МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

## ПО САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ПОЧВЫ

Москва, 1981 год

gost.e-ecolog.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Главного
Государственного санитарного врача
СССР
**В. Е. Ковшило**
19 февраля 1981 г.
№ 2293—81

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ПОЧВЫ

Настоящие методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы являются дополнением к методическим указаниям выпущенным МЗ СССР в 1977 г. Последние сыграли положительную роль в развитии работ по санитарно-микробиологическому исследованию почв, в частности, способствовали усилению контроля за санитарным состоянием почвы, явились методической основой для широкого фронта работ по гигиеническому нормированию химических веществ в почве. Содержащиеся в них методы прошли широкую практическую апробацию в самых различных учреждениях страны, хорошо зарекомендовали себя и рекомендуются для дальнейшего использования в соответствии с требованиями указаний 1977 г. Вместе с тем, проведенные за 1976—1980 гг. экспериментальные и натурные методические разработки ряда авторов позволили предложить с целью дальнейшего совершенствования методических указаний, в виде дополнений, ряд методов по их основным разделам.

## IV. САНИТАРНО - БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

### IV.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ФЕКАЛЬНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВЫ

#### Определение количества энтерококков в почве

Количество энтерококков в почве может считаться наряду с определением БГКП показателем фекального загрязнения. На основе многократных исследований можно судить о пове-

дении энтерококков в почве, а следовательно характеризовать процесс самоочищения почвы от фекального загрязнения. Рекомендуются для определения энтерококков в почве следующие три метода: 1) титрационный; 2) прямой поверхностный посев; 3) капельный метод.

Первоначальные этапы определения энтерококков в почве такие как отбор проб почвы, хранение и подготовка почвы к анализу, приготовление почвенной суспензии, предварительная обработка почвы, приготовление децимальных разведений — будут одинаковыми, независимо от того, какой будет применен в дальнейшем метод: прямой посев, титрационный или капельный.

### Методы обнаружения энтерококков в почве

Отбор проб почвы для обнаружения энтерококков, подготовка почвы к анализу и приготовление почвенной суспензии осуществляется в соответствии с требованиями «Методических указаний по санитарно-микробиологическому анализу почвы», 1977 г., стр. 8—13. Отобранные пробы почвы можно хранить в течение 3 суток в холодильнике при +3— +5°С, не допуская при этом подсушивания почвенных проб.

Наиболее эффективным приемом предварительной обработки почвенной суспензии является озвучивание ее низкочастотным ультразвуком (на отечественном диспергаторе УЗДН-1, частота 22 кгц, интенсивность 44 вт/см$^2$, сила тока 0,44 а в течение 1 мин. с использованием экспоненциального излучателя). Однако, учитывая недостаточную техническую оснащенность ряда лабораторий, допустима обработка почвенной суспензии путем встряхивания в пробирках или обработка на РТ-2.

При использовании последних двух приемов десорбции, при окончательном расчете энтерококков на 1 г почвы, необходимо ввести поправку, увеличив полученные данные на 37%, т. к. при механической обработке указанное количество энтерококков недоучитывается. Приготовление децимальных разведений почвенной суспензии проводят по стандартной методике.

При анализах почв с предполагаемой невысокой степенью загрязнения посев проводится титрационным методом из децимальных разведений почвенной суспензии в жидкую среду ЩЭС (температура инкубации 37°С) с последующим через 24 часа высевом на подтверждающую среду Г. П. Калины. Учет анализов производится через сутки с перерасчетом результатов на 1 г почвы по таблицам НВЧ с учетом влажности.

Сильно загрязненные почвы можно анализировать проводя посев в жидкую среду ЩЭС, как описано выше или стандартным поверхностным методом на плотную среду Сланца-Бертли или капельным методом *. В дальнейшем также делают перерасчет количества определяемых энтерококков на 1 г почвы с учетом влажности и определяют среднюю ошибку опытов.

### Капельный метод посева

Для учета в загрязненных почвах бактерий группы кишечных палочек, энтерококков **, общей численности микроорганизмов, споровых бактерий и актиномицетов рекомендуется использование капельного метода посева в упрощенной модификации. Данная методика удобна в полевых экспедиционных условиях, а также при проведении опытов по установлению гигиенических нормативов химических веществ в почве.

На поверхность плотной, хорошо высушенной соответствующей среды в чашки Петри наносят микропипеткой по 6—10 капель (0,01 мл) из децимальных разведений почвенной суспензии, прошедшей предварительную подготовку. Некоторое время посевы выдерживают на столе, до подсыхания капель, а затем помещают в термостат крышкой вверх. При работе этим методом нужно строго соблюдать режим подсушивания плотных сред в чашках Петри: подсушивание проводят не менее 1 часа при 60—70° или 1 сутки при комнатной температуре (18—20°С) до получения «муаровой пленки».

## IV. 3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

### Ускоренный культурально-морфологический метод установления влияния химических веществ на микроорганизмы

Сущность метода заключается в наблюдении под микроскопом с фазовым контрастом за ростом и размножением чистых культур микроорганизмов на специально приготовленных агаровых пластинках. Питательные среды, соответствующие для изучаемых видов микроорганизмов, расплавляют и разливают в стерильные пробирки по 10 мл. Расчет

* Описание приводится в следующем разделе.

** Рекомендуется для оценки фекального загрязнения и для характеристики самоочищения почвы от органических и химических загрязнений.

рабочих концентраций химических веществ производится следующим образом: не больше 1 мл раствора на 10 мл питательной среды. Одна пробирка каждой серии является контрольной — без химических соединений. После внесения химических веществ все пробирки ставят на водяную баню, для поддержания температуры в пределах 50—70°С. Чистые предметные стекла прожигают над пламенем горелки, затем на них из пробирок наносят тонкий слой (0,5—1 мм) питательной среды. Параллельно, на покровное стекло пастеровской пипеткой наносится небольшая капля суспензии клеток тест-микроорганизма определенной концентрации (для энтеробактерий оптимальная концентрация 200 млн/мл, для дрожжей — 50 млн/мл). Покровное стекло с нанесенной каплей бактериальной взвеси переворачивается и опускается на поверхность тонкого слоя агара. Капля под покровным стеклом растекается на всю его площадь. Результаты проведенных опытов показали, что для получения ответа на статистически достоверном уровне достаточно просмотреть один препарат при подсчете не менее 100 микроколоний и единичных клеток. Наблюдение под микроскопом производится после инкубирования в термостате в течение времени, необходимого для каждого вида микроорганизмов и охлаждения их в холодильнике при температуре 6—10°С в течение 10—15 мин. Из термостата вынимают все слайды (опытные и контрольные) одновременно. Просмотр проводят по диагонали препарата с увеличением 40×7. При таком увеличении в поле зрения попадает 20—25 клеток, которые легко поддаются учету.

Разработаны критерии учета антибактериальных свойств химических веществ. К ним относятся: 1) процент жизнеспособных клеток; 2) интенсивность размножения — показывающая, с какой скоростью делится популяция за определенный промежуток времени; 3) длительность лаг-фазы; 4) морфологические изменения отдельных клеток и микроколоний.

Показатель жизнеспособности — это удельный вес размножившихся клеток микроорганизмов опытных серий (с токсическими соединениями) по сравнению с контролем в аналогичных условиях без внесения изучаемого соединения. Для получения результатов с точностью на уровне 96% необходимо в каждом препарате просмотреть не менее 400 микроколоний и единичных клеток. Время инкубации определяется опытным путем для каждого вида микроорганизмов. Для ряда видов микроорганизмов время инкубации установлено, а именно: для микроорганизмов кишечной группы — 3 часа; Cl. perfringens — 4 часа; Micrococcus — 3,5—5 часов; Rh. gracilis — 7 часов.

Целесообразно, на основании показателя жизнеспособности, определять процент ингибирования, который высчитывается вычитанием от 100 процента жизнеспособности.

Интенсивность размножения является вторым важным показателем влияния токсических соединений на микроорганизмы и определяется следующим образом. После определения первого показателя (жизнеспособность или процент ингибиции) в нескольких полях зрения, подсчитывается общее количество клеток во всех микроколониях контрольных и опытных препаратов. Подсчету подлежат и отдельные неразмножавшиеся клетки. Общее количество подсчитываемых отдельных клеток и микроколоний должно быть не менее 100. После, на основании получаемых величин, высчитывается степень подавления или стимуляции выражаемой в процентах по сравнению с контролем. Для этого в контроле и опытных препаратах определяется среднее количество клеток в одной микроколонии. Среднее количество клеток в микроколониях контрольного препарата принимается за 100%.

Одновременно, без дополнительных опытов, на тех же препаратах, можно определить и другой показатель — морфологические изменения микроорганизмов под действием токсических веществ и соединений. В контрольных препаратах отдельные клетки и клетки в микроколониях располагаются в определенном, характерном для каждого вида, порядке, в одной полости, имеют четкое очертание. При выращивании тест-микроорганизмов на питательных средах, содержащих токсическое соединение, наблюдаются морфологические изменения как отдельных клеток, так и микроколоний.

Культурально-морфологическим методом определяется еще один показатель антибактериального действия химических веществ на микроорганизмы — лаг-фаза. Для определения длительности лаг-фазы готовится не один, а несколько препаратов (5—6 и более) контроля и каждой концентрации изучаемого химического соединения. Это необходимо для того, чтобы просмотреть контрольный и опытные препараты в динамике — через определенные промежутки времени инкубации. Для этого, с учетом лаг-фазы каждого вида микроорганизма, определяют периодичность просмотра препаратов. Например, если лаг-фаза микроорганизмов находится в пределах 1 часа, то целесообразно препараты просматривать каждые 10—15 минут, если 2—3 часа и более — каждые 30 минут или 1 час. Общее время наблюдения не должно превышать срок наблюдения при определении первого показателя — жизнеспособности.

Длительность лаг-фазы равна времени от начала инкубации до появления 1—3 микроколоний, состоящих из 4 и бо-

лее клеток и выражается в часах и минутах. Общим требованием, при определении этого показателя, является просмотр всех препаратов (контрольных и опытных) через равные промежутки времени. Для этого, если невозможно их учесть в течение нескольких минут, препараты помещают в холодильник, чтобы прекратить размножение популяции микроорганизмов.

Результаты выражаются в абсолютных (время лаг-фазы в минутах) или относительных (процент удлинения или сокращения лаг-фазы микроорганизмов под действием токсических веществ по сравнению с контролем) показателях.

### Экспрессные методы по изучению влияния химических веществ на микроорганизмы

Для получения в короткие сроки данных о действии химических веществ на микроорганизмы, могут использоваться методы определения дыхания, ферментативной активности и показатели начальных этапов роста микроорганизмов. Эти методы позволяют сократить время исследований до нескольких часов.

#### Определение дыхания микроорганизмов

Исследование проводят в аппарате Варбурга. В пробирки с соответствующей питательной средой, содержащей заданные концентрации изучаемого вещества, вносят тест-микроорганизм. Действие вещества оценивают по разности выделяемого углекислого газа в контроле и опыте.

#### Определение дегидрогеназной активности микроорганизмов

Определение основано на способности ферментов микроорганизмов — дегидрогеназ восстанавливать за счет дегидрирования субстрата бесцветный трифенилтетразолийхлорид (ТТХ) до формазана (трифенилформазана), имеющего темно-красный цвет. Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию биологических ядов, в присутствии которых их активность снижается. Это позволяет, путем сравнения количества восстановленного дегидрогеназами микроорганизмов ТТХ в опытах и контроле, оценить степень токсичности исследуемого вещества.

Ход определения. Готовят в физиологическом растворе густую суспензию тест-микроорганизмов из суточной культуры на скошенном агаре. Бактериальные клетки осаждают центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. (Экс-

позиция установлена для кишечных палочек и сибиреязвенных бацилл). Надосадочную жидкость сливают, а клетки отмывают от посторонних примесей 3—4 раза водопроводной водой или физраствором при той же скорости и времени центрифугирования. Из отмытых клеток готовят стандартную суспензию в физрастворе с постоянной плотностью, соответствующей показанию ФЭК 0,32—0,34. Плотность суспензии определяют на ФЭКе в кюветах 5 мм, при зеленом светофильтре.

В химически чистые сухие пробирки вносят в указанной последовательности следующие растворы: 1,2 мл 1/15 $Na_2HPO_4$, 0,5 мл 0,1 М глюкозы (субстрат для дегидрирования), 0,1 мл 0,1 М $MgSO_4$, 0,2 мл 0,5% трифенилтетразолийхлорида (ТТХ), 1 мл бактериальной суспензии и исследуемое вещество, в количестве создающем необходимую его концентрацию в пересчете на 1 л. Общий объем реакционной смеси должен быть равен 3 мл. Смесь инкубируют в термостате при 37°С в течение 2 часов до появления окраски формазана.

Для извлечения формазана клетки разрушают ледяной уксусной кислотой, которую добавляют по 3 мл в каждую пробирку. Из реакционной смеси формазан эстрагируют толуолом (3 мл в каждую пробирку). Для полного извлечения формазана из реакционной смеси, пробирки несколько раз встряхивают и отстаивают. На полноту извлечения формазана указывает обесцвечивание реакционной смеси. Формазан очень осторожно, с помощью пастеровской пипетки, переносят в кюветы для колориметрирования. Колориметрируют в кюветах 3 мл при сине-зеленом светофильтре (с фильтром 490 нм). Качество образованного бактериями формазана расчитывают по калибровочной кривой. Исследования проводят не менее, чем в пятикратной повторности, для статистической обработки полученных материалов. При этом значение доверительного коэффициента и в зависимости от этого показателя оценивают действие испытанной концентрации вещества.

Для построения калибровочной кривой, готовят растворы формазана различной концентрации. Для приготовления основного раствора к 10 мг трифенилтетразолийхлорида добавляют 100 мг гидросульфита натрия и 2—5 мл фосфатного буфера с pH 7,4. Образовавшийся осадок формазана доводят толуолом до объема 20 мл. Основной раствор содержит 1000 мг формазана в 2 мл. Из основного раствора, путем сочетания его различных объемов с толуолом, готовят стандартные растворы с концентрацией формазана от 5 мкг до

500 мкг. Светопоглощаемость стандартных растворов измеряют на ФЭКе и по полученным данным строят кривую.

Метод оценки токсичности веществ по дегидрогеназной активности бактерий имеет ряд преимуществ. К их числу относят: экспрессность анализа, высокую чувствительность, высокую производительность, позволяющие иметь большое число повторностей для статистической обработки результатов, возможность количественно выразить эффект действия вещества.

### Определение начальных этапов роста микроорганизов

Данное определение позволяет ограничить наблюдения первыми периодами развития популяции — лаг-фазой и фазой роста по экспоненте (логарифмический рост).

Изучение роста микроорганизмов только на первых этапах их развития, без длительных наблюдений в течение 1—10 суток обосновано экспериментально и является следствием прямой зависимости численной характеристики популяции от особенностей ее начального роста.

Для оценки токсичности вещества, определяют время (в часах) лаг-фазы и фазы логарифмического роста исследуемого микроорганизма в присутствии вещества и в контроле. Изменение этих периодов роста указывает на токсический эффект изучаемого вещества, выражающийся в увеличении времени лаг-фазы и сокращении продолжительности фазы логарифмического роста.

Для исследования готовят на физиологическом растворе суточную взвесь тест-микроорганизма с концентрацией 1 млрд/мл. Методом убывающих разведений концентрацию микроорганизмов снижают до 200—300 клеток в мл. Последнее разведение готовят во флаконе с питательной средой и вносят в него изучаемое вещество в заданной концентрации. Посевы инкубируют при оптимальной для тест-микроорганизма температуре. Каждый час, от момента посева и на протяжении первых часов роста определяют численность микроорганизмов общепринятым методом: глубинного или поверхностного посева на соответствующие питательные среды. По результатам ежечасного учета численности микроорганизмов строят кривую роста и определяют длительность лаг-фазы, т. е. время в часах от момента посева до первого удвоения исходной численности популяции. Для установления периода логарифмического роста расчитывают время генерации микроорганизмов за каждый час после завершения лаг-фазы. Время генерации определяют по формуле:

$g = \frac{t \cdot lg^2}{lgB - lgb}$, где g — время генерации, t — время наблюдений, B — число бактерий к концу опыта, в — начальное число бактерий. Период логарифмического роста устанавливают по продолжительности развития популяции с одинаковой скоростью (время генерации).

По разнице (в часах) указанных периодов роста в опыте и контроле определяют токсические для тест-микроорганизмов концентрации исследуемого вещества. Продолжительность исследования начальных периодов роста составляет 2—6 часов при испытании в мясо-пептонных средах и 10—12 часов при исследовании в воде. При необходимости исследования могут быть ограничены не только определением продолжительности лаг-фазы роста микроорганизмов.

## IV.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ

### Количественный учет сальмонелл в почве

В основу предлагаемого метода количественного учета сальмонелл в почве положен принцип однолинейной растирровки на четыре десятикратно уменьшающихся объема по аналогии с бродильным методом определения титра кишечной палочки.

Из исследуемого почвенного образца отбирают навеску в 55,5 г, добавляют 500 мл стерильной водопроводной воды и проводят обработку для получения почвенной суспензии (в соответствии с «Методическими указаниями» 1977 г.). По 0,1 мл почвенной суспензии засевают на 3—5 чашек висмут-сульфитного агара, а к оставшейся суспензии добавляют растворы и навески магниевой среды по экспедиционной модификации из расчета на 500 мл. При этом происходит увеличение объема на 10% т. е. до 550 мл. Среда тщательно перемешивается и растирровывается на 4 объема с учетом внесенных ингредиентов среды накопления на 0,5 (0,495), 5,0 (4,95), 49,5; 495. Таким образом исследуется 500 мл почвенной суспензии, раститрованной в магниевой среде на 0,45; 4,5; 45; 450 мл, что соответствует 0,05; 0,5; 5 и 50 г почвы.

После 18—20 часовой инкубации в термостате при температуре 37°С из каждого исследуемого объема среды накопления проводят пересев петлей на 2 чашки с висмут-сульфитным агаром. Дальнейшая идентификация проводится по общепринятой методике.

Расчет индекса сальмонелл в почве. При наличии положительного результата прямого посева почвенной суспензии

на висмут-сульфитный агар высчитывают среднее количество выросших колоний в 0,1 мл, что соответствует количественному содержанию (индексу) сальмонелл в г почвы.

Полученные результаты посевов из сред обогащения оценивают по экспериментально разработанной таблице, которая по соотношению положительных и отрипательных находок сальмонелл в исследуемых объемах позволяет дать количественную оценку содержания их в почве.

**Схема количественного учета сальмонелл в почве**

| Исследуемые объемы почвенной суспензии в мл (почвы в г) | | | | Экспериментально установленные границы индексов сальмонелл (на 1 г почвы) | Расчитанная по формуле Томаса НВЧ (наиболее вероятное число сальмонелл) |
|---|---|---|---|---|---|
| 450<br>50 | 45<br>5 | 4,5<br>0,5 | 0,45<br>0,05 | | |
| + | + | + | + | 50 клеток и выше | не подвергается расчету |
| + | + | + | — | 49—5 | 13 |
| + | + | — | — | 4—1 | 2 |
| + | — | — | — | единичные клетки на исследуемую навеску почвы в 55,55 г | 0,2 |

В случае получения отрицательного результата посева в большем объеме, при положительном посеве из меньшего, следует производить расчет по последнему объему, давшему положительный результат. Если рост сальмонелл обнаружен лишь в одном объеме, независимо от его величины, индекс сальмонелл в данной пробе определяется единичными клетками в исследуемой пробе почвы 55,5 г.

Прямой посев почвенной суспензии может быть заменен растиранием 0,1—0,5 г почвы на поверхности висмут-сульфитного агара. Количество выросших колоний сальмонелл пересчитывают на 1 г почвы.

Экспериментально установлено, что тип почвы не влияет на чувствительность метода. Предлагаемый метод апробирован в натурных условиях на сероземах, черноземах и дерново-подзолистой почве. Разработанная в экспериментальных условиях таблица количественного учета сальмонелл в почве подтверждена путем математического обсчета полученных результатов исследований (по формуле Томаса).

### Обнаружение шигелл в почве

В почвенную суспензию вносятся растворы и навески среды обогащения «С» (разработана в Институте общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР). Посевы инкубируют в течение 20—24 часов в термостате при температуре 37°С. После инкубации производят высев петлей на чашки со средой Эндо и Плоскирева (по одной чашке на каждую среду). Дальнейшая идентификация осуществляется по общепринятой методике.

### Пропись среды «С»

В 100 мл почвенной суспензии вносятся 100 мл бульона Хоттингера, 10 мл 10% пептона отечественного, 0,5 г хлористого натрия, 2,5 мл дрожжевого экстракта, 0,8 мл 20% вторичного алкилсульфата натрия, 4 мл 10% раствора селенистокислого натрия (готовится «ex temporе»), pH 7,2—7,4.

## САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

Усовершенствование методики учета вирусов в почве по подразделу «предварительная обработка почвы для проведения вирусологического исследования».

В настоящее время можно рекомендовать проводить первичную обработку почвы при санитарно-вирусологическом анализе с применением ультразвуковой обработки. Для этого в навеску почвы добавляют в качестве десорбента среду 199 с 5% нативной бычьей сыворотки (pH 8,5) и обрабатывают на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1. Время обработки будет зависеть от исследуемого типа почвы: серозема — 30 минут, торфа — 5 минут, чернозема — 15 минут. Параметры работы диспергатора при использовании трубчатого излучателя рекомендуются следующие: сила тока 0,44 а, частота ультразвука 44 кгц, интенсивность — 22 вт/см$^2$. После обработки ультразвуком почвенная суспензия переносится в центрифужные пробирки и центрифугируется при 400 об/мин в течение 15 минут. Дальнейшая обработка надосадочной жидкости и выделение вирусов на культуре ткани проводится в соответствии с методами работы при выделении вирусов из воды.

В подготовке дополнений к методическим указаниям принимали участие: Г. А. Багдасарьян, Ю. Г. Талаева, А. Ф. Перцовская, Г. П. Кашкарова, Т. В. Доскина, Е. В. Филимонова (Институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР), Г. В. Меренюк, А. И. Кречун (Молдавский НИИ гигиены и эпидемиологии), Е. М. Юровская (Киевский НИИ общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Марзеева).

Т-07142 26/II-81 г. Зак. 513 Тир. 1160
Типография Министерства здравоохранения СССР
gost.e-ecolog.ru