>3</sup>) материала.

**Титр** – наименьший объем (мл), или весовое количество (г) материала, в котором еще обнаруживаются СПМ.

Титр и индекс определяют путем посева материала на питательные и среды и подсчета числа санитарно-показательных микроорганизмов.

### **3. ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Точность санитарно-микробиологических исследований обеспечивается благодаря соблюдению основных принципов:

1. Правильное взятие проб для санитарно-микробиологических исследований с соблюдением всех необходимых условий, регламентированных для каждого исследуемого объекта, и правил стерильности. При упаковке и транспортировке проб необходимо создавать такие условия, чтобы не допустить гибели или размножения исходной микрофлоры в исследуемом объекте. Сохранение материала допускается только в условиях холодильника и не более 6–8 ч. Каждая проба сопровождается документом, в котором указывают название исследуемого материала, номер пробы, время, место взятия, характеристику объекта, подпись лица, взявшего пробу.

2. Проведение серийных анализов. Как правило, объекты исследования содержат разнообразные микроорганизмы, распределение которых неравномерно. Поэтому берут серию проб из разных участков исследуемого объекта, что позволит получить более достоверную характеристику объекта. Доставленные в лабораторию пробы смешивают, затем точно отмеряют необходимое количество материала – среднее по отношению к исследуемому материалу в целом.



3. Повторное взятие проб. Данная операция необходима для получения сопоставимых результатов. Исследуемые объекты весьма динамичны (вода, воздух и т.п.), сменяемость микрофлоры в них во времени и пространстве очень велика. Патогенные микроорганизмы попадают в окружающую среду, как правило, в небольшом количестве, к тому же и распределяются в ней неравномерно. Поэтому повторное взятие проб позволяет более точно определить биологическую контаминацию объектов окружающей среды.

4. Применение стандартных методов исследования, утвержденных соответствующими ГОСТами и инструкциями, что дает возможность в различных лабораториях получать сравнимые результаты.

5. Использование одновременно комплекса тестов для получения разносторонней санитарно-микробиологической характеристики. Применяют прямой метод обнаружения патогенных микроорганизмов и косвенный, позволяющий судить о загрязнении объектов окружающей среды выделениями человека и животных и его степени.

6. Проведение оценки исследуемых объектов по совокупности полученных результатов при использовании санитарно-микробиологических тестов с учетом других гигиенических показателей, указанных в соответствующих ГОСТах и нормативах (органолептических, химических, физических и т.д.). Всегда необходимо учитывать, что развитие микробов тесно связано с другими факторами окружающей среды, которые могут оказывать как благоприятное, так и неблагоприятное влияние, усиливая или ограничивая возможности размножения патогенных микроорганизмов и накопления их токсинов. Следует учитывать течение биохимических процессов, происходящих в норме в исследуемом объекте, технологию их производства. В ходе исследования необходимо оценить характер вредного воздействия попавших микробов, возможные последствия такого воздействия и рекомендовать конкретные мероприятия по их предупреждению.

7. Ответственность специалистов за точность обоснования выводов и заключений о состоянии исследуемых объектов. При санитарно-микробиологическом исследовании выявляется степень порчи пищевых продуктов (или других объектов), пригодность их к употреблению, возможная опасность для здоровья населения. Запрещение использовать пищевые продукты, воду водоемов и др., закрытие предприятия из-за санитарного неблагополучия наносят определен-

ный экономический ущерб. Ответственность за такое решение несет врач санитарной службы.

## **4. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА**

### **4.1. Микрофлора воздуха**

Воздух – среда, не поддерживающая размножение микроорганизмов; это определяется отсутствием питательных веществ и недостатком влаги. Кроме того, в воздухе более выражено микробицидное действие солнечных лучей УФ-спектра.

Загрязнение воздуха микробами происходит из почвы, воды, от животных, людей и растений. Состав микрофлоры воздуха разнообразен и значительно изменяется в зависимости от условий. Воздух верхних слоев атмосферы, а также горный и морской воздух содержит очень мало микроорганизмов. В населенных местах их значительно больше, особенно в летнее время. Особенно сильно микроорганизмами насыщен атмосферный воздух над крупными городами. Это связано с тем, что микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. Выделяют три основные фазы бактериального аэрозоля.

*Капельная, или крупноядерная, фаза* состоит из бактериальных клеток, окруженных водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц около 0,1 мм и более. Частицы оседают довольно быстро: длительность

пребывания в воздухе составляет несколько секунд, а скорость перемещения – в среднем 30 см/с.

*Мелкоядерная фаза* образуется при высыхании частиц первой фазы и состоит из бактериальных клеток, сохранивших только химически связанную воду на своей поверхности и свободную воду внутри клеток. В этой фазе частицы имеют наименьшие размеры, легко перемещаются потоками воздуха, длительное время находятся в нем во взвешенном состоянии. Это наиболее устойчивая фаза, так как диаметр большинства частиц не превышает 0,05 мм, а скорость оседания частиц составляет в среднем 0,013 см/с. При этом скорость их передвижения превышает 30 см/с, поэтому они могут рассеиваться на большие расстояния. Эта фаза представляет наибольшую эпидемиологическую опасность, так как в ее составе распространяется большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций, особенно малоустойчивых к внешним воздействиям (например, возбудитель коклюша).

*Фаза «бактериальной пыли».* Из первых двух фаз бактерии могут переходить в состав более крупных частиц, оседающих в виде пыли на различных предметах, образуя так называемую «бактериальную пыль». Ее важное свойство – способность легко диспергироваться под воздействием даже малых токов воздуха. Размер частиц варьирует от 0,01 до 1 мм. В зависимости от размера частиц и скорости воздушных течений скорость их перемещения находится в пределах 0,5–30 см/с. Вследствие длительного пребывания во взвешенном состоянии и способности частиц проникать в дистальные отделы легких, мелкодисперсная бактериальная пыль также представляет эпидемиологическую опасность. Эта фаза бактериального аэрозоля преобладает в воздухе жилых помещений и с ней рассеиваются патогенные микроорганизмы, устойчивые к высушиванию (микобактерии, клостридии, стафилококки, стрептококки, грибы).

Микрофлора атмосферного воздуха и микрофлора воздуха жилых помещений различается.

**Микрофлора атмосферного воздуха.** Среди микроорганизмов атмосферного воздуха доминируют виды, обитающие в почве. Стафилококки и стрептококки обнаруживают лишь в 3,7 % проб, взятых в местах большого скопления людей. В атмосферном воздухе в основном встречаются следующие группы микроорганизмов:

- пигментообразующие кокки в солнечные дни составляют до 70–80 % всей флоры (пигмент защищает бактерии от инсоляции);

- почвенные споровые и гнилостные микроорганизмы. Их содержание резко увеличивается в сухую и ветреную погоду;
- плесневые грибы и дрожжи. Их содержание увеличивается при повышении влажности воздуха.

В атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самоочищения за счет осадков, инсоляции, температурных воздействий и других факторов. В свою очередь атмосферный воздух сам по себе – фактор очищения воздуха жилых помещений.

**Микрофлора воздуха закрытых помещений** более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носоглотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. К ним можно отнести стафилококки, стрептококки, дифтероиды, пневмококки, менингококки, различные вирусы и др. Основным источником загрязнения воздуха патогенными видами – бактерионосителями. Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязненности, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижают обсемененность воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). *Самоочищения воздуха закрытых помещений не происходит.*

## 4.2. Исследование воздуха

Воздух может служить фактором передачи острых респираторных вирусных заболеваний, гриппа, туберкулеза, дифтерии, менингококковой инфекции, туберкулеза, ветряной оспы и др. Задачами санитарно-микробиологического исследования воздуха являются гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды и, как следствие, разработка комплекса мероприятий, направленных на профилактику аэрогенной передачи возбудителей инфекционных болезней. Объектами санитарно-микробиологического исследования воздуха закрытых помещений являются: воздух больниц (операционные, отделение реанимации, родильные залы роддомов и т.п.), детских садов, школ, поликлиник, аптек, производственных цехов и вспомогательных помещений на предприятиях различного профиля

(пищевых, микробного синтеза и т.п.), а также мест массового скопления людей – кинотеатров, спортивных залов и т.д.

При санитарно-бактериологическом исследовании воздуха проводят:

1) определение общей бактериальной обсемененности воздуха (общее число бактерий в 1 м<sup>3</sup>);

2) выявление санитарно-показательных микроорганизмов;

3) по эпидемическим показаниям выделение вирусов и патогенных бактерий из воздуха закрытых помещений;

4) при исследовании атмосферного воздуха дополнительное определение качественного состава микрофлоры с учетом наличия спорообразующих аэробов и анаэробов, которые служат показателем загрязненности воздуха микроорганизмами почвы.

Санитарно-микробиологическое исследование атмосферного воздуха в крупных городах проводится в плановом порядке и в некоторых случаях по эпидемическим показаниям. Исследование атмосферного воздуха в местах орошения земледельческих полей сточными водами методом дождевания проводится с целью обнаружения микроорганизмов родов *Salmonella*, *Escherichia*.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений (табл. 1 и 2) в зависимости от задач исследования определяется общее микробное число, присутствие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолитических стрептококков), а также непосредственно патогенных микроорганизмов (в зависимости от характера помещений – микобактерий туберкулеза, коринебактерий дифтерии, дрожжей и мицелиальных грибов и пр.). Например, при исследовании воздуха аптек определяется присутствие грибов.

Таблица 1

**Нормативные показатели воздуха  
жилых помещений**

Степень загрязненности	Зима	Лето
Чистый воздух	ОМЧ не более 4500, гемолитических стрептококков – до 35	ОМЧ не более 1500, гемолитических стрептококков – до 16;
Грязный воздух	ОМЧ не более 7000, гемолитических	ОМЧ не более 2500, гемолитических

	стрептококков – до 124	стрептококков – до 36
--	------------------------	-----------------------

Таблица 2

**Нормативные показатели микробной обсемененности воздуха  
в некоторых помещениях аптек**

Помещение	ОМЧ (в 1 м <sup>3</sup> )	Количество золотистого стафилококка (в 1 м <sup>3</sup> )	Количество дрожжевых и плесневых грибов (в 1 м <sup>3</sup> )
Асептический блок: до начала работы после работы	не более 500 не более 1000	не допускается	не допускается
Ассистентская, фасовочная, де- фектарная, матери- альная: до начала работы после работы	не более 750 не выше 1000	не допускается	не допускается
Моечная	не выше 1000	не допускается	до 12
Зал обслуживания	не более 1500	до 100	до 20

Как показатель запыленности и отсутствия влажной уборки, расценивают присутствие спорообразующих палочек, а показателем повышенной влажности – плесневых грибов. Показатель плохой освещенности – отсутствие пигментообразующих форм бактерий (иногда этот показатель может быть определен по заданию фтизиатров).

На предприятиях микробиологической промышленности, где в производстве используются актиномицеты, грибы, спорообразующие бациллы, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и др., изучается присутствие и количественное содержание в воздухе микробов-продуцентов с целью предупреждения воздействия их на организм работающих людей (возможность заболевания и развития сенсбилизации).

### **Исследование воздуха аптечных помещений**

Основной целью микробиологического контроля воздуха аптек и фармацевтических производств является определение уровня и спектра микробной загрязненности, чтобы оценить вероятность ее проникновения в производимый продукт.

Пробы воздуха отбирают в следующих помещениях аптеки:

- 1) асептический блок, стерилизационная;
- 2) ассистентская, фасовочная, материальная комнаты;
- 3) моечная;
- 4) зал обслуживания.

Отбор проб воздуха производят при соблюдении следующих условий:

- чистое, подготовленное к работе помещение, не ранее 30 мин после влажной уборки;
- закрытые форточки, окна и двери;
- уровень отбора проб воздуха соответствует высоте рабочего стола.

При исследовании воздуха аптечных помещений определяют:

- 1) общее количества бактерий;
- 2) наличие дрожжевых и плесневых грибов;
- 3) наличие золотистого стафилококка.

Содержание этих микроорганизмов в воздухе различных помещений должно соответствовать нормам (табл. 2).

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха можно разделить на 4 этапа:

- 1) отбор проб;
- 2) обработка, транспортировка, хранение проб, получение концентрата микроорганизмов (если необходимо);
- 3) бактериологический посев, культивирование микроорганизмов;
- 4) идентификация выделенной культуры (определение патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов, ОМЧ).

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

Следует обратить внимание на то, что при отборе проб воздуха во многих случаях происходит посев его на питательную среду.

Методы отбора проб воздуха для бактериологического исследования подразделяют на активный и пассивный. Активный (аспирационный, количественный) – с помощью импакторов и центрифужных пробоотборников. Пассивный (седиментационный, качественный) – экспозиция открытой плотной питательной среды в чашках Петри в течение определенного времени (от 15 мин до 1 ч). Этот метод также называют методом седиментации.

**Седиментационный** – наиболее старый метод, широко распространен благодаря простоте, экономичности и доступности, однако является неточным, так как имеет ряд недостатков. Этот метод используют только при исследовании воздуха закрытых помещений. Метод предложен Р. Кохом и заключается в способности микроорганизмов под действием силы тяжести и под влиянием движения воздуха (вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля) оседать на поверхность питательной среды в открытые чашки Петри. Чашки устанавливаются в точках отбора на горизонтальной поверхности. При определении общей микробной обсемененности чашки с мясопептонным агаром (МПА) оставляют открытыми на 5–10 мин или дольше в зависимости от степени предполагаемого бактериального загрязнения. Для выявления санитарно-показательных микробов применяют кровяной агар (для обнаружения стрептококков), молочно-солевой или желточно-солевой агар (для определения стафилококков), суслоагар или среду Сабуро (для выявления дрожжей и грибов). При определении санитарно-показательных микроорганизмов чашки оставляют открытыми в течение 40–60 мин.

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

Седиментационный метод имеет ряд недостатков: на поверхность среды оседают только грубодисперсные фракции аэрозоля; нередко колонии образуются не из единичной клетки, а из скопления микробов; на применяемых питательных средах вырастает только часть воздушной микрофлоры; температура и направленность воздушного потока влияет на скорость оседания частиц; невозможно точно определить объем отбираемой пробы. К тому же этот метод



совершенно непригоден при исследовании бактериальной загрязненности атмосферного воздуха.

**Аспирационные методы** основаны на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость (мясо-пептонный бульон, буферный раствор, изотонический раствор хлорида натрия и др.). Аспирационные методы используют при исследовании воздуха как закрытых помещений, так и атмосферного.

В настоящее время широко применяется при исследовании воздуха закрытых помещений прибор Кротова (рис. 2). Принцип работы этого аппарата основан на том, что воздух, просасываемый через клиновидную щель в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды, при этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе. Чашку Петри с тонким слоем среды укрепляют на вращающемся столике аппарата, что обеспечивает равномерное распределение бактерий на ее поверхности. Работает аппарат от электросети. После отбора пробы с определенной экспозицией чашку вынимают, закрывают крышкой и помещают на 48 ч в термостат. Обычно отбор проб проводят со скоростью 20–25 л/мин в течение 5 мин. Таким образом, определяется флора в 100–125 л воздуха. При обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов объем исследуемого воздуха увеличивают до 250 л.

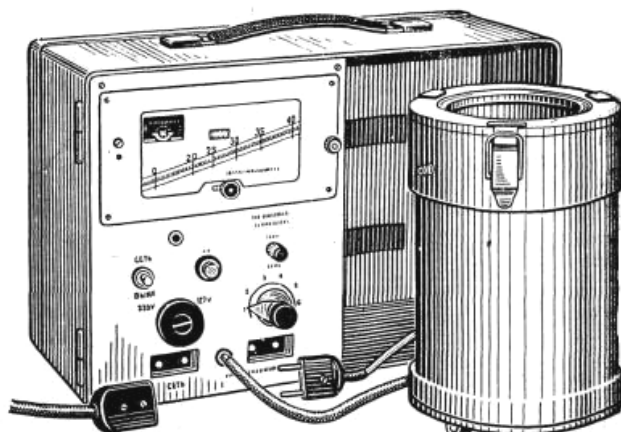


Рис. 2. Аппарат Кротова

В практике санитарной службы при аспирационном взятии проб используются также бактериоуловитель Речменского, прибор для отбора проб воздуха (ПОВ-1), пробоотборник аэрозольный бактериологический (ПАБ-1), бактериально-вирусный электропреципи-

татор (БВЭП-1), прибор Киктенко, приборы Андерсена, Дьяконова, МБ и др. Для исследования атмосферного воздуха могут быть использованы и мембранные фильтры № 4, через которые воздух просасывается с помощью аппарата Зейтца.

При использовании любого из перечисленных приборов получаемые результаты являются приблизительными, однако они дают более правильную оценку обсемененности воздуха в сравнении с седиментационным методом. Во многих случаях отбор проб совмещен с этапом посева.

### ***Определение общего микробного числа***

Для определения общего количества бактерий в воздухе закрытых помещений забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи любого прибора (чаще всего аппарата Кротова), либо седиментационным методом, расставляя чашки с питательной средой по принципу конверта. Чашки с посевом помещают в термостат на сутки, а затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре. Экспозиция чашек с посевами на свету дает возможность подсчитать отдельно количество пигментных колоний (желтых, белых, розовых, черных, оранжевых и др.), количество спорообразующих бацилл, грибов и актиномицетов.

Подсчитывают количество колоний на обеих чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха. Количество каждой группы колоний (пигментных, беспигментных, плесеней, бацилл, актиномицетов) выражают в процентах по отношению к общему числу.

При определении микробного числа методом седиментации по Коху подсчитывают колонии, выросшие на чашках Петри (площадь поверхности агара в чашке равна 75 см<sup>2</sup>), и расчет ведут по правилу В. Л. Омелянского: на поверхность площадью 100 см<sup>2</sup> за

5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л воздуха:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{75 \text{ см}^2},$$

где  $X$  – количество микробов в 1 м<sup>3</sup>;  $A$  – количество колоний на агаре в чашке Петри.

Результаты получаются заниженными примерно в 3 раза по сравнению с данными, получаемыми при использовании аппарата Кротова.

### ***Определение стафилококков***

Отбор проб воздуха проводится с помощью аппарата Кротова в количестве 250 л на 2–3 чашки с желточно-солевым агаром и на чашку с кровяным агаром. Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч. Изучают культуральные признаки всех видов колоний, из подозрительных готовят мазки и окрашивают по Граму.

Подсчитывают количество выросших колоний стафилококков и определяют число микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

### ***Определение грибов***

Для определения дрожжеподобных и плесневых грибов пробу воздуха (250 л) засевают на плотную среду Сабуро и инкубируют при температуре 22–24 °С 4 сут. Подсчитывают количество колоний, вырастающих на среде, и делают пересчет на 1 м<sup>3</sup> воздуха.

## **5. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ**

### **5.1. Микрофлора воды**

В воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения. Количественный и качественный состав микрофлоры воды зависит от состава и концентрации минеральных и органических веществ, температуры, рН, скорости движения воды, массивности поступления ливневых, фекально-бытовых и промышленных сточных вод. Количество микробов прямо пропорционально степени загрязненности водоемов. Особенно богаты микроорганизмами пруды, ручьи, озера густо населенных районов. В закрытых водоемах (озера, пруды) наблюдается определенная закономерность в распределении бактерий. Состав микроорганизмов различен на поверхности воды и на дне водоемов. Наиболее обильно заселена микроорганизмами вода на глубине 10–100 см. В более глубоких слоях их количе-

ство значительно снижается. Ключевые воды и воды артезианских колодцев наиболее чисты.

Микрофлора воды активно участвует в процессе самоочищения от органических отходов. Утилизация органических отходов связана с деятельностью постоянно обитающих в воде микроорганизмов, т.е. составляющих аутохтонную микрофлору. В пресных водоемах находятся различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрочкокки), извитые и нитевидные (актиномицеты). На дне водоемов, в иле, увеличивается количество анаэробов. При загрязнении воды органическими веществами появляется большое количество непостоянных (аллохтонных) представителей микрофлоры воды, которые исчезают в процессе самоочищения воды.

Вода – фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, тальными и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций, криптоспориоза и др.). Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы).

## **5.2. Исследование воды**

Поскольку вода используется при производстве любого вида продукции, а также непосредственно в пищу, соответствие ее качества санитарно-микробиологическим показателям чрезвычайно важно. Водным путем могут передаваться кишечные инфекции – холера, брюшной тиф и паратифы, сальмонеллез, дизентерия, гепатит А, а также лептоспирозы, сибирская язва, туляремия, различные грибковые заболевания. В связи с этим основной целью санитарно-микробиологического исследования воды является определение наличия в воде патогенной и условно-патогенной микрофлоры и, следовательно, источника этого попадания, а также предупреждение распространения инфекционных заболеваний среди населения.

Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, бассейнов, а также сточные воды.

Санитарно-микробиологическое исследование воды проводится в следующих случаях:

- 1) при выборе источника централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения и периодическом контроле этого источника;
- 2) при контроле эффективности обеззараживания питьевой воды централизованного водоснабжения;
- 3) при наблюдении за подземными источниками централизованного водоснабжения, такими как артезианские скважины, почвенные воды и т.д.;
- 4) при определении состояния и степени пригодности воды источников индивидуального водопользования (колодцев, родников и т.д.);
- 5) при наблюдении за санитарно-эпидемиологическим состоянием воды открытых водоемов: водохранилищ, прудов, озер, рек;
- 6) при контроле эффективности обеззараживания воды плавательных бассейнов;
- 7) при проверке качества и степени очистки сточных вод;
- 8) при определении очага водных вспышек инфекционных болезней.

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяются различные показатели в зависимости от поставленной задачи и характера исследуемого объекта (табл. 3)

Таблица 3

**Требования к микробиологической чистоте воды**

Наименование объекта контроля	Определяемые микробиологические показатели	Требование	Нормативный документ
1	2	3	4
Вода питьевая централизованных систем водоснабжения	ОМЧ	Не более 50 (в 1 мл)	СанПиН 2.1.4.1074-01
	Общие колиформные бактерии	Отсутствие (в 100 мл)	
	Термотолерантные колиформные бактерии	Отсутствие (в 100 мл)	
	Колифаги	Отсутствие (в 100 мл)	
	Споры сульфитредуцирующих бактерий	Отсутствие (в 20 мл)	
Вода питьевая при нецентрали-	Общие колиформные бактерии	Отсутствие (в 100 мл)	СанПиН 2.1.4.1175-02

званном использо- вании местных источников	ОМЧ	100 (в 1мл)	
	Дополнительные: термотолерантные колиформные бактерии	Отсутствие (в 100 мл)	
	Колифаги	Отсутствие (в 100 мл)	
Вода в водных объектах в рекреации	Число лактозоположи- тельных кишечных палочек (ЛКП)	Не более 1000 (в 1 дм <sup>3</sup> ) при использо- вании объекта для купания	ГОСТ 17.1.5.02–80
	Дополнительные: Общие колиформные бактерии	Не более 500 (в 100 мл)	
	Термотолерантные ко- лиформные бактерии	Не более 100 (в 100 мл)	
	Колифаги	Не более 10 (в 100 мл)	
	Возбудители кишечных инфекций	Отсутствие	

Окончание табл. 3

1	2	3	4
Вода купально- плавательных и спортивных бассейнов с пресной и морской водой	Общие колиформные бактерии	Не более 1 (в 100 мл)	СанПиН 2.1.2.1188–03
	Термотолерантные колиформные бактерии	Отсутствие (в 100 мл)	
	Колифаги	Отсутствие (в 100 мл)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутствие (в 100 мл)	
	Дополнительные: Возбудители кишечных инфекций	Отсутствие	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствие (в 100 мл)	
Сточные воды после очистки и обеззара- живания, отводимые в водные объекты	Общие колиформные бактерии	Не более 100 (в 100 мл)	МУ 2.1.5.800–99
	Колифаги	Не более 100 (в 100 мл)	

	Термотолерантные колиформные бактерии	Не более 100 (в 100 мл)	
	Фекальные стрептококки	Не более 10 (в 100 мл)	
	Патогенные микроорганизмы	Отсутствие	

### ***Контроль воды питьевой централизованных систем водоснабжения***

Пробы воды отбирают с целью определения качества воды: в магистральных распределительных сетях, поступающих от производителя; в распределительной внутридомовой сети; фактически потребляемой из крана (такие пробы отбирают в особых случаях).

Для отбора проб воды питьевой используют стерильные флаконы емкостью 500 мл с притертой резиновой, корковой или каучуковой пробкой. Бумажный колпачок с пробкой снимают с флакона непосредственно перед заполнением, не касаясь руками горлышка флакона и пробки. При необходимости исследования воды на присутствие возбудителей кишечных инфекций количество воды увеличивают до 2,5 л.

Качество питьевой воды должно соответствовать гигиеническим нормативам перед ее поступлением в распределительную сеть, а также в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети. Безопасность питьевой воды в эпидемическом отношении определяется ее соответствием нормативам по микробиологическим показателям, представленным в табл. 3.

Санитарно-микробиологическое исследование питьевой воды включает определение ОМЧ, количества колиформных бактерий, термотолерантных колиформных бактерий, спор сульфитредуцирующих клостридий и колифагов.

ОМЧ позволяет оценить уровень микробного загрязнения питьевой воды, дополняя показатели фекального загрязнения, а также позволяет выявить загрязнение из других источников, например промышленные сбросы. Увеличение этого показателя даже в пределах норматива, выявленное повторно, служит сигналом для поиска причины загрязнения.

Показателем степени фекального загрязнения служит количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Обнаружение в питьевой воде этих бактерий указывает на потенциальную эпидемиче-

скую опасность водоиспользования из-за возможного присутствия в ней представителей патогенных кишечных бактерий. Термотолерантные колиформные бактерии способны ферментировать лактозу при температуре 44 °С в течение 24 ч. Так как это свойство быстро утрачивается, то обнаружение бактерий с такими свойствами говорит о свежем фекальном загрязнении. При определении этих двух показателей проводится трехкратное исследование по 100 мл отобранной пробы воды. Превышение норматива по общему числу колиформных бактерий не допускается в 95 % проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

Колифаги являются индикаторами эффективности охраны грунтовых вод и очистки питьевой воды. Определение этого показателя проводится только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

Споры сульфитредуцирующих бактерий устойчивы к обеззараживанию и действию неблагоприятных факторов среды. Этот показатель рекомендован для оценки эффективности технологических процессов очистки воды. Обнаружение клостридий в воде перед поступлением в распределительную сеть указывает на недостаточную очистку и на то, что устойчивые к обеззараживанию патогенные микроорганизмы, вероятно, не погибли при очистке.

При обнаружении в пробе питьевой воды термотолерантных колиформных бактерий и (или) общих колиформных бактерий, и (или) колифагов проводится их определение в повторно взятых в экстренном порядке пробах воды. В таких случаях для выявления причин загрязнения одновременно проводится определение хлоридов, азота аммонийного, нитратов и нитритов. При обнаружении в повторно взятых пробах воды общих колиформных бактерий в количестве более 2 в 100 мл и (или) термотолерантных колиформных бактерий, и (или) колифагов проводится исследование проб воды для определения патогенных бактерий кишечной группы и (или) энтеровирусов.

Исследования питьевой воды на наличие патогенных бактерий кишечной группы и энтеровирусов проводится также по эпидемиологическим показаниям по решению центра госсанэпиднадзора.

***Контроль воды питьевой при нецентрализованном водоснабжении***



Источниками нецентрализованного водоснабжения являются подземные воды, захват и подача которых осуществляется путем устройства и специального оборудования водозаборных сооружений (колодцы, скважины, каптажи родников).

Отбор проб из скважин, родников и колодцев проводят с целью определения качества воды в водоносном горизонте; в водопункте (скважине, колодце); потребляемой воды. Пробы отбирают при помощи стационарно установленного насоса и постоянно установленного металлического крана. Подготовительные мероприятия перед забором воды проводят в соответствии с ГОСТ Р 53415–2009 в зависимости от цели отбора.

Если скважина или колодец не имеют стационарно установленного насоса, то отбор проб проводят с использованием: временно установленного насоса (в водоносном горизонте); стерильного батометра (рис. 3, 4) (в водопункте); ведра, ковша, бидона (в точке потребления). Отбор проб из фонтанирующих скважин проводят из устья скважины. Из родников отбор проб воды проводят на выходе из каптажного сооружения или в месте выхода родника на поверхность земли. Пробы, взятые из фонтанирующих скважин или головки родника, характеризуют качество подземных вод в водоносном горизонте.

Отбор воды проводят в стерильные емкости.

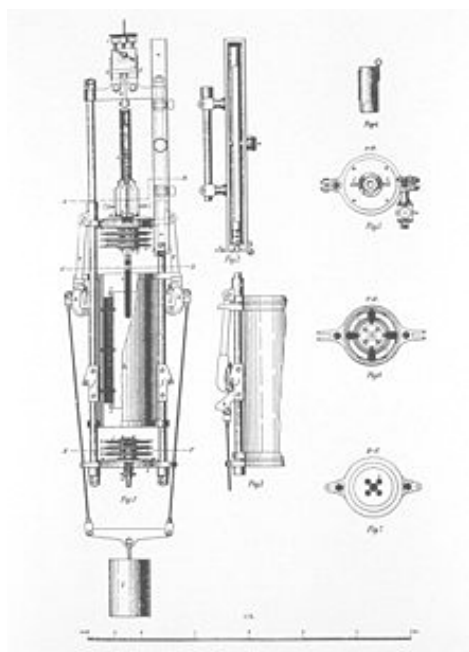


Рис. 3. Батометр Экмана



Рис. 4. Батометр Никсина

При санитарно-микробиологическом исследовании питьевой воды нецентрализованного водоснабжения определяют ОМЧ, количество общих и термотолерантных колиформных бактерий, количество колифагов. По своим свойствам вода должна соответствовать нормативам, приведенным в табл. 3.

С целью обеспечения постоянства качества воды, безопасности и приемлемости водоснабжения населения контроль должен включать в себя систематическое санитарное обследование не только источника водоснабжения, оборудования и устройств, но и территории, прилегающей к водозаборным сооружениям. Центры государственного санитарно-эпидемиологического надзора осуществляют плановый или выборочный контроль за качеством воды источников нецентрализованного водоснабжения общего пользования, а также контроль по разовым заявкам от индивидуальных пользователей. Если при контроле качества воды отмечено превышение микробиологических показателей по сравнению с нормативами, следует выполнить повторный отбор проб воды и провести дополнительные исследования. При стойком ухудшении качества воды проводят установление его причины и устранение. Эти мероприятия включают

в себя чистку, промывку и при необходимости профилактическую дезинфекцию. Если не удалось выявить или ликвидировать причину ухудшения качества воды, то вода в колодце (каптаже) должна постоянно обеззараживаться хлорсодержащими препаратами. Контроль за эффективностью обеззараживания воды в колодце (каптаже) проводится центром государственного санитарно-эпидемиологического надзора в установленные им сроки.

### ***Контроль воды водных объектов, используемых для рекреации***

Зоной рекреации водного объекта является водный объект или его участок с прилегающим к нему берегом, используемый для отдыха.

При санитарно-микробиологическом исследовании воды водных объектов, используемых для рекреации, определяют число лактозоположительных кишечных палочек в 1 дм<sup>3</sup> (табл. 3).

В случае превышения числа ЛКП при использовании водного объекта для купания для решения вопроса о необходимости проведения оздоровительных мероприятий или закрытия пляжа проводят дополнительные исследования на наличие сальмонелл, шигелл, эне-

ровирусов и стафилококков. При отсутствии в исследуемых пробах сальмонелл тифа и паратифов, шигелл и при благоприятной эпидемиологической ситуации по согласованию с органами санитарно-эпидемиологической службы может быть продолжена эксплуатация водного объекта, если число ЛКП не будет превышать 10000 в 1 дм<sup>3</sup>. При необходимости уточнения характера и установления источника микробного загрязнения проводятся исследования воды на содержание *E. coli*, энтерококков, фагов кишечных палочек.

Контроль качества воды водных объектов проводится ежегодно перед началом купального сезона на расстоянии 1 км вверх по течению от зоны купания на водотоках и на расстоянии 0,1–1,0 км в обе стороны от нее на водоемах и в море, а также в границах зоны купания; в период купального сезона не менее чем в двух точках, выбранных в соответствии с характером, протяженностью и интенсивностью использования зоны купания.

Поверхностные пробы отбирают с глубины 10–30 см от поверхности воды, придонные – с глубины 30–50 см от дна. Отбор проб проводят с использованием различных плавучих средств, мостов и других приспособлений в местах, где глубина водоема не менее 1–1,5 м. Не допускается проводить отбор проб с берега. Если в местах купания глубина воды менее 1 м, то допускается отбирать пробы на меньшей глубине. Следует принять меры к минимизации взмучивания донных отложений.

Пробы воды рекомендуется отбирать батометром или другими специальными устройствами, которые должны быть стерильными.

Частота отбора проб устанавливается в каждом конкретном случае местными органами санитарно-эпидемиологической службы, но не менее двух раз по всем показателям до начала купального сезона и не менее четырех раз в месяц в период купального сезона (для установления числа ЛКП).

### ***Контроль воды бассейнов***

Качество пресной воды, поступающей в ванну плавательного бассейна, должно отвечать гигиеническим требованиям, предъявляемым к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Качество морской воды в местах водозаборов для плавательных бассейнов должно отвечать по физико-химическим и бактериологическим показателям гигиеническим требованиям, предъявляемым к прибрежным водам морей в местах водопользования населения.

Отбор проб воды в плавательных бассейнах осуществляют с целью оценки качества воды:

- 1) поступающей (для бассейнов всех типов);
- 2) до и после фильтров (для бассейнов рециркуляционного типа и с морской водой);
- 3) после обеззараживания перед подачей воды в ванну (при наличии этого этапа);
- 4) в ванне плавательного бассейна.

Отбор проб для целей 1–3 проводят из специальных пробоотборных кранов. Для этого предварительно из крана удаляют дополнительные приспособления и вкладыши, проводят его стерилизацию фламбированием и спускают минимальный объем воды, необходимый для удаления продуктов стерилизации.

При исследовании воды, поступающей в плавательный бассейн после очистки и обеззараживания, пробу отбирают в местах трубопровода, удаленных от места ввода дезинфектанта, там, где его остаточное содержание стабильно.

Отбор проб воды в ванне плавательного бассейна производится не менее, чем в 2 точках (глубокой и мелкой части): поверхностный слой толщиной 0,5–1,0 см и на глубине 25–30 см от поверхности зеркала воды в количестве одного литра с соблюдением правил стерильности.

В процессе эксплуатации бассейна определяют основные микробиологические показатели: ОМЧ, количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, термотолерантных колиформных бактерий, золотистого стафилококка, колифагов и дополнительные – возбудителей кишечных инфекций, синегнойную палочку (табл. 3).

Основные микробиологические показатели определяют 2 раза в месяц.

Получение неудовлетворительных результатов исследований воды по основным микробиологическим показателям является основанием для полной смены воды в ванне бассейнов с проточной системой водообмена, в том числе малых бассейнов с площадью зеркала воды не более 100 м<sup>2</sup>, а также бассейнов с морской водой. Обнаружение в пробах воды возбудителей кишечных инфекционных и (или) синегнойной палочки является основанием для полной смены воды в ванне вне зависимости от вида бассейна и системы водообмена.

### ***Контроль сточных вод***

Сточные воды являются основным источником микробного загрязнения объектов окружающей среды, в том числе поверхностных пресных и морских вод, подземных водоносных горизонтов и почвы. Санитарно-микробиологическое исследование сточных вод проводят с целью проверки эффективности их очистки и обеззараживания перед их отведением в водные объекты, используемые для хозяйственно-питьевого, культурно-бытового и рыбохозяйственного водопользования, при применении в промышленном водоснабжении в открытых и закрытых системах, а также при отведении на поля орошения. В ряде случаев исследуют сточные воды неочищенные или на этапах очистки до хлорирования для контроля работы очистных сооружений.

Пробы сточных вод рекомендуется отбирать батометром или другими специальными устройствами, которые должны быть стерильными. Объем каждой пробы может колебаться от 500 до 10 мл в зависимости от места взятия (при проверке отдельных этапов очистки, после обработки, перед сбросом в водоем) и от задач анализа.

В сточных водах, прошедших очистку и обеззараживание, определяют ОМЧ, определение колиформных бактерий, колифагов (табл. 3). В качестве индикаторных микроорганизмов в ряде стран рекомендуется использовать термотолерантные колиформные бактерии, *E. coli*, фекальные стрептококки.

Периодичность производственного контроля при обеззараживании сточных вод зависит от их вида и дальнейшего использования.

### ***Хранение и транспортировка проб воды***

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

Транспортировать пробы необходимо в чистых продезинфицированных контейнерах, предохранять от резких толчков (чтобы не замочить пробки), замерзания, действия солнечных лучей. Предпочтительно охладить пробы до температуры  $5 \pm 3$  °С, используя аккумуляторы холода.

Исследование воды должно быть проведено как можно быстрее, максимальный срок хранения проб до анализа (включая транспортировку) 8 ч при температуре  $5 \pm 3$  °С. При более длительном и неправильном хранении может наступить размножение или гибель микрофлоры.

### ***Определение общего микробного числа***

Сущность метода заключается в определении в 1 см<sup>3</sup> воды общего содержания мезофильных аэробов и факультативных анаэробов, способных расти на питательном агаре данного состава при температуре 37 °С в течение 24 ч, образуя колонии, видимые при увеличении в 2–5 раз.

Определение общего микробного числа воды можно проводить методом серийных десятикратных разведений с посевом на мясопептонный агар и методом прямого микроскопического подсчета микроорганизмов в исследуемой воде.

**При определении методом** серийных десятикратных разведений с посевом производят посев проб воды на питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний.

Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Водопроводную воду засевают в объеме 1 мл, воду открытых водоемов – в объемах 1; 0,1 и 0,01 мл. Для посева 0,1 см<sup>3</sup> и меньших объемов воды используют разведения анализируемой воды. Для этого в пробирку с 9 см<sup>3</sup> стерильной воды вносят 1 см<sup>3</sup> анализируемой воды. Другой стерильной пипеткой продуванием воздуха тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают из нее 1 см<sup>3</sup> и переносят в чашку, что будет соответствовать посеву 0,1 см<sup>3</sup> анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов воды этой же пипеткой переносят 1 см<sup>3</sup> содержимого первой пробирки в следующую с 9 см<sup>3</sup> стерильной воды. Посев 1 см<sup>3</sup> из второй пробирки будет соответствовать посеву 0,01 см<sup>3</sup> анализируемой воды и т.д.

С флаконов с пробой воды снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку.

Засев каждого разведения проводят глубинным способом. Для этого стерильной пипеткой отбирают по 1 мл воды и вносят в 2 стерильные чашки, слегка приоткрывая крышку. После внесения воды в чашки Петри ее заливают 10–12 см<sup>3</sup> остуженного питательного агара. Воду быстро смешивают с агаром, осторожно наклоняя или

вращая чашку по поверхности стола. После этого чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат и выращивают при 37 °С в течение 24 ч.

Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при температуре 37° С в течение 24 ч, а другую – при 20–22 °С 48 ч. При температуре 20 °С вырастает большее количество сапрофитов, именно они являются наиболее активными участниками процесса самоочищения водоема. В местах большого загрязнения сточными водами численное значение обеих групп сапрофитов близко, поэтому динамика численности этого показателя считается чувствительным индикатором загрязнения водоемов, особенно органическими веществами.

Для выявления плесневых и дрожжевых грибов исследуемую воду засевают по 0,5 мл на среду Сабуро и инкубируют при комнатной температуре в течение 3–4 сут. Подсчитывают число выросших колоний и также рассчитывают среднее арифметическое. Результат (ОМЧ) вычисляют путем суммирования среднего арифметического числа бактерий, дрожжевых и плесневых грибов и выражают в КОЕ/мл.

*Учет результатов.* Колонии, выросшие как на поверхности, так и в глубине агара, подсчитывают с помощью лупы с увеличением в 2–5 раз или прибора для счета колоний. Для этого чашку кладут вверх дном на черный фон. Для большей точности счета каждую подсчитанную колонию отмечают со стороны дна тушью или чернилами для стекла.

Оценивают только те разведения, при посеве которых на чашке выросло от 30 до 300 колоний. При посеве 1 см<sup>3</sup> неразведенной пробы учитывают любые количества колоний, но не превышающие 300. Если в чашке с наиболее высоким разведением выросло свыше 300 колоний и анализ нельзя повторить, то допускается подсчитывать колонии с помощью пластинки с сеткой и лупы при сильном боковом освещении. Подсчитывают не менее 20 квадратов площадью 1 см<sup>2</sup> каждый в разных местах чашки, затем выводят среднее арифметическое число колоний на 1 см<sup>2</sup>, значение которого умножают на площадь чашки в см<sup>2</sup>, вычисленную по формуле:  $S = \pi r^2$ .

Результат подсчета колоний в каждой чашке выражают в количестве бактерий на 1 см<sup>3</sup> анализируемой воды с учетом посеянного объема. За окончательное количество бактерий принимают среднее арифметическое результатов подсчета на двух параллельных чашках или разных разведений. Результаты округляют следующим образом:

если результат находится в пределах чисел от 1 до 100, то записывают те числа, которые получены; если результат находится в пределах чисел от 101 до 1000, то результат округляют до 10; если результат находится в пределах чисел от 1001 до 10000, то результат округляют до 100 и т.д.

Количество колоний учитывают, ориентируясь на одну чашку, в случаях: если на другой чашке при посеве из разведения выросло менее 20 колоний; при ползучем росте бактерий, распространившихся на всю поверхность чашки или значительные зоны, маскирующем рост других колоний; при количестве колоний свыше 300.

Счетную пластинку рекомендуется применять при подсчете количества колоний, когда на обеих чашках отмечен ползучий рост. При этом просчитывают квадраты на свободных от сплошного роста местах чашки.

**Прямой микроскопический метод** определения общего количества микроорганизмов заключается в концентрации бактерий на мембранных фильтрах (при пропускании через них исследуемой воды), последующем окрашивании эритрозином и микроскопировании.

Прямой метод удобен тем, что результат, т.е. количество микроорганизмов в 1 мл воды, может быть получен в течение нескольких часов. Поэтому рекомендуется использовать прямой метод, если необходимо дать быструю санитарную оценку воды: при оценке процесса естественного самоочищения водоемов, при оценке эффективности работы очистных сооружений на всех этапах и т.д. Для фильтрации воды используют мембранные фильтры, фильтр Зейтца или специальный аппарат Долгова – Разумова.

Мембранный фильтр с окрашенными микроорганизмами высушивают и помещают на предметное стекло, предварительно капнув каплю иммерсионного масла на стекло и на фильтр, который накрывают тонким покровным стеклом. Микроскопируют с иммерсионным объективом, в окуляр вкладывают сетчатый микрометр, разделенный на мелкие квадраты. Подсчитывают микроорганизмы в 20 полях зрения (в каждом поле зрения в 4 маленьких квадратах, расположенных по диагонали). Расчет общего количества бактерий в 1 мл ( $X$ ) ведется по формуле

$$X = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{S_1 \cdot V},$$

где  $S$  – фильтрующая площадь прибора ( $\text{мм}^2$ );  $10^6$  – переводной коэффициент  $\text{мм}^2$  в  $\text{мкм}^2$ ;  $N$  – среднее количество бактерий в одном



квадрате;  $S_1$  – площадь квадрата окулярного микрометра ( $\text{мкм}^2$ );  $V$  – объем профильтрованной воды (мл).

### **Определение колиформных бактерий (БГКП)**

Количество колиформных бактерий выражают в виде коли-титра или коли-индекса. *Коли-титр воды* – минимальное количество БГКП в 1 л воды. *Коли-индекс воды* – количество БГКП в 1 л воды.

Для определения этих показателей используют метод мембранных фильтров и титрационный (бродильный) метод.

**Исследование воды методом мембранных фильтров.** Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциально-диагностической среде и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим признакам.

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

Фильтрацию производят с помощью специальных приборов или фильтра Зейтца. Перед посевом воды фильтровальный аппарат стерилизуют фламбированием после обтирания ватным тампоном, смоченным спиртом. После охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора. Отросток колбы, в которую фильтруется вода, с помощью резиновой трубки соединяют с водоструйным или масляным насосом для создания вакуума в приемном сосуде (около 0,25 атм.).

Объем пробы воды зависит от целей исследования. При анализе воды, поступающей в водопроводную сеть, и в наиболее характерных ее точках необходимо анализировать объем не менее  $333 \text{ см}^3$ , профильтровывая этот объем не менее чем через два фильтра.

На этапах очистки анализируют не менее двух десятикратных объемов воды, выбранных в зависимости от ее качества таким обра-

зом, чтобы на одном из фильтров выросло не более 30 колоний бактерий группы кишечных палочек. При этом необходимо ориентироваться на результаты предыдущих анализов воды в этих же пунктах (например, для воды после первичного хлорирования могут быть выбраны объемы 10 и 100 см<sup>3</sup>; для воды необеззараженной – 0,1, 1 и 10 см<sup>3</sup>). При анализе воды неизвестного качества следует засеивать 3–4 десятикратных объема (например, из водопроводной сети можно фильтровать 3; 30; 100; 200 см<sup>3</sup> воды; по этапам очистки – 0,1; 1; 10; 100 см<sup>3</sup> воды).

Для фильтрования в воронку или стакан наливают необходимые объемы воды, начиная с меньших, а затем большие, каждый раз меняя фильтры. Самый меньший объем воды – 1 мл – следует фильтровать через фильтр, предварительно смоченный стерильной водой. После фильтрования верхнюю часть прибора снимают и фильтр осторожно (при сохранении вакуума для удаления излишка влаги на фильтре) стерильным пинцетом переносят на среду Эндо в чашку Петри. Фильтр накладывают вверх поверхностью, на которой осели бактерии, избегая появления пузырьков воздуха между фильтром и средой. На одну чашку можно разместить 4 фильтра, под каждым на дне чашки следует надписать объем воды, номер пробы и число.

Если вода мутная, то фильтрование ведется сразу через два фильтра: предварительный фильтр № 6 (для задержания крупных частиц) помещают на фильтр № 2. После фильтрования оба фильтра переносят на среду Эндо. Чашки с фильтрами помещают в термостат и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. При окончательном результате учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

При наличии в воде БГКП на фильтрах появляется рост типичных для этих бактерий колоний: темно-красные с металлическим блеском или красные, розовые с красным центром, имеющие четкий отпечаток на обратной стороне фильтра. Бактерии из таких колоний окрашивают по Граму и микроскопируют. С культурой грамотрицательных бактерий лактозоположительных колоний ставят оксидазный тест для дифференциации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* от *Pseudomonadaceae* (последние являются оксидазообразующими бактериями). Для этого фильтр с выросшими на нем колониями бактерий переносят пинцетом, не переворачивая, на кружок фильтровальной бумаги, смоченной диметил-п-фенилендиамином. При наличии оксидазы реактив окрашивает колонию в синий цвет. 2–3 колонии, не изменившие окраску (оксидазоотрицательные) засеивают в пробирку с полужидкой средой с 0,5 % раствором глюкозы и инкубируют при 37 °С. При появлении кислоты и газа результат счи-

тают положительным. Подсчитывают число красных колоний на фильтре и определяют коли-индекс.

Коли-индекс (индекс ОКБ – общих колиформных бактерий, БГКП) высчитывают следующим образом: количество бактерий группы кишечных палочек, выросших в анализируемом объеме воды, умножают на 1000 см<sup>3</sup> и делят на этот объем воды:

$$\text{Коли-индекс} = \frac{K \cdot 1000}{V},$$

где  $K$  – количество проверенных на принадлежность к ОКБ (БГКП) колоний на фильтрах;  $V$  – объем профильтрованной воды через фильтры, на которых велся учет.

Пример 1. При посеве трех объемов воды по 100 см<sup>3</sup> на одном фильтре выросло три колонии бактерий группы кишечных палочек, на двух других нет роста; коли-индекс равен:  $(3 \cdot 1000) / 300 = 10$ .

Пример 2. При посеве 10 и 100 см<sup>3</sup> воды на одном фильтре выросла одна колония, на другом выросло пять колоний; коли-индекс равен:  $(6 \cdot 1000) / 110 = 54$ .

Если на одном из фильтров сплошной рост бактерий и подсчет их невозможен, тогда в расчет принимают тот объем воды, при фильтровании которого на фильтре выросли изолированные колонии.

Для перевода индекса в титр используют формулу

$$\hat{E} \hat{i} \hat{e} \hat{e} - \hat{o} \hat{e} \hat{o} \hat{d} = \frac{1000}{\hat{E} \hat{i} \hat{e} \hat{e} - \hat{e} \hat{i} \hat{a} \hat{a} \hat{e} \hat{n}}.$$

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

Метод мембранных фильтров является современным, точным, менее трудоемким и более дешевым в сравнении с титрационным методом. Он удобен и тем, что позволяет концентрировать бактерии, содержащиеся в значительном объеме воды на небольшой поверхности фильтра. Однако одним из самых существенных недостатков метода является то, что этим методом выявляется меньшее количество бактерий в сравнении с титрационным. Для большей точности рекомендуется исследование воды проводить параллельно обоими методами.

**Титрационный метод исследования воды** основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

Объем засеваемой воды зависит от характера исследуемого объекта, но обязательно посев ведется в 2–3, а в некоторых случаях – в 5 повторностях. Объемы воды выбирают с таким расчетом, чтобы в одном из разбавлений получить хотя бы один отрицательный результат. При исследовании на этапах очистки и обеззараживания засевают 100; 10; 1 и 0,1 см<sup>3</sup> воды; на выходе в водопроводную сеть и в наиболее характерных ее точках засевают три объема по 100 см<sup>3</sup>, три объема по 10 см<sup>3</sup> и три объема по 1 см<sup>3</sup>.

Посев воды производится в глюкозопептонную среду (1 % пептонная вода, 0,5 % раствор глюкозы, 0,5 % раствор хлорида натрия, индикатор Андрее, поплавков). Для посевов больших объемов воды используют концентрированную среду, содержащую 10-кратные количества указанных веществ. Так, посев 100 мл воды производят в 10 мл концентрированной среды, 50 мл – в 15 мл концентрированной среды, 10 мл – в 1 мл концентрированной среды; 1 мл и последующие разведения – в 10 мл глюкозопептонной среды нормальной концентрации. Большие объемы воды засеваются во флаконы или колбы, меньшие – в пробирки. Посевы инкубируют в термостате в течение суток при температуре 37 °С.

Из пробирок с посевами, в которых наблюдается помутнение (а также образование кислоты и газа в поплавке), делают высев петлей штрихами на поверхность среды Эндо, разделенной на 3–4 сектора. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 16–18 ч. При наличии на среде Эндо характерных для БГКП колоний (красных с металлическим блеском) следует провести все тесты, перечисленные выше. Положительный ответ на наличие БГКП дается в том случае, если наблюдается рост характерных колоний, образованных оксидазоотрицательными, Гр(–) бактериями, сбрасывающих глюкозу при 37 °С с образованием кислоты и газа. Таким образом, положительный ответ выдается через 40–42 ч.

Результат выражается в виде индекса (титра) БГКП, цифровое выражение которого определяют по таблицам: при анализе питьевой воды на выходе в водопроводную сеть и из нее – по табл. 4; при анализе воды на этапах очистки и обеззараживания – по табл. 5.

Таблица 4

**Определение индекса БГКП при исследовании 300 см<sup>3</sup> воды**

Количество положительных результатов анализа воды:	Коли-индекс	Пределы индекса (доверительные границы)	Коли-титр
--	-------------	---	-----------

из трех флаконов по 100 см <sup>3</sup>	из трех пробирок по 10 см <sup>3</sup>	из трех пробирок по 1 см <sup>3</sup>		нижний	верхний	
0	0	0	Менее 3	–	–	Более 333
0	0	1	3	0,5	9	333
0	1	0	3	0,5	13	333
1	0	0	4	0,5	20	250
1	0	1	7	1	21	143
1	1	0	7	1	23	143
1	1	1	11	3	36	91
1	2	0	11	3	36	91
2	0	0	9	1	36	111
2	0	1	14	3	37	72
2	1	0	15	3	44	67
2	1	1	20	7	89	50
2	2	0	21	4	47	48
2	2	1	28	10	149	86
3	0	0	23	4	120	43
3	0	1	39	7	130	26
3	0	2	64	15	379	16
3	1	0	43	7	210	23
3	1	1	75	14	230	13
3	1	2	120	30	380	8
3	2	0	93	15	380	11
3	2	1	150	30	440	7
3	2	2	210	35	470	5
3	3	0	240	36	1300	4
3	3	1	460	71	2400	2
3	3	2	1100	150	4800	0,9
3	3	3	Более 1100	–	–	Менее 0,9

Таблица 5

### Определение индекса БГКП при исследовании воды по этапам очистки

Объем исследуемой воды, см <sup>3</sup>				Коли-индекс	Коли-титр
100	10	1,0	0,1		
–	–	–	–	Менее 9	Более 111
–	–	+	–	9	111
–	+	–	–	10	105
+	–	–	–	23	43
+	–	+	–	94	10
+	+	–	–	230	4
+	+	–	+	960	1
+	+	+	–	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

### **Определение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ)**

ТКБ определяют теми же методами, что и БГКП, кроме последнего этапа идентификации, который проводится по ферментации лактозы на полужидкой питательной среде при 44,5 °С. В случае роста на среде Эндо типичных лактозоположительных колоний, Гр(-), оксидазоотрицательных, способных ферментировать лактозу при 44,5 °С, их учитывают как ТКБ, индекс или титр определяют по табл. 4, 5.

### **Определение колифагов**

Присутствие колифагов (бактериофагов, паразитирующих на *E. coli*) определяют методом агаровых слоев по Грациа.

Для определения используют чувствительные музейные культуры микроорганизмов (тест-организмы): мутант *Salmonella typhimurium*, непатогенный для человека, штамм *Escherichia coli* K-12 Hfr из соответствующей коллекции культур ATCC 23631 или NTCT12486, штамм *E. coli* рода CN, называемый WG5, а также бактериофаги MS2, NCTC12487 или ATCC 15597 для контроля чувствительности тест-организмов.

За 18–24 ч перед проведением анализа необходимо сделать посев тест-культуры *E. coli* K<sub>12</sub> F<sup>+</sup> на скошенный питательный агар (МПА). Перед проведением анализа сделать смыв с «косяка» 5 мл стерильной водопроводной воды и по стандарту мутности приготовить взвесь тест-организма в концентрации 10<sup>9</sup> бакт. клеток/мл.

Расплавить и остудить до 45 °С 2 % питательный агар. Исследуемую воду 100 мл внести в пять стерильных чашек Петри (по 20 мл в каждую). В питательную среду добавить смыв *E. coli* (из расчета 1 на 100 мл агара) и хорошо перемешать. Полученной смесью залить по 30 мл сначала пустую чашку Петри (контроль), а затем все чашки, содержащие исследуемую воду. Содержимое чашек перемешивают вращательными движениями. После застывания питательной среды чашки переворачивают вверх дном и ставят для инкубирования в термостат при 37 °С на 18–24 ч.

В результате индикаторная культура образует равномерный сплошной рост, а при наличии колифагов в этом «газоне» образуются прозрачные бляшки («негативные колонии» бактериофага). Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на пяти чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообра-

зующих единицах на 100 мл воды. В контрольной пробе бляшки должны отсутствовать.

### ***Определение спор сульфитредуцирующих клостридий***

Испытуемую воду вносят в расплавленную и остуженную среду Вильсона – Блера. Среда содержит тиосульфат (гипосульфит) и бесцветную соль железа. В результате прорастания спор, размножения клостридий и восстановления ими сульфита образуется сульфид железа, который придает среде черный цвет.

Количественно эти микроорганизмы в воде можно определить методом мембранной фильтрации или прямым посевом.

Перед посевом пробу воды прогревают на водяной бане при температуре  $75 \pm 5$  °С в течение 15 мин для уничтожения вегетативных форм. При исследовании хлорированной воды ее можно не прогревать. Применяя метод мембранной фильтрации, пробу воды определенного объема пропускают через фильтр, который затем помещается в пробирку с подготовленной расплавленной питательной средой верхней стороной внутрь (пробирка с питательной средой после посева должна быть немедленно охлаждена в холодной воде во избежание попадания воздуха) или в чашку Петри на поверхность питательной среды, которая затем заливается той же питательной средой толстым слоем.

Метод прямого посева предполагает посев в стерильные пробирки 20 мл воды следующим образом: по 10 мл в 2 пробирки (объемом не менее 30 мл), или по 5 мл в 4 пробирки (объемом не менее 15 мл).

Сверху посева воды заливают горячим (75–80 °С) железосульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливают по стенке пробирки, стараясь не допустить образования пузырьков воздуха. Пробирки с посевами быстро охлаждают в стакане с холодной водой, инкубируют при 44 °С в течение 24 ч.

Количественному учету подлежат только те посева, в которых получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтре, так и в толще питательной среды. Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц спор сульфит-редуцирующих клостридий в определенном объеме воды (подвергнутой анализу).

## **6. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ**

### **6.1. Микрофлора почвы**

Почва состоит из минеральных и органических соединений. Она – продукт жизнедеятельности микроорганизмов, осуществляющих процесс ее формирования, самоочищения, круговорота азота, углерода, серы и железа в природе. Микроорганизмы почвы фиксируют азот из воздуха (около 100 млн т ежегодно), образуют гумус почвы и высвобождают питательные вещества для растений, выполняют санитарную функцию почвы. Почва является основной средой



обитания многих микробов. Отсюда они поступают в воду и обсеменяют воздух.

Микрофлора почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и неспорообразующие бактерии, актиномицеты, грибы, спирохеты, архебактерии, простейшие, сине-зеленые водоросли, микоплазмы и вирусы. В 1 г почвы насчитывается до 6 млрд микробных тел.

Очаговость распространения микроорганизмов – главная особенность их экологии в почве, позволяющая сохранить виды почвенных микроорганизмов и специфичность группировок по горизонтам почвы. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних – грибы и анаэробы. Количественный состав микроорганизмов почвы неравномерен. Самый поверхностный слой толщиной 1–2 мм содержит мало микроорганизмов, так как они быстро погибают под действием солнечных лучей и высыхания. Следующий слой, глубиной 10–20 см, наиболее обсеменен разнообразными микроорганизмами, под влиянием которых в нем протекают бурные биохимические процессы. По мере увеличения глубины количество микробов постепенно уменьшается, но их обнаруживают даже на значительной глубине. Независимо от глубины наиболее густо всегда заселена околокорневая (ризосферная) зона растений. Качественный состав околокорневой микрофлоры зависит от вида растений, но во всех случаях преобладает грибная флора. Количество микроорганизмов околокорневой зоны в тысячи раз превышает микробное число не занятой растениями почвы. Этот факт используется при обезвреживании почвы, обсемененной патогенными бактериями.

На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет тип почвы, ее плодородие, влажность, аэрация и физико-химические свойства. На микробиоценоз почвы существенно влияет деятельность человека: обработка почвы, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств.

Патогенные микроорганизмы могут попасть в почву с выделениями человека и животных. Особо опасным в санитарном отношении является загрязнение почвы необезвреженными отходами животноводства (навоз, моча, трупы животных). Самоочищающая способность почвы ограничена, а методы обеззараживания почвы громоздки и малоэффективны (например, 5 кг хлорной извести на 1 м<sup>3</sup> почвы).

Патогенные для человека микроорганизмы можно разделить на три группы.

К первой группе относятся патогенные микробы, для которых почва является постоянным местом обитания. Это возбудители ботулизма, актиномицеты, грибы, вызывающие микозы.

Вторая группа представлена споровыми микроорганизмами, для которых почва является вторичным резервуаром, где они сохраняются длительное время (десятилетия). К ним относятся возбудители сибирской язвы, столбняка и газовой гангрены.

Третья группа – патогенные микробы и вирусы, которые, попадая в почву с выделениями человека и животных, сохраняются там от нескольких часов до нескольких месяцев (кишечная палочка, сальмонеллы, шигеллы). Опасность передачи через почву заболеваний, вызванных этими возбудителями, невелика и зависит от интенсивности обсеменения микробами.

## **6.2. Исследование почвы**

Санитарно-микробиологическое исследование почвы необходимо для выявления и предотвращения распространения возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных.

Исследование почвы можно разделить на предупредительный и текущий санитарный надзор.

Предупредительный надзор осуществляют:

- а) при планировке, строительстве и реконструкции вновь заселяемых участков и населенных мест;
- б) при выборе участков для строительства лечебно-профилактических и аптечных учреждений, санаториев, детских учреждений;
- в) при решении вопросов водоснабжения и канализации населенных территорий;
- г) при санитарной оценке пляжей, мест коллективного отдыха и т.д.

Текущий санитарный надзор осуществляют:

- а) при оценке санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению после загрязнений (например, почву детских садов, больниц, зон отдыха исследуют 2 раза в год);
- б) при контроле за почвенными и биотермическими методами обезвреживания сточных вод и отходов (1–4 раза в месяц);
- в) по эпидемическим показаниям для выяснения возможного пути передачи инфекционных заболеваний.

При осуществлении текущего санитарного надзора рекомендуется сокращенный анализ. Он включает: определение ОМЧ, БГКП, титра строгих анаэробов, термофильных бактерий, нитрифицирующих бактерий. В полный санитарно-микробиологический анализ дополнительно входят: определение численности и процентного отношения спор к общему количеству микроорганизмов, количество актиномицетов, грибов, целлюлозоразрушающих микроорганизмов и аммонификаторов, основных групп почвенного микробиоценоза и ряд дополнительных исследований (например, токсичность почв для микроорганизмов). По эпидемическим показаниям в ходе исследований проводят обнаружение патогенных микроорганизмов: сальмонелл, шигелл, возбудителя сибирской язвы, патогенных клостридий.

### ***Санитарно-показательные микроорганизмы почвы***

К санитарно-показательным микроорганизмам, которые определяют в почве, относятся БГКП, *Clostridium perfringens*, термофильные и нитрифицирующие бактерии (табл. 6).

Таблица 6

#### **Требования к микробиологической чистоте почв**

Категория почвы	Титр БГКП	Титр нитрифицирующих бактерий	Титр клостридий	Индекс термофильных микроорганизмов
Чистая	> 1,0	> 0,1	> 0,001	100–1000
Загрязненная	0,9–0,01	0,09–0,001	0,009–0,0001	1001–100000
Сильно загрязненная	< 0,009	< 0,0009	< 0,00009	10001–4000000

По количеству БГКП судят о фекальном загрязнении почвы и наличии прочих энтеробактерий. Важным критерием санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению является содержание *Clostridium perfringens*. Эти микроорганизмы свидетельствуют о фекальном загрязнении, при этом эшерихии исчезают уже через 4–5 месяцев, а клостридий обнаруживают в титре 0,01 г. Определение термофильных бактерий помогает оценить загрязнение почвы навозом, компостом или сточными водами и стадию разложения их органического субстрата. Появление нитрифицирующих бактерий указывает на развитие процесса самоочищения. Для более полной оценки процесса самоочищения определяют также группы микроор-

ганизмов, быстро разрушающих органический субстрат: бациллы, актиномицеты, грибы.

При попадании в почву органических веществ сразу же повышается общее микробное число, а также общее число сапрофитов (ОЧС). Обычно в грязных почвах  $ОМЧ > ОЧС$ , а в чистых  $ОМЧ = ОЧС$  или  $ОМЧ < ОЧС$ . Сначала размножаются гетеротрофы, обладающие очень высокой ферментативной активностью и представленные семейством псевдомонад, аэромонад и др. В этот период в почве много фекальных бактерий (БГКП, энтерококки, *Cl. Perfringens*), протеолитов, разлагающих белки, пептоны, аммонии-фикаторов (микробов, расщепляющих белки до  $NH_3$ ). Для самого свежего загрязнения характерны большая обсемененность почвы энтерококками, БГКП, *Cl. perfringens*, термофилами и отсутствие нитрификаторов.

В процессе самоочищения почвы состав микрофлоры меняется. По мере повышения кислотности в почве появляются ацидофильные микроорганизмы: молочнокислые бактерии, дрожжи, грибы, плесени, актиномицеты. По мере накопления аммиака в почве начинают размножаться нитрификаторы, т.е. микроорганизмы, окисляющие  $NH_3$  до нитритов и нитратов. Эти микроорганизмы завершают цикл превращений органических веществ в неорганические. За окисление  $NH_3$  до  $HNO_2$  ответственны нитрозобактерии (*Nitrosomonas*), а за окисление  $HNO_2$  в  $HNO_3$  – нитробактерии (*Nitrobacter*). Одновременно с процессами нитрификации идут процессы денитрификации, т.е. восстановление нитратов в нитриты, а далее в газообразный азот. На этом этапе ОМЧ почвы становится низким. Видовой состав и численность микрофлоры стабилизируется. Активные вегетативные формы спорообразующих бактерий и грибов уступают покоящимся спорам бацилл, актиномицетам, грибам. В чистых почвах всегда доминируют покоящиеся споры. Спорообразование всегда говорит о законченных процессах минерализации почвы.

Сочетание ОМЧ и нитрификаторов используют для распознавания и отличия чистых почв от почв, бывших загрязненными, но находящихся на стадии минерализации. Для них характерно низкое ОМЧ, но высокое число нитрификаторов. То же самое можно сказать и при сопоставлении общего числа сапрофитов и процентов споровых аэробов. Если процент споровых форм к ОЧС высок (40–60 %), то это характерно для чистых почв, если же низок (25 %), то почва загрязнена.

### **Отбор и подготовка проб**

Перед отбором пробы заполняют сопроводительные документы с описанием местности (характер рельефа, растительности и т.д.), предполагаемых источников загрязнения. Пробы отбирают с прямоугольного участка размером не менее чем  $5 \times 5$  м из 5 точек («метод конверта»). При этом в условиях асептики берут с глубины 20–25 см образцы для приготовления смешанной пробы весом 1 кг.

Пробу помещают в стерильную посуду, маркируют. Исследование пробы желательно проводить в тот же день, допускается хранение материала в течение 24 ч при температуре 4–5 °С.

Перед исследованием образцы почвы освобождают от крупных включений, растирают в ступке и просеивают через стерильное сито с диаметром пор 3 мм. Масса навесок для исследования зависит от цели исследования. Навеску почвы помещают в стерильную колбу и заливают стерильной водопроводной водой в соотношении 1:10. Полученную смесь встряхивают 10–15 мин, затем 2–3 мин отстаивают. Полученную суспензию используют для приготовления последующих разведений.

### ***Определение ОМЧ***

ОМЧ почвы определяют глубинным посевом (на плотной среде) из 10-кратных разведений или методом прямой микроскопии (по Перфильеву).

**Для глубинного посева** готовят несколько разведений почвенной суспензии ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  и т.д.) Для посева выбирают разведения исходя из загрязненности почвы. По 0,1 мл выбранных разведений смешивают с 40 мл расплавленного и остуженного до 45 °С питательного агара, после чего выливают вторым слоем в чашки Петри с питательным агаром. Посевы инкубируют при 28–30 °С в течение 72 ч и подсчитывают количество выросших колоний. Для подсчета колоний выбирают такие разведения почвенной суспензии, при которых на чашках вырастает от 50 до 150 колоний. Затем делают пересчет на 1 г почвы с учетом разведений.

**При использовании прямого метода по Б. В. Перфильеву** к 1 мл почвенной суспензии в разведении 1:10 добавляют 1–2 капли раствора акридинового оранжевого. Затем каплю суспензии помещают в капиллярную камеру. Капилляр помещают на предметное стекло, фиксируют парафином и исследуют при помощи люминесцентной микроскопии. Затем делают пересчет на 1 г почвы.

### ***Определение коли-индекса***

Если предполагается невысокая степень фекального загрязнения, БГКП в почве определяют бродильным методом или методом мембранных фильтров; при высокой степени – прямым посевом почвенной суспензии в разведении 1:10 на среду Эндо.

Метод мембранных фильтров проводят так же, как и при исследовании воды. Предварительно почвенную суспензию 1:10 центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин, затем 5–10 мл суспензии фильтруют через мембранные фильтры.

При титрационном методе из приготовленных разведений почвенной суспензии делают посевы в питательную среду Кесслера (1 % пептона, 5 % желчи, 0,25 % лактозы, генциановый фиолетовый). Из разведения 1:10 10 мл засевают во флакон с 50 мл среды, что соответствует 1 г почвы. Для посева меньших количеств (0,1 и 0,01 г почвы) делают разведение 1:100 и по 1 мл из разведений 1:10 и 1:100 соответственно засевают в пробирки с 9 мл среды. Далее методика соответствует определению коли-индекса воды.

#### ***Определение перфрингенс-титра***

Перфрингенс-титр почвы – минимальное количество почвы, в котором еще определяются *Clostridium perfringens*.

Из приготовленных 10-кратных разведений почвенной суспензии по 1 мл переносят в два параллельных ряда пробирок. Один ряд прогревают при 80 °С 15 мин для уничтожения вегетативных форм. Далее пробирки заливают свежеприготовленной средой Вильсона-Блера. Посевы инкубируют при 43 °С в течение 24–48 ч, после чего учитывают результаты по образованию черных колоний. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму и обнаруживают типичные грамположительные палочки.

#### ***Определение термофильных бактерий***

Число термофильных бактерий определяют глубинным посевом различных разведений на плотные среды (МПА) с инкубированием при 60 °С в течение суток. Из каждого разведения рекомендуется засеивать по 2–3 параллельные чашки.

#### ***Определение нитрифицирующих бактерий***

Титр нитрифицирующих бактерий определяют посевом из 10-кратных разведений почвенной суспензии на жидкую синтетическую среду Виноградского. Посевы инкубируют при 28 °С в течение 14–15 суток. На 5–7 день можно проверить образование азотистой или азотной кислоты при помощи дифениламина. Для этого на стек-

лянную пластину помещают каплю среды и добавляют несколько капель дифениламина (в концентрированной серной кислоте), синее окрашивание свидетельствует о присутствии нитратов.

## **7. МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Микроорганизмы являются неизменными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, высших растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. В России используется более 200 видов лекарственных растений.

Все микроорганизмы, населяющие лекарственные растения, можно поделить на две группы:

- представители нормальной микрофлоры растений;

- фитопатогенные микроорганизмы – возбудители заболеваний растений.

## 7.1. Нормальная микрофлора растений

Нормальную микрофлору растений можно разделить на эпифитные, ризосферные микроорганизмы и грибы-микоризообразователи.

**Эпифитная микрофлора** (греч. *epi* – над, *phyton* – растение) – это микроорганизмы, развивающиеся на **поверхности стеблей** или **листьев растений**. Они растут за счет питательного субстрата, представленного выделениями растительных тканей и веществами-загрязнителями (пылью), и не наносят вреда растению. Эпифитная микрофлора препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, являясь тем самым антагонистами некоторых фитопатогенных микроорганизмов.

Состав микрофлоры растений зависит от вида, возраста растений, типа почвы и температуры окружающей среды. Общая численность эпифитных микроорганизмов резко возрастает при повышении влажности воздуха и усиленном выделении продуктов обмена растительными тканями.

Состав эпифитной микрофлоры весьма специфичен. Нередко 80 % общего количества эпифитов составляют бактерии *Erwinia herbicola*. Второе место по численности занимают различные грибы (*Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* и др.). Разнообразная и обильная микрофлора находится на поверхности семян. Так, на 1 г зерна ржи приходится не менее 2500 тыс. микробных клеток, пшеницы – 1500 тыс., риса – 250 тыс. В состав микрофлоры зерна обязательно входят неспорообразующие бактерии *Pseudomonas*, *Arthrobacter* и *Flavobacterium*, дрожжи *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, а также грибы *Penicilium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* и др. Развитие микроорганизмов на поверхности зерна в значительной мере зависит от влажности и температуры. Установлено, что при температуре 15–20 °С и влажности 14,5–15 % на зерне пшеницы начинается развитие грибов, а при влажности 17,5–18 % – бактерий.

**Микрофлору зоны корня** принято подразделять на микрофлору **ризопланы** – микроорганизмы, непосредственно поселяющиеся на поверхности корня, и микрофлору **ризосферы** – микроорганизмы, населяющие область почвы, прилегающую к корню.



Численность микроорганизмов в ризоплане и ризосфере в сотни и даже тысячи раз превышает их содержание в окружающей почве.

Микрофлора ризосферы, принимая участие в процессах трансформации органических веществ в почве, обеспечивает растения необходимыми элементами минерального питания и некоторыми биологически активными веществами. Выделяемые бактериями угольная и другие минеральные и органические кислоты способствуют растворению и усвоению растениями труднодоступных соединений, таких как фосфаты кальция, силикаты калия и магния. Синтезируемые микроорганизмами витамины (тиамин, витамин В<sub>12</sub>, пиридоксин, рибофлавин, пантотеновая кислота и др.) и ростовые вещества (гиббереллин, гетероауксин) оказывают стимулирующее действие на ростовые процессы растений. Кроме того, микроорганизмы ризосферы разлагают многие токсичные для растений соединения, обеззараживая почву. Многие сапрофитные бактерии ризосферы являются антагонистами фитопатогенных микробов и выполняют роль санитаров в почве. В любой почве изменения окружающей среды, включая агротехнические мероприятия, оказывают меньшее воздействие на микроорганизмы в ризосфере по сравнению с обитателями почвы. Ризосферная зона представляет собой своеобразную «буферную» систему, препятствующую воздействию среды на микрофлору.

На численность и групповой состав микрофлоры ризопланы и ризосферы оказывают влияние: тип почвы, климатические условия, характер растительного покрова, стадия развития растений.

Корни растений стимулируют или угнетают микроорганизмов в разной степени. Бобовые растения чаще всего стимулируют развитие микробов. В ризосфере клеверов, например, обнаружено значительно больше микроорганизмов, чем в зоне корней злаков и деревьев.

Как правило, в динамике численности микроорганизмов ризопланы и ризосферы наблюдаются два максимума: первый приходится на фазу кущения растений, второй – на фазу цветения и начало плодоношения. В зоне молодого корня доминируют неспорообразующие бактерии рода *Pseudomonas* и некоторые микроскопические грибы. К фазе цветения растений их сменяют бациллы; актиномицеты, образующие активные вещества – антибиотики, угнетающие развитие патогенов на корнях; клетчаткоразрушающие бактерии, которые принимают участие в разложении органических веществ отмирающих корней. Корневые выделения растений, несомненно, служат селективным фактором в формировании микробной ассоциации ризосферы. Например, в ризосфере пшеницы ведущая роль

принадлежит микобактериям, в то время как в ризосфере клевера преобладают флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*.

**К микроорганизмам-микоризообразователям** относятся грибы, осуществляющие симбиоз с корнем высшего растения. Микориза благоприятна для развития растений, так как увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разрастаний гиф гриба. Кроме того, грибы своими ферментами разлагают органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой, а также синтезируют ростовые факторы. Растения,

в свою очередь, выделяют ряд веществ, стимулирующих развитие гриба, а также грибы получают от растений углеводы, служащие источником энергии.

Микоризу образует большинство растений (за исключением водных), как древесных, так и травянистых (особенно многолетних). Травянистые растения вступают в микоризный симбиоз с микроскопическими грибами в основном из класса несовершенных грибов (*Deuteromycetes*), отчасти из класса зигомицетов (*Zygomycetes*) с мицелием, лишенным перегородок (неклеточным) и отчасти из класса сумчатых грибов (*Ascomycetes*). Грибы родов элафомицес (*Elaphomyces*) и трюфель (*Tuber*) образуют микоризу с буком, дубом и другими деревьями. Но большинство древесных пород образуют микоризу с грибницей шляпочных грибов – макромицетов из класса базидиальных (*Basidiomycetes*) и группы порядков гименомицетов.

## **7.2. Фитопатогенные микроорганизмы**

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, вирусы и грибы, вызывающие инфекционные заболевания растений.

Болезни, вызываемые бактериями, называют бактериозами. Различают общие и местные бактериозы. Общие бактериозы вызывают гибель всего растения или его отдельных частей вследствие распространения возбудителя в сосудистой системе. Местные бактериозы ограничиваются поражением отдельных участков растений и возникают при интрацеллюлярном распространении.

По совокупности анатомических и физиологических нарушений можно выделить следующие типы болезней растений:

- Камеде-, смоло-, слизетечения.

- Сухая и мокрая гниль проявляется размягчением и разрушением отдельных участков тканей растения за счет деятельности микробов.

- Мучнистая роса. При этом на листьях и побегах возникает белый налет.

- Пожелтение, увядание, засыхание. Некоторые бактерии способны повреждать клеточные мембраны сосудов, в результате чего происходит закупорка сосудов и гибель растения.

- Чернь. При этом на листьях и побегах возникает темная пленка.

- Ожог. Заболевание характеризуется почернением листьев, молодых побегов, цветов, плодов.

- Пятнистость – образование пятен на листьях, плодах, семенах различного цвета, формы, размеров.

- Опухоли – местное увеличение ствола, веток, корней, корневищ в виде наростов, вздутий, утолщений за счет гиперплазии клеток.

- Язвы – углубления, часто окруженные наплывом.

- Мозаика листьев – проявляется в виде бледно окрашенных пятен на листьях.

- Ведьмины метлы – образование побегов из спящих почек.

- Деформация – проявляется в изменении формы органов (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость).

Передача возбудителей бактериозов происходит через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух, путем переноса насекомыми, моллюсками, нематодами. Бактерии проникают в растения через устьица, нектарники и другие части, а также даже через небольшие повреждения. При проникновении бактерий внутрь растений происходит повреждение растительных клеток, они мацерируются и отслаиваются друг от друга. Такой путь проникновения называется **интрацеллюлярным и межклеточным**, а заболевания – **паренхиматозными**. В том случае, если распространение и размножение бактерий происходит в сосудистых пучках, то такие заболевания называются **сосудистыми**. При этом может происходить закупоривание просвета сосудов бактериальной массой, что приводит к увяданию растений. Увядание растений объясняется также действием ядов, выделяемых микроорганизмами.

Среди возбудителей бактериозов встречаются *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* (табл. 9).

## Фитопатогенные бактерии

Виды	Заболевания растений
<i>Erwinia amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>	Ожог, увядание Мокрая бактериальная гниль
<i>Pseudomonas syringae</i>	Пятнистость
<i>Xanthomonas heterocea</i> , <i>X. campestris</i> , <i>X. beticola</i> , <i>X. vesicatoria</i>	Пятнистость, увядание сосудистый бактериоз туберкулез черная бактериальная пятнистость
<i>Corynebacterium insidiosum</i> , <i>C. fasciens</i> , <i>C. michidanense</i>	Увядание увядание бактериальный рак
<i>Pectobacterium phetopthorum</i> , <i>P. aroidae</i>	Гнили
<i>Rhizobium leguminosorum</i>	Язвы
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Опухоли

Вирусы вызывают более 20 % болезней растений. Большая часть фитопатогенных вирусов относится к семейству *Reoviridae*, родам *Phytoreovirus*, *Fijivirus*. Вирусы вызывают мозаику листьев и деформации.

Из фитопатогенных грибов следует отметить два класса – аскомицеты (*Ascomycetes*) и несовершенные грибы. Грибы, поражающие растения, могут в случае приготовления из пораженного зерна продуктов питания вызывать пищевые отравления – микотоксикозы. Такие поражения могут вызывать грибы родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др., которые способны размножаться на вегетирующих или скошенных растениях в условиях повышенной влажности и низкой температуры. Примером микотоксикоза также является эрготизм – заболевание, возникающее при употреблении продуктов, приготовленных из зерна, зараженного спорыньей (гриб *Claviceps purpurea*).

Длительность инкубационного периода (промежуток времени от момента заражения до появления поражений) зависит от температуры, влажности воздуха, света, питания, от устойчивости или восприимчивости растения.

У больных растений изменяются обменные процессы, клеточные структуры, химический состав тканей и, как следствие, понижа-

ется содержание биологически активных веществ. Использование их в качестве лекарственного сырья невозможно.

## **8. МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ**

Лекарственное растительное сырье может инфицироваться патогенными микроорганизмами на всех этапах заготовки (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. Увеличение микробной обсемененности вызывают повышенная влажность, пыль, насекомые и другие факторы. Достаточно быстро

портятся плоды, ягоды и корневища, так как они богаты углеводистыми соединениями. Более устойчивыми являются сухие листья, корешки, кора. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание всего растения либо его частей. Инфицирование лекарственного сырья приводит не только к резкому снижению или полному исчезновению биологически активных веществ, но и накоплению веществ, ядовитых для организма человека. В связи с этим внедрение такого сырья становится бесполезным или даже вредным.

Состав микрофлоры растительного сырья определяется составом нормальной микрофлоры растения (эпифитная и ризосферная микрофлора), а также зависит от вида лекарственного сырья, его структуры и фармакологических параметров. Преобладают грибы (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*), актиномицеты и спорообразующие виды микробов (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*).

Для предупреждения порчи лекарственного сырья необходимо проводить следующие мероприятия:

- уничтожать больные растения;
- соблюдать технологию транспортировки, сушки, хранения и переработки растительного лекарственного сырья.

## **Санитарно-микробиологическое исследование лекарственного растительного сырья**

Для оценки санитарного состояния лекарственного сырья определяют микробное число (количество микробов в 1 г сырья) и количество плесневых и дрожжевых грибов.

**Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья.** В асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек массой 1 г или площадью 1 см<sup>2</sup>, который помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят десятикратные разведения, для посева используют разведения 1:1000 и 1:10000. В стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавлен-

ного и остуженного до 45 °С МПА, перемешивают и после застывания агара посеvy инкубируют при 37 °С 24–48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Затем делают пересчет на 1 г растительного сырья.

**Определение количества дрожжевых и плесневых грибов в растительном лекарственном сырье.** По 0,5 мл смывов из растительного лекарственного сырья засевают газоном на две чашки со средой Сабуро. Посевы инкубируют при температуре 20–22 °С в течение 4 сут. После инкубации подсчитывают число колоний плесневых и дрожжевых грибов на обеих чашках Петри и определяют среднее арифметическое из суммарного числа колоний. Делают пересчет на 1 г или 1 см<sup>2</sup> исходного сырья.

*Допускается содержание в 1 г или 1 см<sup>2</sup> лекарственного сырья не более 10000 микроорганизмов, из них до 1000 грибов.*

## **9. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДС [Е АПТЕК**

Санитарно-эпидемический режим в аптеке регламентируется приказом МЗ РФ № 309 от 21.10.1997 «Об утверждении Инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)».

В аптеках согласно инструкции, утвержденной приказом Министерства здравоохранения, не менее двух раз в квартал осуществляется бактериологический контроль, объектами которого служат:

- вода дистиллированная;
- инъекционные растворы до и после стерилизации;
- глазные мази после стерилизации;
- глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильной основе;
- нестерильные лекарственные формы;
- аптечная посуда, пробки, прокладки, прочие материалы;
- инвентарь, оборудование, руки, санитарная одежда персонала;
- воздух аптечных помещений.

## **9.1. Микрофлора готовых лекарственных форм**

Готовые лекарственные формы в зависимости от микробной обсемененности можно разделить на стерильные, асептические и нестерильные. Нестерильными называются лекарственные формы, в которых допускается содержание определенного количества непатогенных микробов. К ним относят настои, настойки, порошки, таблетки, мази, капли и др. Стерильные (безмикробные) лекарственные формы готовят в асептических условиях и стерилизуют. К ним относятся растворы для инъекций, глазные капли, препараты для детей до 1 года. Асептические лекарственные формы готовят в асептических условиях без стерилизации.

Все лекарственные формы из-за несоблюдения методики их приготовления могут подвергаться микробному обсеменению, в том числе и патогенными микроорганизмами. Использование таких лекарственных средств может привести к развитию инфекционных заболеваний у людей.

### **9.1.1. Источники загрязнения лекарственных средств**

Основными источниками загрязнения лекарственных средств (ЛС) микроорганизмами являются:

- 1) технологическое оборудование, посуда;
- 2) сырье и вспомогательные вещества на всех стадиях производства, хранения и транспортировки продукции;
- 3) вода, используемая в производстве;



- 4) воздух производственных помещений;
- 5) персонал.

Вспомогательные вещества, в частности крахмал картофельный, часто содержат грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*, среди которых обнаружены продуценты микотоксинов. Кроме вспомогательных материалов, в качестве источников загрязнения ЛС обнаруживают основное сырье, чаще природного происхождения, и упаковочные материалы.

Вода входит в состав ЛС или используется при их производстве. Системы подачи воды в производственные помещения достаточно обширны. Многие виды бактерий способны переживать в воде определенное время. Сроки их выживания в воде зависят главным образом от вида бактерий и концентрации микробной взвеси, температуры и состава воды.

Микроорганизмы могут быть внесены в ЛС с воздухом. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли, почвы. Загрязненность воздуха жилых и некоторых производственных помещений всегда выше атмосферного. Причинами попадания микроорганизмов в ЛС через воздух могут быть высокое первичное загрязнение атмосферного воздуха или неэффективная работа систем воздухоподготовки.

Среди источников загрязнения ЛС наиболее существенным является персонал. Микроорганизмы могут попадать в продукт:

- воздушно-капельным путем с выделениями полости рта и носа;
- воздушно-пылевым и контактными путями с участков кожи, незащищенной одеждой, и даже с индивидуальной технологической одежды.

Из верхних дыхательных путей человека в окружающее пространство выделяется значительное количество микроорганизмов. При чихании на расстоянии 10 м и более распространяется от 100 до 1000 жизнеспособных клеток бактерий и вирусов, со слюной –  $10^2$ – $10^6$  КОЕ/мл слюны, с секретом из полости носа –  $10^1$ – $10^6$  КОЕ/мл. Наиболее обсемененными участками кожи являются кисти рук, лицо, шея. На других участках тела человека количество сапрофитных аэробных бактерий находится в пределах  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Количество механических и микробных частиц зависит от характера выполняемых движений. В течение 1 мин человек, не двигаясь, выделяет в окружающую среду 10–1000 механических и микробных частиц, а при интенсивной работе – до  $10^6$ . Количество частиц, выделяемых технологической одеждой, зависит от вида ткани, способа

обработки швов и края, а также от степени изношенности. К уменьшению контаминации ЛС микроорганизмами может привести соблюдение гигиены, выполнение мероприятий по дезинфекции, а также повышение квалификации сотрудников.

### **9.1.2. Микрофлора лекарственных средств и ее влияние на свойства препаратов**

Присутствие микробов может существенно повлиять на терапевтическую ценность ЛС, начиная с его стабильности, заканчивая потенциальной опасностью для здоровья человека из-за токсигенных, аллергенных, а иногда и канцерогенных свойств некоторых видов бактерий и грибов, а также их метаболитов.

Наиболее часто в фармацевтических продуктах обнаруживаются:

- спорообразующие бактерии (*Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*);
- бактерии родов *Salmonella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *P. Aeniginosa* и другие виды этого рода;
- кокки – сарцины, стафилококки;
- грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*.

Микроорганизмы способны разрушать и трансформировать различные компоненты ЛС благодаря широкому набору ферментов. При этом могут изменяться количественно или полностью разрушаться биологически активные вещества лекарственных препаратов. Например, в таблетках преднизолона из-за присутствия *Aspergillus sp.* выявлена трансформация стероида; в глазных каплях с атропином, содержащих *Corynebacterium sp.*, обнаружено пониженное содержание атропина сульфата. Микроорганизмы могут разлагать консерванты: метилпарабен разлагался *P. aeruginosa*, а сорбиновая кислота – грибами рода *Penicillium* и др.

Микроорганизмы могут вызвать изменение органолептических свойств различных лекарственных форм, часто сопровождающееся весьма нежелательными модификациями внешнего вида (обесцвечивание, газообразование), вкусовых качеств и запаха.

В жидких лекарственных формах метаболиты микроорганизмов могут изменить его химический состав, а также привести к образованию токсичных продуктов. Из жидких лекарственных форм легче всего обсеменяются микробами настои и отвары; здесь чаще всего обнаруживаются дрожжи и плесневые грибы. При хранении

ЛС появляются признаки порчи: помутнение, изменение цвета, пленка, осадок, необычный запах. Срок хранения этих препаратов ограничен. Спиртовые настойки меньше подвержены порче вследствие антимикробного действия алкоголя.

Мягкие лекарственные формы также подвержены микробному загрязнению. Их микробная порча носит очаговый характер и проявляется изменением запаха, цвета и консистенции вещества. Например; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* приводят к изменению цвета, разделению фаз, появлению неприятного запаха у эмульсий. Кроме того, на поверхности кремов и мазей возможно развитие *C. albicans*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Verticillium sp.*

В твердых лекарственных формах риск микробной порчи меньше, так как отсутствуют условия для размножения микробов. Присутствие в таблетках аспирина и кодеина *Penicillium sp.* приводило к поверхностному обесцвечиванию образцов и возникновению запаха уксусной кислоты. Такие же изменения вызывают *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* в таблетках нитрозепама. Часто регистрируется загрязнение в группе коллоидных порошков неорганической природы (общее число бактерий и грибов более 1000 в 1 г). Вероятно, коллоидные свойства этих порошков способствуют агрегации спор плесневых грибов. Кроме того, магний, составляющий структуру этого порошка, является существенным макроэлементом питания бактерий и грибов.

### **9.1.3. Влияние микроорганизмов-контаминантов на здоровье человека**

Помимо ухудшения качества ЛС под воздействием микроорганизмов, загрязненные препараты могут быть опасны для здоровья пациентов. Основными отрицательными последствиями использования пациентами загрязненных ЛС могут быть снижение или отсутствие терапевтического действия препарата, возникновение побочных реакций, заболеваний, а также передача и распространение лекарственно устойчивых бактерий и грибов.

Серьезные заболевания пациентов могут быть обусловлены продуктами биоразрушения или микробными токсинами. Последние могут вызвать токсикоинфекции – острые кишечные заболевания, развивающиеся после приема внутрь ЛС, загрязненных патогенными и условно-патогенными бактериями, выделяющими токсины.

Среди них различные микроорганизмы: энтеротоксигенные варианты кишечной палочки, протей, энтерококки, *B. cereus*, *S. aureus*, *Cl. perfringens*, реже – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробной загрязненности, вирулентности микробов, от иммунного статуса пациента и способа введения препарата. Наибольшую опасность представляет их введение в кровоток, глаза, в полости тела, в норме стерильные. При местном применении препаратов вероятность развития инфекционного процесса возрастает при обширных повреждениях тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства. Наибольшую опасность подобные инфекции представляют для людей со сниженным иммунным статусом: новорожденных, больных пожилого возраста, ослабленных пациентов.

Лекарственная инфекция чаще всего встречается в офтальмологической практике. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию микрофлоры глазных контактных линз и растворов для их промывания, так как из-за микробной загрязненности последних резко увеличивается риск возникновения заболеваний глаз.

Возможно развитие кожных заболеваний, вызванных применением медицинских кремов, загрязненных *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

В ряде случаев лекарственные средства, оставаясь стерильными, приобретают **пирогенные свойства**. При парентеральном и особенно при внутрисосудистом введении таких препаратов наблюдается быстрое повышение температуры тела до 40 °С. Кроме того, происходит учащение пульса, возникает озноб, повышенное потоотделение, тошнота и головная боль. В особо тяжелых случаях эти явления приводят к смертельному исходу.

Пирогенные вещества (пирогены) представляют собой эндотоксины (в большей степени грамотрицательных микробов). С химической точки зрения пирогены – это сложные вещества с высокой молекулярной массой и размером частиц от 50 до 1 мкм, состоящие в основном из липополисахаридов, адсорбированных на белковом носителе.

Пирогены растворимы в воде, нерастворимы в спирте и ацетоне, устойчивы к воздействию повышенной температуры. Нагревание в автоклаве при 120 °С в течение 20 мин приводит к гибели бактерий, но не уничтожает пирогены. Чувствительность пирогенов к высокой температуре различна. Изменение рН водного раствора практически не влияет на термолабильность пирогенов. В сухом состоянии их полное разложение происходит только при температуре

200 °С в течение 30 мин; стерилизация сухим воздухом при 160 °С в течение 2 ч не гарантирует полной апиrogenности. Повышение температуры позволяет сократить время, необходимое для уничтожения пирогенов. При температуре 600 °С достаточно минутного нагревания, при 450 °С – двухминутного, следовательно, освободить от них воду и инъекционные растворы термической стерилизацией практически невозможно.

Пирогенные вещества чувствительны к действию окислителей, например, перекиси водорода или перманганата калия. Пирогены обладают очень малыми размерами и проходят через самые плотные фильтры с размерами пор от 0,005 до 0,001 мкм.

Возникновение пирогенности лекарственных препаратов возможно из-за микробного загрязнения дистиллированной воды, нарушения асептики технологического процесса, увеличения времени между приготовлением раствора и стерилизацией (более 1,5 ч).

## **9.2. Санитарно-микробиологический контроль лекарственных средств**

Для соблюдения санитарного режима изготовления лекарственных препаратов проводят санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды предприятия и каждой серии выпускаемой лекарственной формы. Микробиологическая чистота выпускаемых ЛС (лекарственных препаратов и субстанций), а также вспомогательных веществ, используемых в производстве лекарственных препаратов, должна соответствовать стандартам (табл. 7, 8). Нестерильные лекарственные средства могут быть контаминированы микроорганизмами. В них допускается наличие лимитированного количества микроорганизмов при отсутствии определенных видов бактерий, представляющих опасность для здоровья человека.

*Таблица 7*

**Микробиологическая чистота лекарственных препаратов**

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
1	2	3
1	Препараты, к которым предъявляется требование «стерильность»	Препараты должны быть стерильными
2	Для применения местно, наружно, интравагинально.	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более $10^2$

	<p>Для введения в полости уха, носа Респираторно. Трансдермальные пластыри.</p> <p>За исключением тех лекарственных препаратов, которые должны быть стерильными</p>	<p>в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Отсутствие энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Не более 10 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в 1 г или в 1 мл остальных препаратов. Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу). Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл, или на 1 пластырь (включая клейкую сторону и основу)</p>
3	<p>А. Для приема внутрь или введения ректально</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^3</math> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл</p>
	<p>Б. Для приема внутрь – из сырья природного происхождения (животного, растительного или минерального), уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки и относительно которого федеральный орган контроля качества лекарственных средств допускает уровень микробной загрязненности более <math>10^3</math> жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл. Исключением являются лекарственные средства, включенные в Категорию 4</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^4</math> в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл. Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл</p>

Окончание табл. 7

1	2	3
4	<p>Лекарственные растительные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция) или нескольких (сборы), а также растительное сырье «ангро»</p>	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^7</math> в 1 г. Общее число грибов не более <math>10^5</math> в 1 г. <i>Escherichia coli</i> не более <math>10^2</math> в 1 г.</p>

	А. Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленные с использованием кипящей воды	Общее число аэробных бактерий не более $10^5$ в 1 г. Общее число грибов не более $10^4$ в 1 г
	Б. Лекарственные растительные средства или растительное сырье «ангро», приготовленные без использования кипящей воды	Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более $10^3$ в 1 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г

Таблица 8

**Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных веществ для производства лекарственных препаратов**

Категория	Субстанции, вспомогательные вещества	Рекомендуемые нормы
1	2	3
1.2	Субстанции для производства: А. Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации Б. Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации В. Нестерильных лекарственных препаратов, относящихся к категории 2	Субстанции должны быть стерильными  Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более $10^2$ в 1 г или в 1 мл. Отсутствие энтеробактерий в 1 г или в 1 мл  Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл
2.2	Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов	Общее число аэробных бактерий не более $10^3$ в 1 г или в 1 мл. Общее число грибов не более $10^2$ в 1 г или в 1 мл. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл

Окончание табл. 8

1	2	3
---	---	---

3.2	Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^4</math> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Энтеробактерий не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл</p>
4.2	Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)	<p>Общее число аэробных бактерий не более <math>10^3</math> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Общее число грибов не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл.</p> <p>Других энтеробактерий не более <math>10^2</math> в 1 г или в 1 мл</p>

Примечания к табл. 7 и 8.

1. В нормативных документах могут быть указаны в виде исключения и другие нормы в зависимости от состава препарата и особенностей технологического процесса производства.

2. В нормативных документах на препараты для детей должны быть введены более жесткие нормы, а именно: количество аэробных бактерий в 1 г или в 1 мл – в пределах от 100 до 500, количество грибов – от 10 до 50, отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

3. При обнаружении во время проведения испытания других патогенных бактерий, кроме указанных выше, считают, что качество лекарственных средств, субстанций и вспомогательных веществ не соответствует требованиям по показателю «микробиологическая чистота».

### 9.2.1. Испытание на стерильность



Лекарственные средства для инъекций и инфузий, глазные капли, мази, пленки и другие препараты и субстанции, в отношении которых имеются соответствующие указания в документации, должны быть стерильными. Методы контроля стерильности применяют для испытания всех лекарственных средств, независимо от их природы и лекарственной формы.

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях, чтобы избежать микробной контаминации во время посева, используя, например, ламинар-бокс класса А, расположенный в зоне класса В, или изолятор. Можно применять и другие меры, предотвращающие контаминацию, при условии, что они не оказывают пагубное влияние на микроорганизмы, которые могут содержаться в исследуемых образцах.

### ***Определение антимикробного действия***

До проведения испытания на стерильность следует определить, обладает ли исследуемый образец антимикробным действием, которое может существенно повлиять на результаты испытания. Для этого готовят взвеси культур тест-микроорганизмов (табл. 9) с конечной концентрацией не более 100 КОЕ в 1 мл. Испытание проводят дважды с каждым микроорганизмом в отдельности. В пробирки с 10 мл питательной среды, рекомендованной для испытания, вносят по 1 мл приготовленной взвеси тест-микроорганизма. В две пробирки с инокулированной средой вносят по 1 мл исследуемого образца, в две другие вносят по 1 мл соответствующего растворителя – положительный контроль. Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С в течение 3 сут. Посевы на жидкой соево-казеиновой среде и среде Сабуро инкубируют при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С в течение 5 сут. Сравняют рост тест-микроорганизмов в контрольных и опытных посевах при визуальном просмотре. Если результаты неодинаковые, т.е. в контроле наблюдают рост тест-микроорганизма, а в опыте рост отсутствует, считают, что исследуемый образец обладает бактериостатическим или фунгистатическим действием.

При наличии антимикробного действия исследуемого образца используют специфические инактиваторы, указанные в нормативных документах. Например, парааминобензойная кислота для сульфаниламидов, бета-лактамаза для пенициллинов и цефалоспоринов. Неспецифические инактиваторы (твин-20, твин-80, яичный лецитин, гистидина гидрохлорид, натрия тиосульфат и др.) добавляют в буферный раствор и (или) в питательные среды, как правило, до стерилизации.

*Таблица 9*

**Тест-микроорганизмы для определения ростовых свойств питательных сред и определения антимикробного действия**

Питательные среды	Тест-микроорганизмы	
	вид	штамм
Жидкая тиогликолевая среда	Аэробные бактерии: <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Анаэробные бактерии: <i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 6633 ATCC 6538-P ATCC 9027  ГИСК 272
Жидкая соево-казеиновая среда	Грибы: <i>Candida albicans</i>	NCTC 885-653
Жидкая среда Сабуро	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642

**Примечание:**

ATCC – Американская коллекция типовых культур, США.

ГИСК – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича, Россия.

NCTC – Национальная коллекция типовых культур.

Для разведения исследуемого образца перед испытанием на стерильность можно использовать нейтрализующую жидкость промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Полисорбата-80 (твина-80) – 30,0 г.
- Лецитина яичного (или соевого) – 3,0 г.
- L-гистидина гидрохлорида – 1,0 г.
- Пептона (мясного или казеинового) – 1,0 г.
- Натрия хлорида – 4,3 г.
- Калия фосфата однозамещенного – 3,6 г.
- Натрия фосфата двузамещенного – 7,2 г.
- Воды – 1000 мл.

Стерилизуют в автоклаве, рН после стерилизации  $7,0 \pm 0,2$ .

Если разведение в вышеприведенном растворе не устраняет антимикробное действие исследуемого образца, то увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина. Альтернативно допускается добавление в буферный раствор специфических инактиваторов, устраняющих антимикробное действие лекарственных средств или консервантов (табл. 10).

Таблица 10

### Инактиваторы антимикробного действия консервантов

Тип консерванта	Инактиватор	Концентрация в растворителе
Фенолы	Натрия лаурилсульфат Твин-80 и лецитин Яичный желток	4 г/л 30 г/л и 3 г/л 5–50 мл/л
Органо-ртутные соединения	Натрия тиогликолят	0,5–5 г/л
Галогены	Натрия тиосульфат	5 г/л
Четвертичные соединения аммония	Яичный желток	5–50 мл/л

При отсутствии инактиватора исследуемый образец разводят, изменяя соотношение объемов посевного материала и питательной среды, или используют метод мембранной фильтрации.

#### *Испытание на стерильность*

Для испытания используют жидкую тиогликолевую среду, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро. Жидкую тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро применяют для выявления грибов.

Для испытания отбирают образцы лекарственного средства в количестве, указанном в табл. 11, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

*Таблица 11*

#### Количество единиц (ампул, флаконов и др.) от серии исследуемого образца для проведения анализа

Количество единиц в серии	Количество единиц для проведения анализа (не менее)
1	2
Парентеральные лекарственные средства:	
Не более 100	10 % или 4 (берут наибольшее)
От 100 до 500	10
Более 500	2 % или 20 (берут наименьшее)
Парентеральные лекарственные средства большого объема	2 % или 10 (берут наименьшее)
Антибиотики, твердые формы, «ангро» (более 5 г)	6

*Окончание табл. 11*

1	2
Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные): Не более 200 Более 200 Препараты в однодозовой упаковке	5 % или 2 (берут наибольшее) 10 См. графу «Парентеральные лекарственные средства»
Твердые формы, «ангро»: Не более 4 упаковок Свыше 4, но не более 50 Свыше 50	Каждую 20 % или 4 (берут наибольшее) 2 % или 10 (берут наибольшее)

При вскрытии образцов не допускают их контаминации микроорганизмами, которые могут находиться на его внешней поверхности. Ампулы и пробки флаконов протирают спиртом этиловым ректифицированным 96 % и фламбируют. Для посева на каждую питательную среду используют количество исследуемого образца, приведенное в табл. 12, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

Таблица 12

**Минимальное количество образца для посева на питательные среды**

Количество лекарственного средства в упаковке	Количество образца для посева
Жидкие: Менее 1 мл 1–40 мл 40–100 мл более 100 мл Антибиотики Другие препараты, растворимые в воде или изопропилмиристите	Весь объем 1/2 г содержимого, но не менее 1 мл 20 мл 10 % содержимого, но не более 20 мл 1 мл Содержимое упаковки, но не менее 0,2 г
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	Содержимое упаковки, не менее 0,2 г
Твердые: Менее 0,05 г 0,05–0,3 г 0,3–5 г Более 5 г	Все содержимое 1/2 г содержимого, но не более 0,05 г 0,150 г 0,500 г

**1. Метод мембранной фильтрации**

При определении стерильности лекарственных средств, обладающих выраженным антимикробным действием, и лекарственных средств в сосудах вместимостью более 100 мл используют метод мембранной фильтрации. Исключение составляют лекарственные средства с антимикробным действием, нерастворимые в воде или изопропилмиристате.

Испытание проводят с использованием фильтрационной установки, которая должна быть смонтирована таким образом, чтобы исследуемый раствор можно было ввести и профильтровать в условиях асептики. Испытания проводят под вакуумом 93,3 кПа (70 см рт.ст.) при скорости вытекания воды 55–75 мл в 1 мин. Допускается использование аппарата, представляющего собой стерильную замкнутую систему и работающего также по принципу фильтрации растворов, с мембраной, вмонтированной в канистру, в которую после фильтрования добавляют стерильную среду. Используют мембранные фильтры с размером пор  $0,45 \pm 0,02$  мкм и внешним диаметром 47 мм. Фильтры из нитрата целлюлозы используются для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетата целлюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и др. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность сводят к минимуму потери препарата при фильтрации. Для лекарственных средств, не обладающих бактериостатическим или фунгистатическим действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, увлажняя их перед фильтрацией, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

Установки и фильтры стерилизуют и хранят в условиях, гарантирующих сохранение стерильности.

При исследовании лекарственных средств в виде раствора в масле фильтр и установка перед анализом должны быть тщательно высушены.

### ***Подготовка проб***

Жидкое лекарственное средство в упаковке перемешивают, отбирают необходимое для испытания количество исследуемого образца (табл. 12) и асептически переносят на один или несколько фильтров. Мембранную фильтрацию проводят с помощью вакуума или давления.

Если исследуемый образец обладает антимикробным действием или в его состав входит консервант, то для промывания фильтров используют раствор натрия хлорида изотонический 0,9 % или жид-

кость № 1 (1 г ферментативного пептона растворяют в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют, рН после стерилизации – 7,1). Испытание проводят, исключая контаминацию микроорганизмами последней порции жидкости для промывания.

Перед помещением на фильтр вязких жидкостей или суспензий для увеличения скорости фильтрации к общей пробе асептически добавляют достаточное количество подходящего растворителя.

Если в состав исследуемого образца входят лецитин, масло или консервант и при наличии антимикробного действия, то для промывания фильтров используют жидкость № 2 (1 мл твина-80 добавляют к 1000 мл жидкости № 1, разливают в сосуды и стерилизуют, рН после стерилизации – 7,1).

Мази на жировой основе и эмульсии типа «вода в масле» растворяют в изопропилмиристате (ИПМ), предварительно простерилизованном, методом мембранной фильтрации с использованием мембран с диаметром пор 0,22 мкм. Стерильный растворитель и, если необходимо, исследуемый образец непосредственно перед фильтрацией нагревают до температуры не более 44 °С. Первоначально через мембрану пропускают стерильный ИПМ в количестве 5 мл. Затем фильтруют раствор препарата в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса над фильтром постоянно должен быть слой раствора во время фильтрации. После фильтрации мембрану промывают вначале двумя порциями жидкости № 2, по 200 мл каждая, а затем 100 мл жидкости № 1. При испытании в питательные среды добавляют твин-80 из расчета 1 г/л.

Если в состав лекарственного средства входит вазелин, для промывания фильтров используют жидкость № 3 (5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 растворяют в 1000 мл воды, разливают в сосуды и стерилизуют, рН после стерилизации – 6,9). Перед началом фильтрации через фильтр пропускают 200 мл жидкости № 3. Для максимальной эффективности процесса над фильтром постоянно должен быть слой раствора во время фильтрации. После фильтрации образца фильтр промывают тремя порциями жидкости № 3 по 100 мл каждая.

Если препарат выпускается в шприц-тюбиках, то содержимое каждого шприц-тюбика переносят в две воронки установки для мембранной фильтрации или собирают общую пробу в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

Из твердых лекарственных форм для инъекций (кроме антибиотиков) готовят разведение в соответствии с инструкцией по применению.

Содержимое препаратов в стерильной аэрозольной упаковке асептически извлекают и помещают в стерильную колбу нажатием на шток распылительного клапана. Если возможно, пропелент удаляют путем испарения. Добавляют в колбу жидкость № 2 и осторожно перемешивают.

**Валидация** (процедура, дающая высокую степень уверенности в том, что метод будет последовательно приводить к результатам, отвечающим заранее установленным критериям приемлемости) метода мембранной фильтрации при контроле лекарственных средств, обладающих антимикробным действием

Фильтруют определенный объем исследуемого образца, используя для одного фильтра количество единиц (ампул, флаконов и т.д.), указанное в табл. 12. Фильтр промывают как минимум тремя порциями соответствующей жидкости по 100 мл каждая. В последнюю порцию жидкости для промывания вносят 1 мл приготовленной микробной взвеси тест-микроорганизмов: *B. subtilis* АТСС 6633 – для тиогликолевой среды; *C. albicans* NCTC 885-653 – для соевоказеинового бульона или жидкой среды Сабуро. Концентрация тест-штаммов – не более 100 КОЕ/мл. Фильтр помещают в колбу со 100 мл соответствующей питательной среды или добавляют среду в канистру замкнутой системы. Посевы инкубируют при соответствующей температуре в течение не более 3 сут. для бактерий и 5 сут. для грибов. Определяют наличие роста тест-микроорганизма при визуальном просмотре. При наличии роста считают, что антимикробное действие полностью инактивировано, и проводят испытание на стерильность, используя то же количество препарата, количество единиц (ампул, флаконов и т.п.), объем жидкости для промывания и те же питательные среды. При отсутствии роста тест-микроорганизма считают, что антимикробное действие не инактивировано, и испытание повторяют, увеличивая объем жидкости для промывания фильтра. Однако общий объем жидкости, пропущенный через мембрану, не должен превышать 1000 мл.

#### **Ход исследования**

Фильтры после фильтрации асептически снимают с фильтродержателя и помещают в жидкую тиогликолевую среду, жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом сред.

При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды. Посевы инкубируют не менее 14 сут. при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С на жидкой тиогликолевой среде и при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро (независимо от метода посева), периодически просматривая питательные среды. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально.

## **2. Метод прямого посева**

### ***Подготовка проб***

Определенный объем (табл. 12) нефилтующейся жидкости отбирают в асептических условиях и проводят посев на питательные среды.

Для исследования образцов ЛС, представляющих собой растворы в маслах, в питательную среду предварительно добавляют 10 г/л твина-80 или другого эмульгатора в концентрации, не оказывающей антимикробного действия в условиях испытания.

Для исследования мазей и кремов отбирают 20 образцов и разделяют их на 2 группы по 10 в каждой. Исследуемые образцы эмульгируют в разведении 1:10 с помощью подходящего эмульгатора в соответствующем стерильном растворителе, например, жидкости № 1. Полученную эмульсию вносят в питательную среду, не содержащую эмульгатора.

Если исследуемый образец обладает антимикробным действием в условиях испытания, его устраняют путем добавления подходящих инактиваторов (например, твина-80, количество которого указывают в частной фармакопейной статье) или увеличивают количество питательной среды. Посевы образцов растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают. Однако в том случае, когда тиогликолевая или аналогичная ей среда применяется для выявления анаэробных микроорганизмов, встряхивание или перемешивание должно быть сведено к минимуму для того, чтобы не нарушать анаэробных условий.

Если в состав лекарственного средства входят трудноэмульгируемые жиросодержащие продукты, допускается использование определенного эмульгатора соответствующей концентрации в стерильном растворителе с одновременным нагреванием образца до 40 °С (в исключительных случаях – до 45 °С) в течение не более 30 мин.

Твердые лекарственные формы в виде порошка или суспензии (если в сосуд добавляют стерильный растворитель) переносят в количестве, указанном в табл. 12, в жидкую тиогликолевую среду,



жидкую соево-казеиновую среду или жидкую среду Сабуро и осторожно перемешивают.

### ***Ход исследования***

Посевы инкубируют не менее 14 сут. при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С на жидкой тиогликолевой среде и при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро (независимо от метода посева), периодически просматривая питательные среды.

Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если исследуемый образец вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов, через 14 сут. после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее 14 сут., но не более 18 сут. от начала испытания.

### **3. Интерпретация результатов при проведении испытаний на стерильность**

При отсутствии роста микроорганизмов считают, что исследуемый образец соответствует требованиям испытания. При наличии роста микроорганизмов, наблюдаемого визуально и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что исследуемый образец не соответствует требованиям испытания на стерильность, если не доказана недостоверность испытания, вызванная причинами, не связанными с исследуемым образцом. Результаты испытания могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий:

- 1) получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды в ходе проведения испытания;
- 2) выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- 3) обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле;
- 4) после идентификации микроорганизмов, выделенных из исследуемого образца, однозначно признано, что причиной возникновения роста этого вида или видов являются материалы и/или технические приемы, использованные при испытании;
- 5) если питательная среда нестерильна и/или ее ростовые свойства неудовлетворительны.

Если результаты испытания признаны недостоверными, его повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально. Ес-

ли в результате повторного испытания не обнаруживают роста микроорганизмов, считают, что препарат выдерживает испытание на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не выдерживает испытание на стерильность.

### **9.2.2. Определение микробиологической чистоты**

Испытание на микробиологическую чистоту включает:

- подготовку образцов различных лекарственных форм перед испытанием;
- отбор образцов для анализа;
- количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов;
- выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в нестерильных лекарственных средствах.

Испытание проводят в асептических условиях, чтобы предотвратить контаминацию исследуемых образцов.

### **Определение антимикробного действия лекарственного средства**

Перед проведением контроля необходимо определить, обладает ли исследуемое лекарственное средство в условиях испытания на микробиологическую чистоту антимикробным действием, подавляющим рост отдельных видов бактерий и грибов, так как это может привести к неправильной оценке результатов анализа. Для определения антимикробного действия используют тест-микроорганизмы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* IHE 103/39, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (или *P. aeruginosa* ГИСК 453), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов.

Готовят необходимые разведения лекарственного средства (1:10, 1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000) методом последовательных разве-

дений, используя фосфатный буферный раствор с хлоридом натрия и пептоном рН 7,0.

### **1. Метод определения антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту**

Каждое разведение препарата в количестве 1 мл вносят в шесть чашек Петри диаметром 90 мм, в две из которых добавляют по 0,2 мл взвеси спор *B. subtilis*, в две другие – по 0,2 мл взвеси культуры *S. albicans*, в две последние – 0,2 мл взвеси конидий *A. niger*. Чашки с бактериями заливают 10–15 мл расплавленного и охлажденного до  $47,5 \pm 2,5$  °С питательного агара, чашки с культурами грибов – тем же количеством среды Сабуро. По 1,0 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред № 3 и 8 (или аналогичных), куда затем добавляют по 1 мл взвеси *E. coli*, *Salmonella abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* соответственно средам, каждый микроорганизм отдельно. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя. Опыт ставят в двойной повторности. Посевы на средах № 1, 3, 8 инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С в течение 48 ч (среды № 3, 8) и 5 сут. (среда № 1). Посевы на среде № 2 инкубируют при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С в течение 5 сут.

После окончания сроков инкубации отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках без препарата и наличие или отсутствие роста тест-штаммов на средах с различными разведениями препарата. В случае помутнения или изменения окраски среды, затрудняющих учет результатов, делают пересевы на агаризованные среды. При росте типичных колоний *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* отмечают отсутствие антимикробного действия исследуемого препарата.

### **2. Метод репликаций**

Для водонерастворимых (суспензии, эмульсии и др.) или окрашенных соединений предпочтительно использовать метод репликаций.

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл каждого разведения исследуемого препарата. В контрольные чашки вносят по 1 мл разбавителя, используемого для получения разведений. В чашки Петри как в эксперименте, так и в контроле добавляют по 10–15 мл расплавленного и охлажденного до  $45 \pm 2$  °С соево-казеинового агара или среды № 1, в другие – такое же количество среды Сабуро и тщательно перемешивают. Опыт ставят в двойной повторности.

После застывания агара чашки подсушивают для удаления конденсата с поверхности среды, на которую затем бактериологической петлей, пипеткой или репликатором наносят взвесь каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек на среды № 1 и 2 (или аналогичные) соответственно. Чашки с соево-казеиновым агаром или средой № 1 инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С в течение 48 ч. Чашки со средой Сабуро инкубируют при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С в течение не более 5 сут.

#### *Учет и интерпретация результатов*

Наличие такого же роста тест-микроорганизмов, как в контроле, обозначают знаком «+», отсутствие роста – знаком «–», слабый, замедленный или угнетенный рост – знаком «+/-». Если по сравнению с контролем на средах с препаратом наблюдают заметное уменьшение количества колоний на чашках (более 70 %) или отсутствие роста тест-микроорганизмов, делают заключение о наличии антимикробного действия.

Первое из последовательных разведений препарата, в котором отсутствует антимикробное действие, используют для посева на соответствующую питательную среду.

### **Способы устранения антимикробного действия лекарственных средств**

Для устранения антимикробного действия препаратов используют соответствующие специфические (например, парааминобензойную кислоту и бета-лактамазу) или неспецифические (твин-20, твин-80, соевый или яичный лецитин и др.) инактиваторы; увеличивают разведение препарата, взяв больший объем растворителя в пределах норм допустимой микробной загрязненности; применяют метод мембранной фильтрации с последующей промывкой фильтров, если позволяет природа исследуемого лекарственного средства, т.е. препарат растворим в воде или в изопропилмиристате.

Если в связи с природой лекарственного средства, нерастворимого в воде или изопропилмиристате, нельзя использовать метод мембранной фильтрации, а все вышеперечисленные методы устранения его антимикробного действия в отношении конкретного тест-микроорганизма неэффективны, этот вид испытания не проводят.

## **Особенности отбора и подготовки образцов для анализа**

От каждой исследуемой серии лекарственного средства, независимо от ее объема, отбирают образец для анализа из достаточного количества разных упаковок препарата (не менее 3–5).

При анализе твердых лекарственных форм используют 10 г образца для определения общего числа бактерий и грибов в 1 г препарата, для испытания на наличие *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. Coli*; 10 г образца – для определения *Salmonella*; 10 г – для количественного определения других энтеробактерий, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

При исследовании таблеток, драже, гранул и других твердых ЛС 10 г образца (если другое количество не указано в частной фармакопейной статье) измельчают (в случае необходимости) в стерильных фарфоровых ступках или с помощью специального оборудования и переносят в 100 мл буферного раствора. Далее проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

При исследовании капсул 10 г образца переносят в 100 мл буферного раствора, содержащего не более 5 % твина-80 и нагретого до температуры не выше 40 °С. После суспендирования капсул в буферном растворе проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

При анализе мягких лекарственных форм используют 10 г препарата для определения общего числа бактерий и грибов, для испытания на наличие *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* в 1 г препарата, 10 г образца – для испытания на наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 г препарата, если нет других указаний в частной фармакопейной статье.

При исследовании мазей, кремов, суппозиторий, легко смешиваемых с водой, 10 г образца помещают в стерильную колбу, содержащую 100 мл буферного раствора и стеклянные бусы диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Если мягкие лекарственные формы трудно смешиваются с водой, то 10 г образца смешивают со стерильным твином-80, количество которого не должно быть более 1/2 объема образца (в данном случае 5 г). Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до температуры не выше 40 °С (в исключительных случаях – до 45 °С)

и осторожно перемешивают. При этом время нагревания не должно превышать 30 мин. Добавляют необходимое количество предварительно нагретого до соответствующей температуры стерильного фосфатного буферного раствора и стеклянные бусы диаметром 5–6 мм. Смесь осторожно перемешивают для получения гомогенной эмульсии в разведении 1:10, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

При необходимости готовят последующие десятикратные разведения, используя фосфатный буферный раствор, содержащий соответствующую концентрацию стерильного твина-80.

При анализе жидких лекарственных форм используют 10 мл образца для определения общего числа бактерий и грибов в 1 мл препарата, для испытания на наличие *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*, 10 мл образца – для количественного и качественного определения *E. coli* и других энтеробактерий, 10 мл – для определения *Salmonella*.

Если исследуют растворы, суспензии, сиропы, микстуры, то 10 мл образца переносят в 90 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Если исследуют растворы в маслах, эмульсии, то 10 мл образца помещают в стерильную колбу, содержащую 90 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5 % и стеклянные бусы диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

При анализе аэрозолей используют 3 г образца для определения общего числа аэробных бактерий и грибов в 1 г препарата и испытания на наличие *P. aeruginosa*, *S. aureus*, 3 г образца – для испытания на наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Образец отбирают путем многократных нажатий на шток клапана (насадку).

Если исследуют аэрозоли на основе спиртов, то 3 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Если исследуют аэрозоли на основе масел, то 3 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5 % и стеклянные бусы диаметром 5–6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не

выше 40 °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Если исследуют аэрозоли на основе твердых веществ, 3 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

При отборе трансдермальных пластырей используют образец, состоящий из 20 единиц. С каждого из 10 пластырей снимают защитную пленку, пользуясь стерильными инструментами. При необходимости разрезают пластырь стерильными ножницами на более мелкие фрагменты, которые переносят в колбу емкостью 1000 мл, содержащую 500 мл стерильного буферного раствора и стеклянные бусы диаметром 5–6 мм, нагревают на водяной бане до температуры не выше 40 °С, энергично встряхивают в течение 30 мин. 50 мл полученного смыва используют для количественного определения микроорганизмов методом мембранной фильтрации, а также для выделения *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

Для выделения и количественного определения энтеробактерий используют следующие 10 пластырей, которые вносят в лактозный бульон (среду № 11).

Если известно, что пластырь обладает антимикробным действием, в разбавитель добавляют подходящий инактиватор (твин-80 и/или лецитин).

Если смыв с трансдермальных пластырей нерастворим и нельзя использовать метод мембранной фильтрации, применяют метод прямого посева на питательные среды.

### **Методы количественного определения аэробных бактерий и грибов**

Представленные методы предназначены для количественного определения мезофильных бактерий и грибов, которые растут в аэробных условиях.

В зависимости от природы лекарственного средства и его физико-химических свойств используют один из вариантов чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный), метод мембранной фильтрации или пробирочный метод наиболее вероятных чисел (НВЧ).

## 1. Чашечный агаровый метод

Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные питательные среды: соево-казеиновый агар или среду № 1, сухую, для контроля микробной загрязненности – для выращивания бактерий; агар Сабуро или среду № 2, сухую, для контроля микробной загрязненности – для выращивания грибов. Если нет других указаний в частной фармакопейной статье, посеvy на среде для выращивания бактерий инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С, а на среде для грибов – при температуре  $22,5 \pm 2,5$  °С. Для каждого разведения образца используют не менее двух чашек Петри с определенной средой. После расплавления среды охлаждают до температуры  $45 \pm 5$  °С и вносят в чашки Петри в необходимом количестве.

### *Глубинный метод*

Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 15–20 мл агаризованной питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют посеvy.

### *Двухслойный метод*

Агаризованные питательные среды вносят в количестве 15–20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1 мл вносят в пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной питательной среды, быстро перемешивают содержимое пробирки и переносят на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

### *Поверхностный метод*

Расплавленные и охлажденные питательные среды вносят в количестве 15–20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашках подсушивают. Образец, приготовленный для анализа, наносят на агар в количестве 0,1 мл и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды. Чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.



### *Модифицированный глубинный метод*

Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 7–10 мл расплавленной и охлажденной питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют. Учет результатов производят через 48–72 ч.

### *Учет результатов посевов чашечными методами*

Посевы просматривают ежедневно. Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительный результат) и через 5 сут. (окончательный результат).

Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний бактерий находится в пределах от 30 до 300, а колоний грибов – от 10 до 100. Если при учете результатов двух последующих разведений число колоний на чашках находится в указанных выше пределах, рассчитывают результаты из меньшего разведения.

Если в среднем на чашках выросло более 300 колоний бактерий или более 100 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая подходящее для посева.

Если в среднем на чашках выросло менее 30 колоний бактерий и менее 10 колоний грибов, делают расчет количественного содержания бактерий и грибов по имеющимся результатам.

Если на питательной среде отсутствует рост микроорганизмов, результаты отмечают следующим образом: при посеве лекарственного средства в разведении 1:10 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 10 бактерий (или грибов)», при посеве лекарственного средства в разведении 1:100 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 100 бактерий (или грибов)» и т.д.

Количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл рассчитывают по формуле

$$N = \frac{c}{n} 10^d,$$

где  $N$  – количество микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл;  $c$  – сумма колоний на всех чашках;  $n$  – число чашек;  $d$  – коэффициент разведения образца.

При подсчете количества микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл образца полученный результат выражают в виде числа в пределах от 1,0 до 9,9, умноженного на  $10^x$ .

Пример. При посеве из разведения  $10^{-2}$  на двух чашках выросло 168 и 215 колоний

$$N = \frac{168 + 215}{2} 10^2 = 19150.$$

Полученный результат округляют до двух значащих цифр – 19000 и записывают:  $1,9 \times 10^4$ .

### *Интерпретация результатов*

При необходимости подсчета общего количества микроорганизмов (бактерий и грибов суммарно) в 1 г или в 1 мл лекарственного средства следует сложить число аэробных бактерий с числом грибов.

## **2. Метод мембранной фильтрации**

Метод мембранной фильтрации используют для количественного определения микроорганизмов в лекарственных средствах, обладающих или не обладающих антимикробным действием. Метод применим только для растворов и водорастворимых лекарственных средств, а также для жиросодержащих препаратов, растворимых в изопропилмиристате.

Для посева используют мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы, что подтверждается валидацией. Установка для мембранной фильтрации должна быть такой конструкции, из которой можно извлечь фильтры и перенести их на питательные среды. Материал мембраны следует выбирать таким образом, чтобы компоненты исследуемого препарата не влияли на его эффективность. Фильтры из нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30 %), из ацетата целлюлозы – для спиртовых растворов (более 30 %), кислот, щелочей. Мембранную фильтрацию проводят в асептических условиях с помощью вакуума.

Образец, как правило, растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10. В воронку фильтровальной установки вносят сначала промывную жидкость (примерно 5 мл) для смачивания фильтра. Добавляют 10 мл препарата в разведении 1:10, что соответствует 1 г образца, и немедленно фильтруют. В случае наличия антимикробного действия лекарственного средства для отмывания мембраны используют жидкости № 1, 2 или 3. Через фильтр пропускают минимум три порции по 100 мл подходящей стерильной промывной жидкости. При необходимости к промывной жидкости могут быть

добавлены поверхностно-активные вещества (например, твин-80) или инактиваторы антимикробного действия. Через одну мембрану можно пропустить не более 1000 мл жидкости. Допускается использование для отмывания мембран менее трех порций промывной жидкости при условии валидации метода.

Смыв с трансдермальных пластырей пропускают через мембранные фильтры по 50 мл (соответствует одному пластырю) через каждую мембрану.

По окончании процесса фильтрации мембраны переносят на соответствующие питательные среды, разлитые в чашки Петри. Чашки с фильтрами переворачивают и инкубируют в термостате.

#### *Учет результатов*

Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительные результаты) и через 5 сут. (окончательные результаты). Отбирают чашки, где число колоний бактерий на фильтрах не превышает 100, а грибов – 50, и рассчитывают число микроорганизмов на 1,0 г, или на 1,0 мл образца, или на одном пластыре. Если на фильтре большее количество микроорганизмов, то делают ряд последовательных разведений образца и выбирают подходящее.

Для того чтобы определить, полностью ли отмыты мембраны от фильтруемого препарата, обладающего антимикробным действием, после фильтрации раствора в последнюю порцию промывной жидкости вносят по отдельности по 1 мл взвеси *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. albicans* ATCC 885-653, содержащей от 10 до 100 колониеобразующих единиц в 1 мл. Рост тест-штаммов на фильтрах подтверждает отсутствие антимикробного действия лекарственного средства. Напротив, отсутствие роста определенного микроорганизма свидетельствует о сохранении антимикробного действия лекарственного средства в отношении данного вида микроорганизмов. В этом случае используют специфические или неспецифические инактиваторы или увеличивают объем промывной жидкости.

#### *Жидкости для промывания фильтров:*

- Раствор натрия хлорида изотонического 0,9 % стерильного рН 7,0.

- Жидкость № 1: 1 г мясного пептона растворяют в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают во флаконы и стерилизуют. рН после стерилизации –  $7,0 \pm 0,2$ .

- Жидкость № 2 мл твина-80 добавляют к 1000 мл жидкости № 1, разливают во флаконы и стерилизуют. рН после стерилизации –

$6,9 \pm 0,2$ . Жидкость применяют, если в составе препарата имеется масло.

- Жидкость № 3: 5 г мясного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 растворяют в 1000 мл воды. Разливают во флаконы и стерилизуют. рН после стерилизации –  $6,9 \pm 0,2$ .

### 3. Метод наиболее вероятных чисел

Исследуемый образец готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, используя подходящий растворитель. Жидкую питательную среду разливают в 12 стерильных пробирок по 9 мл в каждую. Пробирки ставят в штатив в четыре ряда по три пробирки.

В первый ряд пробирок вносят по 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10, во второй ряд – по 1 мл в разведении 1:100, в третий ряд – по 1 мл в разведении 1:1000. В пробирки четвертого ряда вносят по 1 мл разбавителя, который используют для растворения, суспендирования или эмульгирования образца. Посевы инкубируют в течение не более 5 сут.

#### *Учет результатов*

Отмечают число пробирок в первом, втором и третьем рядах, в которых визуально наблюдают рост микроорганизмов. Среда в пробирках четвертого ряда (контроль разбавителя) должна оставаться стерильной. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному количеству жизнеспособных микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл лекарственного средства, приведенному в табл. 13.

*Таблица 13*

#### Наиболее вероятное число микроорганизмов

Количество проросших пробирок в каждом ряду			Наиболее вероятное число микроорганизмов в 1 г
Количество препарата в пробирке, мг			
100 мг	10 мг	1 мг	
1	2	3	4
3	3	3	> 1100
3	3	2	1100
3	3	1	460
3	3	0	240
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	93

1	2	3	4
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	75
3	1	0	43
3	0	3	95
3	0	2	64
3	0	1	39
3	0	0	23

Пример. В первом ряду рост микроорганизмов наблюдается в трех пробирках, во втором ряду – в двух пробирках, в третьем ряду – в одной пробирке. Полученное число «321», по табл. 13, соответствует цифре «150». Следовательно, наиболее вероятное число бактерий в 1 г или 1 мл исследуемого образца – 150. Если учет результатов не может быть определен точно в связи с природой исследуемого препарата (помутнение среды, изменение ее цвета и т.п.), делают пересев на соответствующую жидкую или агаризованную среду, чтобы убедиться в наличии роста микроорганизмов.

Варианты чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный и модифицированный глубинный) можно использовать при испытании различных лекарственных форм, независимо от уровня микробной загрязненности. Поверхностный агаровый метод предпочтительнее использовать при испытании нестерильных лекарственных средств с высоким уровнем микробной контаминации. Для количественного определения в ускоренные сроки бактерий и грибов, колонии которых склонны к сливному росту, используют модифицированный глубинный агаровый метод посева.

Метод мембранной фильтрации используют при испытании растворов водорастворимых лекарственных средств и жиросодержащих лекарственных средств, растворимых в изопропилмиристате.

Метод НВЧ используют при испытании лекарственных средств с низким уровнем микробной контаминации, а также в тех случаях, когда нельзя применить другие методы. Метод НВЧ менее чувствителен и точен по сравнению с чашечным агаровым методом или методом мембранной фильтрации. Метод используется только для определения общего числа бактерий, так как результаты, полученные для определения общего числа грибов, особенно плесневых, считаются недостоверными.

В случае необходимости при повышенном уровне контаминации испытание повторяют, используя удвоенное количество препарата.

## **Определение отдельных видов бактерий**

Испытание включает использование селективных и дифференциально-диагностических питательных сред, а также сред для предварительной инкубации посевов исследуемых образцов.

### **1. Выявление энтеробактерий и подобных им грамотрицательных микроорганизмов**

При выявлении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* могут быть выделены другие подобные им виды микроорганизмов, например бактерии рода *Aeromonas* и рода *Pseudomonas*.

#### *Выделение бактерий*

Для восстановления жизнеспособности микроорганизмов, поврежденных во время технологического процесса, используют предварительную инкубацию образца в жидкой питательной среде.

10 г или 10 мл исследуемого образца переносят в 100 мл лактозного бульона (среда № 11), перемешивают и инкубируют в течение, как правило, 2 ч, но не более 5 ч. После инкубации перемешивают содержимое флакона (гомогенат А) и переносят 10 мл (количество, соответствующее 1 г или 1 мл образца) в 100 мл среды обогащения (бульон Моссея, среда № 3). Посев инкубируют в течение 18–48 ч. При появлении роста делают пересев бактериологической петлей на плотную среду (агар Моссея, среда № 4), которую инкубируют при той же температуре в течение 18–24 ч.

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл лактозного бульона (среда № 11), осторожно встряхивают, избегая вспенивания среды, в течение не менее 15 мин. 50 мл смыва пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который переносят в 100 мл среды обогащения (бульон Моссея, среда № 3) и инкубируют в течение 18–24 ч. При наличии роста в жидкой среде пересевают петлей на плотную среду (агар Моссея, среда № 4), которую инкубируют при той же температуре в течение 18–24 ч для выделения энтеробактерии и других грамотрицательных микроорганизмов.

Появление на плотной среде колоний грамотрицательных палочек является свидетельством того, что исследуемый образец контаминирован вышеупомянутыми бактериями.

### Количественное определение

Для посева используют три пробирки с 9 мл бульона Мосселя или среды № 3 в каждой. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствует 0,1 г образца) вносят в первую пробирку, тщательно перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,01 г образца) во вторую пробирку, снова перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,001 г образца) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага (рис. 5). Посевы инкубируют в течение 24–48 ч.

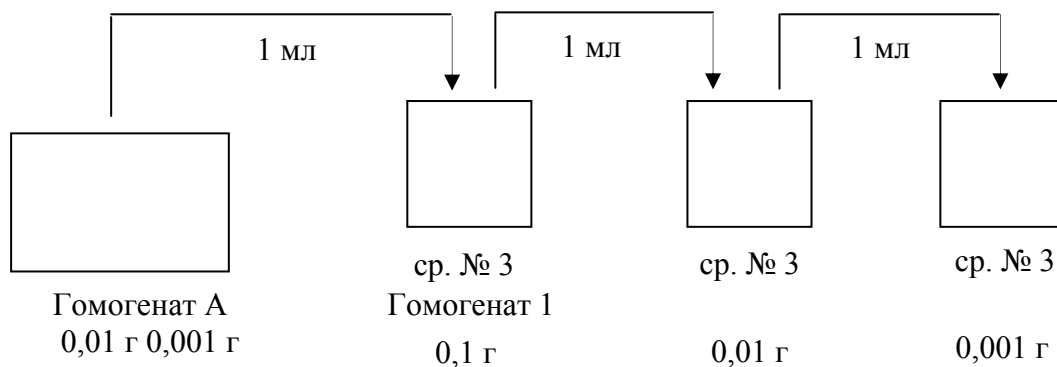


Рис. 5. Схема количественного определения энтеробактерий

В случае роста для подтверждения наличия энтеробактерий делают пересев петлей на плотную среду (агар Мосселя, среда № 4) и инкубируют чашки Петри в течение 18–24 ч. Появление на плотной среде колоний грамотрицательных палочек является положительным тестом, отсутствие роста этих колоний – отрицательным тестом. Наиболее вероятное количество энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов в 1 г или 1 мл образца определяют по табл. 14.

Таблица 14

#### Определение количества энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в образце

Соответствующее количество испытуемого образца			Наиболее вероятное количество бактерий в 1 г образца
0,1 г	0,01 г	0,001 г	
1 мл гомогената 1	1 мл гомогената 1 в разведении 1:10	1 мл гомогената 1 в разведении 1:100	
+	+	+	Более $10^3$
+	+	–	От $10^2$ до $10^3$
+	–	–	От 10 до $10^2$
–	–	–	Менее 10

Примечание: (+) – положительный тест, (–) – отрицательный тест.

## 2. Выявление *Escherichia coli*

Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон, среда № 8), перемешивают и инкубируют в течение 18–48 ч. 1 мл содержимого флакона переносят в 10 мл бульона Мак-Конки или среды № 3. Посевы инкубируют в течение 18–24 ч.

При наличии роста, в случае равномерного помутнения среды в пробирках, делают пересев петлей на плотные среды – агар Мак-Конки или среду № 4. Посевы инкубируют в течение 18–48 ч (агар Мак-Конки) или 18–24 ч (среда № 4). На агаре Мак-Конки *E. coli* образует красные неслизистые колонии, на среде № 4 – малиновые колонии с металлическим блеском, окруженные малиновыми зонами, неслизистые. Подозрительные на принадлежность к *E. coli* колонии на плотных средах микроскопируют. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отдельные колонии отсевают на скошенный в пробирках соево-казеиновый агар (среду № 1) и инкубируют в течение 18–24 ч.

Для подтверждения используют биохимические тесты. Из пробирок с чистой культурой делают пересевы на агар Симмонса (среда № 14) и соево-казеиновый бульон (среда № 15), а также проводят тест на наличие фермента цитохромоксидазы. Через 18–24 ч инкубации отмечают бактериальный рост или его отсутствие на агаре Симмонса. Утилизацию цитрата устанавливают по смещению рН-среды в щелочную сторону (изменению цвета среды из зеленого в синий). Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона при добавлении реактива Ковача.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что лекарственное средство контаминировано *E. coli*.

### *Количественное определение E. coli*

Количественное определение *E. coli* проводят таким же образом, как количественное определение других энтеробактерий, делая пересев из гомогената А в пробирки с бульоном Мак-Конки или средой № 3. В случае равномерного помутнения среды в пробирках для подтверждения наличия *E. coli* из каждой пробирки делают пересев петлей на плотную среду (агар Мак-Конки, среда № 4). Посе-



вы инкубируют в течение 18–48 ч (агар Мак-Конки) или 18–24 ч (среда № 4).

Появление на средах характерных для *E. coli* колоний граммотрицательных палочек является положительным тестом, отсутствие роста этих колоний – отрицательным тестом. Наиболее вероятное количество клеток *E. coli* в 1 г или в 1 мл образца определяют по табл. 17.

### 3. Выявление бактерий рода *Salmonella*

10 г или 10 мл исследуемого образца переносят в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8, перемешивают и инкубируют в течение 18–24 ч. При наличии роста 1 мл после перемешивания переносят в 10 мл тетрагидратного бульона или среды № 12 и инкубируют в течение 16–24 ч. Делают пересев петлей минимум на двух из четырех плотных диагностических сред (дезоксихолат-цитрат агар; ксилоза-лизин-дезоксихолат агар; агар с бриллиантовым зеленым, феноловым красным, с лактозой и сахарозой; Висмут-сульфит агар – среда № 5) и инкубируют в течение 24–48 ч. На дезоксихолат-цитрат агаре бактерии из рода *Salmonella* образуют хорошо развитые бесцветные колонии. На ксилоза-лизин-дезоксихолат агаре – хорошо развитые красные колонии с черными центрами или без них. На агаре с бриллиантовым зеленым, феноловым красным, с лактозой и сахарозой – мелкие, блестящие, бесцветные, розовые или опалово-белые колонии, часто окруженные розовой или красной зоной. На висмут-сульфит агаре (среда № 5) бактерии из рода *Salmonella* образуют, как правило, черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивается в черный цвет.

Колонии, подозрительные на принадлежность к роду *Salmonella*, микроскопируют. При обнаружении в мазках граммотрицательных палочек 2–3 характерные колонии (каждую отдельно) пересевают на трехсахарный агар с солями железа (среда № 13), нанося большое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки. Через 24 ч инкубации отмечают изменение цвета из красного в желтый в столбике питательной среды. Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода – типичном признаке видов рода *Salmonella*. Параллельно ставят тест на наличие фермента «цитохромоксидаза», используя чистую культуру со скошенного соево-казеинового агара или среды № 1. Если требуется дополнительное подтверждение,

можно использовать подходящие биохимические и серологические тесты.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом «цитохромоксидаза», не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

#### **4. Выявление *Pseudomonas aeruginosa***

Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон, среда № 8), перемешивают и инкубируют в течение 24–48 ч. При наличии роста пересевают петлей на селективную питательную среду для выделения синегнойной палочки (цетримидный агар, цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) агар – среда № 16). Выросшие колонии грамотрицательных палочек пересевают на среду № 9 для выявления сине-зеленого пигмента пиоцианин. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч.

Для подтверждения видовой принадлежности используют биохимический тест на наличие фермента «цитохромоксидаза» и способность выделенной культуры расти на соево-казеиновом бульоне или среде № 8 при температуре  $42 \pm 1$  °С в течение 18–24 ч.

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора, осторожно встряхивают в течение не менее 15 мин. 50 мл смыва пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который переносят в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8 и инкубируют в течение 24–48 ч. После инкубации, при наличии роста, пересевают петлей на селективные среды – цетримидный или ЦПХ-агары. Дальнейшую идентификацию проводят, как указано выше.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, образующие сине-зеленый пигмент пиоцианин, обладающие цитохромоксидазой и растущие при температуре  $42 \pm 1$  °С, считают, что лекарственное средство контаминировано *P. aeruginosa*.

#### **5. Выявление *Staphylococcus aureus***

Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеиновый бульон

или среда № 8), перемешивают и инкубируют в течение 24–48 ч. При наличии роста пересевают петлей на селективные питательные среды: агар Фогеля – Джонсона, Берда – Паркера или среду № 10 и инкубируют в течение 24–48 ч. Черные блестящие колонии грамположительных кокков, окруженные желтыми зонами, на среде Фогеля – Джонсона, черные колонии на среде Берда – Паркера или золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, на среде № 10 свидетельствуют о наличии *S. aureus*.

Для идентификации используют реакцию плазмокоагуляции с чистой культурой стафилококка, отсеянной на соево-казеиновый агар или среду № 1.

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей, 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора, осторожно встряхивают в течение не менее 15 мин. 50 мл смыва пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который переносят в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8 и инкубируют в течение 24–48 ч. После инкубации при наличии роста пересевают петлей на агар Фогеля – Джонсона, Берда – Паркера или среду № 10 для выделения *S. aureus*.

Если в образце обнаружены грамположительные кокки, ферментирующие маннит (среда Фогеля – Джонсона, среда № 10), обладающие ферментом коагулаза, считают, что лекарственное средство контаминировано *S. aureus*.

## **Биохимические тесты для идентификации микроорганизмов**

### **1. Тест на наличие цитохромоксидазы**

Реактив: 1 % раствор N, N-диметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида. Раствор хранят при температуре от 4 до 10 °С во флаконах нейтрального светозащитного стекла. Раствор должен быть бесцветным.

Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом. Платиновой петлей или стеклянной палочкой наносят 24-часовую чистую культуру исследуемых бактерий, выросших на соево-казеиновом агаре или среде № 1. Темно-красное окрашивание, появляющееся в течение 1 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Положительным контролем служит культура *P. aeruginosa*, отрицательным – культура *E. coli*.

## 2. Тест на наличие индола

Реактив Ковача:

- Спирта амилового или изоамилового – 75 мл;
- Пара-диметиламинобензальдегида – 5 г;
- Хлористоводородной кислоты конц. – 20 мл.

Навеску альдегида растворяют в спирте при легком нагревании (на водяной бане при 50–55 °С), остужают и медленно добавляют кислоту. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 4 до 10 °С. Реактив должен быть желтого цвета. При неправильном хранении цвет реактива становится коричневым, и реактив непригоден для использования.

В пробирку с соево-казеиновым бульоном или со средой № 15, в которой выросла исследуемая культура, вносят 0,5 мл реактива Ковача и слегка встряхивают. Через несколько минут при наличии индола наблюдают появление красного кольца на поверхности среды в пробирке. Положительным контролем является культура *E. coli*, отрицательным – культура *S. abony*.

## 3. Тест на наличие коагулазы (реакция плазмокоагуляции)

Сухую цитратную кроличью плазму разводят согласно приложенной инструкции 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида изотоническим и разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. В пробирку помещают одну петлю суточной культуры выделенных кокков, выращенных на соево-казеиновом агаре или на среде № 1. Положительным контролем служит культура *S. aureus*, отрицательным – культура *S. epidermidis*. Необходимо поставить также контроль неконтаминированной плазмы. Пробирки инкубируют при температуре  $32,5 \pm 2,5$  °С. Реакцию плазмокоагуляции отмечают через каждый час в течение 4–6 ч, слегка наклоняя пробирку, но не встряхивая ее.

При отсутствии положительной реакции плазмокоагуляции удлиняют время инкубации до 24 ч для получения окончательных результатов.

Тест на наличие коагулазы считается положительным при коагуляции плазмы.

Описанные методы определения микробиологической чистоты распространяются на нестерильные лекарственные средства (субстанции и препараты), вспомогательные вещества и полупродукты, а также используются при определении эффективности антимикробных консервантов и мониторинге производственных помещений фармацевтических предприятий и лабораторий контрольных служб.

### **9.2.3. Состав питательных сред, используемых для испытания лекарственных средств на стерильность и микробиологическую чистоту**

Готовить питательные среды следует, строго придерживаясь приведенной рецептуры, а сухие питательные среды – согласно инструкции по применению предприятия-изготовителя. Необходимый рН питательных сред устанавливают при температуре  $25 \pm 2$  °С. Среда стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121 °С, если нет других указаний, при условии валидации процесса стерилизации.

Питательные среды должны обеспечивать рост и развитие микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств.

#### ***Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном рН 7,0:***

- Калия фосфата однозамещенного 3,6 г.
- Натрия фосфата двузамещенного 7,2 г.
- Натрия хлорида 4,3 г.
- Пептона (мясного или казеинового) 1,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.

#### ***Полужидкий агар для хранения тест-микроорганизмов:***

- Панкреатического гидролизата казеина 8,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Агара 5,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,0 \pm 0,2$ .

#### ***Соево-казеиновый агар (Casein Soya Bean Digest Agar):***

- Панкреатического гидролизата казеина 15,0 г.
- Папаинового гидролизата бобов сои 5,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Агара 15,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для выращивания аэробных бактерий – среда № 1 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Агар Сабуро с глюкозой и антибиотиками (Sabouraud Glucose Agar with antibiotics):***

- Пептона (мясного и казеинового) 10,0 г.
- Глюкозы моногидрата 40,0 г.
- Агара 15,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $5,6 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для выращивания дрожжевых и плесневых грибов – среда № 2 (агар Сабуро с глюкозой и антибиотиками) для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Перед употреблением добавляют 0,1 г натриевой соли бензилпенициллина и 0,1 г тетрациклина на 1 л среды в виде стерильных растворов или добавляют альтернативно 50 мг хлорамфеникола (левомицетина) на 1 л среды перед стерилизацией.

***Бульон Мосселя для обогащения энтеробактерий (Enterobacteria Enrichment Broth – Mossel):***

- Панкреатического гидролизата желатина 10,0 г.
- Глюкозы моногидрата 5,0 г.
- Бычьей желчи сухой 20,0 г.
- Калия фосфата однозамещенного 2,0 г.
- Натрия фосфата двузамещенного 8,0 г.
- Бриллиантового зеленого 0,015 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН  $7,2 \pm 0,2$ .

Среду нагревают при 100 °С в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением.

Отечественная среда обогащения для энтеробактерий – среда № 3 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Агар Мосселя (Crystal violet, Neutral Red, Bile Agai):***

- Дрожжевого экстракта 3,0 г.
- Панкреатического гидролизата казеина 7,0 г.
- Солей желчи 1,5 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Глюкозы моногидрата 10,0 г.
- Агара 15,0 г.
- Нейтрального красного 0,03 г.
- Кристаллического фиолетового 0,002 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

Нагревают до кипения. Нельзя нагревать в автоклаве.

Отечественная среда для выделения энтеробактерий – среда № 4 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Бульон Мак-Конки (MacConkey Broth):***

- Панкреатического гидролизата желатина 20,0 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Бычьей желчи сухой 5,0 г.
- Бромкрезолового пурпурного 10,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- pH после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$ .

Отечественная среда обогащения для энтеробактерий – среда № 3 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Агар Мак-Конки (MacConkey Agar):***

- Панкреатического гидролизата желатина 17,0 г.
- Пептона (мясного и казеинового) 3,0 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Солей желчи 1,5 г.
- Агара 13,5 г.
- Нейтрального красного 0,03 г.
- Кристаллического фиолетового 0,001 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- pH после стерилизации  $7,1 \pm 0,2$ .

Перед стерилизацией кипятят 1 мин, постоянно встряхивая.

Отечественная среда для выделения энтеробактерий – среда № 4 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Дезоксихолат цитрат агар (Deoxycholate Citrate Agar):***

- Мясного экстракта 10,0 г.
- Мясного пептона 10,0 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Натрия цитрата 20,0 г.
- Железа цитрата 1,0 г.
- Натрия дезоксихолата 5,0 г.
- Агара 13,5 г.
- Нейтрального красного 0,02 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН  $7,3 \pm 0,2$ .

Доводят до кипения на медленном огне и кипятят в течение 1 мин, охлаждают до 50 °С и разливают в чашки Петри. Нельзя нагревать в автоклаве.

***Ксилоза, лизин, дезоксихолат агар (Xylose, Lisine, Deoxycholate Agar):***

- Ксилозы 3,5 г.
- L-лизина 5,0 г.
- Лактозы моногидрата 7,5 г.
- Сахарозы 7,5 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Дрожжевого экстракта 3,0 г.
- Фенолового красного 0,08 г.
- Агара 13,5 г.
- Натрия дезоксихолата 2,5 г.
- Натрия тиосульфата 6,8 г.
- Железа аммоний цитрата 0,8 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН  $7,4 \pm 0,2$ .

Доводят до кипения, охлаждают до 50 °С и разливают в чашки Петри. Нельзя нагревать в автоклаве.



***Агар с бриллиантовым зеленым, феноловым красным, лактозой и сахарозой (Brilliant Green Agar Medium):***

- Пептона (мясного и казеинового) 10,0 г.
- Дрожжевого экстракта 3,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Сахарозы 10,0 г.
- Агара 20,0 г.
- Фенолового красного 0,08 г.
- Бриллиантового зеленого 0,0125 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $6,9 \pm 0,2$ .

Кипятят 1 мин. Используют сразу после автоклавирования.

***Висмут-сульфит агар (Bismuth Sulfite agar):***

- Мясного экстракта 5,0 г.
- Мясного пептона 10,0 г.
- Глюкозы моногидрата 5,0 г.
- Натрия фосфата двузамещенного 4,0 г.
- Железа сульфата 0,3 г.
- Бриллиантового зеленого 0,025 г.
- Висмута сульфита 8,0 г.
- Агара 15,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН  $7,6 \pm 0,2$ .

Среду не автоклавируют. Приготовленная среда мутная, зеленого цвета.

Отечественная среда для выделения сальмонелл – среда № 5 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Бульон с глюкозой (Dextrose Broth):***

- Мясного пептона 10,0 г.
- Мясного экстракта 3,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Глюкозы моногидрата 10,0 г.
- Бромкрезола пурпурного 0,02 г.

- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для идентификации энтеробактерий – среда № 6 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Нитратный бульон (Nitrate Broth):***

- Мясного пептона 8,6 г.
- Натрия хлорида 6,4 г.
- Калия нитрата 1,5 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для идентификации энтеробактерий – среда № 7 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Соево-казеиновый бульон (Casein Soya Bean Digest Broth):***

- Панкреатического гидролизата казеина 17,0 г.
- Папайнового гидролизата бобов сои 3,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Калия фосфата двузамещенного 2,5 г.
- Глюкозы моногидрата 2,5 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для выращивания бактерий – среда № 8 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Цетримидный агар (Cetrimide Agar):***

- Панкреатического гидролизата желатина 20,0 г.
- Магния хлорида 1,4 г.
- Калия сульфата двузамещенного 10,0 г.
- Цетримида (цетилпиридиния бромид) 0,3 г.
- Агара 13,6 г.
- Глицерина 10,0 мл.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для выделения синегнойной палочки – ЦПХ-агар для выделения синегнойной палочки, сухая.

***ЦПХ-агар:***

- Пептона сухого ферментативного 20,0 г.
- Калия сернокислого 7,6 г.
- Магния сернокислого семиводного 2,4 г.
- Сода кальцинированной 1,0 г.
- Фенозан-кислоты 0,2 г.
- ЦПХ (N-цетилпиридиния хлористого 1-водного) 0,3 г.
- Агара 8 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН  $7,2 \pm 0,2$ .

Среду не стерилизуют.

***Агар для выявления пуроцианина Pseudomonas (Pseudomonas Agar Medium for Detection of Pyocyanin):***

- Панкреатического гидролизата желатина 20,0 г.
- Магния хлорида безводного 1,4 г.
- Калия сульфата безводного 10,0 г.
- Агара 15,0 г.
- Глицерина 10,0 мл.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

Все компоненты, кроме глицерина, растворяют в воде. Нагревают при перемешивании и кипятят 1 мин. Добавляют глицерин и стерилизуют.

Отечественная среда для идентификации синегнойной палочки – среда № 9 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Агар Берда – Паркера (Baird – Parker Agar):***

- Панкреатического гидролизата казеина 10,0 г.
- Мясного экстракта 5,0 г.
- Дрожжевого экстракта 1,0 г.
- Лития хлорида 5,0 г.
- Агара 20,0 г.

- Глицина 12,0 г.
- Натрия пирувата 10,0 г.
- Воды очищенной 950 мл.
- рН после стерилизации  $6,8 \pm 0,2$ .

После стерилизации охлаждают до 45–50 °С и добавляют 10 мл стерильного 1 % раствора калия теллурита и 50 мл коммерческой желточной эмульсии.

***Агар Фогеля –Джонсона (Vogel – Johnson Agar Medium):***

- Панкреатического гидролизата казеина 10,0 г.
- Дрожжевого экстракта 5,0 г.
- Маннита 10,0 г.
- Калия фосфата двузамещенного 5,0 г.
- Лития хлорида 5,0 г.
- Глицина 10,0 г.
- Агара 16,0 г.
- Фенолового красного 0,025 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

После стерилизации охлаждают до 45–50 °С и добавляют 20 мл 1 % стерильного раствора калия теллурита.

Отечественная среда для выделения золотистого стафилококка – среда № 10 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Лактозный бульон (Lactose Monohydrate Broth):***

- Мясного экстракта 3,0 г.
- Панкреатического гидролизата желатина 5,0 г.
- Лактозы моногидрата 5,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $6,9 \pm 0,2$ .

После стерилизации следует быстро охладить среду.

Отечественная среда для предварительного обогащения энтеробактерий – среда № 11 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Тетратионатный желчный бульон с бриллиантовым зеленым (Tetra-thionate Bile Brilliant Green Broth):***

- Пептона 8,6 г.
- Бычьей желчи сухой 8,0 г.
- Натрия хлорида 6,4 г.
- Кальция карбоната 20,0 г.
- Калия тетратионата 20,0 г.
- Бриллиантового зеленого 0,07 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН 7,0 ± 0,2.

Нагревают до кипения. Нельзя перегревать. Перед употреблением к 1000 мл среды добавляют 20 мл раствора йода с калия йодидом (6 г йода металлического, 5 г калия йодида, 20 мл воды очищенной).

Отечественная среда для выделения сальмонелл – среда № 12 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

***Трехсахарный агар с солями железа (Triple Sugar Iron Agar):***

- Мясного экстракта 3,0 г.
- Дрожжевого экстракта 3,0 г.
- Пептона (казеинового и мясного) 20,0 г.
- Натрия хлорида 5,0 г.
- Лактозы моногидрата 10,0 г.
- Сахарозы 10,0 г.
- Глюкозы моногидрата 1,0 г.
- Железо-аммоний цитрата 0,3 г.
- Натрия тиосульфата 0,3 г.
- Фенолового красного 0,025 г.
- Агара 12,0 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации 7,4 ± 0,2.

Среду разливают в пробирки, наполняя их на 1/3 объема. После стерилизации среду скашивают таким образом, чтобы образовались столбик и косяк.

Отечественная среда для идентификации сальмонелл – среда № 13 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

### ***Цитратный агар Симмонса:***

- Натрия хлорида 5,0 г.
- Магния сульфата 0,2 г.
- Аммония дигидрофосфата 1,0 г.
- Калия гидрофосфата 1,0 г.
- Натрия цитрата 3,0 г.
- Бромтимолового синего 0,08 г.
- Агара 20 г.
- Воды очищенной 1000 мл.
- рН после стерилизации  $7,2 \pm 0,2$ .

Отечественная среда для идентификации *E. coli* – среда № 14 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

### **9.2.4. Испытание на пирогенность**

Методы обнаружения пирогенов можно разделить на химические, физические, биологические. Химические методы основаны на проведении определенных цветных реакций. Физические методы основаны на измерении электропроводности и полярографических максимумов. Из-за ряда недостатков первых двух методов чаще всего применяют биологический метод, который является официально принятым и указан в Государственной фармакопее XII РФ.

Испытание на пирогенность инъекционных растворов и субстанций, из которых они изготавливаются, основано на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции.

Каждого кролика содержат в отдельной клетке на полноценном пищевом рационе, ограждая от раздражающих воздействий (акустических, оптических и других). Перед испытанием проводят осмотр животных и отбирают здоровых кроликов одного пола, не альбиносов, с массой тела от 2,0 до 3,5 кг, которые не теряли в массе в течение предыдущей недели. В помещениях, где находятся животные и проводятся испытания, поддерживают постоянную температуру воздуха  $20 \pm 3$  °С. За 18 ч до испытания кроликов лишают корма без ограничения воды. Во время опыта животные не получают ни корма, ни воды. Кроликов, впервые предназначенных для опыта или не

участвовавших в опыте более четырех недель, предварительно готовят к процедуре испытания, осуществляя все рабочие операции (осмотр, взвешивание, измерение температуры тела) за исключением инъекции. Кролики, ранее бывшие в опыте, могут быть использованы повторно через трое суток, если введенное им лекарственное средство было апиrogenным. При повышении температуры тела на 0,6 °С и более кролик может быть использован для дальнейших опытов не ранее, чем через две недели.

Если испытуемое лекарственное средство обладает антигенными свойствами, то порядок повторного использования животных для испытаний указывают в частной фармакопейной статье.

Посуда для разведения, шприцы и иглы для инъекций должны быть стерильными и апиrogenными, что обеспечивается нагреванием при температуре 250 °С в течение 30 мин или 200 °С в течение 60 мин. Для разведения испытуемых лекарственных средств используют раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций, если в частной фармакопейной статье не указан другой растворитель. Все растворители должны быть стерильными и апиrogenными. Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до 0,1 °С медицинским максимальным ртутным или электронным термометром с термочувствительным датчиком. Термометр или датчик вводят в прямую кишку кролика на глубину от 5 до 7,5 см в зависимости от массы тела животного.

Испытуемое лекарственное средство вводят в ушную вену кролика, если в частной фармакопейной статье не указан другой путь введения. Объем инъецируемого раствора должен составлять не менее 0,2 мл и не более 10 мл на 1,0 кг массы тела животного. Перед введением раствор подогревают до  $37,0 \pm 2$  °С. Весь объем лекарственного средства вводят за период времени не более 2 мин. Тест-дозу испытуемого лекарственного средства, объем вводимого раствора и, если необходимо, скорость введения указывают в частной фармакопейной статье.

Испытание лекарственного средства проводят на группе из трех кроликов с исходной температурой 38,5–39,5 °С. Перед опытом, с интервалом не менее 30 мин, у каждого кролика дважды измеряют температуру тела. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. В противном случае кролика исключают из испытания. За исходную темпера-

туру принимают величину последнего результата измерения. Раствор испытуемого лекарственного средства вводят животным сразу после второго измерения температуры. Измерения температуры после внутривенного введения испытуемого лекарственного средства проводят с интервалом не более 30 мин на протяжении трех часов. При других путях парентерального введения – на протяжении пяти часов.

Испытание лекарственного средства можно проводить поэтапно. На каждом этапе используют трех кроликов. Максимальное число этапов не должно превышать четырех. По окончании каждого из этапов испытания определяют максимальное изменение температуры (дельта  $t$ ) тела у кролика по сравнению с исходным значением. Изменение температуры тела животного ниже исходной величины принимают за нуль и не учитывают. Для трех кроликов определяют сумму индивидуальных максимальных повышений температур (SUM дельта  $t$ ). Значения SUM дельта  $t$ , полученные на разных этапах испытания, последовательно суммируют, а результаты сравнивают с уровнями, указанными в табл. 16.

Таблица 16

**Оценка результатов испытания**

Этап	Общее количество животных	SUM дельта $t$				ЛС признают пирогенным, если SUM дельта $t$
		Лекарственное средство признают апиrogenным		Повторное испытание (перестановку) проводят		
		если SUM дельта $t$	при числе животных с повышением дельта $t > 0,5$ °C не более	если SUM дельта $t$	при числе животных с повышением дельта $t > 0,5$ °C	
1	2	3	4	5	6	7
I	3	$\leq 1,2$	–	$> 1,2$	$\geq 1$	–
II	6	$\leq 2,8$	1	$> 2,8$ , но $< 4,3$	$> 1$	$> 4,3$
III	9	$\leq 4,5$	2	$> 4,5$ , но $< 6,0$	$> 2$	$> 6,0$
IV	12	$\leq 6,6$	3	–	–	6,6*



\* При индивидуальном повышении температуры свыше 0,5 °С более чем у трех кроликов из двенадцати, лекарственное средство признают пирогенным.

### **9.2.5. Исследование на содержание бактериальных эндотоксинов**

В связи с введением показателя «Бактериальные эндотоксины» в Государственной фармакопее XII описан метод определения бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, предназначенных для парентерального применения, и субстанциях, используемых для их изготовления.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) или *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив). В результате реакции с эндотоксином происходит помутнение реакционной смеси и увеличение ее вязкости вплоть до формирования плотного геля, образование которого служит индикатором наличия в пробе бактериальных эндотоксинов. Проводимый таким образом анализ называется гель-тромб тест. Этот метод может быть использован для определения соответствия содержания бактериальных эндотоксинов предельному содержанию бактериальных эндотоксинов, указанному в частной фармакопейной статье, и для определения содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве.

Допускается использование других методов и/или модификаций ЛАЛ-теста, если они указаны в частной фармакопейной статье и валидированы для данного лекарственного средства. Лекарственное средство считают выдержавшим испытания, если определенное в эксперименте среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов менее значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в частной фармакопейной статье.

Этот метод имеет ряд преимуществ перед биологическим: он чувствительнее в 5–10 раз, результат получается быстрее, возможно количественное определение пирогена. Кроме того, с его помощью возможен контроль препаратов, которые нельзя испытать на кроликах. Одним из недостатков этого метода является его специфичность в отношении эндотоксина грамотрицательных бактерий, т.е. опасность не уловить наличие в лекарственных средствах пирогенов другого происхождения.

### **9.3. Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, лабораторной посуды, рук и спецодежды персонала**

Бактериальное загрязнение определяют путем изучения микрофлоры смывов, сделанных с рук и поверхностей исследуемых объектов.

В аптеках исследованию подлежит **лабораторная посуда**: флаконы для приготовления и розлива растворов, резиновые пробки, фильтровальные воронки, колбы, цилиндры.

**Отбор проб.** Флаконы для приготовления и розлива инъекционных растворов, глазных капель, нестерильных жидких лекарственных препаратов отбирают в количестве 3 шт. одного объема, укупоривают стерильными пробками и доставляют в лабораторию. В лаборатории три одноименных флакона последовательно ополаскивают 10 мл стерильной дистиллированной воды.

Резиновые пробки по 5 шт. одинакового размера помещают в широкогорлые стерильные колбы или банки, закрытые ватно-марлевыми стерильными пробками и бумажными колпаками. В банку с доставленными в лабораторию пробками наливают 10 мл стерильной воды и тщательно споласкивают.

Фильтровальные воронки, мерные колбы, цилиндры в количестве не менее трех единиц одного наименования ополаскивают 10 мл стерильной дистиллированной воды. Смывы помещают в стерильный флакон лаборатории и доставляют в лабораторию для исследования.

Пипетки (не менее 3 шт. одного объема) последовательно прополаскивают не менее 5 раз каждую в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки со смывной жидкостью закрывают стерильными ватномарлевыми пробками и доставляют в лабораторию.

В аптеках подлежит исследованию методом смывов следующее **оборудование**:

- а) рабочие столы;
- б) тара для хранения пробок;
- в) водопроводный кран;
- г) дистиллятор и другое оборудование.

**Отбор проб.** Взятие смывов производят стерильным ватным тампоном или марлевыми салфетками, размером 5×5 см, простерилизованными в бумажных пакетах или в чашках Петри. Для увлажнения тампонов и салфеток в стерильные пробирки наливают по

2 мл стерильного физиологического раствора. Салфетку захватывают стерильным пинцетом, увлажняют физиологическим раствором из пробирки, после протирания исследуемого объекта помещают в ту же пробирку.

При контроле мелких предметов смывы забирают с поверхности всего предмета. При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят в нескольких местах исследуемого предмета площадью примерно в  $100 \text{ см}^2$ . Для ограничения поверхности берется шаблон (трафарет), сделанный из проволоки. Трафарет должен иметь площадь  $25 \text{ см}^2$ , и, чтобы взять смывы с площади  $100 \text{ см}^2$ , его накладывают 4 раза в разных местах исследуемого предмета. Трафареты, завернутые в бумагу, стерилизуются в лаборатории. Допускается стерилизация трафарета на месте отбора проб путем обжигания его спиртом или на горелке. Ограниченная трафаретом поверхность протирается тампоном во взаимно-перпендикулярных направлениях.

Для взятия смыва *с рук аптечных работников* тампоном протирают ладонные поверхности, пальцы, межпальцевые пространства, ногтевые ложа и подногтевые поверхности, проводя тампоном не менее 5 раз по каждому участку обеих рук.

Микробиологическое исследование *мягкого инвентаря* проводят путем смывов. При взятии смывов с халатов протирается четыре поверхности по  $25 \text{ см}^2$ : нижняя поверхность каждого рукава и две площади с верхней части халата. При взятии смывов с полотенца протирается четыре площади по  $25 \text{ см}^2$  в разных его участках.

Смывы с аптечного оборудования, мягкого инвентаря, рук аптечных работников готовят путем добавления 8 мл физраствора в пробирку с ватным тампоном и 2 мл стерильного физраствора, используемого для увлажнения тампона, и перемешивают путем перекатывания пробирки между ладонями в течение 3 мин.

В смывах определяют:

- 1) общую бактериальную обсемененность (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий);
- 2) наличие БГКП.

*Для определения общего микробного числа* определяют количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в 10 мл смывной жидкости. Для этого по 1 мл смыва засевают в две стерильные чашки Петри глубинным методом. Чашки Петри инкубируют при температуре  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  18–24 ч и 24 ч при комнатной температуре. По истечении времени инкубирования посевов подсчи-

тывают число выросших колоний как на поверхности, так и внутри агара, используя лупу. Число колоний, установленное в 1 мл смывной жидкости, умножают на 10, что соответствует количеству микроорганизмов на всей смывной поверхности одноименных предметов.

**Для определения наличия БГКП** оставшуюся смывную жидкость засевают в 1 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды. Через сутки инкубирования при 37 °С делают пересев на среду Эндо в чашки Петри. Через сутки инкубирования в термостате посеvy просматривают. Отсутствие роста бактерий указывает на отрицательный результат.

При наличии на среде Эндо типичных для бактерий группы кишечной палочки колоний из них делают мазки и окрашивают по Граму. И, если в мазках обнаруживаются грамтрицательные палочки, то подозрительные колонии засевают в пробирки с глюкозо-пептонной средой и инкубируют при температуре 43 °С 18–24 ч. Газообразование в среде с глюкозой и типичные грамтрицательные палочки дают основание для окончательного положительного ответа о наличии *E. coli* в смывной жидкости.

***Требования к микробиологической чистоте:***

1) количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий не должно превышать 150 микроорганизмов в 10 мл смывной жидкости;

2) бактерии группы кишечной палочки в аптечной посуде, смывах с оборудования и рук не допускаются.

## Список литературы

1. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2001. – 736 с.
2. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошей, В. П. Ширококов. – М. : Академия, 2003. – 464 с.
3. Государственная фармакопея РФ. – XII издание – М., 2008. – 1 ч. – 696 с.
4. Государственная фармакопея СССР. – XI издание. – М. : Медицина, 1990. – Вып. 2. – 385 с.
5. Гунар, О. В. Микрофлора лекарственных средств и различные аспекты ее излучения (обзор) / О. В. Гунар // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 2. – С. 31–39.
6. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учеб. для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб. : СпецЛит, 2002. – 591 с.
7. Муштоватова, Л. С. Микробиология растений, лекарственного сырья и готовых лекарств : учеб.-метод. пособие / Л. С. Муштоватова, О. П. Бочкарева ; под ред. Е. П. Красноженова. – Томск, 2006. – 41 с.
8. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология / О. К. Поздеев ; под ред. В. И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с.
9. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. В. В. Теца. – М. : Медицина, 2002. – 352 с.

## Нормативные документы

1. ГОСТ 17.1.5.02–80. Охрана природы. Гидросфера. Гигиенические требования к зонам рекреации водных объектов.
2. ГОСТ 18963–73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа.
3. ГОСТ Р 53415–2009. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа.
4. МУ 2.1.5.800–99. Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод.
5. МУК 4.2.1018–01. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды.

6. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 309 от 21.10.97 «Об утверждении Инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)».

7. СанПиН 2.1.2.1188–03. Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества.

8. СанПиН 2.1.4.1074–01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества.

9. СанПиН 2.1.4.1175–02. Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников.

10. СанПиН 2.1.5.980–00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод.

11. СанПиН 2.1.5.980–00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод.

*Учебное издание*

**Правосудова Наталья Александровна,  
Мельников Виктор Львович,  
Мельников Лев Викторович**

**ОСНОВЫ САНИТАРНОЙ  
И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Редактор *А. Г. Темникова*  
Компьютерная верстка *Р. Б. Бердниковой*

Подписано в печать 18.11.2014. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Усл. печ. л. 6,86. Тираж 58.  
Заказ № 1146.

---

Издательство ПГУ.  
440026, Пенза, Красная, 40.  
Тел./факс: (8412) 56-47-33; e-mail: [iic@pnzgu.ru](mailto:iic@pnzgu.ru)