

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Дальневосточный федеральный университет



ИНСТИТУТ
МИРОВОГО ОКЕАНА

Кафедра биоразнообразия и морских биоресурсов

М.Л. Сидоренко, А.В. Ким, Е.А. Богатыренко

САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Учебное пособие

*Рекомендовано Дальневосточным региональным
учебно-методическим центром (ДВ РУМЦ) в качестве учебного пособия
для студентов направлений подготовки 06.03.01 «Биология»,
05.03.06 «Экология и природопользование»,
19.03.01 «Биотехнология», 06.03.02 «Почвоведение»
вузов региона*

Владивосток



2025

УДК 579.63(075.8)

ББК 28.4я73

*Утверждено Ученым советом
Института Мирового океана (Школы) ДВФУ*

Рецензенты:

Л.Н. Пуртова, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. Лаборатории почвоведения
и экологии почв, ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН;

Е.Г. Лебедева, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Лаборатории геохимии
гипергенных процессов ДВГИ ДВО РАН

Сидоренко, Марина Леонидовна.

С34 Санитарно-гигиенический анализ почвы по микробиологическим показателям : учебное пособие / М.Л. Сидоренко, А.В. Ким, Е.А. Богатыренко. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2025. – 84 с.

ISBN 978-5-7444-5854-6.

В пособии описаны основные методы санитарно-микробиологического исследования почвы и ее гигиеническая оценка с точки зрения инфекционной опасности для человека. Текущий санитарно-микробиологический контроль над почвами наряду с индикацией отдельных патогенных микроорганизмов включает косвенные приемы, в основу которых положены учет общего количества сапрофитных бактерий и определение степени загрязнения экскретами человека и животных по санитарно-показательным микроорганизмам. В пособии отражены нормы санитарного законодательства РФ и методы санитарно-микробиологического контроля качества почвы в отношении ее эпидемической безопасности. Представлен список методов контроля, методических указаний, санитарных правил. Адаптировано для школьников старших классов, студентов биологических специальностей.

Пособие подходит для обучения студентов направлений подготовки 06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование», 19.03.01 «Биотехнология» и 06.03.02 «Почвоведение».

УДК 579.63(075.8)

ББК 28.4я73

ISBN 978-5-7444-5854-6

© ФГАОУ ВО ДВФУ, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
РАЗДЕЛ 1. ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ И НОРМАТИВЫ КАЧЕСТВА ПОЧВЫ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ	7
РАЗДЕЛ 2. МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ.....	11
2.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ	11
2.2. ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	19
2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ	22
2.4. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	27
2.5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	32
2.5.1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре.....	32
2.5.2. Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП).....	33
2.5.3. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий	42
2.5.4. Определение колифагов	43
2.5.5. Определение энтерококков	49
2.5.6. Определение патогенных энтеробактерий родов Salmonella и Shigella.....	52
2.5.7. Определение Clostridium perfringens в почве	52
2.5.8. Показатели биологической активности почвы	54
2.5.9. Определение токсичности почв по отношению к микроорганизмам	57
РАЗДЕЛ 3. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЧВ	60
РАЗДЕЛ 4. ОРГАНИЗАЦИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПОЧВ	61
4.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	62
4.2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОДГОТОВКЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ	64

4.3. ПРАВИЛА ПРИГОТОВЛЕНИЯ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ	68
РАЗДЕЛ 5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	72
РАЗДЕЛ 6. ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	74
РАЗДЕЛ 7. ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ.....	81
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	82

ВВЕДЕНИЕ

Почва представляет собой наиболее насыщенный микроорганизмами биотоп, отличающийся стабильностью состава микрофлоры. На формирование микробных почвенных биоценозов, имеющих в том числе и санитарное значение, на их качественный и количественный состав влияет множество факторов:

- Тип почвы и степень её окультуренности. Чем она выше, тем больше общая микробная обсеменённость. Соответственно, исходный «нормальный» показатель ОМЧ для разных почв различен.
- Физико-химические свойства почвы: структурированность, аэрация, влажность, водопроницаемость, наличие свободного и связанного кислорода.
- Возраст, географическое расположение почвы. В направлении с юга на север содержание органических веществ в ней, а соответственно, и микроорганизмов уменьшается.
- Климатические условия и сезонность. Весной в почве преобладают анаэробные, летом – спорообразующие бактерии. К концу лета увеличивается содержание актиномицетов, усваивающих органические вещества, не утилизированные бактериями. Биологическая активность всех почвенных микроорганизмов увеличивается осенью и заметно снижается в зимний период.
- Глубина почвенного слоя. В толще почвы выделяют три основных горизонта: А (0–10 см), В (10–20 см) и С (20–30 см). На поверхности и в горизонте А микроорганизмов мало вследствие низкой влажности и микробицидного действия прямого солнечного света. В необработанной почве горизонта А их содержание наиболее велико на глубине 5–10 см (то есть в зоне, пограничной с горизонтом В). В обработанной почве микроорганизмов особенно много на границе горизонтов В и С. На глубине 1 м выделяют единичные микроорганизмы. Виды, выделяемые на глубине 4 м и более, рассматривают не как почвенные, а как имеющие геологическое значение.

Целью санитарно-микробиологических исследований почвы является ее гигиеническая оценка с точки зрения инфекционной опасности

для человека. Непосредственная индикация возбудителей заболеваний достоверно свидетельствует о наличии эпидемической ситуации, вскрывает эпидемические связи при массовых заболеваниях, объясняет происхождение вспышек и определяет специфичность последующих противоэпидемических мероприятий.

Опасность загрязнения почв определяется уровнем ее возможного отрицательного влияния на контактирующие среды (вода, воздух), пищевые продукты и прямо или опосредованно на человека, а также на биологическую активность почвы и процессы самоочищения. Бактериологические методы исследования являются прямыми показателями загрязнения почвы хозяйственно-фекальными сточными водами и поэтому нашли самое широкое применение в практике санитарной оценки почв и почвогрунтов.

Основным критерием эпидемической безопасности является отсутствие патогенных микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний. Согласно действующим санитарным правилам по охране почвенного покрова от загрязнения, индикаторными микробиологическими показателями эффективности обеззараживания являются: бактерии группы кишечных палочек, термофильные, нитрифицирующие, общее количество бактерий и *Clostridium perfringens*.

Текущий санитарно-микробиологический контроль над почвами и почвогрунтами наряду с индикацией отдельных патогенных микроорганизмов включает косвенные приемы, в основу которых положены учет общего количества сапрофитных бактерий и определение степени загрязнения экскретами человека и животных по санитарно-показательным микроорганизмам. Динамику развития сапрофитных микроорганизмов используют в качестве косвенного показателя присутствия в почвах легкоусвояемых органических веществ в количествах, которые удастся обнаружить обычными методами санитарно-химического анализа. Надежный контроль потенциальной опасности загрязнения возможен только по санитарно-показательным микроорганизмам, постоянно выделяемым человеком и животными, которые могут стать источником инфекции. Уровень микробного загрязнения нормируется по установленной величине косвенных показателей. Эти нормативы отражены в документах санитарного законодательства.

РАЗДЕЛ 1. ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ И НОРМАТИВЫ КАЧЕСТВА ПОЧВЫ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Программа обследования почвы определяется целями и задачами исследования с учетом санитарно-эпидемического состояния района, уровня и характера техногенной нагрузки, условий землепользования. Гигиенические требования и нормативы качества почвы определяются требованиями СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы» и МУ 2.1.7.730-99 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы», СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В настоящих Методических указаниях приведен полный набор микробиологических показателей и методов их определения, использование которых позволяет дать комплексную санитарно-микробиологическую оценку почвенного покрова. Одни показатели (бактерии группы кишечных палочек, термофильные, нитрифицирующие, общее количество бактерий и *Cl. perfringens*) указывают на степень фекального загрязнения. Изучение состояния почвенного биоценоза по этим показателям и дополнительно по ряду групп и видов почвенной микрофлоры позволяет более глубоко определять изменения в почве, происходящие в результате бактериального, органического и химического загрязнений. Схема санитарно-микробиологического исследования почв по группам методов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Краткий санитарно-микробиологический анализ	Полный санитарно-микробиологический анализ	Методы определения влияния химических веществ на микроорганизмы	Индикация и выделение патогенных микроорганизмов
<ul style="list-style-type: none"> – общее количество бактерий, – бактерии группы кишечной палочки, – термофильные бактерии, нитрифицирующие бактерии, – <i>Clostridium perfringens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – краткий санитарно-микробиологический анализ, – общая численность сапрофитов, – общее число и процент спор, – количество актиномицетов и грибов, – аэробные целлюлозные микроорганизмы, – аммонификаторы, – токсичность почв к микроорганизмам 	<ul style="list-style-type: none"> – постановка опытов по определению влияния химических веществ на отдельные микроорганизмы, – постановка экспериментальных и натуральных опытов и наблюдений, – определение способности микроорганизмов к метаболизму химических веществ 	<ul style="list-style-type: none"> – определение сальмонелл в почве, – индикация и выделение патогенных клостридий, – определение сибиреязвенной палочки, – санитарно-вирусологическое исследование почвы.

Данная схема позволяет оценивать санитарное состояние почвы в 2-х аспектах: загрязнения патогенными энтеробактериями и органическими веществами. Причем исследования, проведенные в ИОКГ им. А.Н. Сысина, Молдавском НИИ гигиены и эпидемиологии и в Киевском НИИ ОКГ им. А.Н. Марзеева, показали, что основной косвенный показатель - численность кишечных палочек - является надежным индикатором фекального загрязнения почвы и при загрязнении ее химическими веществами. Выше изложенное позволяет рекомендовать эту

схему для оценки санитарного состояния почвы независимо от того, загрязнена она химическими веществами или нет.

Косвенные микробиологические показатели не указывают на наличие или отсутствие в почве других возбудителей инфекционных заболеваний (столбняка, сибирской язвы, ботулизма), кишечника и других вирусов, патогенных для человека.

Для выделения или индикации этих патогенных микроорганизмов необходимо проводить специальные исследования с использованием лабораторных животных в крупных бактериологических лабораториях или научных учреждениях. Описание этих методик приводится далее в соответствующих разделах Методических указаний 2.1.7.730-99 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы».

В санитарно-бактериологических лабораториях районных санэпидстанций можно проводить исследование почв на присутствие тифопаратифозных и сальмонеллезных возбудителей. Необходимость в проведении таких анализов возникает при расследовании вспышек, при установлении источника заражения, а также при проведении противоэпидемических мероприятий.

Исследование почвы по полному санитарно-микробиологическому анализу показано при осуществлении предупредительного санитарного надзора при выборе территорий для размещения населенных пунктов, отдельных объектов, ЗПО и др., а также при проведении научных исследований. Проведение анализа почвы по полной схеме позволяет получать наиболее полные данные о степени фекального и органического загрязнения и течении процессов самоочищения.

Определение влияния химических веществ на почвенный биоценоз предусматривает дополнительные исследования, позволяющие дать более быструю характеристику антибактериального действия химических соединений, а также их действия на активность почвенной микрофлоры.

В необходимых случаях, а также по эпидемическим показаниям можно проводить индикацию и выделение из почвы патогенных микроорганизмов, в распространении которых почва играет важную роль.

По степени опасности в санитарно-эпидемиологическом отношении почвы населенных мест могут быть разделены на следующие категории по уровню загрязнения: чистая, допустимая, умеренно опасная, опасная и чрезвычайно опасная.

Степень эпидемической опасности почвы оценивается согласно таблице 2.

Таблица 2

Категория почв	Титры			Индексы		Патогенные бактерии, в т.ч. сальмонеллы	Количество термофильных бактерий в грамме почвы
	Кишечной палочки	Нитрифицирующих бактерий	Сl. perfringens	БГКП	энтерокочков		
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	1-10		0	100-1000
Загрязненная (умеренно опасная)	0,9-0,01	0,09-0,001	0,009-0,0001	10-100		0	1001-100000
Сильно загрязненная (опасная и чрезвычайно опасная)	0,009 и ниже	0,0009 и ниже	0,00009 и ниже	100-1000 и выше		0	100001-4000000

РАЗДЕЛ 2. МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

Гигиеническая оценка почвы населенных мест проводится согласно инструкции 2.1.7.11-12-5-2004. Методы санитарно-микробиологического контроля качества почвы в отношении ее эпидемической безопасности устанавливаются методическими указаниями (МУ 2.1.7.730-99) «Гигиенические требования к качеству почвы населенных мест».

2.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ

Программа обследования почвы определяется целями и задачами исследования с учетом санитарно-эпидемического состояния района, уровня и характера техногенной нагрузки, условий землепользования.

При выборе объектов в первую очередь обследуют почвы территорий повышенного риска воздействия на здоровье населения (детские дошкольные, школьные и лечебные учреждения, селитебные территории, зоны санитарной охраны водоемов, питьевого водоснабжения, земли, занятые под сельхозкультуры, рекреационные зоны и т.д.).

Отбор, транспортирование, хранение, подготовка к анализу и анализ проб осуществляются в соответствии с утвержденными нормативными документами:

- ГОСТ 27593-88 (СТ СЭВ 5298-85) «Почвы. Термины и определения».
- ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82) «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб».
- Методические указания по оценке степени опасности загрязнения почвы химическими веществами. № 4266-87. Утв. МЗ СССР 13.03.87.
- Оценочные показатели санитарного состояния почв населенных мест. № 1739-77. Утв. МЗ СССР 7.07.77.
- Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы. М. 1977. Утв. МЗ СССР № 1446-76 4.08.76.
- ГН 2.1.7.020-94 Гигиенические нормативы. 2.1.7. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана

почвы. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах (Дополнение № 1 к перечню ПДК и ОДК № 6229-91). М. 1995. УТВ. ГКСЭН РФ №13 27.12.94.

Принципиальные положения по отбору проб почвы представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Методологические принципы отбора проб почвы
для оценки санитарного состояния почв (микроорганизмы)**

Характер анализа	Частота отбора проб	Размещение пробных площадок	Необходимое количество пробных площадок	Размер пробных площадок	Количество объединенных проб с одной площадки	Глубина отбора проб, см	Масса объединенной пробы
1	2	3	4	5	6	7	8
бактериологический	не менее 1 раз/год	в местах возможного нахождения людей, животных, загрязнения органическими отходами	на площади 100 м ² одна площадка	25 м	10 из 3-х точечных по 200–250 г каждая	по- слойно о 0–5 5–20	600– 750 г

Контроль за загрязнением почв населенных пунктов проводится с учетом функциональных зон города. Места отбора проб предварительно отмечаются на картосхеме, отражающей структуру городского ландшафта. Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. При неоднородности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа. 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.

При контроле за загрязнением почв промышленными источниками площадки для отбора проб располагают на площади трехкратной величины санитарно-защитной зоны вдоль векторов розы ветров на расстоянии 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 5000 м и более от источника загрязнения (ГОСТ 17.4.4.02-84 «Охрана природы. Почва. Методы отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа»).

Для контроля санитарного состояния почв детских дошкольных, школьных и лечебно-профилактических учреждений, игровых площадок и зон отдыха отбор проб проводят не менее 2 раз в год – весной и осенью. Размер пробной площадки должен быть не более 5х5 м. При контроле санитарного состояния почв территорий детских учреждений и игровых площадок отбор проб проводится отдельно из песочниц и общей территории с глубины 0–10 см.

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

Пробы почвы отбирают либо с игровых территорий каждой группы (одна объединенная из не менее пяти точечных), либо одна объединенная 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.п.) пробные площадки размером не более 5х5 м закладываются на разном расстоянии от источника и в относительно чистом месте (контроль).

При изучении загрязнения почв транспортными магистралями пробные площадки закладываются на придорожных полосах с учетом рельефа местности, растительного покрова, метео- и гидрологических условий. Пробы почвы отбирают с узких полос длиной 200–500 м на

расстоянии 0–10, 10–50, 50–100 м от полотна дороги. Одна смешанная проба составляется из 20–25 точечных, отобранных с глубины 0–10 см.

При оценке почв сельскохозяйственных территорий пробы почвы отбирают 2 раза в год (весна, осень) с глубины 0–25 см. На каждые 0–15 га закладывается не менее одной площадки размером 100–200 м в зависимости от рельефа местности и условий землепользования (26).

Точечные пробы отбирают в соответствии с ГОСТом (ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82) «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб»), с соблюдением стерильности. Объединенную пробу составляют из равных по объему точечных (не менее 5), отобранных на одной площадке. Объединенные пробы должны быть упакованы в чистые полиэтиленовые пакеты, закрыты, маркированы, зарегистрированы в журнале отбора проб и пронумерованы. На каждую пробу составляется сопроводительный талон, вместе с которым проба вкладывается во второй внешний пакет, что обеспечивает целостность и безопасность их транспортирования. Время от отбора проб до начала их исследований не должно превышать 1 суток.

Требования к отбору проб:

1. Отбор проб производит специалист после прохождения инструктажа по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа.

2. Для отбора проб почвы используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов.

3. Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Многоразовая посуда, в т.ч. пробки, должна выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

4. При отборе проб в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для бактериологических исследований. Если отбирают почву после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта

в емкость, предназначенную для отбора проб, вносят до стерилизации натрий серноватисто-кислый в виде кристаллов из расчета 10 мг на 500 мл воды.

5. Пробу отбирают в стерильные емкости. Емкость открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться.

6. Отбор проб проводится с учетом вертикальной структуры, неоднородности покрова почвы, рельефа и климата местности, а также с учетом особенностей загрязняющих веществ или организмов.

7. Отбор проб проводится на пробных площадках, закладываемых так, чтобы исключить искажение результатов анализов под влиянием окружающей среды.

8. При необходимости получения сравнительных результатов пробы незагрязненных и загрязненных почв отбирают в идентичных естественных условиях.

9. При общем загрязнении почв пробные площадки намечают по координатной сетке, указывая их номера и координаты.

9.1. Пробные площадки на почвах, загрязненных предположительно равномерно, намечают по координатной сетке с равными расстояниями.

9.2. Пробные площадки на почвах, загрязненных предположительно неравномерно, намечают по координатной сетке с неравномерными расстояниями между линиями. Расстояния между линиями сетки намечаются с учетом расстояния от источника загрязнения и преобладающего направления ветра.

9.3. При загрязнении почвы патогенными организмами и вирусами, содержащимися в твердых или жидких отходах населенных пунктов или животноводческих комплексов, пробные площадки наносятся на координатную сетку с учетом распределения этих веществ на площади.

9.4. При локальном загрязнении почв для определения пробных площадок применяют систему концентрических окружностей, расположенных на дифференцированных расстояниях от источника загрязнения,

указывая номера окружностей и азимут места отбора проб. В направлении основного распространения загрязняющих веществ систему концентрических окружностей продолжают в виде сегмента, размер которого зависит от степени распространения загрязнения.

10. Пробы отбирают по профилю из почвенных горизонтов или слоев с таким расчетом, чтобы в каждом случае проба представляла собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов или слоев данного типа почвы. При исследовании загрязнений почв сельскохозяйственных угодий патогенными организмами и вирусами пробы отбирают с пахотного горизонта с глубины от 0 до 5 см и от 5 до 20 см.

11. В зависимости от цели исследования размер пробной площадки, количество и вид пробы должны соответствовать указанным в таблице 4.

Таблица 4

Цель исследования	Размер пробной площадки, га		Количество проб
	однородный почвенный покров	неоднородный почвенный покров	
Определение содержания в почве химических веществ	От 1 до 5	От 0,5 до 1	Не менее одной объединенной пробы
Определение физических свойств и структуры почвы	От 1 до 5	От 0,5 до 1	От 3 до 5 точечных проб на один почвенный горизонт
Определение содержания патогенных организмов и вирусов	От 0,1 до 0,5	0,1	10 объединенных проб, состоящих из 3 точечных проб каждая

12. При мощности горизонта или слоя свыше 40 см отбирают отдельно не менее 2 проб с различной глубины. Масса объединенной пробы должна быть не менее 1 кг. Монолиты следует отбирать объемом не менее 100 см³.

13. Пробы для выявления патогенных организмов и вирусов следует отбирать с соблюдением правил асептики, исключающих вторичную контаминацию.

14. 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.

15. Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб почвы с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилии исследователя и другой важной информации.

Хранение и транспортирование проб:

- Доставку проб осуществляют в контейнерах – холодильниках при температуре 4–100С. В холодный период года контейнеры должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При соблюдении указанных условий срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 часов.

- Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2 ч после забора.

- Если не может быть соблюдено время доставки пробы и температура хранения, анализ пробы проводить не следует.

Подготовка проб к анализу проводится в соответствии с видом анализа (ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82) «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб»). В лаборатории проба освобождается от посторонних примесей, доводится до воздушно-сухого состояния, тщательно перемешивается и делится на части для проведения анализа. Отдельно оставляется контрольная часть от каждой анализируемой пробы (около 200 г) и хранится в холодильнике 2 недели на случай арбитража.

Перечень показателей биологического загрязнения почв определяется исходя из: целей и задач исследования; характера землепользования (таблица 5).

Таблица 5

**Объекты наблюдения и основные показатели оценки
санитарного состояния почв населенных мест
(показатели выбраны с учетом ГОСТ 17.4.2.01-81 с изм. № 1
от 1985 г. (СТ СЭВ 4470-84))**

Наименование показателя	Объекты наблюдения (функциональные зоны, территории)						
	Жи- лая зона	Детские дошколь- ные и школьные учреждения, игро- вые площадки, территории дворов	Зоны сани- тарной охраны во- доемов	Рекреационные зоны (скверы, парки, бульвары, пляжи, ле- сопарки)	Транс- портные маги- страли	Про- мыш- ленная зона	Почвы с/х (опытные поля, сады и ого- роды, приусадебные участки, тепличные хозяйства)
Лактозоположи- тельные кишеч- ные палочки (Коли формы)*, индекс	+	+	+	+	+	+	+
Энтерококки (фе- кальные стрепто- кокки), индекс	+	+	+	+	+	+	+
Патогенные мик- роорганизмы (по эпидпоказаниям), индекс	+	+	+	+	+	+	+

* – допускается определение фекальных форм. Знак «+» означает обязательность определения показателя при определении санитарного состояния почв.

2.2. ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Оборудование:

- Термостат для температурного режима $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Термостат для температурного режима $44 \pm 10^{\circ}\text{C}$.
- Термостат или водяная баня для температурного режима $44 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$.
- Водяная баня для температурного режима $75 \pm 50^{\circ}\text{C}$.
- Водяная баня или термостат для температурного режима $45\text{--}490^{\circ}\text{C}$ (для питательных сред).
- Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разрежения $0,5\text{--}1,0$ атм.
- Весы лабораторные общего назначения 4 класса точности, с пределом взвешивания до 1000 г (ГОСТ 24104-80).
- Максимальный термометр ртутный с диапазоном измерения от 20 до 2000°C с ценой деления шкалы 10°C .
- Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 1000°C с ценой деления шкалы $0,50^{\circ}\text{C}$ рН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до $0,01$.
- Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже ГОСТ 6709-72.
- Стерилизатор суховоздушный для температурного режима $(180 \pm 5)^{\circ}\text{C}$.
- Стерилизатор паровой.
- Холодильник бытовой электрический.
- Вытяжной шкаф для работы с хлороформом при проведении анализа на колифаги.
- Нагревательный прибор для варки питательных сред либо магнитные мешалки с подогревом до 3000°C .
- Прибор для счета колоний бактерий.
- Лупа с двукратным увеличением.

- Дозаторы для разлива питательных сред.
- Дозаторы пипеточные.
- Облучатель бактерицидный.
- Оптический стандарт мутности на 10 ед.
- Горелки газовые или спиртовки.
- Петли бактериологические.
- Поплавки бактериологические.
- Пинцеты для работы с мембранными фильтрами.
- Штативы для пробирок.
- Емкости эмалированные.

Расходные материалы:

- Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм и другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества.
- Индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6-8 с интервалом определения 0,2–0,3.
- Фольга алюминиевая, колпачки силиконовые, металлические
- Пипетки вместимостью 1, 5, 10 мл с ценой деления 0,1 мл (много-разового или одноразового использования) (ГОСТ 29227-91).
- Пробирки (многоразового или одноразового использования) (ГОСТ 25336-82).
- Цилиндры вместимостью 100, 250, 500 мл или мензурки вместимостью 250, 500, 1000 мл (ГОСТ 1770-74).
- Чашки бактериологические (Петри) (ГОСТ 23932-90).
- Воронки стеклянные (ГОСТ 25336-82).
- Пробки (силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием).
- Бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76).
- Вата хлопковая медицинская гигроскопическая (ГОСТ 5556-81).
- Марля медицинская (ГОСТ 9412-77).
- Карандаши или фломастеры по стеклу.
- Лейкопластырь.
- Перчатки резиновые.

Химические реактивы:

• Все химические реактивы должны соответствовать квалификации не ниже ч.д.а. (<*> Вещества обладают канцерогенным и мутагенным действием, работа с ними требует соблюдения мер предосторожности.).

- Железо серно-кислое закисное 7-водное (ГОСТ 4148-78).
- Бромтимоловый синий (ТУ 6-09-20-86-77).
- Кислота соляная (ГОСТ 3118-77).
- Натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) 5-водный (ГОСТ 27068-86).
- Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77).
- Натрий гидрат окиси (ГОСТ 4328-77).
- Калий гидрат окиси (ГОСТ 24363-80).
- Спирт этиловый ректифицированный медицинский (ГОСТ 5962-67).
- Спирт этиловый технический (ГОСТ 18300-87).
- Глюкоза (ГОСТ 6038-79).
- Лактоза (ГОСТ 6038-74).
- Натрий сернисто-кислый (сульфит натрия) (ГОСТ 903-76).
- альфа-нафтол <*> (ГОСТ 5838-79).
- Розоловая кислота.
- Фенилендиаминовые соединения <*> (тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлорид, диметил-п-фенилендиамин соляно-кислый).
- Фуксин основной <*> (ТУ 6-09-4119-75).
- Хлороформ технический <*> (ГОСТ 20015-76).
- Стрептомицин стерильный.
- Йод кристаллический (ГОСТ 4159-64).
- Калий йодистый (ГОСТ 4232-65).
- Генциан фиолетовый кристаллический.
- Фенол (ГОСТ 6417-72).

Питательные среды:

- Агар Эндо сухой.
- Агар микробиологический (ГОСТ 17206-84).

- Агар питательный сухой (ТУ 42-14-33-75).
- Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой или среда Гисса с лактозой.
- Сухой питательный бульон.
- Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей (ГОСТ 13805-76).
- Системы индикаторные бумажные (СИБ): СИБ-лактоза и СИБ-оксидаза.

Допускаются к использованию коммерческие питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации производства зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29000. При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Все обезвоженные коммерческие питательные среды и препараты отечественного производства должны иметь сертификат соответствия.

Тест-культуры микроорганизмов

- Контрольный колифаг MS2, штамм ВКПМ-3254 E.coli K12 FRStr получают в ГНИИ Генетика – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ - Россия, 113545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1).
- Штамм E.coli M17-02 и один из штаммов: Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas fluorescens получают в Государственном национальном органе контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Минздрава России (Россия, 121002, г. Москва, ул. Сивцев Вражек, д. 41).

2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

Общие положения:

- Предпочтительно использование стандартизованных сухих питательных сред промышленного производства.

- При использовании промышленных сухих питательных сред их приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке.
- В этом случае следует соблюдать способ применения и срок хранения питательных сред, указанные на упаковках.
- Сухие питательные среды хранят в сухих помещениях, в темноте, при комнатной температуре. Открытые упаковки тщательно закупоривают.
- Среды с измененным внешним видом (уплотненные, с комками), а также с истекшим сроком годности не используют.
- Для приготовления растворов, реактивов и питательных сред применяют воду дистиллированную по ГОСТу 6709-72.
- Питательные среды готовят в посуде из инертного материала.
- Учитывая возможное изменение pH питательных сред после кипячения и стерилизации, окончательный контроль pH проводят в готовой среде при температуре 250С с использованием индикаторной бумаги.
- После стерилизации питательные среды оставляют для охлаждения при комнатной температуре. При необходимости розлива в чашки Петри среды охлаждают до температуры 50–600С.
- Температура сред, хранящихся в холодильнике, перед посевом должна быть доведена до комнатной.

Питательный бульон

- Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.
- Питательный бульон (десятикратный) для колифагов готовят путем увеличения в 10 раз навески сухого препарата, указанной на этикетке.

Питательный агар

- Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.
- Питательный агар для определения колифагов прямым методом готовят, увеличивая навеску сухого препарата в 2 раза от прописи.

- Питательный агар запрещается выдерживать в расплавленном состоянии более 8 ч. Оставшийся неиспользованным агар повторному расплавлению не подлежит.

- Полужидкий питательный агар готовят следующим образом: сухой питательный бульон (15 г) и агар микробиологический (3 г) растворить при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды. Довести рН до 7,0–7,2, разлить в пробирки и стерилизовать автоклавированием при 1210С в течение 15 мин.

- Питательный агар со стрептомицином готовят из расчета содержания 100 мкг стрептомицина на 1 мл питательного агара, приготовленного по стандартной прописи. Стерильно на стерильной дистиллированной воде готовят раствор стрептомицина в концентрации 10 мг на 1 мл. В готовый питательный агар, отмеренный по объему и остуженный до температуры 45–490С, вносят приготовленный стерильный раствор стрептомицина из расчета 0,1 мл на 10 мл питательного агара. Разливают в пробирки для приготовления скошенного агара. Повторное расплавление питательной среды со стрептомицином запрещается.

Фуксин-сульфитная среда Эндо

- Основная модификация. Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить. Срок хранения чашек со средой не более 2–3 суток в темноте, если производителем не оговорены другие сроки.

- Повышение дифференцирующих свойств сред. Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60–700С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды 0,2 мл 5%-ного спиртового раствора основного фуксина. Срок хранения раствора фуксина – не более 1 мес.

- Модификация среды с добавлением розоловой кислоты. В случаях, когда мембранные фильтры зарастают микрофлорой, не относящейся к бактериям кишечной группы, помимо фуксина, допускается добавление на 100 мл среды Эндо 0,2 мл 5%-ного спиртового раствора

розовой кислоты. Срок хранения раствора розовой кислоты – не более 1 мес. Модификацию среды Эндо с добавлением розовой кислоты используют только при работе методом мембранной фильтрации.

Лактозо-пептонная среда

- 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают рН 7,4–7,6, разливают по 10 мл в пробирки, стерилизуют при $112 \pm 20^\circ\text{C}$ 12 мин.

- Для приготовления концентрированной лактозо-пептонной среды все ингредиенты, кроме воды, увеличивают в 10 раз, разливают по 1 мл в пробирки и по 10 мл во флаконы.

Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу до кислоты и газа

Полужидкая среда с лактозой из сухого препарата. Готовят по способу, указанному на этикетке. Срок хранения – не более 2 недель при комнатной температуре. Посев производят уколом до дна пробирки. При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется в соответствии с использованным индикатором. При газообразовании газ скапливается или по уколу, или на поверхности, или в толще среды появляются разрывы. При инкубации посевов более 5 ч газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды «карманы» – потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.

Полужидкая среда с лактозой. Готовят при отсутствии сухого препарата. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4–5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают рН 7,2–7,4, добавляют 1 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при $120 \pm 2^\circ\text{C}$ 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3–5 см и стерилизуют при $112 \pm 2^\circ\text{C}$ 12 мин. Срок хранения – не более 2 недель при комнатной температуре. Правильно приготовленная среда зеленого цвета с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла). При образовании кислоты цвет среды изменяется на желтый.

Лактозо-пептонная среда. Готовят так же как лактозо-пептонная среда с добавлением 1 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего на 1 л и разливают по 3–5 мл в пробирки с поплавком.

СИБ-лактоза. Готовят по прописи завода-изготовителя.

Реактивы для оксидазного теста

Вариант 1. 1%-ный водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорид. Готовят перед употреблением.

Вариант 2.

Реактив N 1. 1%-ный спиртовой раствор альфа-нафтола.

Реактив N 2. 1%-ный водный раствор фенилендиаминового соединения.

Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: 1 – до одного месяца, 2 – до одной недели. Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора. Могут быть использованы коммерческие тест-системы для постановки оксидазного теста (СИБ-оксидаза или аналоги).

Перед работой с каждой серией проб реактивы или тест-системы на оксидазу следует испытывать с тест-культурами микроорганизмов, дающих положительную (*Ps.aeruginosa*, *Ps.fluorescens*) и отрицательную оксидазную реакцию (*E.coli*).

Железосульфитный агар

В 1000 мл стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10г глюкозы, нагревают до растворения, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при $112 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 12 мин. (основная среда).

20%-ный раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) и 8%-ный раствор железа серно-кислого закисного (FeSO_4) или железа хлористого (FeCl_2) готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20%-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8%-ного раствора серно-кислого железа, перемешивают и стерильно разливают в пробирки высоким столбиком 12–15 см для работы методом мембранной фильтрации или во флаконы для работы методом прямого посева.

Реактивы для окраски препаратов по Граму

Карболовый раствор генциана фиолетового готовят следующим образом: 1 г генциана фиолетового, 10 мл ректифицированного этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

Раствор Люголя готовят следующим образом: 1 г йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Хранить во флаконе из темного стекла.

Фуксин Циля готовят следующим образом: 1 г основного фуксина, 10 мл спирта этилового ректифицированного, 54 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

2.4. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Подготовка посуды и материалов.

Лабораторную посуду моют, ополаскивают сначала водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают.

Пробирки, колбы, бутылки, флаконы закрывают силиконовыми или ватно-марлевыми пробками и колпачками (силиконовые, металлические, из фольги или плотной бумаги).

Пипетки со вставленными тампонами из ваты укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу.

Чашки Петри укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации.

Подготовленную посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 160⁰С в течение 2 ч или при 180⁰С 1 ч, считая с момента достижения указанной температуры. Стерильную посуду вынимают из стерилизационного шкафа после его охлаждения ниже 60⁰С. Срок хранения стерильной посуды – не более 10 дней.

Материалы и лабораторную посуду, разрушающиеся при температуре 160–180⁰С (резина и т.п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре 121 ± 2⁰С 20 мин.

Новые резиновые пробки кипятят в 2%-ном растворе натрия двууглекислого 30 мин. и 5 раз промывают водопроводной водой

(кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят в дистиллированной воде 30 мин., высушивают, заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют в паровом стерилизаторе. Резиновые пробки, использованные ранее, обеззараживают, кипятят 30 мин. в водопроводной воде с нейтральным моющим средством, промывают в водопроводной воде, высушивают, монтируют и стерилизуют.

После выполнения анализа все использованные чашки, пробирки и пипетки обеззараживают в автоклаве при $126 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, в исключительных случаях допускается обеззараживание кипячением в 2%-ном растворе пищевой соды или 0,5%-ном растворе моющего средства в течение 60 мин с момента закипания (в закрытой емкости с полным погружением в раствор).

Подготовка проб почвы

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 просеивают 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.

Приготовление почвенной суспензии

Образец почвы тщательно перемешивают и из него отбирают навески, величины которых выбираются исходя из предполагаемой степени загрязнения почвы и планируемых определений (рис. 1). Для учета почвенных микроорганизмов достаточно навески от 1 до 10 г.

В навеску почвы добавляют небольшое количество стерильной водопроводной воды до получения пастообразного состояния почвы, растирая ее в течение 5 минут. Из суспензии делают раститровку. Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде, добавляя к суспензии стерильную водопроводную воду в соотношении 1:9 к весу почвы (например: 1 г почвенной суспензии разводят в 9,0 куб. см стерильной водопроводной воды, 10 г почвы – в 90,0 куб. см 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.

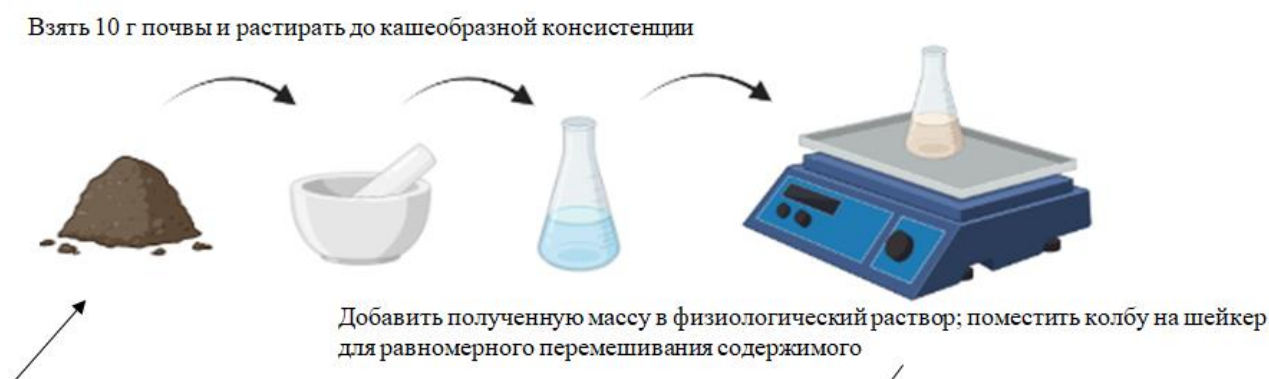


Рис. 1. Приготовление почвенной суспензии

Основными приемами предварительной обработки почвы являются:

- 10-минутное вертикальное встряхивание почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками - при навеске почвы 1 г;
- 3-минутная обработка почвенной суспензии первого разведения на мешалке механического диспергатора – при навеске почвы более 1 г.

Почвенную суспензию, содержащую в 1,0 куб. см 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 куб. см и переносят в пробирку с 9,0 куб. см стерильной водопроводной воды. При этом получают второе разведение, содержащее 0,01 г/куб. см (10(2)) почвы. Повторяя эту операцию, доводят разведение почвы до 0,0001 – 0,00001 г/куб. см. (10(4) – 10(5)). Для приготовления каждого разведения используют отдельные пипетки (рис. 2).

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

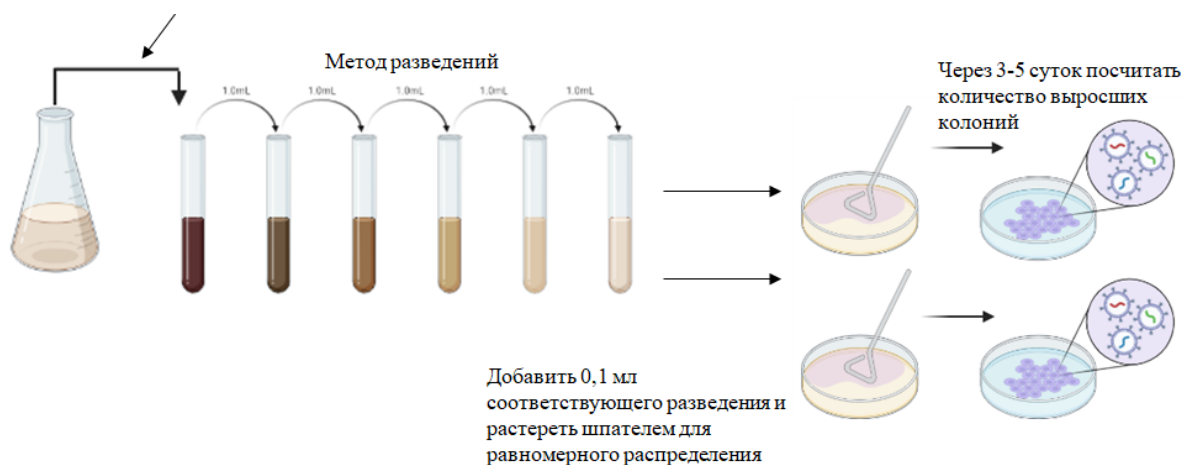


Рис. 2. Приготовление разведений

Подготовка мембранных фильтров.

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 ректифицированным, и фламбируют. После охлаждения на столик фильтровального аппарата кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его воронкой (рис. 3).



Рис. 3. Фильтровальная установка

Фильтрация почвенной суспензии

В воронку прибора для фильтрации наливают отмеренный объем суспензии, затем создают вакуум. При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат без обеззараживания сначала меньшие, а затем большие объемы суспензии, меняя каждый раз фильтры. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают.

Следует начинать с фильтрования проб обеззараженной почвенной суспензии или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы.

При фильтровании 1 мл исследуемой воды следует в воронку налить предварительно не менее 10 мл стерильной воды, а затем внести анализируемую суспензию.

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, разлитую в чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

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

2.5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.5.1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре

Определение понятия показателя. Метод определяет почве общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37⁰С в течение 24 ч, видимые с увеличением в 2 раза.

Выполнение анализа. Из каждой пробы делают посев не менее двух объемов по 1 мл. После тщательного перемешивания почвенной суспензии вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. После внесения суспензии в каждую чашку вливают 8–12 мл (на чашку диаметром 90–100 мм) расплавленного и остуженного до 45–49⁰С питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара. Расплавленный агар на период проведения анализа помещают в водяную баню или термостат, поддерживающие температуру 45–49⁰С. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

Учет результатов. Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 грамме исследуемой почвы. Если на одной из 2 чашек подсчет невозможен, результат выдают на основании учета колоний на одной чашке. Если на двух чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющийся на всю поверхность чашки, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают сектор чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе

отмечают «число КОЕ/г почвы - ориентировочно». Если подсчет колоний на чашках невозможен, то в протоколе отмечают «сплошной рост».

2.5.2. Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП)

Определение понятия показателя. 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, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24–48 ч. Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. 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 разведения суспензии на поверхность среды Эндо. Для исследования используют предварительно подготовленные почвенные суспензии и разведения по описанной выше методике.

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 куб. см на поверхность среды Эндо и немедленно

равномерно распределять по поверхности шпателем. Посев при анализах сравнительно чистых почв производится из разведения 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Следующий этап исследований заключается в идентификации выросших микроорганизмов, который проводится аналогично определению общих колиформных бактерий титрационным методом и подсчету количества колиформных бактерий в 1 г почвы, для чего среднее число колиформных колоний, выросших на чашке, умножается на степень десятикратного разведения.

Титрационный метод определения индекса БГКП (колиформ) в почве

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

Посев меньших количеств (0,01 г, 0,001 г, то есть 10(2), 10(3) и т.д.) делают по 1,0 куб. см из соответствующих разведений почвенной суспензии в пробирки с 9,0 куб. см 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 48 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, через (24 ± 2) ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. Отсутствие газообразования и помутнения через 48 ч 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. 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 предназначен для дифференциации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* от бактерий рода *Pseudomonas* и других видов сапрофитных бактерий. Микроскопирование и постановка оксидазного теста проводится по МУК 4.2.1018-01.

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 куб. см, для подтверждения ферментации лактозы при температуре (37 +/- 1) °С. Учет 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 еще 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 БГКП 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 куб. см 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 (рис. 1) обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом ректифицированным, 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 посеvy при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч. Анализ заканчивают через 24 ч.

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

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 БГКП.

Для подтверждения наличия БГКП 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.

Постановка оксидазного теста

Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2–3 каплями реактива для оксидазного теста. Готовые бумажные системы смачивают дистиллированной водой. Часть изолированной колонии стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин. появляется фиолетово-коричневое или синее окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. При положительном результате эту колонию из дальнейшего исследования исключают.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо пересеять культуру со среды Эндо на питательный агар. После инкубации тест повторяют.

Определение принадлежности к Граму

Из оксидазоотрицательной колонии делается мазок (рис. 2), окрашивается по Граму и микроскопируется. На обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии

и распределяют по поверхности стекла. Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки. На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциана фиолетового на 0,5–1 мин., снимают бумагу, наливают раствор Люголя на 0,5–1 мин., сливают раствор Люголя и стекло промывают в этиловом спирте в течение 0,5–1 мин., пока не перестанет отходить краситель. Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1–2 мин. фуксином Циля, разведенным 1:10 дистиллированной водой. После промывания и просушивания препарата мазок микроскопируют.

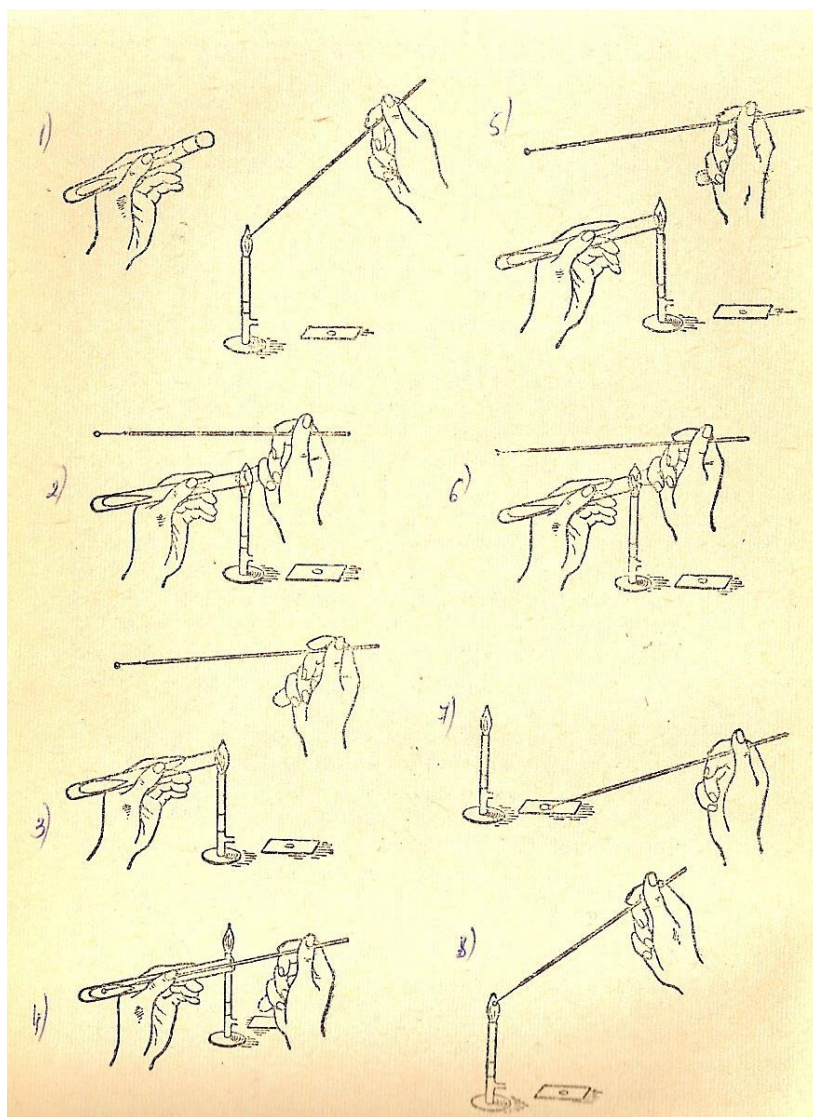


Рис. 4. Схема приготовления препарата для микроскопирования

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные окрашиваются в синий цвет. Колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Окраска по Граму может быть заменена тестом Грегерсена, не требующим использования оптики.

Тест Грегерсена: в капле 3%-ного водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры или колонии к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются – реакция отрицательная.

Определение ферментации лактозы. Оставшуюся часть оксидазоотрицательной грамотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой:

- для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч;
- для подтверждения наличия ТКБ посев осуществляют в среду, предварительно прогретую до температуры $43\text{--}44^{\circ}\text{C}$, и инкубируют при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч.

Первичный учет образования кислоты и газа на подтверждающих полужидких средах и СИБ возможен через 4–6 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами для окончательного учета ТКБ оставляют до 24 ч. Пробирки с посевами для подтверждения наличия ОКБ после просмотра через 24 ч и получения отрицательного результата оставляют для окончательного учета до 48 ч.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, ее пересевают на скошенный питательный агар и после инкубации в течение 18–24 ч выполняют все необходимые подтверждающие тесты.

Постановка подтверждающих тестов при наложении колоний или сплошном росте

Если на части или на всей поверхности фильтра наблюдается наложение колоний или сплошной рост, выполняют оксидазный тест путем помещения мембранного фильтра на кружок фильтровальной

бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом, или на диск СИБ-оксидаза, смоченный дистиллированной водой. При появлении первых признаков реакции, но не более чем через 5 мин., мембранный фильтр переносят обратно на среду Эндо. После четкого проявления реакции определяют результат. При появлении фиолетово-коричневого или синего окрашивания (в зависимости от примененного реактива) оксидазный тест считают положительным.

Если на фильтрах все колонии оксидазоположительные, они не учитываются, и выдают ответ об отсутствии ОКБ и ТКБ и завершают анализ.

При отрицательной оксидазной реакции проводят рассев до получения изолированных колоний и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ.

Учет результатов. Грамотрицательные колонии учитываются как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре 37⁰С с образованием кислоты и газа. Грамотрицательные колонии учитываются как ТКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре 44⁰С с образованием кислоты и газа. При отсутствии общих и термотолерантных колиформных бактерий на всех фильтрах результат записывают «не обнаружено КОЕ ОКБ в 100 мл» и «не обнаружено КОЕ ТКБ в 100 мл». В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний число колониеобразующих единиц ОКБ и ТКБ подсчитывают на всех фильтрах и выражают результат анализа КОЕ в 100 мл воды.

Вычисление проводят по формуле 1:

$a \times 100$

$X = \frac{a \times 100}{V}$,

V

где: X – число колоний в 100 мл; V – профильтрованный объем воды через фильтры, на которых велся учет; а – число подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

Примеры:

1. При посеве 3 фильтров по 100 мл выросло две колонии в 100 мл, на остальных двух фильтрах нет роста. Число общих или термотолерантных колиформных бактерий будет:

$$2 \times 100$$

$$\text{-----} = 0,7 \text{ КОЕ ОКБ (ТКБ) в } 100 \text{ мл.}$$

$$300$$

2. При посеве 10, 40, 100 и 150 мл на фильтрах с профильтрованным объемом 40 мл выросло 4 изолированные колонии, с профильтрованным объемом 100 – 3 ОКБ. Фильтры с объемами 10 мл и 150 мл заросли и учету не подлежат. Суммируют общее число колоний ОКБ (ТКБ) на тех фильтрах, где получены изолированные колонии, и пересчитывают на объем 100 мл.

$$(4 + 3) \times 100$$

$$\text{-----} = 5 \text{ КОЕ в } 100 \text{ мл.}$$

$$(40 + 100)$$

Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то вычисляют числа ОКБ или ТКБ среди колоний этого типа по формуле 2:

$$(a \times c)$$

$$X = \text{-----},$$

$$b$$

где: X – число подтвержденных бактерий одного типа; a – общее число колоний этого типа; b – число проверенных из них; c – число колоний с положительным результатом.

Полученные результаты учета по каждому типу колоний суммируют и далее подсчитывают по формулам 1 и 2. Окончательный результат выдают: количество КОЕ ОКБ в 100 мл, из них количество КОЕ ТКБ в 100 мл. Ориентировочный результат может быть выдан при обнаружении типичных колиформных колоний на среде Эндо, образованных граммотрицательными оксидазоотрицательными бактериями. Окончательный ответ подтверждается по результатам ферментации лактозы.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ и ТКБ выдается качественный результат «обнаружено ОКБ в 100 мл».

Если все колонии на фильтре оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают «зарост фильтров».

В обоих случаях анализ повторяют.

2.5.3. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре $44 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч.

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

Выполнение анализа. Почвенную суспензию, подготовленную по методике, указанной выше, 20 мл прогревают на водяной бане в пробирках при температуре $75 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. для исключения вегетативных форм. Из каждой подготовленной пробы делают посев или фильтруют 20 мл. При необходимости подбирают объемы с таким расчетом, чтобы в посевах (на фильтрах) выросло не более 10–15 колоний. При этом ориентируются на результаты предыдущих исследований.

Определение методом фильтрования в пробирках

Перед посевом пробирки с железосульфитным агаром расплавляют на водяной бане (не кипятить!). В течение посева поддерживают среду нагретой до $70\text{--}80^\circ\text{C}$ в водяной бане. После фильтрования установленного объема суспензии 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 $44 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч.

Определение методом фильтрования в чашках Петри

Чашки Петри диаметром 55–60 мм заливают тонким слоем железосульфитного агара. После фильтрации фильтр поместить фильтрующей поверхностью вниз на застывшую питательную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем заливают расплавленным железосульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы

крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий. Культивируют посевы при $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16–18 ч.

Определение прямым посевом

Готовят железосульфитный агар во флаконах и почвенную суспензию. В стерильные пробирки вносят по 10 мл в 2 пробирки (объемом не менее 30 мл) или по 5 мл в 4 пробирки (объемом по 15 мл).

Посевы заливают горячим железосульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливать по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирку быстро охлаждают, помещая ее в емкость с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16–18 ч.

Учет результатов

Количественному учету подлежат только те посевы, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтрах, так и в толще питательной среды. Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 1 грамме почвы. При отсутствии роста черных колоний на всех фильтрах дают ответ «не обнаружено в 1 грамме почвы». При невозможности учета колоний из-за сливного роста результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в 1 грамме почвы». При необходимости получения количественного результата анализ повторяют.

2.5.4. Определение колифагов

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать *E.coli* и формировать при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ через 18 ± 2 ч зоны лизиса бактериального газона (бляшки) на питательном агаре.

Титрационный метод определения колифагов

Определение колифагов в почве заключается в предварительном накоплении колифагов в среде обогащения на культуре *E.coli* и последующем выявлении зон лизиса (просветления) газона *E.coli* на питательном агаре. Метод предназначен для проведения текущего контроля качества почвы.

Подготовка тест-культуры E.coli K12 Str

На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь, приготовленную следующим образом: культуру E.coli засевают в пробирку со скошенным питательным агаром со стрептомицином. Через 18 ± 2 ч инкубации при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ произвести смыв бактерий с косяка 5 мл стерильного физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl) и по стандарту мутности готовят взвесь E.coli в концентрации 10 бактериальных клеток в 1 мл.

Допускается использование 4-часовой бульонной культуры E.coli, полученной путем подрачивания в термостате при температуре 37°C . Концентрация 10 бактериальных клеток E.coli содержится в 2 мл.

Проведение качественного анализа

В исследуемую пробу почвенной суспензии объемом 100 мл вносят 10 мл 10-кратного питательного бульона и 1 мл подготовленного смыва тест-культуры или 2 мл 4-часовой бульонной культуры.

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий E.coli (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) помещают в чашку Петри и заливают питательным агаром.

Исследуемую пробу почвенной суспензии (100 мл) и чашку Петри с контролем E.coli помещают в термостат и инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч.

После инкубации из исследуемой пробы отливают в пробирку 10 мл и добавляют 1 мл хлороформа.

Пробирку закрывают стерильной резиновой или силиконовой пробкой, энергично встряхивают для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставляют при комнатной температуре не менее 15 мин. До полного осаждения хлороформа.

В предварительно расплавленный и остуженный до $45\text{--}49^{\circ}\text{C}$ питательный агар добавляют приготовленный смыв бактерий E.coli из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

В стерильную чашку Петри пипеткой из пробирки переносят 1 мл обработанной хлороформом пробы (не касаясь хлороформа) и заливают смесью расплавленного и остуженного до $45 - 49^{\circ}\text{C}$ питательного агара объемом 12–15 мл, а также одну дополнительную чашку Петри для

контроля культуры *E.coli* и осторожно покачивают для равномерного перемешивания пробы воды и агара. Для полного застывания чашки оставляют на столе при комнатной температуре на 10 мин. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат на 18 ± 2 ч при 37°C .

При выполнении серии проб ставится общий контроль для всей серии.

Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. Проба считается положительной при наличии полного лизиса, просветления нескольких бляшек, одной бляшки на чашке с пробой воды при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке (рис. 5). При наличии зон лизиса в контроле культуры результат считается недействительным.

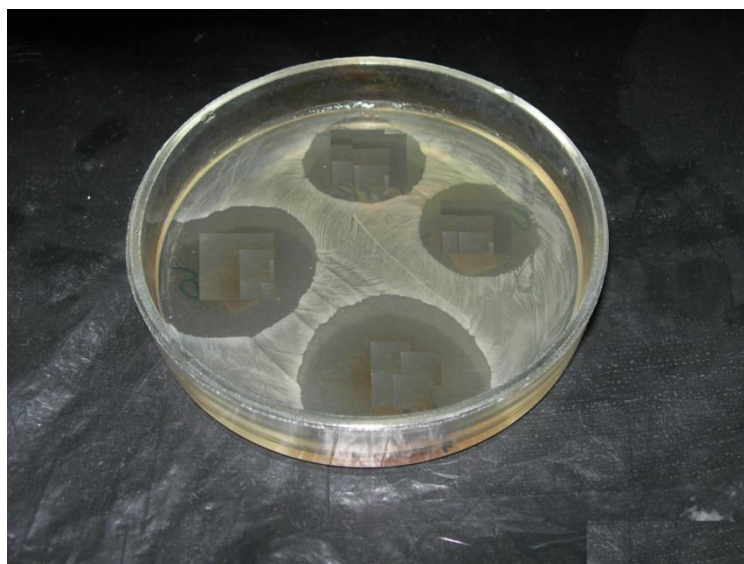


Рис. 5. Зоны лизиса бактерий на питательном агаре

Проведение количественного анализа

Исследуемую пробу почвенной суспензии в количестве 100 мл разлить на 6 объемов: 1 флакон 50 мл и 5 пробирок по 10 мл. В 50 мл пробы добавить 5 мл десятикратного питательного бульона и 0,5 мл смыва (или 1 мл 4-часовой бульонной культуры) бактерий *E.coli*. В каждые 10 мл пробы внести по 1 мл десятикратного питательного бульона и 0,1 мл смыва (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) бактерий *E.coli*.

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) *E.coli* помещают в чашку Петри и заливают питательным агаром.

Посевы инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч.

После инкубации из объема 50 мл отлить в пробирку 10 мл. Во все исследуемые 6 объемов добавить по 1 мл хлороформа. Пробирки закрыть стерильными резиновыми или силиконовыми пробками, энергично встряхнуть для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставить при комнатной температуре не менее 15 мин. для осаждения хлороформа.

В предварительно расплавленный и остуженный до $45\text{--}49^{\circ}\text{C}$ питательный агар добавить приготовленный смыв бактерий *E.coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара. Приготовленную смесь разлить в чашки Петри: 1 чашку для контроля культуры *E.coli* на лизогенность и по одной чашке на каждую исследуемую пробу воды. При одновременном анализе нескольких проб ставится один контроль культуры *E.coli*.

После застывания агара чашки, предназначенные для посева проб, разделить на 6 секторов, промаркировать их в соответствии с исследуемыми объемами. На каждый сектор из соответствующей пробирки нанести пастеровской пипеткой (микропипеткой или бактериологической петлей продольным штрихом) по 1 капле надосадочной жидкости (без хлороформа).

После подсыхания капель чашки с исследуемыми пробами и контрольную чашку поместить в термостат при $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ на 18 ± 2 ч.

Просмотр результатов осуществляется в проходящем свете.

Учет проводится по наличию зон просветления (лизиса) на секторах газона *E.coli*.

При применении капельного способа посева пипеткой образуется зона лизиса в виде округлого пятна или отдельных бляшек. При посеве продольным штрихом бактериологической петлей отмечается лизис по ходу штриха.

Проба считается положительной при наличии зоны лизиса хотя бы на одном секторе при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат считать недействительным.

Прямой метод определения колифагов

Определение колифагов в почве заключается в исследовании нормируемого объема почвы путем его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на газоне *E.coli* в чашках Петри с питательным агаром. Прямой метод выделения колифагов из почвы проводят параллельно с титрационным при исследованиях по эпидемическим показаниям.

Проведение анализа

В питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45–49⁰С, добавить смыв *E.coli* из расчета 2,0 мл смыва (или 4 мл 4-часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара, перемешать. Исследуемые 100 мл почвенной суспензии разлить по 20 мл в большие пробирки, нагреть до 35–44⁰С и немедленно (не более чем через 5 мин. по достижении требуемой температуры) разлить в 5 чашек Петри и сразу же внести в каждую чашку по 20 мл смеси агара с культурой *E.coli*.

Для контроля культуры *E.coli* в одну чашку Петри внести 20 мл стерильной водопроводной воды, предварительно прогретой до 35–44⁰С, залить 20 мл приготовленного агара с *E.coli* и осторожно перемешать. Содержимое чашек осторожно перемешать и оставить при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром поместить дном вверх в термостат и инкубировать при температуре 37 ± 1⁰С в течение 18 ± 2 ч.

Просмотр посевов осуществляется в проходящем свете.

Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5 чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

Наиболее часто зоны лизиса выглядят прозрачными пятнами на фоне газона тест-культуры питательного агара в виде круглых изолированных бляшек от 1 до 5–7 мм в диаметре с четко выраженными либо стертыми границами.

При высоких концентрациях фага наблюдается разная картина лизиса.

Слияние негативных колоний дает «ажурный» газон *E.coli*, рост единичных колоний *E.coli* на фоне сплошного лизиса либо полное отсутствие роста на чашке.

При прямом посеве возможен лизис, маскируемый неомогенно застывшим агаром, а также закрытый сопутствующей микрофлорой. Капли конденсата и неомогенно застывший при прямом посеве агар могут приводить к образованию артефактов на газоне *E.coli*, визуально напоминающих лизис.

Предварительный учет результатов можно проводить через 5–6 ч инкубации. На этом этапе при наличии четких зон лизиса может быть выдан предварительный ответ о присутствии колифагов в воде.

Окончательный количественный учет прямого посева проводится через 18 ± 2 ч. Результаты выражают количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 10 грамм почвы.

Если отмечен сливной рост бляшек и счет затруднителен, то по данным прямого посева может быть выдан качественный результат: «обнаружено в 10 г почвы».

При получении отрицательного результата при работе прямым методом окончательный ответ выдается по результатам титрационного метода.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат исследования считается недействительным.

Постановка контролей

Отрицательный контроль подтверждает отсутствие контаминации фагом питательных сред, лабораторной посуды, оборудования на этапах подготовки и проведения анализа, а также позволяет оценить способность тест-культуры *E.coli* давать равномерный газон.

Отрицательным контролем служит исследование стерильной водопроводной воды, проводимое аналогично анализируемой пробе воды. Так, при анализе воды титрационным методом 10 мл стерильной водопроводной воды вносят в дополнительную пробирку. При анализе воды прямым посевом в дополнительную шестую чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды.

Дополнительные посевы исследуются на колифаги аналогично основным пробам.

При анализе серии проб отрицательный контроль может быть один на каждый вид анализа: титрационный и прямой. В этом случае постановка отрицательного контроля поэтапно осуществляется после обработки всех проб данной серии.

В случае обнаружения бляшек колифагов в чашках с отрицательным контролем результаты исследования всей серии проб воды недействительны.

Следует проверить стерильность лабораторного оборудования, посуды, питательных сред, а также повторить контрольный посев на чистоту тест-штамма *E.coli* K12 F Str .

Кратность проведения отрицательного контроля – 1 раз в день.

Методика подтверждения фаговой природы лизиса

В сомнительных случаях при работе как титрационным, так и прямым методом необходимо провести контрольный посев на подтверждение фаговой природы лизиса.

С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара, подозрительный на колифаги, помещают его в 5 мл питательного бульона, куда добавляют каплю тест-культуры *E.coli* и инкубируют при 37⁰С в течение 16–18 ч. Полученную культуру обрабатывают хлороформом и исследуют на наличие фага. Высев осуществляют петлей или пипеткой на сектора питательного агара. Лизис на любом из секторов расценивается как подтверждение наличия фага.

2.5.5. 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 куб. см и засевают во флаконы с 50 куб. см жидкой среды (ЛПС или ЩЭС). Посевы инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 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 $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в качестве положительных результатов отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых с металлическим блеском или сероватых, мелких колоний. Эта среда позволяет дифференцировать виды энтерококков: *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 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 $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 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 бледноокрашенные 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%-ной 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%-ной 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 нечетко 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 которых велся подсчет.

2.5.6. Определение патогенных энтеробактерий родов *Salmonella* и *Shigella*

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, магниевую среду, тетрациклиновый бульон. Для сальмонелл используют любые две среды из четырех, для шигелл – селенитовую среду.

Проведение исследования аналогично исследованию на колиформы.

Посевы инкубируют при (37 ± 1 °C) в течение 18–24 часов, затем из каждого флакона делают высевы бактериологической петлей 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 °C) в течение 18–20 часов, а в случае отсутствия роста чашки с посевами оставляют еще на 24 часа в термостате. 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».

2.5.7. Определение *Clostridium perfringens* в почве

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре (44 ± 1) °C в течение (16–18) ч.

Принцип метода

Метод основан на выращивании посевов в железосульфитном 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 $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 20 минут для исключения вегетативных форм, по 1,0 куб. см переносится в два параллельных ряда пробирок. Затем во все пробирки наливают по 9–10 куб. см горячего железосульфитного агара, приготовленного *ex tempore* и прогретого до 70–80 °C (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 $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16–18 часов. При росте в среде черных крупных колоний (грамположительные, каталазоотрицательные) выдают положительный ответ о присутствии *C. perfringens* в 1 г почвы.

Определение методом фильтрации в пробирках

Перед посевом пробирки с железосульфитным агаром расплавляют на водяной бане (не кипятить!). В течение посева поддерживают среду нагретой до (70–80) °C в водяной бане.

После фильтрации 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 $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16–18) ч.

Определение методом фильтрации в чашках Петри

Чашки Петри заливают тонким слоем железосульфитного агара 4,0–5,0 куб. см. После фильтрации фильтр помещают фильтрующей поверхностью вниз на застывшую питательную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем заливают расплавленным железосульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы крышка

плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий. Культивируют посеvy при $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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.

2.5.8. Показатели биологической активности почвы

Основными интегральными показателями биологической активности являются: общая микробная численность (ОМЧ), определение актиномицетов, аммонификаторов, нитрификаторов 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 5–7 $^\circ\text{C}$ в течение 20–30 мин., затем производят раститровку суспензии обычным способом. Из каждого разведения делают посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,2 куб. см на поверхность почвенного агар, разлитого в стерильные чашки Петри, и равномерно шпателем растирают по всей поверхности чашки. Термостатирование засеянных чашек ведут при (28–30) $^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Учет результата: количество колоний на обеих чашках суммируют, делят на два и умножают на степень разведения. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).

Определение количества актиномицетов и грибов в почве

Актиномицеты (греч. Actis — луч, micos — гриб) — одноклеточные микроорганизмы, тело состоит из нетитрованного мицелия, который имеет вид ветвящихся тонких 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 °С (оптимальная температура 35–37 °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 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, веретенообразная, 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 рассматриваться как отрицательное явление. Актиномицетам и грибам принадлежит большая роль в превращении широкого круга органических и минеральных веществ. Благодаря чрезвычайно выраженным антагонистическим 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 куб. см 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. Прибавлением такого количества кислоты доводят рН среды до 4,0–4,5. Кислота добавляется непосредственно перед посевом в расплавленную среду. Поскольку прибавляют концентрированные кислоты, то их предварительно не стерилизуют.

Определение аммонификаторов в почве

Аммонифицирующие микроорганизмы принимают участие в расщеплении 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 определения выделяющегося аммиака над средой в пробирке подвешивают красную лакмусовую бумажку (при выделении аммиака она синее) или полоски фильтровальной бумаги, пропитанные реактивом Круппа (от аммиака краснеют). При выращивании почвенных суспензий на мясо-пептонном агаре результаты выражают в КОЕ (колониеобразующих единицах) на 1 г 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.

2.5.9. 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 вносится 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 переносят в бокс и устанавливают на ровной поверхности. Чашки с почвой заливают 1,5%-ным непитательным агаром в количестве около 10,0 куб. см с таким расчетом, чтобы он покрыл слой почвы. После его застывания в чашки вносится питательный агар также в количестве 10 куб. см, 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 распределяется 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 1 мл 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 наливают 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 анаэроостате при оптимальной температуре и продолжительности в зависимости от физиологических особенностей индикаторного штамма.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент пророста (Р) высчитывается как количество образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: $T = 100 - P$. 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.

РАЗДЕЛ 3. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЧВ

Рекомендации об использовании почв обуславливаются степенью их химического, бактериологического, паразитологического и энтомологического загрязнения (таблица 6).

Таблица 6

Рекомендации по использованию почв в зависимости от степени их загрязнения

Категории загрязне- ния почв	Рекомендации по использованию почв
Чистая	Использование без ограничений
Допусти- мая	Использование без ограничений, исключая объекты повышенного риска
Умеренно опасная	Использование в ходе строительных работ под отсыпки котлованов и выемок, на участках озеленения с подсыпкой слоя чистого грунта не менее 0,2 м
Опасная	Ограниченное использование под отсыпки выемок и котлованов с перекрытием слоем чистого грунта не менее 0,5 м. При наличии эпидемиологической опасности – использование после проведения дезинфекции (дезинвазии) по предписанию органов госсанэпидслужбы с последующим лабораторным контролем
Чрезвы- чайно опасная	Вывоз и утилизация на специализированных полигонах. При наличии эпидемиологической опасности – использование после проведения дезинфекции (дезинвазии) по предписанию органов госсанэпидслужбы с последующим лабораторным контролем

Мероприятия по рекультивации территории, загрязненной возбудителями особо опасных инфекций, разрабатываются в каждом конкретном случае в соответствии с нормативными документами по согласованию с органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

РАЗДЕЛ 4. ОРГАНИЗАЦИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПОЧВ

Контроль качества почв проводится на всех стадиях проектирования и строительства. Полнота и объем исследований зависят от стадии проектирования и строительства.

На стадии разработки предпроектной документации и выбора земельного участка допускается исследование почв с использованием сокращенного перечня показателей.

На стадии выбора земельного участка и выполнения проектных работ, а также строительства и приемки объекта в эксплуатацию контроль осуществляется с использованием стандартного перечня показателей.

Стандартный перечень химических показателей включает определение содержания: – тяжелых металлов: свинец, кадмий, цинк, медь, никель, мышьяк, ртуть; – 3,4-бензапирена и нефтепродуктов; – pH; – суммарный показатель загрязнения.

Контроль с использованием расширенного перечня санитарно-эпидемиологических показателей (приложение 3) проводится на объектах повышенного риска, на остальных - по стандартному перечню показателей. Стандартный перечень может быть расширен с учетом санитарно-эпидемиологической ситуации и хозяйственного освоения территории.

После ввода объекта в эксплуатацию заказчик обязан обеспечить проведение лабораторных исследований качества почвы объектов повышенного риска, что должно быть отражено в санитарно-эпидемиологическом заключении.

Мониторинг состояния почвы осуществляется в жилых зонах, включая территории повышенного риска, в зоне влияния автотранспорта, захороненных промышленных отходов (почва территорий, прилегающих к полигонам), в местах временного складирования промышленных и бытовых отходов, на территории сельскохозяйственных угодий, санитарнозащитных зон. Объем исследований и перечень изучаемых показателей при мониторинге определяются в каждом конкретном

случае с учетом целей и задач по согласованию с органами и учреждениями, осуществляющими государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

Мониторинг проводится с учетом результатов исследований на всех предыдущих стадиях проектирования, строительства, а также по окончании строительства объекта, при вводе его в эксплуатацию и на протяжении всего его эксплуатационного периода.

Отбор проб почвы регламентируется государственными стандартами по общим требованиям к отбору проб, методам отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа и методическими указаниями по гигиенической оценке качества почвы населенных мест.

Все исследования по оценке качества почвы должны проводиться в лабораториях, аккредитованных в установленном порядке.

Определение содержания химических загрязняющих веществ в почвах проводится методами, использованными при обосновании ПДК (ОДК), или другими методами, метрологически аттестованными, включенными в государственный реестр методик.

Определение паразитологических показателей в почве проводится в соответствии с действующими методическими указаниями по методам санитарно-паразитологических исследований.

Количество точек отбора проб зависит от площади участка строительства, глубины строительства объекта или заложения инженерных коммуникаций, стадий выполнения проектных и строительных работ.

4.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Ведущим аспектом деятельности современной лаборатории является разработка Системы качества и обеспечение ее функционирования. Система качества – это совокупность организационной структуры, методик, процессов и ресурсов, необходимых для осуществления общего руководства качеством (ISO 8401:1994-04-01). Система качества охватывает широкий спектр позиций, начиная от нормативно-методической документации, всесторонне регламентирующей деятельность лаборатории, ее планировки и технического оснащения,

квалификации, численности и расстановки кадров до организации внутреннего контроля качества выполняемых анализов.

Согласно МУ 2.1.4.682-97 по внедрению и применению СанПиН 2.1.4.559-96 внутри лабораторный (внутренний) контроль качества является обязательным звеном в обеспечении качества исследований. Внутренний контроль качества микробиологических исследований – это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий развития искомого микроорганизма, а также предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата.

Особенностью санитарно-микробиологических исследований является необходимость количественной оценки полученного результата. Специфика объекта микробиологических исследований, живого микроорганизма, обладающего индивидуальными (родовыми, видовыми, штаммовыми) свойствами и особенностями жизнедеятельности, создает не зависящие от исследователя проблемы в оценке точности количественного результата и обуславливает погрешность микробиологических методов, достигающую сотен процентов.

К наиболее значимым объективным факторам, влияющим на результат анализа, относятся следующие:

- неравномерность распределения микроорганизмов, обуславливающая разброс данных при анализе двух одинаковых объемов одной пробы;
- способность адсорбироваться на взвешенных веществах с образованием трудноразделимых в процессе взбалтывания комплексов, которые при посевах могут регистрироваться как один микроорганизм;
- влияние сопутствующих микробов-антагонистов, тормозящих развитие искомым микроорганизмов при их наличии в анализируемой пробе;
- возможное присутствие в исследуемой пробе посторонних химических веществ либо образование их соединений с компонентами питательной среды, которые могут угнетать (стимулировать) рост исследуемых микроорганизмов, а также влиять на изменение видовых биохимических идентификационных признаков;

– нахождение микроорганизма в «стрессовом» состоянии под воздействием неблагоприятных условий среды, в результате которого затормаживается его способность к развитию.

Исходя из этого основной задачей микробиологических исследований является создание оптимальных условий для развития выделяемого микроорганизма в целях получения надежных, сопоставимых количественных результатов.

Организация внутреннего контроля качества на всех этапах выполнения микробиологического анализа воды является основой получения качественного результата.

Основные направления организации внутреннего контроля качества:

1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.).

2. Выполнение регламентированных процедур ведения тестовых культур.

3. Контроль качества питательных сред.

4. Контроль качества мембранных фильтров.

5. Контроль качества дистиллированной воды.

6. Оценка достоверности качественного результата путем использования заведомо положительных и отрицательных контролей.

7. Оценка доверительных границ полученного количественного результата.

8. Систематический анализ результатов контрольных процедур в целях совершенствования руководства по качеству.

4.2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОДГОТОВКЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Одним из факторов, оказывающих влияние на результаты проводимых исследований, является недостаточная чистота посуды.

Вся лабораторная посуда, вышедшая после проведения исследования (чашки, колбы, пробирки со средами), помещается в специальные биксы или ведра с крышками и обеззараживается автоклавированием

при 126⁰С в течение 60 мин. или 132⁰С в течение 20 мин. Категорически запрещается освобождать использованную посуду от содержимого (питательных сред, растворов с посевами) до обеззараживания.

В исключительных случаях допускается обеззараживание кипячением в 2%-ном растворе пищевой соды или 0,5%-ном растворе нейтрального моющего средства в течение 60 мин. с момента закипания. Кипячение должно происходить в закрытой емкости с полным погружением в раствор.

Отработанные пипетки обеззараживают в высоком сосуде с полным погружением в дезраствор. Продолжительность обеззараживания зависит от применяемого дезсредства.

При выборе методов обеззараживания необходимо руководствоваться санитарными правилами СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами». Допускаются также к использованию новые дезинфекционные средства, получившие разрешение Минздрава России на применение. В этих случаях следует руководствоваться рекомендациями производителя.

Для мытья посуды необходимо применять нейтральные моющие средства, лучше всего применять жидкое моющее средство «Прогресс». Допустимо также использовать с этой целью нейтральные синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок (например, «Лотос», «Кристалл», «Эра»).

Схема мытья посуды для исследования воды

Для облегчения процесса мытья посуды после автоклавирования обеззараженную посуду следует замочить в 1%-ном растворе моющего средства «Прогресс» в горячей воде на 1–2 часа. Всю посуду тщательно промыть с помощью ершей и щеток. Отполоснуть от моющего средства в проточной водопроводной воде (8–10 раз при использовании моющего средства «Прогресс» и до 15 раз при использовании других порошков). Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3–4 раза. Высушить при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре 80–100⁰С.

Перед мытьем обеззараженных пипеток удаляют «ватики», промывают водопроводной водой под давлением и кипятят в 1%-ном

растворе бикарбоната натрия в течение 45 мин., многократно промывают водопроводной, затем дистиллированной водой. Высушивают, вставляют «ватики» и стерилизуют в суховоздушном стерилизаторе в завернутом виде или пенале.

Обработка новой посуды

Новую посуду, предназначенную для бактериологических исследований, моют в 0,5%-ном растворе моющего средства, ополаскивают проточной водопроводной водой и кипятят в течение 15–20 мин. в 1–2%-ном растворе соляной кислоты, затем ополаскивают дистиллированной водой.

Проверка качества мытья лабораторной посуды

При обработке и мытье стеклянной лабораторной посуды используются моющие и дезинфицирующие средства, содержащие вещества, которые могут влиять на рост микроорганизмов. Контроль на наличие остаточных количеств моющих средств имеет важное значение.

Контроль чистоты мытья лабораторной посуды осуществляют путем визуального наблюдения и выборочного проведения тестов.

Стекло вымытой и высушенной посуды должно быть прозрачным, без подтеков, пятен и посторонних включений. При ополаскивании вымытой посуды вода стекает равномерно со стенок флаконов, пробирок, по поверхности чашек и пр.

Качество удаления синтетических моющих и моюще-дезинфицирующих средств оценивают по величине рН. Для этих целей используют рН-индикаторную бумагу с шагом измерительного диапазона не более 0,3 ед. Предварительно определяют рН воды, применяемой для ополаскивания посуды на конечном этапе. Контрольные измерения рН проводят путем прикладывания рН-индикаторной бумаги к поверхности вымытого мокрого стекла, прошедшего обработку. Для контроля произвольно выбирают 3–10 ед. посуды. Значение рН воды, полученной в результате контроля, должно соответствовать рН дистиллированной воды, примененной для ополаскивания.

Наличие остаточных жировых загрязнений может быть определено с помощью реактива, содержащего Судан III. Для этого внутреннюю поверхность вымытой и высушенной посуды смачивают 3–5 мл

красящего раствора, распределяют его по исследуемой поверхности в течение 10 с, затем быстро смывают обильной струей воды. На внутренней поверхности посуды не должно оставаться желтых пятен и подтеков.

Приготовление красящего раствора: в 70 мл нагретого до 60°C 90%-ного этилового спирта растворяют по 0,2 г измельченной краски Судан III и метилового синего, затем добавляют 10 мл 20 - 25%-ного раствора аммиака, 20 мл дистиллированной воды и взбалтывают. Раствор годен в течение 6 месяцев.

Подготовка посуды к использованию

Лабораторную посуду (флаконы, пробирки, бутылки, колбы) закрывают силиконовыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный (из фольги) колпачок. Бумажный колпачок обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом.

Чашки Петри, пипетки стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах.

При использовании специальной лабораторной посуды и расходных материалов (флаконов с завинчивающимися пробками, металлических или силиконовых колпачков, выдерживающих автоклавирование, микробиологических пробок многократного использования и других материалов) следует руководствоваться рекомендациями производителя.

Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют сухим жаром в сушильном шкафу при 160°C – в течение 2 часов, 180°C – в течение 60 мин. или паром в автоклаве при 1 атм., 121°C – в течение 30 мин. С последующим подсушиванием в сушильном шкафу при отсутствии вакуумной сушки в автоклаве.

После стерилизации посуду хранят до использования в закрытом шкафу или ящиках с крышками не более 10 суток при ненарушенной упаковке или невскрытом пенале.

Пробирки и другую лабораторную посуду до стерилизации следует хранить в чистых коробках или ящиках столов, выложенных чистой фильтровальной бумагой. Сверху подготовленную посуду также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и случайной грязи.

Вымытые предметные стекла вытирают чистой салфеткой и помещают в склянку с притертой пробкой со смесью Никифорова (смесь этилового спирта и эфира в соотношении 1:1).

Обработка резиновых пробок

Новые пробки кипятят 30 мин. в 2%-ном растворе бикарбоната натрия, многократно промывают горячей проточной водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят 30 мин. в дистиллированной воде, промывают и высушивают.

Пробки, бывшие в употреблении, после кипячения в 2%-ном растворе бикарбоната натрия ополаскивают проточной водопроводной водой, кипятят 30 мин. в дистиллированной воде, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают.

Резиновые пробки для флаконов заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют автоклавированием.

Раздел составлен на основании:

- СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами»;
- МУК 4.2.577-96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского питания и лечебного, их компонентов»;
- Инструкции по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности, 1987;
- ГОСТа 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы». МЗ, 1985;
- Приказа МЗ РФ N 309 «Об утверждении Инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)»;
- XI Государственной фармакопей СССР. Вып. 2, 1990.

4.3. ПРАВИЛА ПРИГОТОВЛЕНИЯ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

Разведением для микробиологических исследований служит раствор или суспензия исследуемого образца, смешанные с девятикратным количеством жидкости для разведения - разбавителем.

Приготовление разведений необходимо:

- при исследовании загрязненных проб в целях снижения количества микроорганизмов на единицу объема, для обеспечения возможности наблюдения за их ростом или подсчетом колоний;

– для постановки исследований, требующих количественного учета используемых модельных микроорганизмов, например при количественной оценке качества питательных сред, мембранных фильтров и т.д.

Приемлемое для учета число микроорганизмов составляет:

– для метода подсчета колоний на чашках Петри (90–100 мм) – от 15 до 300;

– для учета колоний на фильтре (47–50 мм) - от 15 до 100 колоний;

– для учета колоний на фильтре (35 мм) – от 15 до 60 колоний.

Важным моментом в процедуре приготовления разведений является равномерность распределения внесенных микроорганизмов по объему разбавителя. Равномерность распределения достигается тщательным перемешиванием полученной смеси. Достичь более качественных результатов позволяет использование специальных приборов – встряхивателей.

В процессе приготовления разведений каждый образец с помощью прибора тщательно взбалтывают в течение 5–10 с. Частоту вращения подбирают так, чтобы жидкость, которая образует воронку, не доходила до края пробирки на 2–3 см.

Разбавители

В качестве разбавителей при приготовлении разведений используют:

Пептонно-солевой разбавитель:

Пептон 1,0 г

Натрий хлористый 8,5 г

Дистиллированная вода 1000 мл

Физиологический раствор:

Натрий хлористый 8,5 г

Дистиллированная вода 1000 мл.

Для приготовления разбавителя указанные компоненты растворяют в воде, при необходимости с подогреванием. Доводят рН так, чтобы после стерилизации он был равен 7,0 +/- 0,2 при 25⁰С. Разливают

разбавитель во флаконы. Стерилизуют при 121⁰С в течение 20 мин. Помимо перечисленных выше разбавителей, для приготовления разведений исследуемой воды допускается применение стерильной водопроводной воды.

Методика выполнения разведений исследуемой пробы

Разведения исследуемого образца следует готовить непосредственно перед анализом и использовать для инокуляции не позже 30 мин. с момента приготовления. В стерильные пробирки, количество которых соответствует выбранной степени разбавления исследуемой пробы, асептически вносят по 9 мл разбавителя. В первую из пробирок, содержащих 9 мл разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, пипеткой вносят 1 мл хорошо перемешанной пробы, тщательно встряхивают или перемешивают пипетированием.

Приготовленное первое разведение (10) содержит в 1 мл суспензии 0,1 мл исходного образца. В следующую (вторую) пробирку, также содержащую 9 мл разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, новой пипеткой вносят 1 мл хорошо перемешанного первого разведения исследуемой пробы. Смесь тщательно встряхивают или перемешивают пипетированием. Второе разведение (10) в 1 мл суспензии содержит 0,01 мл исходного образца.

Процедуру приготовления разведений продолжают по описанной схеме до получения суспензии с необходимой концентрацией исходного образца.

Методика приготовления суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов

Приготовление суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов осуществляют с использованием оптического стандарта мутности, соответствующего 0,9–1 млрд. микробных клеток/мл.

В стерильную стандартную пробирку, прилагаемую к стандарту, вносят 3–4 мл разбавителя. Агаровую культуру тестового микроорганизма петлей переносят в пробирку и растирают по внутренней поверхности пробирки, постепенно смешивая с содержащимся в ней разбавителем.

Возможно приготовление бактериальной взвеси методом смыва выросшей культуры со скошенного агара 5 мл разбавителя.

Полученную взвесь микроорганизмов интенсивно встряхивают, добиваясь полного и равномерного распределения клеток. Мутность полученной взвеси сравнивают с мутностью оптического стандарта, который также предварительно тщательно встряхивают.

При визуальном несоответствии мутности приготовленной суспензии стандарту ее доводят либо добавлением агаровой культуры, либо добавлением разбавителя. После каждого вносимого изменения суспензию тщательно встряхивают.

При совпадении мутности приготовленной суспензии и мутности оптического стандарта считается, что концентрация клеток тестовой культуры в данной суспензии примерно соответствует значению, указанному для данного стандарта ($0,9 - 1 \times 10$ кл/мл).

Для получения суспензии с нужной концентрацией тестового микроорганизма выполняют серийные разведения полученной стандартной суспензии описанным выше способом.

Для контроля правильности приготовления суспензии, правильности выполнения разведений и расчета заражающей дозы проводят контрольный высеv.

Раздел составлен на основе:

ISO 6887-1983 «Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований».

РАЗДЕЛ 5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Биологическое загрязнение почв – составная часть органического загрязнения, обусловленного диссеминацией возбудителей инфекционных и инвазионных болезней, а также вредными насекомыми и клещами, переносчиками возбудителей болезней человека, животных и растений.

Бокс (боксированное помещение) – изолированное помещение с тамбуром (предбоксником).

Бокс биологической безопасности (ламинарное укрытие, ламинарный шкаф) – конструкция, используемая для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды.

Запас рабочей культуры – культура эталонного штамма в условиях временного хранения (полужидкий агар, 4–8⁰С).

Запас эталонной культуры – культура эталонного штамма в условиях длительного хранения (-70⁰С, жидкий азот).

Культура для целевого использования – культура эталонного штамма, прошедшая не более 2 пассажей после высева со среды временного хранения (из запасов рабочей культуры), предназначенная для использования в анализе.

Лиофилизированная культура – лиофильно высушенная культура эталонного штамма.

Патогенные биологические агенты (ПБА) – патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, хламидии, риккетсии, простейшие, грибы, микоплазмы), генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также материал, подозрительный на содержание перечисленных агентов (включая кровь, другие биологические жидкости и объекты окружающей среды).

Коли-индекс, количественный показатель фекального загрязнения воды или пищевых продуктов. Определяется числом микробов – нормальных обитателей кишечника человека (главным образом кишечной

палочки – *Escherichia coli*) в 1 л или 1 кг субстрата. К.-и. – важный критерий санитарно-гигиенического контроля.

Показатели санитарного состояния почв – комплекс санитарно-химических, -микробиологических, -гельминтологических, -энтомологических характеристик почвы.

Посевная – рабочее помещение, предназначенное для выполнения первого этапа санитарно-микробиологического исследования воды: концентрирования, разведения и/или посева в питательные среды.

Посевная доза – объем конкретного разведения, содержащий необходимое для посева количество жизнеспособных клеток тестового микроорганизма.

Приоритетный компонент загрязнения почвы – вещество или биологический агент, подлежащий контролю в первую очередь.

Разбавитель – жидкость определенного состава, служащая для приготовления серийных разведений исследуемой воды или модельных бактериальных культур.

Санитарное состояние почвы – совокупность физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношении.

Субкультура – культура бактерий, полученная путем пассажа через полноценные питательные среды.

РАЗДЕЛ 6. ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Цель и задачи санитарной микробиологии заключаются во всем, кроме:

- а. ранней и быстрой индикации бактериального загрязнения объектов окружающей среды
- б. проведения мероприятий по снижению и предупреждению инфекционной заболеваемости
- с. использования чувствительных, унифицированных методов исследования для получения достоверных результатов
- д. изучения закономерностей эпидемического процесса разработки методов контроля за эпидемическим состоянием объектов окружающей среды

2. Основными признаками, которым должны отвечать санитарно-показательные микроорганизмы, являются все, кроме:

- а. постоянного выделения в окружающую среду в достаточном количестве из организма человека и теплокровных животных
- б. способности длительно выживать в окружающей среде (дольше патогенных микроорганизмов)
- с. способности к росту на простых средах, типичности свойств
- д. способности к росту на сложных средах и к росту при 200С
- е. ограниченной изменчивости и неспособности размножаться в окружающей среде
- ф. не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и теплокровных животных

3. К колиформным бактериям относят микроорганизмы семейства:

- а. Enterobacteriaceae
- б. Bacillaceae
- с. Vibrionaceae

4. Общими колиформными бактериями (бактериями семейства Enterobacteriaceae) называют:

- а. мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, вырастающие на питательном агаре при 370С за 24 часа

б. грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу до кислоты и газа за 24 часа при 370С

с. грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу до кислоты и газа за 24 часа при 440С

д. грамположительные спорообразующие палочки, мезофильные каталазоотрицательные

5. К бактериям семейства Enterobacteriaceae относят все роды микроорганизмов, кроме:

- a. Escherichia
- b. Klebsiella
- c. Pseudomonas
- d. Citrobacter
- e. Enterobacter
- f. Serratia

6. Типичные лактозоположительные бактерии, образующие альдегид, дают колонии на среде Эндо все, кроме:

- a. темно-красных или красных с металлическим блеском
- b. темно-красных или красных без металлического блеска
- c. выпуклые с красным центром
- d. с красным отпечатком на среде под колонией
- e. розовых без отпечатков на среде

7. Назовите род колиформных бактерий, имеющий наибольшее эпидемиологическое значение:

- a. Escherichia
- b. Klebsiella
- c. Proteus
- d. Citrobacter
- e. Serratia

8. Аутохтонная микрофлора почвы поверхностных водоемов представлена всеми группами микроорганизмов, кроме:

- a. бацилл
- b. кокков

- c. извитых форм
- d. микроскопических водорослей
- e. патогенных энтеробактерий
- f. грибов и актиномицетов

9. Микрофлора почвы, представленная микроорганизмами, живущими и размножающимися в почве, называется:

- a. специфической
- b. аутохтонной
- c. аллохтонной

10. Микрофлора почвы, представленная микроорганизмами, попадающими извне, при загрязнении из различных источников, называется:

- a. специфической
- b. аутохтонной
- c. аллохтонной

11. Санитарно-показательными микроорганизмами почвы являются все, кроме:

- a. общих колиформных бактерий (бактерий семейства Enterobacteriaceae)
- b. термотолерантных колиформных бактерий
- c. коли-фагов
- d. гемолитических стрептококков
- e. энтерококков
- f. стафилококков

12. Краткий санитарно-микробиологический анализ почвы включает:

- a. общее количество бактерий,
- b. *Clostridium perfringens*
- c. бактерии группы кишечной палочки
- d. термофильные бактерии,
- e. нитрифицирующие бактерии
- f. все вышеперечисленное

13. Общее микробное число – это:

- а. количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, содержащихся в 1 мл пробы и вырастающих на питательном агаре при 37 °С за 24 часа
- б. количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, содержащихся в 1 л пробы и вырастающих на питательном агаре при 37 °С за 24 часа
- с. количество общих колиформных бактерий, содержащихся в 1 мл пробы и вырастающих на среде Эндо при 37 °С за 24 часа
- д. количество общих колиформных бактерий, содержащихся в 1 л пробы и вырастающих на среде Эндо при 37 °С за 24 часа

14. Укажите нормативы качества почвы в категории «чистые» по титру нитрифицирующих бактерий.

- а. 0,1 и выше
- б. 0,09-0,001
- с. 0,0009 и ниже

15. В качестве ускоренного метода для обнаружения колиформных бактерий в почве рекомендуется:

- а. прямой посев на пистальную среду
- б. титрационный метод
- с. мембранная фильтрация
- д. микроскопический метод

16. Какие питательные среды используют при определении колиформных бактерий в почве?

- а. Кесслера
- б. сульфит-полимиксин-неомициновая
- с. Китт-Тароцци
- д. лактозо-пептонная среда (ЛПС)
- е. среда Эндо
- ф. полужидкие среды с лактозой

17. При определении колиформных бактерий методом мембранных фильтров первичный посев производят на среду:

- а. Эндо
- б. ГПС
- с. Кесслера

18. При постановке оксидазного теста результат считается положительным, если:

- а. в течение 10–30 с после нанесения реактива появляется фиолетово-коричневое или синее окрашивание
- б. окрашивание не появляется

19. Для определения патогенных микроорганизмов в почве могут быть использованы все методы, кроме:

- а. прямого посева в питательные среды
- б. прямой микроскопии
- с. предварительной концентрации бактерий пропусканием воды через мембранные фильтры или посева в среды накопления
- д. люминесцентно-микроскопического (ИФ), радиоизотопного (РИА)

20. Верно ли утверждение: «Определение токсинов *C. botulinum*, *C. perfringens*, стафилококкового энтеротоксина обязательно производят при санитарно-микробиологическом исследовании почвы»:

- а. да
- б. нет

21. При выделении стафилококков из почвы используют питательные среды:

- а. пластинку МПА
- б. ЖСА (МЖСА)
- с. Гарро, Туржецкого
- д. Эндо, висмут-сульфитный агар
- е. кровяно-теллуриновый агар
- ф. Кит-Тароцци, глюкозо-кровяной

22. Почва как фактор передачи играет основную роль при всех инфекциях, кроме:

- а. столбняка, ботулизма
- б. раневой анаэробной инфекции
- с. лептоспирозов
- д. сибирской язвы, бруцеллеза
- е. сальмонеллез, эшерихиоз, шигеллез
- ф. туберкулеза, стафилококковой инфекции

23. Назовите микроорганизмы, которые попадают в почву с выделениями человека и животных и годами в ней сохраняются:

- a. энтерококки
- b. колиформные бактерии
- c. *B. anthracis*
- d. патогенные энтеробактерии
- e. *C. tetani*
- f. *C. perfringens*

24. Назовите микроорганизмы, для которых почва является природным биотопом:

- a. стафилококки, стрептококки
- b. колиформные бактерии
- c. *C. botulinum*
- d. *C. perfringens*
- e. актиномицеты, плесневые грибы
- f. энтерококки, энтеровирусы

25. Назовите патогенные микроорганизмы, которые попадают в почву с выделениями человека и животных и сохраняются в ней сравнительно недолго. Это все, кроме:

- a. сальмонелл, шигелл
- b. бруцелл
- c. возбудителя туляремии
- d. возбудителя туберкулеза
- e. лептоспир
- f. клостридий ботулизма

26. Какие показатели определяют при санитарном анализе почвы? Это все, кроме:

- a. общего количества сапрофитов
- b. колиформных бактерий
- c. энтерококков
- d. патогенных энтеробактерий
- e. энтеровирусов

27. Назовите заболевание, которое может передаваться через почву:

- a. грипп
- b. менингит
- c. гонорея
- d. герпетическая инфекция
- e. столбняк

28. Наиболее обильно населенный слой почвы на глубине:

- a. 1-5 см.
- b. 10-20 см.
- c. 25-30 см.
- d. Около 50 см.
- e. Более 1 м.

29. Главным резервуаром микроорганизмов во внешней среде является:

- a. Тело человека.
- b. Вода.
- c. Почва.
- d. Воздух.
- e. Теплокровные животные.

30. Санитарно-показательные микроорганизмы почвы:

- a. *Vibrio cholerae*.
- b. *Mycobacterium leprae*.
- c. *Streptococcus pyogenes*.
- d. *Corynebacterium diphtheriae*.
- e. *Clostridium perfringens*.

РАЗДЕЛ 7. ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1d	11d	21b
2d	12f	22f
3a	13a	23cef
4b	14a	24ce
5c	15c	25f
6e	16def	26a
7a	17a	27e
8e	18a	28b
9b	19b	29c
10c	20b	30e

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Закон Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Закон Российской Федерации «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан»
3. ГОСТ 27593-88 (СТ СЭВ 5298-85) «Почвы. Термины и определения».
4. ГОСТ 17.2.2.01-81 (СТ СЭВ 4470-84) «Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния».
5. ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82) «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб».
6. ГОСТ 17.4.3.03-85 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».
7. ГОСТ 17.4.4.02-84 «Охрана природы. Почва. Методы отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа».
8. ГОСТ 17.4.3.06-86 (СТ СЭВ 5101-85) «Охрана природы. Почвы. Общие требования к классификации почв по влиянию на них химических загрязняющих веществ».
9. Методические указания по оценке степени опасности загрязнения почвы химическими веществами. № 4266-87. Утв. МЗ СССР 13.03.87.
10. Оценочные показатели санитарного состояния почв населенных мест. № 1739-77. Утв. МЗ СССР 7.07.77.
11. Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы. М. 1977. Утв. МЗ СССР № 1446-764.08.76.
12. Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы. М. 1981. Утв. МЗ СССР № 2293-8119.02.81.
13. Методические указания по гельминтологическому исследованию объектов внешней среды и санитарным мероприятиям по охране от загрязнения яйцами гельминтов и обезвреживанию от них нечистот, почвы, ягод, овощей, предметов обихода. Утв. МЗ СССР № 1440-76. 1977.
14. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. проф. Д.Г. Звягинцева, М., МГУ, 1980.

15. ГОСТ 26204-84, 26213-84 «Почвы. Методы анализа».

16. Инженерно-экологические изыскания для строительства СП 11-102-97. Издание официальное. Госстрой России. М., 1997, с. 40.

17. Обзор загрязнения окружающей природной среды в Российской Федерации за 1997 год / Минприрода // Зеленый мир. 1998. № 20. Специальный выпуск.

18. СанПиН 2.1.7.1287-03. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы

19. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа

20. Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации № ФЦ/4022-2004

21. СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами»

22. МУК 4.2.577-96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского питания и лечебного, их компонентов»

23. Инструкции по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности, 1987

24. ГОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы». МЗ, 1985

25. Приказ МЗ РФ N 309 «Об утверждении Инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)»

26. XI Государственная фармакопея СССР. 1990. Вып. 2.

Учебное издание

**Сидоренко Марина Леонидовна,
Ким Александра Вячеславовна,
Богатыренко Елена Александровна**

**Санитарно-гигиенический анализ почвы
по микробиологическим показателям**

Учебное пособие

Подписано в печать 07.02.2025 г.
Формат 60×84 / 16. Усл. печ. л. 4,88.
Тираж 300 экз. (1-й завод 1–30). Заказ 431.

Дальневосточный федеральный университет
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

Отпечатано в Дальневосточном федеральном университете
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.
(Типография Издательства ДВФУ,
690091, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10)