Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПОЧВЫ

Методические рекомендации

Издание официальное

Москва, 2005

gost.e-ecolog.ru

Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации-М: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004 г.

1. Разработаны сотрудниками: Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана (Трухиной Г.М., Мойсеенко Н. Н.), Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России (Брагина И.В., Кривопалова Н.С., Белобородова О.К., Гончарук О.Д.), центра ГСЭН в Краснодарском крае (Калашников И.А, Щербина Л.И.).

2. Утверждены и введены в действие Заместителем главного государственного санитарного врача Российской Федерации – Главным врачом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России Е.Н.Беляевым 24.12.2004г.

3. Введены впервые.

Содержание

1. Область применения..... 4
2. Нормативная ссылка..... 4
3. Санитарно-бактериологические показатели почвы и их нормирование .. 4
4. Отбор проб для бактериологического анализа 6
5. Оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды. 8
6. Подготовка и обработка почвы для анализа 9
7. Определение общих колиформных бактерий (БГКП)..... 10
8. Определение энтерококков..... 14
9. Определение CL.perfingens в почве 16
10. Показатели биологической активности почвы..... 17
11. Определение патогенных энтеробактерий родов сальмонелла и шигелла 21

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель главного государственного санитарного врача Российской Федерации

_____Е.Н.Беляев
«24» декабря 2004 г.
№ ФЦ/ 4022
Дата введения: с момента утверждения

1. Область применения

Настоящий документ является методической базой для осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора за санитарным состоянием почв населенных мест, сельскохозяйственных угодий, территорий курортных зон и отдельных учреждений. Документ предназначен для лабораторий учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, а так же лабораторий других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения указанных испытаний.

2. Нормативная ссылка

1.1. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы.
Санитарно-эпидемиологические правила и нормы
СанПиН 2.1.7.1287-03
1.2. ГОСТ 17.4.3.01-83. Общие требования к отбору проб почвы
1.3. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа
1.4. МУ 2. 1 .7.730-99 Гигиеническая оценка качества почвы населённых мест
1.5. МУ по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей №143-9/316-17
1.6. МУК 4.2.1018-01 Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды

3. Санитарно-бактериологические показатели почвы и их нормирование

Санитарное состояние почвы - совокупность физико-химических, биологических свойств почвы, определяющих качество и степень её безопасности в

эпидемическом и гигиеническом отношении.

Состав микрофлоры почвы меняется в зависимости от ее глубины. В поверхностном слое почвы (0-10 см) количество микроорганизмов незначительно; это связано с губительным действием прямого солнечного света и низкой влажности почвы. Максимальное количество микроорганизмов обнаруживается на глубине 10-30 см. На глубине 1м выявляются единичные клетки бактерий. Наиболее богата микроорганизмами культурная возделываемая почва (до 5 млрд клеток на 1 г почвы), наименее – почва, бедная влагой и органическими веществами (200млн клеток в 1г).

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска (детские сады, игровые площадки, зоны санитарной охраны и т.п.) и в санитарно- защитных зонах по *санитарно-бактериологическим показателям, которые делятся на косвенные и прямые:*

1)Косвенные характеризуют интенсивность биологической нагрузки на почву. Это - санитарно- показательные микроорганизмы: бактерии группы кишечной палочки (общие колиформные бактерии) и энтерококки. В крупных городах с высокой плотностью населения биологическая нагрузка на почву очень велика и как следствие, высоки индексы санитарно-показательных микроорганизмов, что наряду с санитарно-химическими показателями (динамика аммиака и нитратов, санитарное число), свидетельствует о неблагополучии и создании повышенного риска инфицирования. На свежее фекальное загрязнение почвы указывает наличие высокого индекса БГКП при низких титрах нитрификаторов, термофилов, а также относительно высокое содержание вегетативных форм С. perfringens. Обнаружение энтерококков всегда свидетельствует о свежем фекальном загрязнении, каковы бы ни были другие показатели.

2) Прямые санитарно-бактериологические показатели эпидемической опасности почвы - обнаружение возбудителей кишечных инфекций (патогенные энтеробактерии, энтеровирусы).

Результаты анализов оцениваются в соответствии с таблицей № 1.

Почву оценивают как «чистую» без ограничений по санитарно-*бактериологическим показателям при отсутствии патогенных бактерий и индексе* санитарно-показательных микроорганизмов до 10 клеток на 1 г. почвы.

О возможности загрязнения почвы патогенными энтеробактериями свидетельствует индекс санитарно-показательных микроорганизмов БГКП (колиформ) и эктерококков 10 и более клеток/г почвы.

Таблица 1

Оценка степени эпидемической опасности почвы

Категория загрязненности почв	Индекс БГКП	Индекс энтерококков	Патогенные бактерии, в	Яйца геогельминтов,	Личинки –Л и куколки –К мух,

			т.ч. сальмонеллы	экз/кг	Экз. в почве с площадью 20х20 см.
Чистая	1-10	1-10	0	0	0
Умеренно опасная	10-100	10-100	0	до 10	Л - до 10 К – отс
Опасная	100-1000	100-1000	0	до 100	Л – до 100 К – до 10
Чрезвычайно Опасная	1000 и выше	1000 и выше	0	> 100	Л>100 К > 10

При необходимости углублённой оценки санитарного состояния почвы и способности ее к самоочищению исследуются показатели биологической активности почвы. Основными интегральными показателями биологической активности почвы являются: общая микробная численность (ОМЧ), клостридии, термофильные бактерии, грибы и актиномицеты, аммонификаторы, аэробные целлюлозные микроорганизмы и т.д.

Перечень показателей определяется целями исследования, природой и интенсивностью загрязнения, характером землепользования.

4. Отбор проб для бактериологического анализа

Контроль загрязнения почв населённых пунктов проводится с учётом функциональных зон города. Места отбора проб предварительно отмечаются на картосхеме, отражающей структуру городского ландшафта. Отбор проб осуществляется согласно ГОСТ 17.4.4.01-83 «Общие требования к отбору проб почвы»; ГОСТ 17.4.4.02-84 «Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа». На территорию, подлежащую контролю, составляют описание с указанием адреса, точки отбора, общего рельефа микрорайона, расположения мест отбора и источников загрязнения, растительного покрова, характера землепользования, уровня грунтовых вод, типа почвы и других данных, необходимых для правильной оценки и трактовки результатов анализов образцов.

Отбор проб для бактериологического анализа проводится не менее 1 раза в год в местах возможного нахождения людей, животных, в местах загрязнения органическими отходами. При изучении динамики самоочищения почвы отбор проводят в течение первого месяца еженедельно, а затем ежемесячно в течение вегетационного периода до завершения активной фазы самоочищения.

***Пробная площадка** - часть исследуемой территории, характеризующаяся сходными условиями (рельефом, однородностью структуры почвы и растительного покрова, характером хозяйственного использования)*

Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. На площади 100м^2 закладывается одна пробная площадка раз-

мером 25м. При неоднородности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа.

***Точечная проба** - материал, взятый из одного места горизонта или одного слоя почвенного профиля, типичный для данного горизонта или слоя.*

Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта. Выкапывается шурф 0,3м х 0,3м и глубиной 0,2м. Поверхность одной из стенок шурфа очищают стерильным ножом. Затем из этой стенки вырезают почвенный образец, размер которого обусловлен заданной навеской, так, если необходимо отобрать 200г почвы, размер образца 20см х 3см х 3см, 500г- 20см х 5см х 3см.

Точечные пробы отбирают ножом, шпателем или почвенным буром.

***Объединённую пробу** составляют путём смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке.*

Для бактериологического анализа с одной пробной площадки составляют 10 объединённых проб. Каждую объединённую пробу составляют из трёх точечных проб массой от 200 до 250г каждая, отобранных послойно с глубины от 0 до 5 см. от 5 см до 20 см.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением правил асептики: отбирают стерильными инструментами, перемешивать на стерильной поверхности, помещая в стерильную тару. Время от отбора проб до начала их исследования не должно превышать 1 суток.

При изучении воздействия пестицидов и др. химических веществ на микрофлору и процессы самоочищения в более глубоких слоях почвы, для отбора проб почвы пользуются шурфом глубиной до 1м. Пробы отбирают из стенки шурфа стерильным инструментом через каждые 10 см.

Для контроля санитарного состояния почв детских дошкольных, школьных и лечебно- профилактических учреждений, игровых площадок и зон отдыха отбор проб проводят не менее 2-х раз в год - весной и осенью. Размер пробной площадки должен быть не более 5х5м.

При контроле санитарного состояния почв территорий детских учреждений и игровых площадок отбор проб проводится отдельно из песочниц и с общей территории с глубины 0 -10см.

С каждой песочницы отбирается одна объединённая проба, составленная из 5 точечных проб. При необходимости возможен отбор одной объединённой пробы из всех песочниц каждой возрастной группы, составленной из 8-10 точечных проб.

Пробы почвы отбирают либо с игровых территорий каждой группы (одна объединённая из не менее пяти точечных), либо одна объединённая проба с общей территории из 10 точечных, при этом следует учитывать наиболее вероятные места загрязнения почв.

При контроле почв в районе точечных источников загрязнения (выгреба, мусоросборники и т.д.) пробные площадки размером не более 5х5м за-

кладываются на разном расстоянии от источника и в относительно чистом месте (контроль).

При изучении загрязнения почв транспортными магистралями пробные площадки закладываются на придорожных полосах с учётом рельефа местности, растительного покрова, метео- и гидрологических условий.

Пробы почвы отбирают с узких полос длинной 200- 500м на расстоянии 0-10, 10-50, 50-100м от полотна дороги. Одна смешанная проба составляется из 20-25 точечных проб, отобранных с глубины 0-10см.

При оценке почв сельскохозяйственных территорий пробы почвы отбирают 2 раза в год (весна, осень) с глубины 0-25см. На каждые 0-15га закладывается не менее 1 площадки размером 100-200м^2 в зависимости от рельефа местности и условий землепользования.

На территории крупных городов с многочисленными источниками загрязнения проводят геохимическое картирование по сети апробирования. Для выявления очагов загрязнения рекомендуется плотность отбора 1-5 проб на 1км^2 с расстоянием между точками отбора 400-1000 м. Для дальнейшего выделения территории с максимальной степенью загрязнения сеть апробирования сгущается до 25-30 проб на 1 км^2 с расстоянием между точками отбора около 200 м. пробы отбирают с глубины 0-5 см.

Отобранные пробы необходимо пронумеровать и зарегистрировать в журнале, указав следующие данные: порядковый номер и место взятия пробы, рельеф местности, тип почвы, целевое назначение территории, вид загрязнения, дату отбора.

Пробы должны иметь этикетку с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилия исследователя.

5. Оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды

6.1. Оборудование

- Термостат для температурного режима (37±1)^{0}C
- Баня водяная с подогревом до температуры 100±2^0 C
- Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом и устройство для создания разрежения (0,5-1,0) атм.
- Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания до 1000 г и допустимой погрешностью ± 10мг **ГОСТ 24104**
- Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100^0 С с ценой деления шкалы 0,5^{0}C
- РН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до 0,01
- Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды

ГОСТ 6709

- Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (180±5)^{0}С
- Автоклав или стерилизатор паровой **ГОСТ 19569**
- Холодильник позволяющий поддерживать температуру **+2-4^{0}С**
- Облучатель бактерицидный
- Горелка газовая или спиртовая
- Петли бактериологические
- Пинцеты для работы с мембранными фильтрами
- Пипетки градуированные 1-го и 2-го классов точности вместимостью 1см^3, 5 см^3, 10 см^3 **ГОСТ 29227-**
- Пробирки **ГОСТ 25336-82**
- Чашки бактериологические (Петри) **ГОСТ 23932-90**

Допускаются к использованию коммерческие, питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации отечественного производства, а также зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29 000. При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

6. Подготовка и обработка почвы для анализа

Для приготовления среднего образца объемом 0,5 кг почву всех образцов одного участка высыпают на стерильный, плотный лист бумаги, тщательно перемешивают стерильным шпателем, отбрасывают камни и прочие твердые предметы. Если проба почвы однородна, допускается тщательное перемешивание почвы в банке. Затем почву распределяют на листе ровным тонким слоем в форме квадрата.

Диагоналями почву делят на 4 треугольника. Почву из двух противоположных треугольников отбрасывают, а оставшуюся вновь перемешивают, опять распределяют тонким слоем и делят диагоналями и так до тех пор, пока не останется примерно 0,5 кг почвы.

Перед посевом почву просевают через сито диаметром 3 мм. При просеивании сито покрывают сверху стерильной бумагой. Почву дисперсную можно не подвергать просеиванию, почву торфяную, содержащую большое количество органических веществ, предварительно растирают в ступке. Неперегнившую растительную массу отбрасывают.

Образец почвы тщательно перемешивают и из него отбирают навески, величины которых выбираются исходя из предполагаемой степени загрязнения почвы и планируемых определений. Для учета почвенных микроорганизмов достаточно навески от 1 до 10 г. В навеску почвы добавляют небольшое количество стерильной водопроводной воды до получения пастообразного состоя-

ния почвы, растирая ее в течение 5 минут. Из суспензии делают раститоровку. Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде, добавляя к суспензии стерильную водопроводную воду в соотношении 1:9 к весу почвы (например: 1г почвенной суспензии разводят в 9,0 $см^3$ стерильной водопроводной воды, 10 г почвы - в 90,0 $см^3$ воды и т.д.). После приготовления разведений применяют соответствующую предварительную обработку почвы в зависимости от типа и вида учитываемого микроорганизма. Основная цель, которую преследуем, проводя предварительную обработку почвы, заключается в том, чтобы извлечь клетки микроорганизмов из почвенных агрегатов, что достигается разрушением последних и десорбцией микроорганизмов с поверхности почвенных частиц.

Основными приемами предварительной обработки почвы являются:
1) 10 минутное вертикальное встряхивание почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками - при навеске почвы 1г.; 2) 3-х минутная обработка почвенной суспензии первого разведения на мешалке механического диспергатора - при навеске почвы более 1 г.

Почвенную суспензию, содержащую в 1,0 $см^3$ 0,1 г почвы через 30 секунд после предварительной обработки (за это время оседают грубые минеральные частицы) используют для приготовления последовательно убывающих концентраций почвы. Для этого из первого разведения, находящегося во флаконе, с содержанием почвы 0,1 г (10^1) отбирают стерильной пипеткой 1,0 $см^3$ и переносят в пробирку с 9,0 $см^3$ стерильной водопроводной воды. При этом получают второе разведение, содержащее 0,01 г/ $см^3$ (10^2) почвы. Повторяя эту операцию, доводят разведение почвы до 0,0001-0,00001 г/ $см^3$.(10^4-10^5). Для приготовления каждого разведения используют отдельные пипетки.

Приготовленные разведения используются для посева на различные питательные среды, а также для учета численности микроорганизмов методом прямой микроскопии.

7. Определение общих колиформных бактерий (БГКП)

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – давно уже считаются удобными микробными индикаторами. Показатель «бактерии группы кишечных палочек» (БГКП) приведен в соответствие с принятой международной номенклатурой, который идентичен показателю «общие колиформные бактерии». К колиформам относятся грамотрицательные бактерии, имеющие форму палочек, способных развиваться в присутствии солей желчных кислот или других поверхностно-активных агентов с аналогичной способностью к подавлению роста и способным ферментировать лактозу при t (35-37°С) с образованием кислоты, газа и альдегида, то есть на среде Эндо лактозоположительные колонии дают отпечаток в течение 24-48ч. Они оксидазоотрицательные и не образуют спор.

Бактерии группы кишечной палочки включают следующие роды: эшерихия, клебсиелла, энтеробактер, цитробактер и серрации.

При анализе почв, для которых предполагается невысокая степень фекального загрязнения, рекомендуется проводить определение титрационным методом. В качестве ускоренного метода для анализа слабозагрязненных почв рекомендуется использовать метод мембранной фильтрации. При анализах проб с предполагаемой высокой степенью фекального загрязнения можно проводить прямой поверхностный посев разведении суспензии на поверхность среды Эндо.

Для исследования используют предварительно подготовленные почвенные суспензии и разведения по описанной выше методике.

Титрационный метод определенияиндекса БГКП (колиформ) в почве.

Из первого разведения почвенной суспензии (1:10), прошедшей предварительную обработку, стерильной пипеткой берут 10,0 $см^3$ засевают во флаконы с 90,0 $см^3$ жидкой лактозо-пептонной среды (ЛПС) или среды Кесслера, что соответствует засеву 1г почвы. Соотношение между навеской почвы или ее эквивалентным разведением и питательной средой 1:9, а для сред двойной концентрации - 1:1.

Посев меньших количеств (0,01г, 0,001г то есть 10^2, 10^3 и т.д.) делают по 1,0 $см^3$ из соответствующих разведении почвенной суспензии в пробирки с 9,0 $см^3$ тех же сред. Титрование проводят до разведения 1: 1000000, то есть 10^6 с регулярной сменой пипеток при переходе от одного разведения к другому. Посевы инкубируют в течение 48ч. при (37±1)^{0}С, через (24±2)ч. инкубации проводят предварительную оценку посевов. Отсутствие газообразования и помутнения через 48ч инкубации выдают окончательный, отрицательный ответ.

При наличии в посевах признаков роста: помутнения и газообразования или только помутнения, производится высев на поверхность среды Эндо.

Чашки с посевами помещают в термостат на (18-24)ч. при температуре (37±1)°С. При отсутствии роста на чашках выдают отрицательный ответ. При наличии на поверхности среды Эндо розовых или красных колоний, малиновых с металлическим блеском или без него проводят микроскопию колоний с последующей постановкой оксидазного теста. Оксидазный тест предназначается для дифференциации бактерий семейства Enterobacteriaceae от бактерий рода Pseudomonoas и других видов сапрофитных бактерий. Микроскопирование и постановка оксидазного теста проводится по МУК 4.2.1078-01.

При наличии оксидазоотрицательных грам (-)палочек по 2-3 колонии каждого типа засевают параллельно в 2 пробирки в полужидкую или жидкую с поплавком среду с лактозой, разлитую в пробирки в количестве 4,0-5,0 $см^3$, для подтверждения ферментации лактозы при температуре (37 ±1)^{0}С Учёт производят через 18 ч. инкубации. Если за это время происходит образование кислоты и газа, это свидетельствует о наличии бактерий группы кишечных палочек.

Признаком газообразования является появление пузырьков газа, об образовании кислоты свидетельствует изменение цвета среды. При появлении только кислоты, пробирки оставляют в термостате для окончательного ответа ещё на 24 ч, при отсутствии газообразования через этот срок выдают окончательный, отрицательный ответ, при появлении газообразования - положительный ответ. После выявления БГКП устанавливают титр, при этом принимается то предельное разведение почвы, в котором обнаруживаются колиформы. Для перевода титра в индекс необходимо 1000 разделить на число, выражающее титр. Так, при титре 0,01 индекс равен 100, а при титре 0,1 индекс равен 10.

Определение БГКБ в почве методом мембранной фильтрации.

В качестве ускоренного метода для обнаружения колиформных бактерий целесообразно использовать метод мембранных фильтров.

Для микробиологических целей используются фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм и другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества. Метод основан на фильтрации установленного объема – 5,0-10,0 $см^3$ почвенной суспензии первого разведения (1:10) – через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциальной, питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам. Для того чтобы облегчить фильтрование почвенной суспензии через мембранный фильтр, желательно до фильтрования провести предварительную обработку.

Мембранные фильтры должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями изготовителя.

Подготовка фильтровального аппарата

Воронку и столик фильтровального аппарата обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом ректификованным, и фламбируют. После охлаждения на столик фильтровального аппарата кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его воронкой.

В воронку прибора для фильтрования наливают отмеренный объем, затем создают вакуум.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат без обеззараживания сначала меньшие, а затем большие объемы, меняя каждый раз фильтры. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают.

Следует начинать с фильтрования проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы. После окончания фильтрования и осушения фильтра отключают вакуум, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят его, не переворачивая, на питательную среду Эндо с добавлением розоловой кислоты,

разлитую в стерильные чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Эта среда используется только при работе методом мембранной фильтрации. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной пробы, номера и даты посева. На одну чашку можно поместить 3-4 фильтра с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посевы при температуре (37±1)^{0}С в течение (24±2)ч.

Если на фильтрах нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, выдают отрицательный ответ: отсутствие БГКБ в исследуемой почве.

Анализ заканчивают через 24 ч.

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитывают число колоний каждого типа отдельно и приступают к подтверждению их принадлежности к БГКБ.

Для подтверждения наличия БГКБ исследуют:

- все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний;
- не менее 3-4 колоний каждого типа.

Каждую выбранную изолированную колонию исследуют на:

- наличие оксидазной активности;
- принадлежность к Граму (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Грегерсена);
- ферментацию лактозы до кислоты и газа.

Для расчета индекса, количества бактерий группы кишечных палочек, выросших в анализируемом объеме почвы, умножают на 1000 и делят на этот объем.

Прямой поверхностный посев на агаризованные питательные среды для учета БГКП в почве

При анализе загрязненных и сильно загрязненных почв, отобранных в местах интенсивного фекального загрязнения рекомендуется проводить прямой поверхностный посев почвенной суспензии в количестве 0,1 или 0,2 см^3 на поверхность среды Эндо и немедленно равномерно распределяют по поверхности шпателем. Посев при анализах сравнительно чистых почв производится из разведении от 1:10 до 1:1000, то есть от 10^1 до 10^3. При работе с загрязненными почвами обычно используют разведения до 10^6. Посевы выращивают в термостате при (37±1)°С в

течении 24 ч. Следующий этап исследований заключается в идентификации выросших микроорганизмов, который проводится аналогично определению общих колиформных бактерий титрационным методом и подсчёту количества колиформных бактерий в 1г почвы, для чего среднее число колиформных колоний, выросших на чашке умножается на степень десятикратного разведения.

8. Определение энтерококков

Энтерококки - грамположительные, не образующие каталазу кокки, слегка вытянутые с заостренными концами, располагающиеся в виде диплококков или коротких цепочек, реже одиночными кокками. Полиморфны. При росте на жидких средах (ЛПС- лактозо-пептонная среда, ЩЭС – щелочно - полимиксиновая среда) вызывают диффузное помутнение и образование осадка.

Подготовка проб и приготовление разведений указаны выше.

Титрационный метод.

Из разведений почвенной суспензии, прошедшей предварительную обработку, стерильной пипеткой берут 10,0 см^3 и засевают во флаконы с 50 см^3 жидкой среды (ЛПС или ЩЭС). Посевы инкубируют при температуре (37±0,5)^{0}С 24 ч. Из порции среды накопления, где отмечены признаки роста, производят высев петлей на одну из плотных сред (МИС – молочно-*ингибиторная среда*, ЖСТ – *желточная среда Турчинского*). *Если через 24 ч* признаки роста отсутствуют, посевы оставляют еще на сутки. В случае отсутствия роста дают отрицательный ответ.

Через 24-48 ч инкубации посевов на молочно-ингибиторной среде при температуре (37±0,5)^{0}С в качестве положительных результатов отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых с металлическим блеском, или сероватых, мелких колоний. Эта среда позволяет дифференцировать виды энтерококов: E. faecalis образует аспидно-черные выпуклые колонии с металлическим блеском, E. faecalis биовар liguefaciens – такие же колонии, окруженные зоной просветления, E. faecium биовар durans – серые, мелкие, плоские колонии.

Для подтверждения наличия энтерококков делают микроскопию окрашенных по Граму мазков и каталазный тест. После выявления энтерококков устанавливают титр, при этом принимается то предельное разведение почвы, в котором обнаруживаются колиформы. Для перевода титра в индекс необходимо 1000 разделить на число, выражающее титр. Так, при титре 0,01 индекс равен 100, а при титре 0,1 индекс равен 10.

Метод мембранных фильтров

Объем испытуемой пробы для посева выбирают с таким расчетом, чтобы не менее чем на 2-х фильтрах выросли изолированные колонии в количестве от 5 до 50.

Выполнение анализа.

Через мембранные фильтры профильтровывают 2-3 десятикратных объема испытуемой пробы. Фильтры с посевом помещают на азидную среду или среду ЖСТ и инкубируют при температуре 37±0,5^{0}С в течение 24 -48 часов.

Учет результатов на среде ЖСТ.

Учет результатов на среде ЖСТ производят через 24-28 часов. Для учета выбирают фильтры, на которых выросло не более 20-30 колоний. Подсчитывают характерные для энтерококков колонии: плоские крупные с ровными краями, белые или бледно-окрашенные с небольшим кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Последние образованы E. faecalis.

Если выросли колонии другого вида – выпуклые белые мелкие или ярко окрашенные, то их принадлежность к энтерококкам можно подтвердить по отсутствию каталазной активности и по характерной морфологии клеток при микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

Каталазный тест можно выполнить путем нанесения петлей капли 3% перекиси водорода на подозрительные колонии. Более точно каталазный тест выполняют на предметном стекле, нанося петлей культуру и после подсушивания на воздухе, добавляя каплю свежеприготовленной 3% перекиси водорода и прикрывая покровным стеклом. Наличие пузырьков газа – положительный тест.

Учет результатов на азидной среде.

Для учета выбирают фильтры, на которых выросло от 5 до 50 колоний.

Подсчитывают колонии, характерные для энтерококков: выпуклые, с ровными краями, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным не четко оформленным центром.

Как правило, все колонии, которые растут на азидной среде, можно отнести к фекальным энтерококкам, имеющим индикаторное значение.

Очень мелкие (на пределе видимости невооруженным глазом), плоские разных оттенков колонии не учитывают.

При необходимости подтвердить наличие энтерококков по 2-3 колонии каждого типа микроскопируют после окраски по Граму.

При обнаружении в мазках грамположительных полиморфных диплококков дают положительный ответ.

Вычисление индекса энтерококков.

Подсчитанное число колоний энтерококков суммируют и делят на объем профильтрованный через фильтры, на которых велся подсчет.

Для расчета индекса, количество колоний энтерококков суммируют, умножают на 1000 и делят на объем, профильтрованный через фильтры, на кото-

рых велся подсчет.

9. Определение CL perfringens в почве

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре при температуре (44±1)^{0}С в течение (16-18) ч.

Принцип метода

Метод основан на выращивании посевов в железо-сульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа черных колоний.

Посев почвенных разведений в среде Вильсон - Блера

Из приготовленных почвенных разведений (до 1:10^6) прогретых при температуре (75±5)°С в течение 20 минут для исключения вегетативных форм, по 1,0 см^3 переносится в два параллельных ряда пробирок. Затем во все пробирки наливают по 9-10 см^3 горячего железо-сульфитного агара, приготовленный ex temporе и прогретого до 70-80^{0}С (среду заливают по стенке пробирки, избегая образования пузырьков). Для создания анаэробных условий роста пробирки быстро охлаждают, помещая в емкости с холодной водой. Посевы инкубируют при (44±1)^{0}С в течение 16-18 часов. При росте в среде черных крупных колоний (грамположительные, каталазоотрицательные) выдают положительный ответ о присутствии C. perfringens в 1г почвы.

Определение методом фильтрования в пробирках.

Перед посевом пробирки с железо-сульфитным агаром расплавляют на водяной бане (не кипятить!). В течение посева поддерживают среду нагретой до (70-80)^{0}С в водяной бане.

После фильтрования установленного объема мембранный фильтр фламбированным пинцетом берут за два противоположных края и согнутый в виде трубочки помещают в пробирку с горячим агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки.

Сразу же после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охлаждают, помещая в емкость с холодной водой. Культивируют посевы при (44±1)^{0}С в течение (16-18) ч.

Определение методом фильтрования в чашках Петри.

Чашки Петри заливают тонким слоем железо-сульфитного агара 4,0-5,0 см^3. После фильтрации, фильтр помещают фильтрующей поверхностью вниз на за-

стывшую питательную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем заливают расплавленным железо-сульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий. Культивируют посевы при $(44\pm1)^0$С в течение (16-18) ч.

Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтрах, так и в толще питательной среды. При отсутствии роста на всех фильтрах – дают отрицательный ответ.

10. Показатели биологической активности почвы

Основными интегральными показателями биологической активности являются: общая микробная численность (ОМЧ), определение актиномицетов, аммонификаторов, нитрификатов и др.

Определение общей численности почвенных микроорганизмов (ОМЧ)

Для более полного учета общей численности сапрофитных микроорганизмов диспергирование и десорбцию клеток с поверхности почвенных частиц рекомендуется проводить следующим способом. Навеску почвы, используемую для приготовления первого разведения, доводят путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния, растирают в течение 5 минут. Затем готовят первое разведение (1:10), т.е. 10^1 почвы на стерильной водопроводной воде и почвенная суспензия охлаждается при $5\text{-}7^0$ в течение 20-30 мин., затем производят растиртровку суспензии обычным способом. Из каждого разведения делают посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,2 $см^3$ на поверхность почвенного агара, разлитого в стерильные чашки Петри и равномерно шпателем растирают по всей поверхности чашки. Термостатирование засеянных чашек ведут при $(28\text{-}30)^0$С в течение 72 ч. Учет результата: количество колоний на обеих чашках суммируют, делят на два и умножают на степень разведения. Результат выражают числом колонеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).

Определение количества актиномицетов и грибов в почве

Актиномицеты (герч. Actis – луч, mucos – гриб) – одноклеточные микроорганизмы, тело состоит из нетитрованного мицелия, который имеет вид ветвящихся таких нитей. У актиномицетов, как и у бактерий, генетическую функцию выполняет нуклеоид. В нитях мицелия находятся зерна хроматина. Размножаются актиномицеты при помощи специальных органов плодоношения, путем прорастания спор, прикрепленных на спороносцах, простым делением, перешнурованием и почкованием.

Актиномицеты – факультативные анаэробы, хорошо развиваются при t 25-30^{0}С (оптимальная температура 35-37 ^{0}С) на плотных средах. Одни виды растут с образованием плотных гладких колоний, другие – имеют складчатые, бугристые, корковидные, бархатистые, пушистые или мучнистые колонии, которые срастаются со средой и с трудом снимаются петлей. Актиномицеты могут быть бесцветными или пигментированными (синие, фиолетовые, красные, желтые, оранжевые, зеленые и т.д.), на плотных питательных средах часто образуют воздушный мицелий, на концах которого развиваются споры, придающие колониям определенный цвет.

Грибы Среди грибов встречаются сапрофиты и паразиты.

Наибольшее значение для медицины представляют оомицеты (Oomycetus), аскомицеты (Ascomycetes), базидиомицеты (Basidiomycetes), дейтеромицеты (Deuteromycetes), форма клеток у молодых культур может быть круглая, яйцевидная или удлиненная, у зрелых клеток – грушевидная, булавовидная, веретинообразная, амебовидная. Основным структурным компонентом клеток грибов является мицелий, состоящий из разветвленных бесцветных нитей (гиф). У одних видов он состоит из нерасчлененной клетки (mucor), у других (высших грибов) он многоклеточный; у дрожжеподобных грибов (Candida) имеется псевдомицелий.

Установлена большая чувствительность почвенных актиномицетов и грибов к действию отдельных химических веществ по сравнению с почвенными споровыми и неспоровыми бактериями. Несомненно, что такая разбалансировка равновесия в почвенном микробиоценозе должна рассматривать как отрицательное явление. Актиномицетам и грибам принадлежит большая роль в превращении широкого круга органических и минеральных веществ. Благодаря чрезвычайно выраженным антогонистическим и токсическим свойствам они оказывают большое влияние на формирование микробных почвенных биоценозов, являются продуцентами многих физиологических активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов.

Для учета почвенных актиномицетов и грибов используются те же разведения почвенной суспензии, что и при учете общей численности микроорганизмов. Как правило, для учета почвенных грибов используют разведение почвенной суспензии 1:10 -1:100, то есть 10^1-10^3 а при учете актиномицетов - 1:100 - 1:10000 (от 10^3 до 10^5). Посев производят поверхностным способом, нанося на агаризованные среды 0,1-0,05 см^3 суспензии. Для учета актиномицетов используется чаще всего крахмало-аммиачный агар или агар Ваксмана, при учете грибов - сусло-агар или минеральная среда Чапека. При учете грибов используют добавление в среду веществ, ингибирующих рост бактерий - концентрированную молочную кислоту в количестве 4 мл/л среды. Прибавление такого количества кислоты доводят pH Среды до 4,0-4,5. Кислота добав-

ляется непосредственно перед посевом в расплавленную среду. Поскольку прибавляют концентрированные кислоты, то их предварительно не стерилизуют.

Определение аммонификаторов в почве

Аммонифицирующие микроорганизмы принимают участие в расщепление белковых соединений до аммиака. Их учитывают на мясо-пептонном агаре, а при необходимости на жидких пептонных средах (мясо-пептонный бульон, пептонная вода) с индикаторными бумажками, определяющими аммиак. Для определение выделяющегося аммиака над средой в пробирке подвешивают красную лакмусовую бумажку (при выделении аммиака она синеет) или полоски фильтровальной бумаги, пропитанные реактивом Круппа (от аммиака краснеют). При выращивании почвенных суспензий на мясопептонном агаре результаты выражают в КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1г почвы. При определении этого показателя в жидких средах определяют титр, индекс аммонифицирующих микроорганизмов по последней пробирке, в которой еще обнаруживается аммиак (на 10-е сутки) после термостатирования при температуре 25-30°С.

Определение токсичности почв по отношению к микроорганизмам

Метод определения степени токсичности почв к микроорганизмам используется в качестве быстрого и достаточно чувствительного теста для получения ориентировочных данных о способности почвы самоочищаться от патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Кроме того, этот тест оказался также чувствительным при определении влияния химических веществ на почвенный микробиоценоз. Низкая степень токсичности или ее снижение по отношению к патогенным микроорганизмам свидетельствует о наличии или возникновении более благоприятных условий для выживания возбудителей в таких почвах. Это явление неблагоприятное по классам:

1 -отсутствие -0-20 % токсичных образцов
2 - слабо выраженная -21-40 % токсичных образцов
3 - средняя -41-60 % токсичных образцов
4 - сильно выраженная. 61-80 % токсичных образцов
5 - абсолютная -81-100 % токсичных образцов

Для определения токсичности почв можно использовать два метода - качественный и качественно-количественный.

Качественный метод определения токсичности почв.

В стерильную чашку Петри 10 г перемешанной и просеянной почвы и ровным слоем распределяется на половину дна чашки. На дне и крышке чашки записывается номер пробы по журналу и тест-микроорганизм. Затем чашки пе-

реносят в бокс и устанавливают на ровной поверхности. Чашки с почвой заливают 1,5% непитательным агаром в количестве около 10,0 см^3 таким расчетом, чтобы он покрыл слой почвы. После его застывания в чашки вносится питательный агар также в количестве 10 см^3 адекватный тест- микроорганизмам. Из одного почвенного образца готовятся 2 параллельные чашки к каждому микроорганизму. Чашки высушивают под бактерицидными лампами в течение 30 минут. Затем производится посев индикаторных штаммов микроорганизмов.

Посевы производятся петлей, причем движения петли всегда начинают с той части чашки, на которой помещена почва. В качестве контроля производят посевы тех же культур на аналогичные среды, но без почвы.

Посевы инкубируют в зависимости от вида индикаторного микроорганизма. Учет результатов начинается с просмотра контрольного посева. В случае равномерного роста тест-микроба на всей поверхности агаровой пластинки просматривают остальные чашки с посевами. Колонии идентифицируются по "форме роста". Кроме того, из каждой серии посевов с нескольких чашек снимают колонии и производят их идентификацию.

Рост колоний только на участке агаровой пластинки, под которой нет почвы, показывает, что исследованный почвенный образец токсичен (Т). При исследовании некоторых почвенных проб отмечается частичное ингибирование роста тест-микроба. В этих случаях регистрируется маловыраженная токсичность (М/Т).

Качественно-количественный метод определения токсичности почв

В стерильную чашку Петри также вносится 10 г почвы и распределяют равномерно по всей поверхности, затем, как и при качественном методе, вносится *непитательный и питательный агар. В качестве дополнительного* барьера между почвой и индикаторным штаммом на поверхности питательной среды укладывают мембранный фильтр.

На матовую поверхность мембранных фильтров простым карандашом наносятся 16 точек, после чего фильтр стерилизуют кипячением. Затем на питательную среду помещают мембранные фильтры (матовой поверхностью вверх) в количестве от 1 до 4-х на одну чашку. На поверхность фильтра в местах, отмеченных точками, производят посев бактериальной петлей (иглой) культуры индикаторного штамма, суспензированного в физиологическом растворе, содержащем около 100 млн. бактериальных клеток в 1мл по оптическому стандарту мутности. Эта манипуляция упрощается при использовании специального штампа в виде металлического диска диаметром около 30 мм. В *диск вмонтированы 16 стальных игл, строго одинаковой длины и толщины.* Культуры микроорганизмов наливаются в чашки Петри и погружают в них кончики игл стерильного штампа, а затем одновременно производится посев в 16 точках мембранного фильтра. Посевы инкубируют в термостате или анаэростате при оптимальной температуре и продолжительности в зависимости от

физиологических особенностей индикаторного штамма.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент прироста (Р) высчитывается как количество образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: Т=100-Р. Этим методом, как и качественным, устанавливается абсолютная токсичность, когда на фильтрах не вырастает ни одна колония; отсутствие токсичности - на метах всех посевов вырастают колонии и различная степень токсичности - когда прорастает только часть засеянных точек.

11. Определение патогенных энтеробактерий родов Salmonella и Shigella в 1 г почвы

Сущность определения шигелл и сальмонелл заключается в использовании методов накопления патогенных бактерий в средах обогащения с последующим пересевом на плотные селективные и дифференциальные среды с последующим изучением биохимических свойств выделенных культур и их серологическую идентификацию по методике.

Используют не менее двух сред накопления из перечисленных: среду Мюллера Кауфмана, селенитовый бульон, магниеву среду, тетратионатовый будьон. Для сальмонелл используют любые две среды из четырёх, для шигелл-селенитовую среду.

Проведение исследования аналогично исследованию на колиформы.

Посевы инкубируют при (37±1^{0}С) в течении 18-24часов, затем из каждого флакона делают высевы бактериологической петлёй на чашки с плотными селективными средами: для сальмонелл- на висмут-сульфитный агар, ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар, для шигелл на бактоагар Плоскирева, среду Эндо или ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37±1^{0}С) в течении 18-20часов, а в случае отсутствия роста чашки с посевами оставляют ещё на 24часа в термостат. С каждой чашки снимают подозрительные на сальмонеллы и шигеллы колонии в пробирки с дифференциально-диагностическими средами. Окончательное определение биохимических и серологических свойств, био- и сероваров проводят по действующим. МУ 17.04-23/307-84 «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями».

gost.e-ecolog.ru